

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

Luana Boldori Bernardes

**Influência da esterilização por radiação gama sobre as características físico-químicas e citotoxicidade de microesferas de PLGA incorporadas com sinvastatina**

Florianópolis

2021

Luana Boldori Bernardes

**Influência da esterilização por radiação gama sobre as características físico-químicas e citotoxicidade de microesferas de PLGA incorporadas com sinvastatina**

Trabalho 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.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Coorientador: MSc. Raissa Borges Curtarelli

Florianópolis

2021

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

Boldori Bernardes, Luana

Influência da esterilização por radiação gama sobre as características físico-químicas e citotoxicidade de microesferas de PLGA incorporadas com sinvastatina / Luana Boldori Bernardes ; orientador, Ricardo de Souza Magini, coorientador, Raissa Borges Curtarelli, 2021.

54 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. Reparação óssea. 3. Microesferas de PLGA. 4. Sinvastatina. 5. Radiação gama. I. de Souza Magini, Ricardo. II. Borges Curtarelli, Raissa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

Luana Boldori Bernardes

**Influência da esterilização por radiação gama sobre as características físico-químicas e citotoxicidade de microesferas de PLGA incorporadas com 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 Odontologia.

Florianópolis, 12 de abril de 2021.

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Gláucia Santos Zimmermann  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Orientador  
Instituição UFSC

---

Prof. Dr. Águedo Aragones  
Avaliador  
Instituição UFSC

---

Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé  
Avaliador  
Instituição UFSC

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço imensuravelmente a meus pais *Terezinha e Luiz Antônio* pela possibilidade de cursar em período integral o curso de odontologia. Serei eternamente grata por acreditarem em mim e apoiarem minhas escolhas apesar de todas as dificuldades.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Ricardo Magini*, que possibilitou conhecer a face científica por trás da odontologia. Um exemplo de ser humano inspirador que me ensinou a buscar nada menos do que a excelência. Por ser uma fonte de conhecimento inesgotável. Obrigada pela confiança em mim depositada. Agradeço muito por cada momento em que disponibilizou seu tempo e conhecimento comigo.

À *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ariadne Cabral*, por toda sua dedicação ao ensino e a pesquisa. Pela coordenação desta pesquisa. Por toda disponibilidade e graciosidade.

Ao *Prof. Dr. Águedo Aragones* por estar sempre disposto a auxiliar no desenvolvimento dessa pesquisa e por ser um ser humano tão gentil. Por todo conhecimento transmitido.

À *MSc. Raissa Curtarelli* por todo o apoio e dedicação doados para realização deste trabalho. Agradeço por toda a atenção e paciência. Levo como exemplo sua organização e delicadeza.

A todo apoio dado pelo *Laboratório de Farmacologia da UFSC*. Em especial, a *MSc. Mariana Battisti* e sua orientadora, *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Machado*, que aprimoraram nosso método de síntese das microesferas. Obrigada por não medirem esforços para nos auxiliar. A interdisciplinaridade desse trabalho foi o que mais agregou conhecimento e amizades.

À *MSc. Mariane Sordi* por todo seu conhecimento e simpatia. Apesar de estar cursando seu doutorado em Londres sempre foi muito receptiva e amável.

Ao *Prof. Dr. Cesar Benfatti*, que agregou muito conhecimento com suas correções.

Ao *Prof. Dr. Felipe Daltoé*, por ter aceitado meu convite para esta banca. Por ser um exemplo tanto do lado profissional, quanto humano. Um ser incrível, que me ensinou a não ter medo dos meus sonhos.

À família do *Laboratório de Virologia da UFSC* onde fui muito bem acolhida e da qual tenho saudades.

Aos demais professores do departamento que contribuíram, e muito, com a pessoa e profissional que me tornei.

A todos que de alguma forma auxiliaram nesta pesquisa. Muito obrigada!

## RESUMO

A presente pesquisa objetivou avaliar a influência da radiação gama sobre as características físico-químicas e citotoxicidade sobre microesferas de PLGA incorporadas com sinvastatina (SIN). Para isso, foram sintetizadas microesferas (MPS) de ácido polilático co-glicólico (PLGA), na proporção 82L:18G, com e sem sinvastatina (SIN) a 2% m/m. As MPS foram preparadas através do método de simples emulsão e evaporação do solvente (O/W) sintetizadas em dois grupos: um sem SIN (PLGA) e outro com SIN (PLGA+ 2%SIN). Destes grupos, uma parte foi designada como esterilizado e outro como não esterilizado. A caracterização físico-química das MPS foram avaliadas por: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS); Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Difração de Raios x (DRX); *Image J*. As características biológicas de citotoxicidade foram avaliadas através do teste de MTT em 1 e 7 dias. A partir da mensuração da área média das MPS foi realizada a análise estatística com base no teste t de *student* ( $p < 0,05$ ), para a análise do comportamento biológico foi utilizado o teste ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As micrografias obtidas por MEV mantiveram a morfologia esférica e homogênea, superfície lisa e ausência de porosidades em todos os grupos esterilizados ou não. As MPS tiveram seu tamanho reduzido após a esterilização. A análise da composição química revelou a presença de C e O nas amostras. A natureza amorfa das MPS de PLGA+2%SIN apresentadas pelo DRX demonstrou sua incorporação ao polímero, assim como pela análise do FTIR. Não houve sinais de citotoxicidade celular, pois todas as amostras, esterilizadas ou não, obtiveram viabilidade celular superior a 70%. A esterilização por radiação gama não teve influência relevante sobre as características físico-químicas analisadas nas MPS de PLGA com e sem SIN incorporada.

**Palavras-chave:** Microesferas 1. PLGA 2. Sinvastatina 3. Radiação Gama 4.

## ABSTRACT

The present research aimed to evaluate the influence of gamma radiation on the physicochemical characteristics and cytotoxicity on PLGA microspheres incorporated with simvastatin (SIN). For that, microspheres (MPS) of polylactic co-glycolic acid (PLGA) were synthesized, in the proportion 82L:18G, with and without simvastatin (SIN) at 2% m/m. The MPS were prepared using the Simple Emulsion and Solvent Evaporation (O/W) method, synthesized in two groups: one without SIN (PLGA) and the other with SIN (PLGA + 2%SIN). Of these groups, part was designated as sterile and the other as non-sterile. The physical-chemical characterization of the MPS were evaluated by: Scanning Electron Microscopy (SEM); Energy Dispersive Spectroscopy (EDS); Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR); X-Ray Diffraction (XRD); Image J. The biological characteristics of cytotoxicity were assessed using the MTT test at 1 and 7 days. From the MPS measurement of the average, statistical analysis was performed based on the student's t test ( $p < 0,05$ ), for the analysis of biological behavior the one-way ANOVA test was used followed by Tukey's post-test ( $p < 0,05$ ). The micrographs obtained by SEM kept the spherical and homogeneous morphology, smooth surface and absence of porosity in all groups, sterilized or not. The MPS had their size reduced after sterilization. The analysis of the chemical composition revealed the presence of C and O in the samples. The amorphous nature of the PLGA+2%SIN MPS presented by the XRD demonstrated their incorporation into the polymer, as well as through the FTIR analysis. There were no signs of cell cytotoxicity, as all samples, sterilized or not, obtained cell viability greater than 70%. Gamma radiation sterilization had no relevant influence on the physical-chemical characteristics analyzed in the PLGA MPS with and without incorporated SIN.

Keywords: Microspheres 1. PLGA 2. Simvastatin 3. Gamma Radiation 4.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de distribuição das MPS esterilizadas e não esterilizadas na placa.....	30
Figura 2 – Imagem das MPS de PLGA não esterilizadas e esterilizadas obtidas através de MEV nos respectivos aumentos 50x, 200x, 500x e 1000x.....	33
Figura 3 – Imagem das MPS de PLGA+2%SIN não esterilizadas e esterilizadas obtidas através de MEV nos respectivos aumentos 50x, 200x, 500x e 1000x.....	34
Figura 4 – Área das MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas (preto) e não esterilizadas (cinza).....	35
Figura 5 – Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de MPS de PLGA analisadas em micrografias de 500x. A) Amostras não esterilizadas. B) Amostras esterilizadas.....	36
Figura 6 – Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de MPS de PLGA+2%SIN analisadas em micrografias de 500x. A) Amostras não esterilizadas. B) Amostras esterilizadas.....	36
Figura 7 – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de MPS de PLGA e PLGA+2%SIN não esterilizadas.....	37
Figura 8 – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas.....	38
Figura 9 – Difrátogramas de Raios x das MPS de PLGA das amostras não esterilizadas e esterilizadas.....	39
Figura 10 – Difrátogramas de Raios x das MPS de PLGA+2%SIN das amostras não esterilizadas e esterilizadas.....	39
Figura 11 – Viabilidade de células SHED expostas às MPS de PLGA esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.....	40
Figura 12 – Viabilidade de células SHED expostas às MPS de PLGA+2%SIN esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.....	41
Figura 13 – Viabilidade de células HGF expostas às MPS de PLGA esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.....	41
Figura 14 – Viabilidade de células HGF expostas às MPS de PLGA+2%SIN esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -TCP	Alfa-fosfato tricálcico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas, do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMP-2	Proteína óssea morfogenética 2, do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
$\beta$ -TCP	Beta-fosfato tricálcico
CO <sub>2</sub>	Fórmula molecular do Dióxido de Carbono
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FDA	Administração de alimentos e medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HGF	Fibroblastos gengivais humanos, do inglês <i>Human Gingival Fibroblasts</i>
H <sub>2</sub> O	Fórmula molecular da Água
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina, do inglês <i>Insulin-like growth factor</i>
KBr	Fórmula molecular do brometo de potássio
kGy	kilogray
m/m	Relação massa/massa
m/v	Relação massa/volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MPS	Microesfera, do inglês <i>microsphere</i>
MTT	3-(4,5) dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio

O/W	Emulsão óleo/água, do inglês <i>Oil in Water</i>
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato, do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>
PGA	Poli-ácido glicólico, do inglês <i>Polyglycolic acid</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
PLA	Poli-ácido lático, do inglês <i>Polylactic acid</i>
PVA	Álcool Polivinílico
rhIGF-I	Fator de crescimento I recombinante semelhante à insulina humana, do inglês <i>recombinant human Insulin-like growth factor</i>
SIN/SIM	Sinvastatina, do inglês <i>simvastatin</i>
SHED	Células-tronco da polpa de dentes decíduos, do inglês <i>Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth</i>
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador $\beta$ , do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1	ETIOLOGIA DO DEFEITO ÓSSEO.....	17
2.2	REPARAÇÃO ÓSSEA .....	17
2.3	BIOMATERIAIS.....	18
2.4	PLGA.....	20
2.5	SINVASTATINA .....	22
2.6	ASSOCIAÇÃO PLGA + SIN.....	23
2.7	ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO GAMA .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>27</b>
4.1	MATERIAL UTILIZADO .....	27
4.2	FABRICAÇÃO DAS MICROESFERAS .....	27
4.3	ESTERILIZAÇÃO POR RAIOS GAMA .....	28
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS.....	28
<b>4.4.1</b>	<b>Análise morfológica e mensuração das MPS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Elementos químicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Grupos funcionais.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Orientação da estrutura molecular.....</b>	<b>29</b>
4.5	TESTE DE CITOTOXICIDADE .....	29
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MENSURAÇÃO DAS MPS .....	32
5.2	ELEMENTOS QUÍMICOS.....	35

5.3	GRUPOS FUNCIONAIS .....	37
5.4	ORIENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR.....	38
5.5	TESTE DE CITOTOXICIDADE .....	40
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXO I – ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo compõe uma estrutura complexa e altamente dinâmica do organismo que permanece sob constante remodelação, mantendo um equilíbrio entre formação e reabsorção ósseas (KLINE; ORTON; SADRZADEH, 2017). No tecido ósseo alveolar que compõe o periodonto de suporte, a remodelação óssea fisiológica associada àquela decorrente de possíveis perdas dentais, traumas ou doenças degenerativas maxilomandibulares resultam em prejuízos estético-funcionais, muitas vezes, irreparáveis fisiologicamente (CONSOLARO; FURQUIM, 2011). Por esse motivo, o estudo de biomateriais sintéticos para a reparação óssea tem sido bastante explorado com o objetivo de desenvolver um biomaterial que apresente as três características ideais para a engenharia óssea tecidual – osteogênese, osteocondução e osteoindução (PAIVA; GRANJEIRO, 2017).

Os polímeros têm se mostrado uma excelente opção para essa aplicação devido a sua fácil manipulação e versatilidade, podendo ser aplicado em variados formatos, bem como podem atuar como veículos em sistemas de liberação de fármacos (TIAN; TANG; ZHUANG; CHEN; JING, 2012). O ácido polilático-co-glicólico (PLGA) tem sido bastante utilizado devido a sua biocompatibilidade, seu potencial osteocondutor e sua capacidade de encapsular e de proporcionar a liberação controlada de fármacos (MAKADIA; SIEGEL, 2011; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

O uso local da sinvastatina (SIN), medicamento usualmente aplicado para controle da hipercolesterolemia sistêmica (FATTAH; SAEED; SHEHZADI, 2019), tem sido estudado devido ao seu potencial osteoindutor (ROGERS, 2009; MUKOZAWA; UEKI; MARUKAWA; OKABE; MOROI; NAKAGAWA, 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo*, têm investigado microesferas (MPS) de PLGA incorporando SIN, demonstrando a sua capacidade de liberação controlada e prolongada do fármaco, bem como sua biocompatibilidade, influência na proliferação e diferenciação osteoblástica, representando um promissor biomaterial para reparação óssea (GENTILE; NANDAGIRI; DALY; CHIONO; MATTU; TONDA-TURO; CIARDELLI; RAMTOOLA, 2016; NATH; LINH; SADIASA; LEE, 2013).

Para implantação clínica desse biomaterial, é necessário que o mesmo seja confeccionado em ambiente que elimine ao máximo a possibilidade de contaminação, bem como deve passar por algum processo de esterilização, a fim de prevenir infecções subsequentes as quais, além de expor o paciente ao risco, podem exigir novas intervenções. Além da garantia do nível de esterilidade, o método de esterilização não deve comprometer as características

físico-químicas e funcionais dos biomateriais (MERKLI; HELLER; TABATABAY; GURNY, 1994).

Dentre os métodos de esterilização utilizados hoje, temos: a autoclavação, o óxido de etileno e a irradiação gama (ASPENBERG, 2014; HOLY; CHENG; DAVIES; SHOICHET, 2000). A autoclavação é um método amplamente utilizado devido a sua capacidade de não gerar resíduos tóxicos, no entanto as condições elevadas de temperatura e pressão nas quais opera, contraindicam a utilização desse método para materiais termosensíveis (ATHANASIOU, 1996). O óxido de etileno é comumente indicado para biomateriais sensíveis à temperatura e pressão, entretanto, pode reagir quimicamente com o produto esterilizado, podendo produzir subprodutos tóxicos (ZHAO; ZHU; WANG; LIU; SHEN, 2019). Já os estudos envolvendo PLGA e radiação gama trazem resultados promissores para a esterilização terminal do biomaterial, em que a irradiação não altera as propriedades físico-químicas do polímero (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013). No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura relacionando MPS de PLGA com SIN encapsulada esterilizadas por radiação gama.

Por esta razão este trabalho tem o objetivo de avaliar a interferência do método de esterilização por radiação gama sobre as propriedades físico-químicas e biológicas das MPS de PLGA com e sem SIN.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor compreensão este trabalho foi segmentado na seguinte ordem: iniciando na importância da estética rosa com foco na etiologia dos defeitos ósseos; perpassando pela reparação óssea; evidenciando as soluções com biomateriais incluindo PLGA com SIN e finalizando com a influência da esterilização por raios gama sobre as MPS.

### 2.1 ETIOLOGIA DO DEFEITO ÓSSEO

Algumas situações clínicas imperam por rapidez na cicatrização óssea, como é o caso de defeitos periodontais ou peri-implantares em áreas estéticas. Para compreender essa necessidade, é necessário saber que a harmonia do sorriso vai muito além da forma, cor e textura dos elementos dentais, também depende da arquitetura gengival, a qual, por sua vez, é dependente da saúde e estabilidade do osso subjacente (OBRADOVIC-DJURICIC; KOSTIC; MARTINOVIC, 2005) que representa a principal estrutura de suporte dos dentes (SODEK; MCKEE, 2000).

O processo alveolar está suscetível a uma variedade de fatores que influenciam a sua integridade e funcionamento. A sua origem ocorre junto a erupção dentária, sendo o dente essencial para sua existência. Sendo assim, a perda do elemento dental dá início a um processo de remodelação óssea fisiológica, de forma que aproximadamente 25% do volume ósseo é perdido após o primeiro ano e, dentro de 5 anos, essa perda pode progredir para cerca de 40-60% do volume alveolar (SANZ; VIGNOLETTI, 2015). Por conta disso, a utilização de biomateriais que auxiliem no reparo e, principalmente, na manutenção dimensional, torna-se essencial, tendo como objetivo restaurar a estética e a função dos tecidos lesados (URIST; SILVERMAN; BURING; DUBUC, 1967).

### 2.2 REPARAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo tem um potencial singular de reparação através da osteogênese controlado por fatores locais e sistêmicos, os quais contribuem para a homeostase óssea. Dentre os fatores locais se destacam os fatores de crescimento e as citocinas; já nos sistêmicos estão a calcitonina e o estrogênio (FLORENCIO-SILVA; SASSO; SASSO-CERRI; SIMÕES; CERRI,

2015; ANDIA, 2006). Estes fatores controlam também a remodelação óssea vinculados especialmente aos osteoclastos (ARBOLEYA; CASTAÑEDA, 2014).

As BMPs são glicoproteínas responsáveis pela indução osteogênica derivadas dos TGF- $\beta$  (DIMITRIOU; GIANNOUDIS, 2005). Os TGF- $\beta$  liberados são responsáveis por desencadear a ativação dos osteoblastos para produção de matriz onde houve reabsorção, um mecanismo de *feed-back* (KATCHBURIAN, 2002). Para que ocorra a neoformação óssea, é necessário que as células osteoprogenitoras se proliferem, migrem e diferenciem em osteoblastos, sendo que esse processo é mediado por hormônios, citocinas e fatores de crescimento (SODEK; MCKEE, 2000).

Apesar do tecido ósseo ter um amplo maquinário para neoformação óssea, por vezes pode encontrar limitações, como por exemplo, a grande extensão do dano impedindo que o preenchimento seja realizado de forma espontânea, ou ainda a proliferação de outro tecido no local da lesão. Sendo assim, defeitos de pequena dimensão reparam-se facilmente, dado que o mecanismo reparador é semelhante à osteogênese embrionária, mecanismo que não ocorre em defeitos maiores (SEAL, 2001).

### 2.3 BIOMATERIAIS

Desde 1991, após a Conferência sobre Consenso nas Definições em Biomateriais realizadas em Chester, os biomateriais são definidos como um material designado a se comunicar com o sistema biológico de forma que substitua qualquer tecido, órgão ou função do organismo (WILLIAMS; BLACK; DOTHERTY, 1992).

Para isso, as características ideais de um biomaterial para reparação óssea envolvem a fácil disponibilidade para uso sem comprometer a área doadora, não provocar resposta imunológica do receptor; conter células capazes de produzir matriz óssea (osteogênese); ter a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos através de fatores de crescimento (osteoindução); possibilitar a adesão e migração celular em toda sua extensão, possibilitando assim rápida revascularização e a neoformação óssea (osteocondução) (ARTZI; KOZLOVSKY; NEMCOVSKY; WEINREB, 2005; URIST, 1965; URIST; HUO; BROWNELL; HOHL; BUYSKE; LIETZE; TEMPST; HUNKAPILLER; DELANGE, 1984; BUSER, 2010).

Durante muito tempo, o enxerto autógeno foi considerado padrão ouro devido à ausência de reação imunológica, ausência de risco de contaminação cruzada, além de possuir as três propriedades biológicas ideais para a reparação óssea: osteogênese, osteocondução e osteoindução. No entanto, sua limitada disponibilidade e elevada morbidade por conta da área doadora, bem como sua baixa estabilidade devido à alta taxa de remodelação na região receptora representam limitações do seu uso (PORTER; RUCKH; POPAT, 2009; LANGER; VACANTI, 1993).

Como alternativa às intercorrências dos autógenos surgiram os substitutos de enxertos alógenos ou homogêneos, que são obtidos de seres da mesma espécie do indivíduo receptor, mas geneticamente distinto. Podem ser frescos, criopreservados ou liofilizados, destes os mais utilizados são os liofilizados, os quais podem ser desmineralizados ou não desmineralizados (KAO; SCOTT, 2007). Entretanto, apesar da liofilização, estudos histológicos evidenciaram a possibilidade de transmissão de doenças (PALMER; GIBBONS; ATHANASOU, 1999). Além disso, foi observada a presença de proteínas que podem desencadear uma resposta imunológica a esse tipo de biomaterial (VANDEVORD; NASSER; WOOLEY, 2005).

Outra possibilidade são os substitutos de enxertos xenógenos ou heterógenos, sendo os mais utilizados os derivados do osso bovino. O processamento do substituto de enxerto xenógeno ocorre através de tratamentos mecânicos e químicos por meio de solventes orgânicos para a remoção de células, debris e sangue (CALASANS-MAIA; ASCOLI; NOVELLINO; ROSSI; GRANJEIRO, 2009). Apesar de seguro, a literatura aponta para risco de transmissão da encefalopatia espongiforme, mais conhecida como “doença da vaca louca”. Ghanaati *et al.* (2014) observou a presença de remanescentes orgânicos em biomateriais xenógenos comercializados, dos quais 3 a cada 5 apresentavam substâncias orgânicas remanescentes, sugerindo a possibilidade de reações imunológicas e contaminação cruzada.

Visando sobrepujar as limitações dos substitutos ósseos naturais, vem se desenvolvendo cada vez mais substitutos ósseos sintéticos, ou também chamados aloplásticos. Dentre eles as cerâmicas, os vidros bioativos e os polímeros se destacam.

Em função dessas características, os polímeros foram a escolha para essa pesquisa visando a reparação de defeitos ósseos, pois são facilmente manipulados e adaptados para exercer uma gama de propriedades funcionais reproduzindo diferentes tamanhos, formas e propriedades mecânicas (TIAN; TANG; ZHUANG; CHEN; JING, 2012).

A utilização inicial dos biomateriais visava que fossem bioinertes, com o avanço tecnológico espera-se hoje, que os biomateriais sejam biocompatíveis, bioativos,

biodegradáveis e biomiméticos objetivando a reparação tecidual estrutural e funcional (RATNER; HOFFMAN; SCHOEN; LEMONS, 2013). A bioatividade dos substitutos ósseos é notada quando uma camada de hidroxiapatita se forma entre o biomaterial e o tecido vivo ligando-se quimicamente ao tecido ósseo (KOKUBO, 2008).

Além das características supracitadas os biomateriais sintéticos devem: promover adesão celular estimulando a osteogênese; atuar como guia para o crescimento ósseo possuindo poros que permitam a migração de células, do suprimento nutricional vascular; possuir taxa de degradação controlável para que possa ser substituído pelo osso nativo gradualmente; evidenciar propriedades mecânicas compatíveis com o tecido a ser substituído; apresentar um processo de fabricação reprodutível e viável financeiramente; e ser esterilizável visando o uso clínico (PLACE; EVANS; STEVENS, 2009).

#### 2.4 PLGA

Na área da Engenharia Tecidual, os polímeros sintéticos mais utilizados são os biodegradáveis em especial o PLGA, pois após sua degradação seus monômeros são removidos completamente por vias naturais (GUNATILLAKE, 2003; REZWAN; CHEN; BLAKER; BOCCACCINI, 2006).

O PLGA é um copolímero formado por monômeros de ácido láctico (PLA) e glicólico (PGA), que pode ter diferentes formas dependendo da razão entre seus monômeros. Essas diferentes concentrações resultam em diferentes propriedades do PLGA, pois o ácido láctico é mais hidrofóbico que o ácido glicólico, subsequentemente absorve menos água corroborando para uma taxa de degradação mais lenta quando encontra-se em maior quantidade que o glicólico (LANAO et al., 2013). Sendo assim, as propriedades de biodegradação podem ser ajustadas conforme a quantidade de ácido láctico/glicólico variando de semanas a meses (GENTILE; CHIONO; CARMAGNOLA; HATTON, 2014).

Em prol do controle na taxa de degradação, sua biocompatibilidade, biodegradabilidade o PLGA se tornou um dispositivo de administração controlada de medicamentos/substâncias ativas aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Devido à degradação por hidrólise do PLGA inúmeras propriedades antes invariáveis tornam-se mutáveis como a temperatura de transição vítrea (Tg), teor de umidade, peso

molecular. A variação dessas propriedades influencia diretamente na biodegradação do polímero e conseqüentemente na liberação do fármaco. Dentre outros fatores que influenciam a taxa de degradação está o pH (potencial hidrogeniônico) e a osmolaridade, sendo que a alcalinização do meio acelera a degradação do PLGA (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006). Um estudo realizado por Siegel *et al.* (2006), evidencia que o tipo de medicamento utilizado desempenha papel importante na taxa de liberação ratificando que a biodistribuição e a farmacocinética do PLGA seguem um perfil não linear e dependente da dose do fármaco.

Outra propriedade importante do PLGA é o grau de cristalinidade dependente da razão molar de seus monômeros, visto que o PGA é cristalino e quando copolimerizado com o PLA reduz seu grau de cristalinidade conseqüentemente aumenta a taxa de hidratação e hidrólise (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

A literatura relata que a Tg do PLGA está acima da temperatura fisiológica de 37°C, exibindo assim natureza vítrea com estrutura de cadeia rígida. Podendo variar sendo diretamente proporcional ao conteúdo lactídeo e ao peso molecular. Ainda é relatado que a água residual presente nas amostras reduz a Tg (PASSERINI; CRAIG, 2001).

A degradação do PLGA ocorre em quatro etapas através da hidrólise de suas ligações éster (ENGINEER; PARIKH; RAVAL, 2011) conseqüentemente esses subprodutos entram na via de eliminação metabólica, dado que o ácido láctico encaminha-se para o ciclo dos ácidos tricarbóxicos sendo metabolizado e eliminado na forma de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, enquanto que o ácido glicólico tem a opção de ir para o mesmo ciclo ou ser excretado diretamente na urina (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Após o biomaterial ser colocado no defeito ósseo sua estrutura servirá de matriz sustentando os novos vasos sanguíneos. Dentro desse arcabouço também ocorre o recrutamento de células com potencial osteogênico, fenômeno denominado de osteocondução (DAVIES; MATTA; MENDES; CARVALHO, 2010). O PLGA possui essa propriedade, no entanto um biomaterial ideal deve promover concomitantemente a indução de células corroborando para a diferenciação e proliferação celular, fenômeno descrito como osteoindução. Conquanto, o PLGA não possui essa propriedade (GUÉHENNEC *et al.*, 2004).

Tendo em vista essa limitação e a capacidade do PLGA em transportar fármacos, este vem sendo estudado como dispositivo para administração controlada de medicamentos em que se associam a fármacos osteoindutores visando a neoformação óssea. Dentre os fármacos que apresentam essa característica se destacam as estatinas (MUKOZAWA; UEKI; MARUKAWA; OKABE; MOROI; NAKAGAWA, 2011).

## 2.5 SINVASTATINA

A aplicação das estatinas no tecido ósseo foi demonstrada pela primeira vez por MUNDY *et al*, 1999. Ainda não há um consenso na literatura sobre o metabolismo da SIN sobre o processo de reparação óssea, no entanto sabe-se que é possível: o aumento da expressão de BMP-2 com a inibição do mevalonato (ROGERS, 2009); o aumento da expressão de osteopontina sugerindo ligação da SIN com potencial diferenciação e crescimento de osteoblastos (GRIFFITHS; CARTMELL, 2008); a indução da osteogênese (WONG; RABIE, 2003); o aumento na expressão do fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) e angiogênese (MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003); aumento da mineralização da fosfatase alcalina, da expressão de sialoproteínas ósseas, osteocalcina e colágeno tipo I, além de ter efeito anti-inflamatório ao diminuir a produção de interleucina-6 e interleucina-8 (SAKODA; YAMAMOTO; NEGISHI; LIAO; NODE; IZUMI, 2006).

Incontestavelmente a literatura afirma que a aplicação direta de fatores de crescimento incluindo a BMP-2 em defeitos ósseos estimula o crescimento ósseo. Essa descoberta foi atribuída a Urist (1965), quando implantou fragmentos de ossos desmineralizados em ratos e coelhos. Posteriormente ocorreu a formação óssea ectópica. Essa proteína mais tarde foi denominada autoindutora. No entanto é uma opção de alto custo inviabilizando seu custo-benefício (COCHRAN; SCHENK; BUSER; WOZNEY; JONES, 1999). Em prol disso, as estatinas vêm sendo estudadas, pois possuem um custo reduzido e grande influência sobre os fatores de crescimento.

Estudos demonstram que os efeitos pleiotrópicos da SIN, com foco na reparação óssea, ocorrem tanto quando a SIN é aplicada sistemicamente quanto localmente, no entanto o uso sistêmico não produziu resultados adequados, pois possui metabolização hepática, sendo necessário um aumento na dose e inevitáveis complicações com os efeitos colaterais do fármaco como: problemas no fígado, doenças renais e danos aos tecidos musculares (GUTIERREZ; LALKA; GARRETT; ROSSINI; MUNDY, 2006). Com isso, observa-se que baixas doses sistêmicas são ineficazes, enquanto que altas doses prejudicam o organismo (SONDERGAARD; PEDERSEN; ANDERSEN; SOE; LUND; OSTERGAARD; GARNERO; DELAISSE; PLESNER, 2009).

Em uma revisão sistemática de literatura realizada por Montero, Manzano e Albaladejo (2014), após a observação de 41 trabalhos relacionando SIN com reparação óssea concluíram que a SIN parece estimular significativamente a formação óssea e reparação periodontal.

Em uma revisão de literatura elaborada por Sousa *et al.* (2017), foram listados 32 artigos relacionando diferentes carreadores a diversas concentrações de SIN dentre eles: esponja de colágeno, membrana de colágeno,  $\alpha$ -TCP (alfa tricálcio-fosfato),  $\beta$ -TCP (beta tricálcio-fosfato), hidroxiapatita, osso bovino inorgânico, sulfato de cálcio, hidrogel, gel de metilcelulose, superfície de implantes de titânio e PLGA. Constatou-se que, o meio de liberação adequado e a concentração do fármaco são essenciais para o sucesso. Sendo que, baixas doses de SIN não provocam estímulos no defeito, enquanto que altas doses são tóxicas, exacerbando o processo inflamatório e atrasando o reparo (FANG; ZHAO; HE; LIU; YANG, 2015). Ainda, a SIN é dose/carreador dependente, sendo que para cada carreador existe uma concentração adequada de fármaco para se obter a neoformação óssea (SOUSA; FERREIRA; SOUZA; STEFANI; RORIZ, 2017).

## 2.6 ASSOCIAÇÃO PLGA + SIN

Para que ocorra a reparação óssea é necessário estabelecer uma concentração adequada de sinvastatina que não seja citotóxica. Em um estudo envolvendo PLGA+SIN a 0,03% os resultados concluíram que as MPS não foram citotóxicas a fibroblastos e osteoblastos (SUMAR; MAGINI, 2018). Entretanto em outro estudo, utilizando PLGA+HA/ $\beta$ TCP com SIN a 5% os arcabouços foram citotóxicos (SORDI; MAGINI; CORDEIRO, 2017).

Diversos estudos comprovam a efetividade na reparação óssea da associação entre PLGA e SIN. Sendo que os melhores resultados vêm da utilização do PLGA com a morfologia de MPS ao invés de nanoesferas. Em um estudo desenvolvido por Mendes Junior, Domingues, Hausen, Cattani, Aragones, Oliveira, Inácio, Barbo e Duek (2017), MPS de PLGA com e sem SIN a 2% foram avaliadas e observou-se que no grupo sem SIN a neoformação óssea se originou das bordas do defeito ósseo, já as que continham SIN a neoformação observada foi independente das bordas, indicativo de osteoindução. Ainda nesta amostra foi observado a presença de células osteoprogenitoras sugerindo a manutenção do crescimento ósseo.

A literatura traz indícios de que a concentração de SIN associada a MPS de PLGA adequada para a neoformação óssea seja próxima a 2% (FERREIRA; BRADASCHIA-CORREA; MOREIRA; MARQUES; ARANA-CHAVEZ, 2014; MACIEL-OLIVEIRA;

BRADASCHIA-CORREA; ARANA-CHAVEZ, 2011; MENDES JUNIOR; DOMINGUES; HAUSEN; CATTANI; ARAGONES; OLIVEIRA; INÁCIO; BARBO; DUEK, 2017).

## 2.7 ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO GAMA

Para que o biomaterial possa ser utilizado *in vivo* um requisito prévio é sua esterilização. Com isso o método de esterilização adequado implica na inativação dos microrganismos seja pela sua total destruição, seja pela inviabilização de sua forma reprodutiva (MOURA; WADA; PURCHIO; ALMEIDA, 1987). Inúmeros métodos de esterilização podem ser usados para se obter o nível de esterilidade adequado, no entanto o PLGA é altamente sensível a altas temperaturas e a umidade restringindo as opções (MERKLI; HELLER; TABATABAY; GURNY, 1994). Um estudo recente utilizando óxido de etileno para esterilização de MPS de PLGA com SIN demonstrou que as características físicas das MPS se mantiveram, enquanto que pequenas alterações químicas foram observadas nas MPS, mas com potencial para uso clínico (BERTOTTO; MAGINI; CURTARELLI, 2020).

A radiação gama pertence ao grupo das radiações ionizantes, ou seja, por meio de uma colisão entre a radiação emitida da fonte e os elétrons das amostras a serem esterilizadas há a perda desses elétrons formando íons. Em um ambiente estruturalmente preparado as amostras são expostas as ondas eletromagnéticas geradas a partir de uma fonte de Cobalto 60 ou Césio 137 (SOUNDY, 1990). A radiação gama atua nos microrganismos rompendo a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) por meio da ação direta ou através de espécies reativas geradas nos fluidos das células, causada pela radiólise da água decorrente da ação indireta (ONEILL, 1987).

Hodiernamente o processo de esterilização por radiação gama é considerada um dos processos tecnológicos mais eficientes para a redução de microrganismos em alimentos consequentemente prolongando sua vida útil. Além de ser considerado um processo seguro, pois não oferece riscos ao consumidor, também não gera nenhum tipo de resíduo ao meio ambiente (PASSOS; MENDES, 2017).

Cada material deve ter sua dose mínima de radiação para assegurar a esterilidade, sendo esta, medida em kGy (KOWALSKI; HERRING; BARYSCHPOLEC; REGER; PATEL; FEENEY; TALLENTIRE, 2002).

Polímeros submetidos a radiação gama podem apresentar alterações nas suas propriedades físico-químicas devido à dose da irradiação, à temperatura durante o processo e a natureza do medicamento ou agente ativo encapsulado (BITTNER; MÄDER; KROLL; BORCHERT; KISSEL, 1999). Para isso a análise das propriedades físico-químicas dos materiais irradiados é necessária.

Em decorrência da radiação o efeito mais citado nos artigos foi a alteração na cinética de liberação do fármaco. A partir de uma fonte de cobalto com dose crescente de radiação (5, 15 e 25 kGy) notou-se que quanto maior a dose de radiação, mais rápida era a liberação do fármaco (KELES; NAYLOR; CLEGG; SAMMON, 2014; CARRASCOSA; ESPEJO; TORRADO; TORRADO, 2003; CALIS; BOZDAG; KAS; TUNÇAY; HINCAL, 2002).

O peso molecular das MPS também é uma das características que pode ser afetada. Ele depende não somente da taxa e tempo da radiação, mas também da substância ativa que o polímero carrega incluindo sua interação fármaco-polímero (LIN; CHEN; TENG; LI, 2000). A avaliação de Montanari *et al*, 1998 sobre MPS de PLGA demonstrou uma tendência decrescente no peso molecular após irradiação, sendo que o decaimento era insignificante para doses inferiores a 15 kGy.

A presença de radicais livres é relatada com frequência sendo decorrente da radiólise da água tanto do polímero quanto do fármaco. Esses radicais são altamente reativos podendo ocasionar alterações nas propriedades físico-químicas do biomaterial, sendo que presença desses radicais pode ser avaliada pelo teste de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) (MONTANARI; COSTANTINI; SIGNORETTI; VALVO; SANTUCCI; BARTOLOMEI; FATTIBENE; ONORI; FAUCITANO; CONTI, 1998).

Para que o método de esterilização via radiação gama seja indicado é necessário que não haja interferências destrutivas nas propriedades físico-químicas do biomaterial. Sabendo que a interação fármaco-polímero é essencial para determinar essas alterações e tendo em vista a escassez de trabalhos na literatura. Este trabalho visa avaliar se há interferência do método de esterilização por radiação gama sobre as propriedades físico-químicas das MPS de PLGA com e sem SIN, bem como avaliar a citotoxicidade destas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a interferência do método de esterilização por radiação gama sobre as características físico-químicas de MPS com e sem SIN encapsulada, assim como a viabilidade celular.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfologia e o tamanho das MPS através da MEV comparando o grupo esterilizado e não esterilizado;
- Avaliar a estrutura química das MPS através do FT-IR;
- Avaliar a composição química das MPS através do DRX;
- Quantificar os elementos químicos das MPS através do EDS;
- Avaliar a citotoxicidade das MPS em linhagens de fibroblastos gengivais humanos (HGF) em 1 e 7 dias;
- Avaliar a citotoxicidade das MPS em linhagens de células tronco procedentes da polpa de dente decíduo (SHED) em 1 e 7 dias.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 MATERIAL UTILIZADO

O Copolímero Ácido polilático-co-glicólico (PLGA) Resomer LG 824S (82L:18G) fabricado pela Evonik Boehringer Ind. Pharma, Alemanha. Sinvastatina obtida da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Álcool Polivinílico (PVA) foi adquirido da Neon Comercial Ltda, Brasil. Diclorometano Emsure® p.a. obtido da Merck KgaA, Alemanha.

### 4.2 FABRICAÇÃO DAS MICROESFERAS

As MPS foram preparadas no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (LVA, UFSC) através do método de simples emulsão de óleo em água (O/W) seguida da evaporação do solvente em cabine de fluxo laminar para reduzir os riscos de contaminação. Primeiramente, o emulsificante foi preparado por meio da diluição de 20g de PVA em 2L de água ultrapurificada (Milli-Q) à 70°C sob agitação constante, resultando em uma concentração de 1% (m/v).

Em seguida, foram preparados dois béqueres com 40mL de diclorometano cada um sob agitação constante à 21°C. Foram adicionados aos béqueres 1g e 0,98g de PLGA, respectivamente, obtendo uma concentração de 2,5% (m/v). Após a completa dissolução do polímero foi adicionado, ao segundo béquer, 0,02g de SIN resultando em uma concentração de 2% (m/m) de proporção entre fármaco e polímero.

Posteriormente, foram reservados dois béqueres com 800mL de PVA cada um. As soluções de PLGA e de PLGA+2% SIN foram gotejadas separadamente nas soluções de PVA, sob constante agitação e temperatura de aproximadamente 21°C. Com o objetivo de promover a total evaporação do solvente, as soluções foram mantidas sob agitação constante durante uma noite. Após esse período, os béqueres foram deixados em repouso para que ocorresse a decantação das MPS. Em seguida, o PVA acima das MPS foi eliminado com auxílio de bomba à vácuo. As MPS foram lavadas com a adição de 800mL de água Milli-Q sob agitação por 10 minutos (min) seguido de decantação por 30 min. Esse procedimento foi repetido por três vezes para eliminar qualquer resíduo de PVA.

Decorrido o tempo da lavagem, os agitadores magnéticos foram desligados, a fim de que as MPS decantassem. A água ultrapurificada foi retirada deixando apenas uma fina lâmina

de água que recobria as MPS, essas foram depositadas em placas de petri devidamente identificadas. Por fim, após a evaporação de toda a água, as MPS foram coletadas e armazenadas em *ependorfs* identificados e contendo 10mg cada um nos seguintes grupos:

- PLGA não esterilizado
- PLGA+2%SIN não esterilizado
- PLGA esterilizado
- PLGA+2%SIN esterilizado

### 4.3 ESTERILIZAÇÃO POR RAIOS GAMA

As amostras foram irradiadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER IPEN/CNEN – USP, SP) através de uma fonte de cobalto 60. Estas foram submetidas a uma dose de 18kGy, a uma taxa de 2kGy/h.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS

#### 4.4.1 Análise morfológica e mensuração das MPS

A morfologia das MPS foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), na qual as MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas ou não foram depositadas sobre fita dupla face de carbono acima de *stubs* e, assim, levadas para recobrimento com ouro. Depois de recobertas, as amostras foram analisadas pelo microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (JEOL JSM-6390 LV Scanning Electron Microscope, Massachusetts, USA) operando a 10kV. Foram aplicados os aumentos de 50x, 200x, 500x e 1000x. A mensuração da área média ( $\mu\text{m}^2$ ) das MPS foi realizada utilizando o *software Image J* (NIH Image, *National Institute of Health Image*). Para isso, 3 micrografias com aumento de 500x de cada grupo, obtidas por MEV, foram analisadas e a área de cada MPS presente na micrografia foi aferida e registrada para o cálculo da área média por grupo.

#### 4.4.2 Elementos químicos

A identificação dos elementos químicos presentes na amostra foi realizado através da espectroscopia por energia dispersiva (EDS), este dispositivo encontra-se adaptado ao MEV

(JEOL JSM-6390 LV Scanning Electron Microscope, Massachusetts, USA). Para a análise foi utilizado as micrografias com aumento de 500x obtidas por MEV.

#### 4.4.3 Grupos funcionais

Para análise da estrutura química foi utilizado a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta análise foi feita a partir de um feixe de luz infravermelho (Agilent, modelo Cary 660, Melbourne, Austrália), que é absorvido de forma diferente pelos diversos grupos funcionais da molécula. Para isso, são associadas com KBr (brometo de potássio) e confeccionadas na forma de pastilhas. Para cada amostra foi realizada uma média de 32 varreduras dentro de um intervalo de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ . Dessa forma, um padrão de bandas espectrais é formado, resultando em um padrão único para cada estrutura molecular.

#### 4.4.4 Orientação da estrutura molecular

A análise da orientação da estrutura molecular foi realizada por meio da difração de raios X (DRX). A partir da incidência da radiação sobre as amostras e a detecção dos fótons difratados, ocorre a caracterização das estruturas cristalinas presentes nas amostras, permitindo identificar as diferentes fases presentes no material. Para isso, foi utilizado o difratômetro de raios x (MiniFlex600, Rigaku, Texas, USA) equipado com detector D/teX Ultra e uma fonte de cobre, operando a uma tensão de 40kV, corrente de 15mA. As MPS de PLGA e PLGA+2%SIN, esterilizadas ou não, foram analisadas num intervalo de 5 a 90°C com *step-size* de 0,05°C e velocidade de 10°C/min.

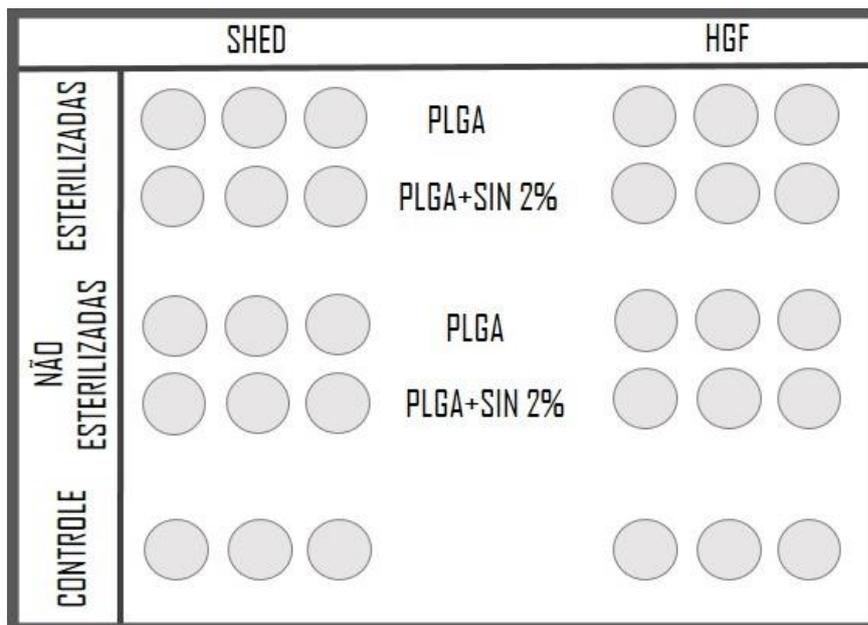
#### 4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das MPS com e sem SIN foi avaliada através do teste colorimétrico de 3-(4,5) dimetilialzólil -2,5 difeniltetrazólio (MTT, Promega). Este teste colorimétrico é possível devido a ação de desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente viáveis, que clivam o anel de tetrazólio e transforma o composto de uma coloração amarela a um composto de coloração azul escuro. Assim, a mudança na coloração reflete o estado funcional da cadeia respiratória corroborando a viabilidade celular.

As células utilizadas para o teste foram fibroblastos gengivais humanos (HGF) e células-tronco procedentes da polpa de dente decíduo (SHED). Os períodos experimentais foram de 1 e 7 dias. As células foram expandidas até atingirem número suficiente para utilização, sendo cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 11885-084 Gibco, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, 12657-029 Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em estufa a 37°C e suprimento de 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao atingirem passagem entre 6-8, as células alcançaram número suficiente para aplicação no experimento e foram semeadas em triplicata a uma densidade celular de 2,0 x 10<sup>4</sup> células por cavidade, em placas de 96 cavidades. Sobre as células semeadas, foi adicionado meio de cultura para um total de 180µL, e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h, as MPS foram adicionadas seguindo o esquema a seguir (Figura 1). Dois grupos, um de SHED e outro de HGF, foram mantidos sem a adição de amostras para controle celular.

Figura 1 – Esquema de distribuição das MPS esterilizadas e não esterilizadas na placa.



Após cada período experimental, as células foram lavadas 2 vezes com 100µL de tampão fosfato salino (PBS, Gibco, Massachusetts, EUA). Após a retirada do sobrenadante foi acrescido 180µL do meio de cultura DMEN com 10% de soro fetal bovino, sobre o qual foi adicionado 45µL de MTT ao abrigo da luz. As placas permaneceram na estufa para incubação por 4h. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado 100µL de dimetilsulfóxido

(DMSO, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, BRA) em cada cavidade. As placas foram levadas ao agitador orbital (Shaker) durante 5min a 98rpm. O sobrenadante de cada cavidade foi realocado em uma nova placa para análise de absorbância através do espectrofotômetro (Infinite M200, TECAN, Áustria GmbH, Grödig, Áustria), a um comprimento de onda de 570nm.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do *software* Graph Pad Inc. (La Jolla, Califórnia, EUA). Foi aplicado teste t de *student* ( $p < 0,05$ ) para análise dos dados de mensuração das MPS em dois momentos: (1) comparando os grupos PLGA e PLGA+2% SIN dentro do mesmo método de esterilização e (2) comparando os diferentes métodos de esterilização para o mesmo grupo PLGA ou PLGA+2% SIN. O teste ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) foi aplicado para análise dos resultados referentes a citotoxicidade comparando os grupos controle, PLGA e PLGA+2% SIN entre si em cada tempo experimental individualmente.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MENSURAÇÃO DAS MPS**

Pela análise das micrografias da MEV é possível observar que as MPS do grupo PLGA (Figura 2) e do grupo PLGA+2%SIN (Figura 3) mantiveram a morfologia esférica e homogênea, superfície lisa e ausência de porosidades mesmo após esterilização por radiação gama.

Figura 2 – Imagem das MPS de PLGA não esterilizadas e esterilizadas obtidas através de MEV nos respectivos aumentos 50x, 200x, 500x e 1000x.

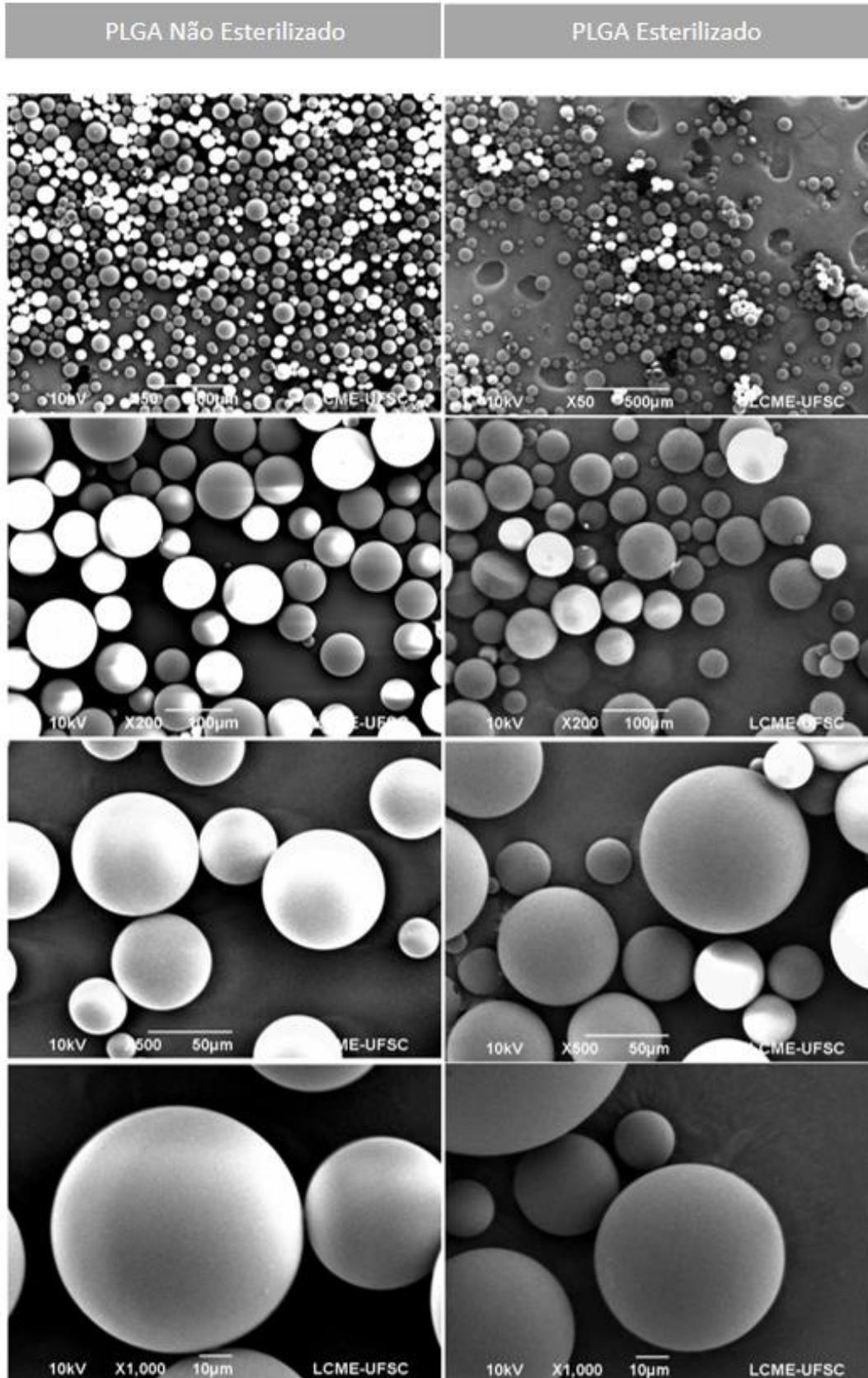
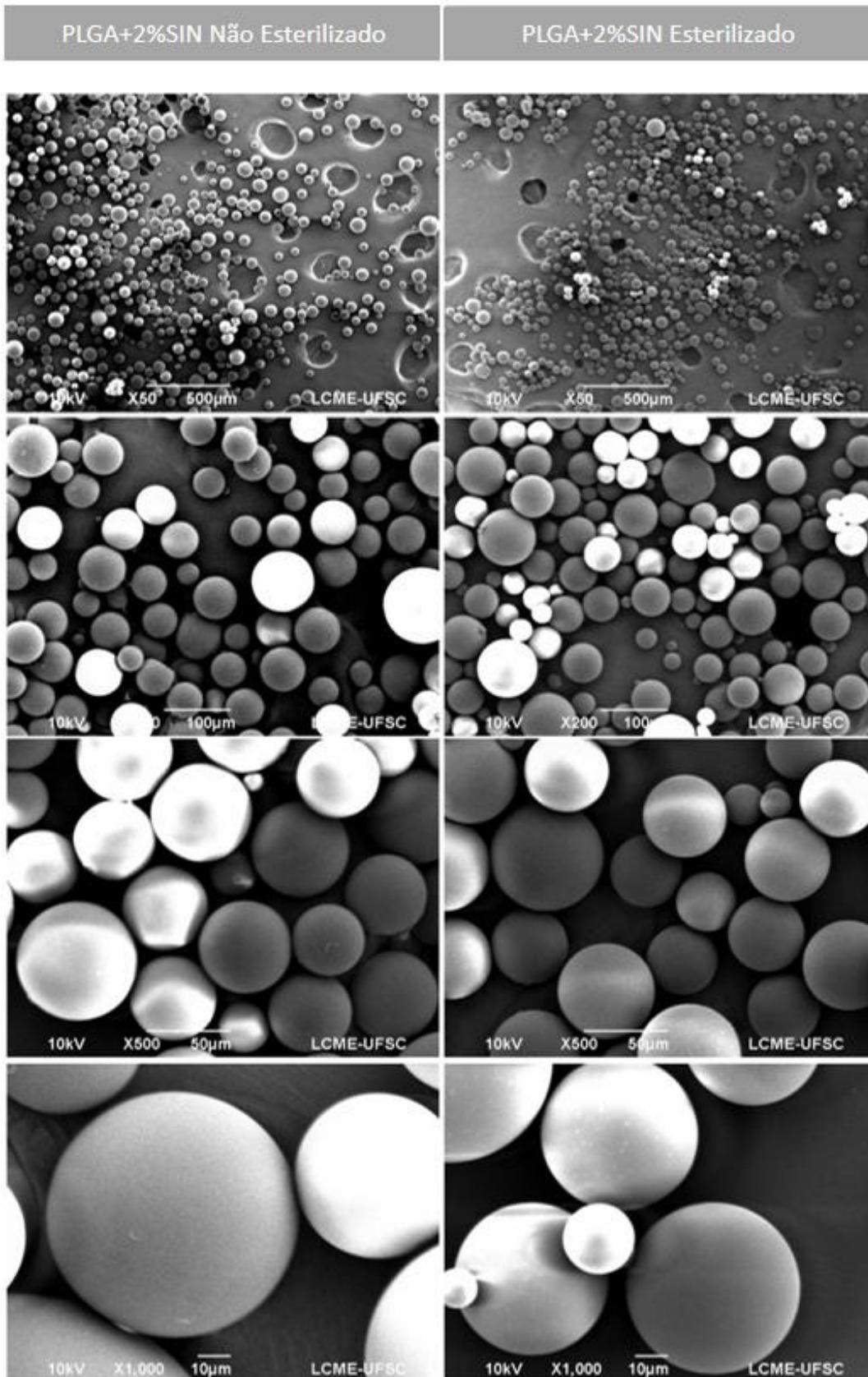
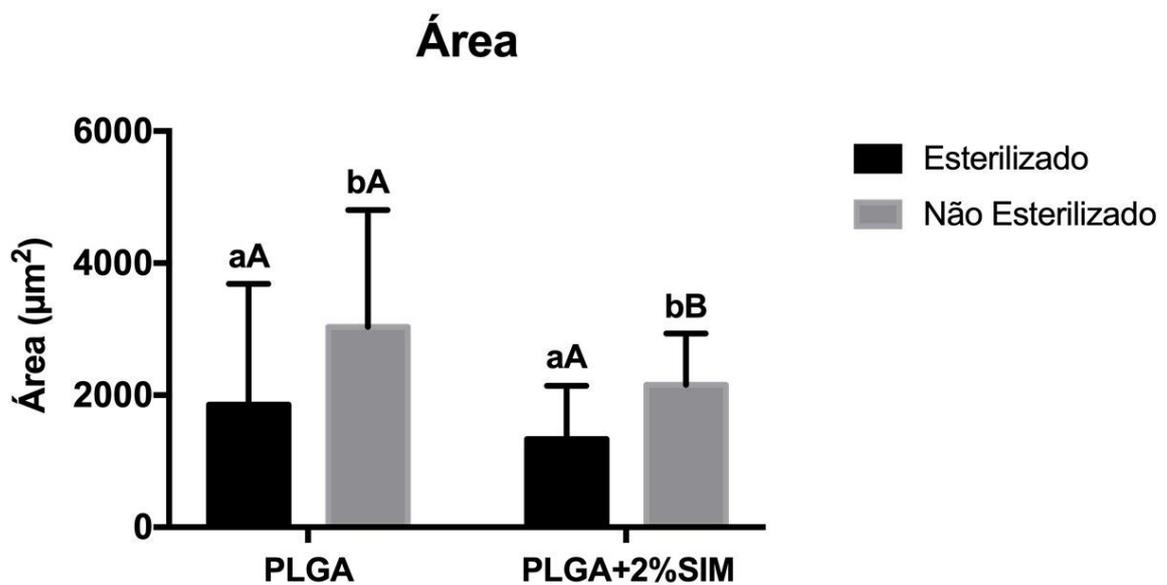


Figura 3 – Imagem das MPS de PLGA+2%SIN não esterilizadas e esterilizadas obtidas através de MEV nos respectivos aumentos 50x, 200x, 500x e 1000x.



A partir da mensuração (Figura 4) é possível inferir que há diferença estatística entre os grupos esterilizados e não esterilizados do grupo PLGA+2%SIN, sendo que os esterilizados possuem menor área que os não esterilizados.

Figura 4 – Área das MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas (preto) e não esterilizadas (cinza). Mensuração, obtida pelo *software Image J*, da área média ( $\mu\text{m}^2$ ) das MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas e não esterilizadas. A diferença estatística significativa entre os diferentes métodos de esterilização do mesmo grupo PLGA ou PLGA+2%SIN se dá por diferentes letras maiúsculas. Já entre os mesmos métodos de esterilização, por letras minúsculas.



## 5.2 ELEMENTOS QUÍMICOS

A análise realizada pelo EDS das amostras de PLGA (Figura 5) e PLGA+2%SIN (Figura 6) esterilizadas e não esterilizadas revelou a presença predominante do elemento carbono (C) e oxigênio (O) em todas as amostras.

Figura 5 – Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de MPS de PLGA analisadas em micrografias de 500x. A) Amostras não esterilizadas. B) Amostras esterilizadas.

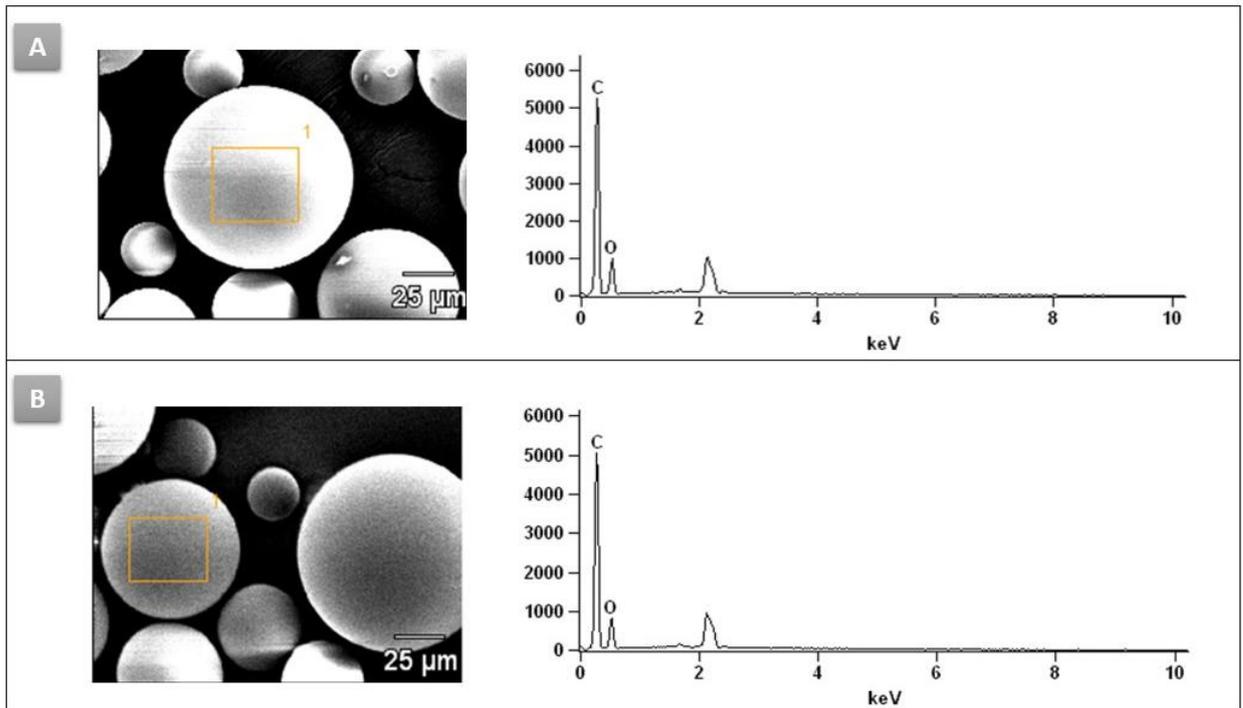
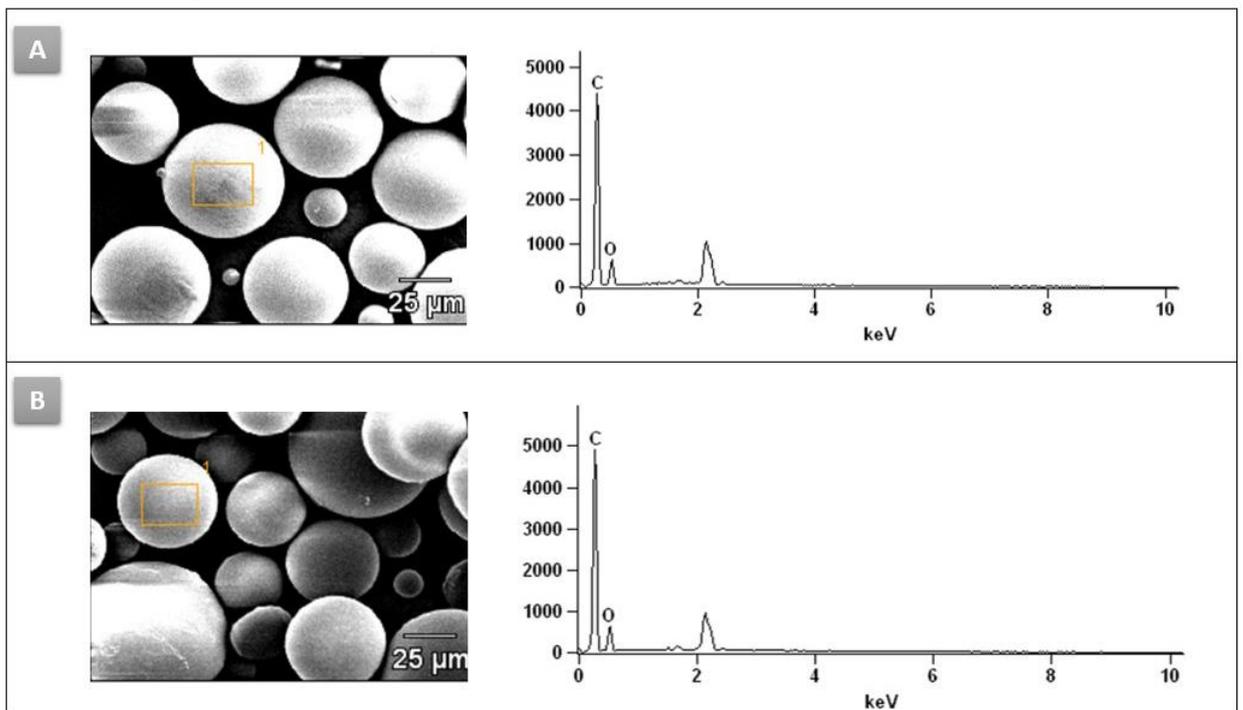


Figura 6 – Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de MPS de PLGA+2%SIN analisadas em micrografias de 500x. A) Amostras não esterilizadas. B) Amostras esterilizadas.



### 5.3 GRUPOS FUNCIONAIS

Com base no espectro de absorção das amostras de PLGA (em preto) e PLGA+2% SIN (em vermelho) no grupo não esterilizado (Figura 7) e no grupo esterilizado (Figura 8) é possível observar que nos dois espectros os picos de vibrações que caracterizam o PLGA estão presentes sendo eles: de alongamento assimétrico do CH, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> (3000-2700 cm<sup>-1</sup>); de estiramento das ligações de C=O (1760-1750 cm<sup>-1</sup>) e estiramento das ligações C-O (1134 cm<sup>-1</sup>). Ainda é possível observar bandas entre 350-1500cm<sup>-1</sup> caracterizando o grupamento éster (C-O) e hidrocarbonetos (CH<sub>2</sub> e CH). Os espectros do PLGA e PLGA+2%SIN comparados a suas respectivas amostras irradiadas se mostraram muito semelhantes, o que confirma que não foram criadas novas ligações ou moléculas mantendo as características de cada composto.

Figura 7 – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de MPS de PLGA e PLGA+2% SIN não esterilizadas.

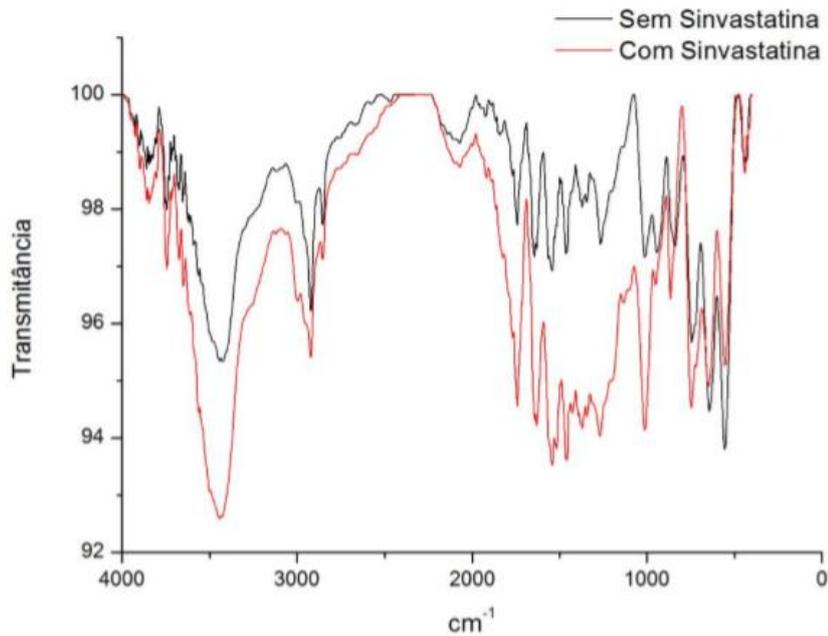
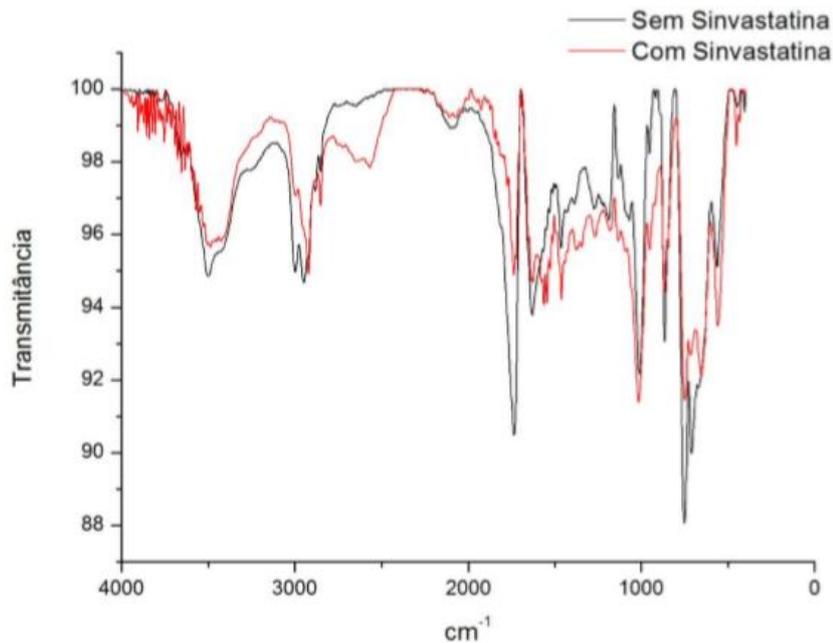


Figura 8 – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas.



#### 5.4 ORIENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR

A partir dos difratogramas obtidos foi possível observar que tanto as amostras de PLGA (Figura 9) e PLGA+2%SIN (Figura 10) esterilizadas e não esterilizadas caracterizam-se pela fase amorfa, ou seja, seus átomos estão desordenados no espaço em que ocupam. É importante notar que a SIN tem característica cristalina, entretanto o difratograma das amostras de PLGA+2%SIN (Figura 10) apresenta forma amorfa, o que segundo Corti *et al.*, (2007) demonstra sua possível incorporação ao polímero.

Figura 9 – Difratoformas de Raios x das MPS de PLGA das amostras não esterilizadas e esterilizadas.

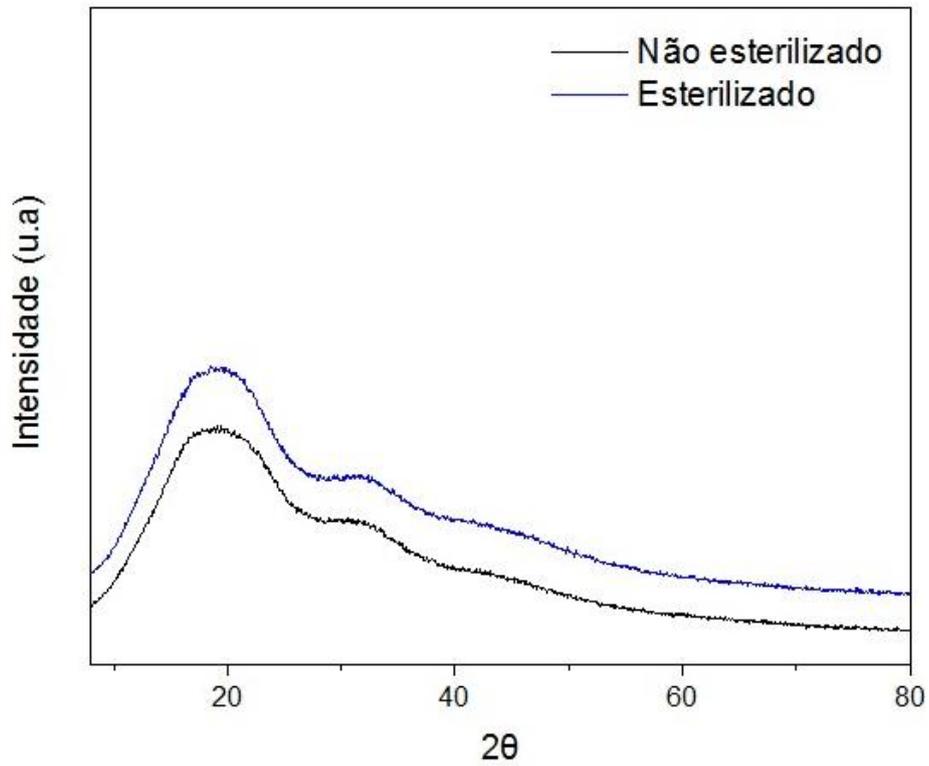
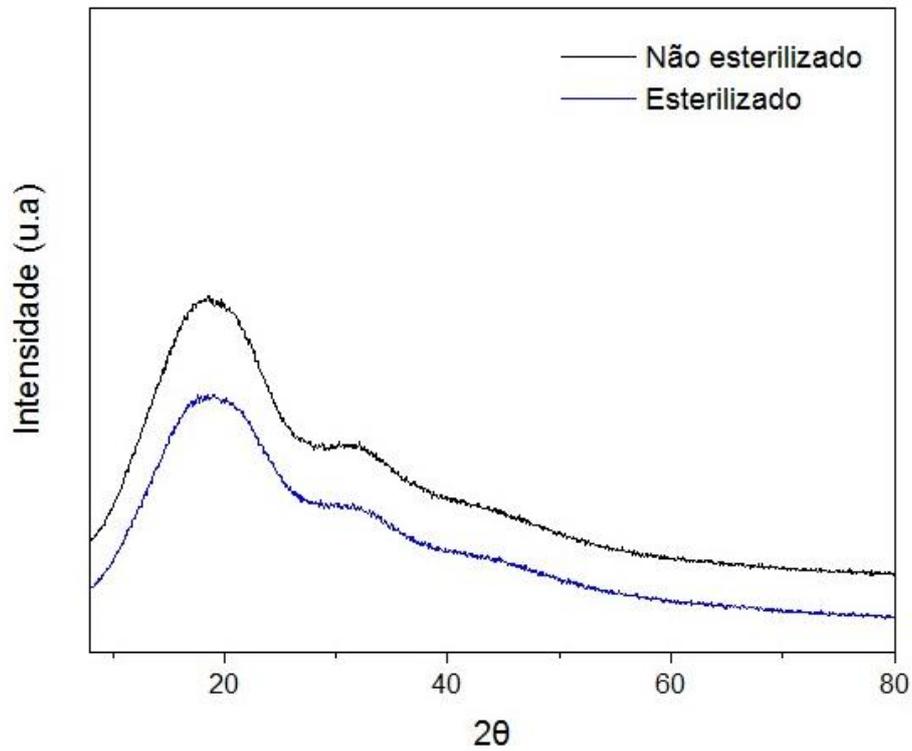


Figura 10 – Difratoformas de Raios x das MPS de PLGA+2%SIN das amostras não esterilizadas e esterilizadas.



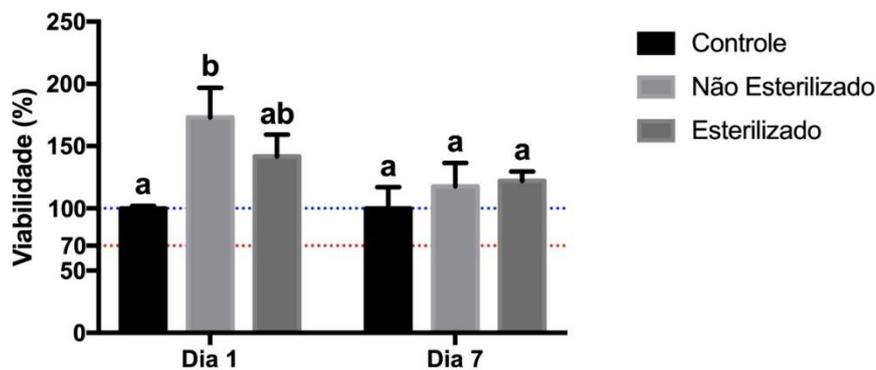
## 5.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE

O resultado da viabilidade celular de células-tronco de polpa de dentes decíduos (SHED) e de fibroblastos gengivais humanos (HGF) foi obtido após a exposição às MPS de PLGA e PLGA+2%SIN esterilizadas por radiação gama e não esterilizadas, por meio do teste colorimétrico MTT, nos tempos experimentais de 1 e 7 dias, apresentados nas figuras 11, 12, 13 e 14.

Foi possível observar que as MPS não foram citotóxicas, uma vez que permitiram viabilidade celular acima de 70% de ambas as linhagens testadas.

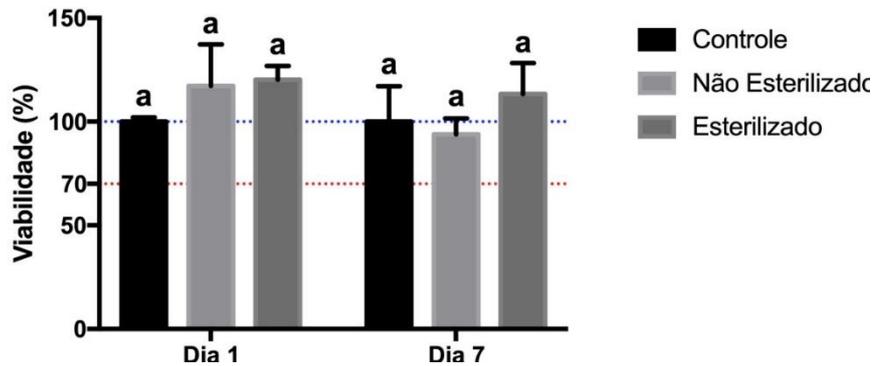
Na análise das amostras de PLGA (Figura 11) não houve diferença estatística na viabilidade de SHED entre os grupos esterilizado e não esterilizado no dia 1. No dia 7, todos os grupos obtiveram semelhança estatística ao grupo controle.

Figura 11 – Viabilidade de células SHED expostas às MPS de PLGA esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.



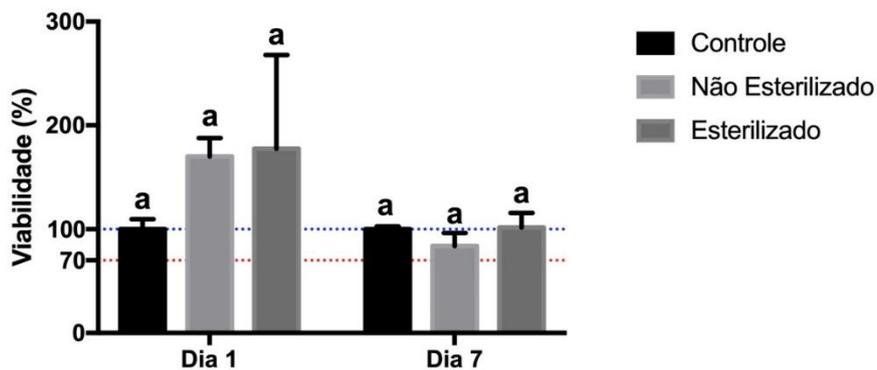
Em relação à viabilidade das SHED em amostras de PLGA+2%SIN (Figura 12), não houve diferença estatística entre os grupos esterilizado, não esterilizado e controle celular, em ambos os tempos experimentais.

Figura 12 – Viabilidade de células SHED expostas às MPS de PLGA+2%SIN esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.



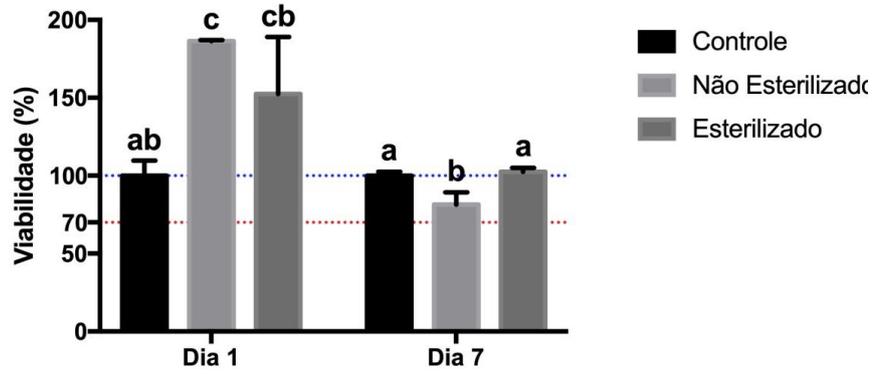
Ao analisar as amostras de PLGA em HGF (Figura 13) observa-se: no dia 1, não houve diferença estatística entre os grupos, embora a viabilidade celular do grupo não esterilizados e esterilizado seja maior que o controle positivo; no dia 7, todos foram estatisticamente iguais ao controle.

Figura 13 – Viabilidade de células HGF expostas às MPS de PLGA esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.



Os resultados obtidos das amostras de PLGA+2%SIN em HGF (Figura 14) expressam: no dia 1, o grupo não esterilizado apresentou maior viabilidade celular, embora seja estatisticamente semelhante ao grupo esterilizado; no dia 7, o grupo esterilizado mostrou-se estatisticamente igual ao controle positivo sendo observada uma redução na viabilidade celular quanto ao grupo não esterilizado.

Figura 14 – Viabilidade de células HGF expostas às MPS de PLGA+2%SIN esterilizadas e não esterilizadas com tempo experimental de 1 e 7 dias.



## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, as MPS de PLGA com e sem SIN foram sintetizadas e submetidas à esterilização por radiação gama, afim de avaliar a interferência da esterilização sobre as características físico-químicas e biológicas do biomaterial, para que este possa ser aplicado clinicamente como substituto ósseo.

O modelo de síntese das MPS foi o método de simples emulsão e evaporação do solvente óleo em água (O/A). Segundo Li, Rouaud e Poncelet (2008) e Jordão, Bazzo, Aragonés e Magini (2017) é um método simples e que possui bons resultados para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos, possibilitando sua liberação controlada (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; JORDÃO; BAZZO; ARAGONES; MAGINI, 2017). A utilização do diclorometano como solvente foi apontada como uma vantagem, uma vez que, devido a sua rápida evaporação, proporciona um menor tempo de síntese das MPS (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Estudos anteriores demonstraram a capacidade da reparação óssea a partir de MPS de PLGA+2%SIN (MENDES JUNIOR; DOMINGUES; HAUSEN; CATTANI; ARAGONES; OLIVEIRA; INÁCIO; BARBO; DUEK, 2017). No entanto, para que este biomaterial possa ser aplicado clinicamente, um método de esterilização final adequado que elimine qualquer possibilidade de contaminação e que, ao mesmo tempo, não altere as propriedades físico-químicas e biológicas deste, é de extrema relevância. Embora alguns estudos a respeito do assunto apresentem resultados promissores, como o trabalho de Carrascosa, Espejo, Torrado (2003), em que esteriliza MPS de PLGA com fator de crescimento I recombinante semelhante a insulina com 25kGy e não apresenta alterações morfológicas, nem na variação do tamanho. A literatura ainda não apresenta um consenso sobre o método ideal para a esterilização de biomateriais poliméricos, ao passo que são substâncias altamente sensíveis.

Martinez-Sancho, Herrero-Vanrell e Negro (2004) estudaram MPS de PLGA com aciclovir esterilizadas por radiação gama (18kGy) e observaram que, sob aspecto morfológico através de MEV, não houve alteração entre os grupos após a esterilização, assim como demonstrado no estudo realizado por Carrascosa *et al.* (2003) (MARTINEZ-SANCHO; HERRERO-VANRELL; NEGRO, 2004; CARRASCOSA *et al.*, 2003). No presente estudo, a análise morfológica por MEV das MPS de PLGA (82L:18G) e PLGA+2%SIN, esterilizadas ou não, revelou uma superfície lisa, homogênea e ausência de poros, colaborando com o encontrado nos estudos citados anteriormente. Segundo Li, Rouaud e Poncelet (2008), a morfologia esférica e homogênea é decorrente da utilização do diclorometano como solvente

na etapa de preparo das MPS. As mesmas características foram citadas em um estudo desenvolvido por Jordão, Bazzo, Aragonés e Magini (2017), sendo que a superfície lisa e livre de poros demonstrou uma liberação mais lenta e controlada do fármaco mesmo nas menores partículas, o que corroboraria para a neoformação óssea (JORDÃO; BAZZO; ARAGONES; MAGINI, 2017).

Através da mensuração, foi possível aferir que as MPS esterilizadas reduziram sua área em comparação com as não esterilizadas no grupo PLGA+2%SIN. No entanto, Martínez-Sancho, Herrero-Vanrell e Negro (2004) estudaram MPS de PLGA incorporadas com aciclovir e observaram que não houve alteração dimensional após a esterilização por radiação gama (MARTÍNEZ-SANCHO; HERRERO-VANRELL; NEGRO, 2004).

A análise do EDS das MPS esterilizadas e não esterilizadas revelaram a presença de C e O assim como já era esperado decorrentes do PLGA e da SIN, assim como demonstrou o estudo de Khalil *et al.* (2013).

No presente estudo, a análise por FTIR revelou que a SIN foi incorporada ao PLGA, assim como demonstrado no estudo de Nath, Son, Sadiasa, Min e Lee (2013). Comparando os respectivos espectros das amostras irradiadas e não irradiadas do mesmo grupo sugere-se que não foram criadas novas ligações ou moléculas, mantendo assim, as características de cada composto.

Os difratogramas apresentados neste trabalho após a análise de DRX evidenciam a característica amorfa das MPS de PLGA+2%SIN esterilizadas e não esterilizadas. A SIN apresenta natureza cristalina, no entanto após sua incorporação ao polímero apresenta forma amorfa (NATH; SON; SADIASA; MIN; LEE, 2013).

Estudos anteriores analisaram a relação entre citotoxicidade e a SIN demonstrando que 0,03%SIN não eram citotóxicos (SUMAR; MAGINI, 2018), enquanto que 5%SIN mostrou-se citotóxico (SORDI; MAGINI; CORDEIRO, 2017). A concentração de SIN utilizada neste trabalho foi de 2% e a citotoxicidade das MPS com e sem SIN, esterilizadas e não esterilizadas. Todas as amostras analisadas nos tempos experimentais de 1 e 7 dias apresentaram viabilidade celular acima de 70%, ou seja, não foram tóxicas para as células HGF e SHED. Segundo Costa e Ré (2008), as cadeias hidrofóbicas do PVA se ligam a superfície do PLGA e permanecem presas mesmo quando o solvente é removido, tendo um efeito residual em torno de 0,3% m/m (COSTA; RÉ, 2008). Considerando que o PVA é biocompatível (SUN; DAI; GUO; SHA, 2019) e utilizado na engenharia tecidual de cartilagens (NIE; ZHANG; HOU; XU; LI; FU, 2015) é

possível que a alta taxa da viabilidade celular do dia 1 seja possível não somente pelo PLGA, mas também pela camada residual de PVA. É evidenciado que todos os grupos esterilizados do dia 7 obtiveram 100% de viabilidade celular, sendo estatisticamente igual ao grupo controle.

Diante do exposto, é possível observar que o método de esterilização por radiação gama não influenciou sobre as características físico-químicas e biológicas das microesferas de PLGA com e sem SIN incorporada.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo demonstram que o método de esterilização via radiação gama sobre as MPS de PLGA e PLGA+2%SIN não influenciou as características físico-químicas analisadas, bem como não exerceu influência citotóxica sobre a viabilidade celular das linhagens SHED e HGF. A partir do potencial osteocondutor e osteoindutor desse substituto ósseo sugere-se futuros estudos com aplicabilidade clínica para melhor observar o comportamento e efetividade do biomaterial para reparação óssea, a fim de ser utilizado no interior de cavidades (inlay) como preenchimento alveolar, no gap de implantes, seio maxilar, defeitos periodontais, bem como em reconstruções ortopédicas associadas a membranas.

## REFERÊNCIAS

- ARBOLEYA, L.; CASTAÑEDA, S.. Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso. **Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.109-121, dez. 2014. Instituto de Salud Carlos III/BNCS/SciELO Espana.  
<http://dx.doi.org/10.4321/s1889-836x2014000400007>.
- ARTZI, Zvi; KOZLOVSKY, Avital; NEMCOVSKY, Carlos E.; WEINREB, Miron. The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material. **Journal Of Clinical Periodontology**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 193-199, fev. 2005. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.2005.00656.x>.
- ASPENBERG, Per. Alendronate-eluting polyglucose-lignol composite (POGLICO). **Acta Orthopaedica**, [s.l.], v. 85, n. 6, p. 687-690, 28 out. 2014. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.3109/17453674.2014.979724>.
- BARBANTI, Samuel H.; ZAVAGLIA, Cecília A. C.; DUEK, Eliana A. R.. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.13-21, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282005000100006>.
- BARBANTI, Samuel H.; ZAVAGLIA, Cecília A. C.; DUEK, Eliana A. R.. Degradação acelerada de suportes de poli(épsilon-caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.141-148, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282006000200015>.
- BITTNER, B; MÄDER, K; KROLL, C; BORCHERT, H.-h; KISSEL, T. Tetracycline-HCl-loaded poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of  $\gamma$ -irradiation on radical formation and polymer degradation. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 23-32, maio 1999. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659\(98\)00170-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(98)00170-9).
- BUSER, Daniel. **20 Anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 2010. 261 p.
- CALASANS-MAIA, Mônica Diuana; ASCOLI, Fabio Oliveira; NOVELLINO, Adriana Terezinha Neves Alves; ROSSI, Alexandre Malta; GRANJEIRO, José Mauro. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tibia de coelho tratada com xenoenxertos. **Acta Ortopédica Brasileira**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 340-343, 2009. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-78522009000600005>.
- CALIS, Sema; BOZDAG, Sibel; KAS, H.süheyla; TUNÇAY, Melike; HINCAL, A.atilla. Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs. **Il Farmaco**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 55-62, jan. 2002. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01171-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01171-5).

CARRASCOSA, C.; ESPEJO, L.; TORRADO, S.; TORRADO, J. J.. Effect of c-Sterilization Process on PLGA Microspheres Loaded with Insulin-Like Growth Factor - I (IGF-I). **Journal Of Biomaterials Applications**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 95-108, out. 2003. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/088532803038026>.

COCHRAN, David L.; SCHENK, Robert; BUSER, Daniel; WOZNEY, John M.; JONES, Archie A.. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulation of Bone Formation Around Endosseous Dental Implants. **Journal Of Periodontology**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.139-150, fev. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1999.70.2.139>.

CONSOLARO, Alberto; FURQUIM, Laurindo. Mecânica intrusiva gera forças de inclinação e estímulos ortopédicos com reposicionamento dentário e remodelação óssea simultâneos OU Na mecânica intrusiva não se aplica forças de intrusão, mas obtém-se o efeito intrusivo. **Dental Press Journal Of Orthodontics**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.20-29, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2176-94512011000500003>.

CORTI, Giovanna; CAPASSO, Gaetano; MAESTRELLI, Francesca; CIRRI, Marzia; MURA, Paola. Physical–chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 45, n. 3, p. 480-486, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.07.018>.

COSTA, Roseane Maria Ribeiro; RÉ, Maria Inês. **Desenvolvimento de microesferas de PLGA contendo interleucina-2 para aplicação na terapia anti-neoplásica**. 2008. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3005>. Acesso em: 29 jul. 2020.

DAVIES, John E.; MATTA, Rano; MENDES, Vanessa C.; CARVALHO, Paulo S. Perri de. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. **Organogenesis**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 161-166, jul. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/org.6.3.12392>.

DESAI, Kashappa-goud H.; KADOUS, Samer; SCHWENDEMAN, Steven P.. Gamma Irradiation of Active Self-Healing PLGA Microspheres for Efficient Aqueous Encapsulation of Vaccine Antigens. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 30, n. 7, p. 1768-1778, 21 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-013-1019-2>.

DIMITRIOU, Rozalia; GIANNOUDIS, Peter V. Discovery and development of BMPs. **Injury**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 28-33, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.031>.

ENGINEER, C; PARIKH, J; RAVAL, A. Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 25, n. 2, 2011.

FANG, Wen; ZHAO, Shifang; HE, Fuming; LIU, Li; YANG, Guoli. Influence of Simvastatin-Loaded Implants on Osseointegration in an Ovariectomized Animal Model. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p.1-7, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/831504>.

FATTAH, Tanzeela A.; SAEED, Aamer; SHEHZADI, Syeda A.. Synthetic Approaches Towards Antihypercholesterolemic Drug Simvastatin. **Current Organic Synthesis**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 652-670, 17 out. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1570179416666190725095951>.

FEOFILOFF ET, JESUS-GARCIA R. Técnicas de obtenção processamento armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos Protocolo do Banco de Ossos da Escola Paulista de Medicina. **Rev Bras Ortop**. 1996;31(11):.

FERREIRA, Lorraine Braga. **Estudo do processo de reparação óssea em defeitos na calvária de ratos utilizando sinvastatina associada a um polímero de poli (ácido láctico-co-glicólico)**. 2014. Tese (Doutorado em Materiais Dentários) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/T.23.2014.tde-22092014-142420. Acesso em: 2020-04-07.

FERREIRA, Lorraine B; BRADASCHIA-CORREA, Vivian; MOREIRA, Mariana M; MARQUES, Natasha Dm; ARANA-CHAVEZ, Victor e. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. **Journal Of Biomaterials Applications**, [s.l.], v. 29, n. 7, p. 965-976, 10 set. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0885328214550897>.

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo; SASSO, Gisela Rodrigues da Silva; SASSO-CERRI, Estela; SIMÕES, Manuel Jesus; CERRI, Paulo Sérgio. Biology of Bone Tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. : Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p. 1-17, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>.

GENTILE, Piergiorgio; CHIONO, Valeria; CARMAGNOLA, Irene; HATTON, Paul. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 3640-3659, 28 fev. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15033640>.

GENTILE, Piergiorgio; NANDAGIRI, Vijay Kumar; DALY, Jacqueline; CHIONO, Valeria; MATTU, Clara; TONDA-TURO, Chiara; CIARDELLI, Gianluca; RAMTOOLA, Zebunnissa. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 59, p. 249-257, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.014>.

GRIFFITHS, S. L.; CARTMELL, S. H.. Use of statins for enhancing bone-tissue-engineered grafts. **European Journal Of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.151-157, 10 jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00238-007-0190-2>.

GUÉHENNEC, L Le et al. A Review of Bioceramics and Fibrin Sealant. *European Cells And Materials*, [s.l.], v. 8, p.1-11, 13 set. 2004. **ECM Research Journal**.  
<http://dx.doi.org/10.22203/ecm.v008a01>.

GUNATILLAKE, Pa. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells And Materials*, [s.l.], v. 5, p.1-16, 1 out. 2003. **ECM Research Journal**.  
<http://dx.doi.org/10.22203/ecm.v005a01>.

GRAHAM, Simon M; LEONIDOU, Andreas; ASLAM-PERVEZ, Nayef; HAMZA, Ahmed; PANTELIADIS, Pavlos; HELIOTIS, Manolis; MANTALARIS, Athanasios; TSIRIDIS, Eleftherios. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation.: the immunology of bone allo-transplantation. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 885-901, 23 abr. 2010. Informa Healthcare.  
<http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2010.481669>.

GUTIERREZ, G. E.; LALKA, D.; GARRETT, I. R.; ROSSINI, G.; MUNDY, G. R.. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. **Osteoporosis International**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.1033-1042, 3 maio 2006. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00198-006-0079-0>.

HOLTZCLAW, Dan; TOSCANO, Nicholas; EISENLOHR, Lisa; CALLAN, Don. The Safety of Bone Allografts Used in Dentistry. **The Journal Of The American Dental Association**, [s.l.], v. 139, n. 9, p. 1192-1199, set. 2008. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0334>.

HOLY, Chantal e; CHENG, Chantelle; DAVIES, John e; SHOICHET, Molly S. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 25-31, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00136-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00136-8).

JANUÁRIO, Alessandro Lourenço et al. Dimension of the facial bone wall in the anterior maxilla: a cone-beam computed tomography study. **Clinical Oral Implants Research**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1168-1171, 15 fev. 2011. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02086.x>.

JORDÃO, Nathalia; BAZZO, Giovana Carolina; ARAGONES, Águedo; MAGINI, Ricardo. Preparation, characterization and in vitro drug release of simvastatin loaded PLGA microspheres. **Clinical Oral Implants Research**, [S.L.], v. 28, p. 163-163, out. 2017. Wiley.  
[http://dx.doi.org/10.1111/clr.162\\_13042](http://dx.doi.org/10.1111/clr.162_13042).

KAO, Solon T.; SCOTT, Daniel D.. A Review of Bone Substitutes. **Oral And Maxillofacial Surgery Clinics Of North America**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.513-521, nov. 2007. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2007.06.002>.

KATCHBURIAN, Eduardo. **Histologia e embriologia oral**: texto, atlas, correlações clínicas. 3. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KATCHBURIAN E, CERRI PS. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. **Cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p. 437-45.

KELES, Hakan; NAYLOR, Andrew; CLEGG, Francis; SAMMON, Chris. Studying the release of hGH from gamma-irradiated PLGA microparticles using ATR-FTIR imaging. **Vibrational Spectroscopy**, [s.l.], v. 71, p. 76-84, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2014.01.012>.

KLINE, Gregory; ORTON, Dennis; SADRZADEH, Hossein. Bone metabolism. **Endocrine Biomarkers**, [s.l.], p. 157-180, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803412-5.00004-5>.

KOKUBO, T. Bioceramics and their clinical applications. CRC Press: Boca Raton, 2008.

KOWALSKI, John B; HERRING, Craig; BARYSCHPOLEC, Lisa; REGER, John; PATEL, Jay; FEENEY, Mary; TALLENTIRE, Alan. Field evaluations of the VDmax approach for substantiation of a 25kGy sterilization dose and its application to other preselected doses. **Radiation Physics And Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 5-6, p. 411-416, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-806x\(01\)00681-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-806x(01)00681-8).

KHALIL, K. A. *et al.* Preparation and Characterization of Electrospun PLGA/ silver Composite Nanofibers for Biomedical Applications. **Int. Journal of Electrochemical Science**, [s.l.], n. 08, p. 3483 - 3493, mar. 2013.

KHEIRALLAH, Mouetaz; ALMESHALY, Hassan. Simvastatin, dosage and delivery system for supporting bone regeneration, an update review. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery, Medicine, And Pathology**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 205-209, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2015.10.005>.

LANAO, Rosa P. Félix *et al.* Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.380-390, ago. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0443>.

LANGER, R; VACANTI, J.. Tissue engineering. *Science*, [s.l.], v. 260, n. 5110, p.920-926, 14 maio 1993. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.8493529>.

LEMONS, Jack E.; MISCH-DIETSH, Francine; MCCRACKEN, Michael S.. Biomaterials for Dental Implants. **Dental Implant Prosthetics**, [s.l.], p. 66-94, 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-07845-0.00004-x>.

LI, Ming; ROUAUD, Olivier; PONCELET, Denis. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 363, n. 1-2, p. 26-39, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>.

LIN, S.-y.; CHEN, K.-s.; TENG, H.-h.; LI, M.-j.. In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters. **Journal Of**

**Microencapsulation**, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 577-586, jan. 2000. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1080/026520400417630>.

MACIEL-OLIVEIRA, Newton; BRADASCHIA-CORREA, Vivian; ARANA-CHAVEZ, Victor E.. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontology**, [s.l.], v. 112, n. 2, p. 170-179, ago. 2011. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.08.027>

MACKIE, E.j.. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.1301-1305, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00107-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00107-9).

MAEDA, Toyonobu; KAWANE, Tetsuya; HORIUCHI, Noboru. Statins Augment Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Osteoblastic Cells via Inhibition of Protein Prenylation. *Endocrinology*, [s.l.], v. 144, n. 2, p.681-692, fev. 2003. **The Endocrine Society**.  
<http://dx.doi.org/10.1210/en.2002-220682>.

MAKADIA, Hirenkumar K.; SIEGEL, Steven J.. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.1377-1397, 26 ago. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym3031377>.

MARTÍNEZ-SANCHO, Concepción; HERRERO-VANRELL, Rocío; NEGRO, Sofia. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 99, n. 1, p. 41-52, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.004>.

MAVROGENIS, Af; DIMITRIOU, R; PARVIZI, J; BABIS, Gc. Biology of implant osseointegration. **Journal Of Musculoskelet Neuronal Interact**, [s. l], p. 61-71, 2009.

MENDES JUNIOR, Dario; DOMINGUES, Juliana A.; HAUSEN, Moema A.; CATTANI, Silvia M.m.; ARAGONES, Aguedo; OLIVEIRA, Alexandre L.r.; INÁCIO, Rodrigo F.; BARBO, Maria L.p.; DUEK, Eliana A.r.. Study of mesenchymal stem cells cultured on a poly(lactic-co-glycolic acid) scaffold containing simvastatin for bone healing. **Journal Of Applied Biomaterials & Functional Materials**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 0, 2017. SAGE  
<http://dx.doi.org/10.5301/jabfm.5000338>.

MERKLI, Alain; HELLER, Jorge; TABATABAY, Cyrus; GURNY, Robert. Gamma Sterilization of a Semi-Solid Poly(ortho Ester) Designed for Controlled Drug Delivery-- Validation and Radiation Effects. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 11, n. 10, p. 1485-1491, 1994. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1023/a:1018964511053>.

MONTANARI, Luisa; COSTANTINI, Monica; SIGNORETTI, Elena Ciranni; VALVO, Luisa; SANTUCCI, Mara; BARTOLOMEI, Monica; FATTIBENE, Paola; ONORI, Sandro; FAUCITANO, Antonio; CONTI, Bice. Gamma irradiation effects on poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 56, n. 1-3, p. 219-229, dez. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659\(98\)00082-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(98)00082-0).

MONTERO, J.; MANZANO, G.; ALBALADEJO, A. The role of topical simvastatin on bone regeneration: A systematic review. *Journal Of Clinical And Experimental Dentistry*, [s.l.], p.286-90, 2014. *Medicina Oral*, S.L. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51415>.

MOURA, Roberto de Almeida; WADA, Carlos Suehita; PURCHIO, Adhemar; ALMEIDA, T. V.. **Técnicas de laboratório**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 511 p.

MUKOZAWA, Aya; UEKI, Koichiro; MARUKAWA, Kohei; OKABE, Katsuhiko; MOROI, Akinori; NAKAGAWA, Kiyomasa. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. **Clinical Oral Implants Research**, [s.l.], v. 22, n. 11, p. 1327-1335, 6 jul. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02135.x>.

MUNDY, Gregory R.. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **Journal Of Periodontal Research**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 213-217, maio 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01647.x>.

MUNDY, G.; GARRET, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; ZHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v.286, n.5446, p. 1946-1949, 1999.

NASR, Hisham F.; AICHELMANN-REIDY, Mary Elizabeth; YUKNA, Raymond A.. Bone and bone substitutes. **Periodontology** 2000, [s.l.], v. 19, n. 1, p.74-86, fev. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00148.x>.

NATH, Subrata D; LINH, Nguyen Tb; SADIASA, Alexander; LEE, Byong T. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. **Journal Of Biomaterials Applications**, [s.l.], v. 28, n. 8, p. 1151-1163, 12 set. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0885328213499272>.

OBRADOVIĆ-DJURICIĆ, Kosovka; KOSTIĆ, Ljiljana; MARTINOVIĆ, Zeljko. Gingival and dental parameters in evaluation of esthetic characteristics of fixed restorations. **Srp Arh Celok Lek**, Serbian, p. 180-187, mar-Apr 2005.

O'NEILL, P.. The Chemical Basis of Radiation Biology. **International Journal Of Radiation Biology And Related Studies In Physics, Chemistry And Medicine**, [s.l.], v. 52, n. 6, p. 976-976, jan. 1987. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09553008714552571>.

PAIVA, Katiucia B.s.; GRANJEIRO, José M.. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [s.l.], p. 203-303, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.05.001>.

PALMER, S; GIBBONS, C; ATHANASOU, NA. The pathology of bone allograft. **The Journal of bone and joint surgery**. British volume. 81. 1999 333-5. 10.1302/0301-620X.81B2.9320.

PASSERINI, N; CRAIG, D.q.m. An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 73, n. 1, p.111-115, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00245-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00245-0).

PASSOS, Flávia Regina; MENDES, Fabrícia Queiroz. RADIAÇÃO GAMA NA CONSERVAÇÃO DE CARNE: uma revisão. **The Journal Of Engineering And Exact Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 0763-0768, 24 ago. 2017. Universidade Federal de Vicosa. <http://dx.doi.org/10.18540/jcecvl3iss6pp0763-0768>.

PORTER, Joshua R.; RUCKH, Timothy T.; POPAT, Ketul C.. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, [s.l.], p.1539-1560, 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.246>.

PLACE, Elsie S.; EVANS, Nicholas D.; STEVENS, Molly M.. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature Materials**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.457-470, jun. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2441>.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J.E. Em Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine; Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds; Elsevier: Oxford, 2013, cap. Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor.

REZWAN, K.; CHEN, Q.z.; BLAKER, J.j.; BOCCACCINI, Aldo Roberto. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 18, p. 3413-3431, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>.

RODRIGUEZ, Angelemmanuel; NOWZARI, Hessam. The long-term risks and complications of bovine-derived xenografts: A case series. **Journal Of Indian Society Of Periodontology**, [s.l.], p.487-492, 2019. Medknow. [http://dx.doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_656\\_18](http://dx.doi.org/10.4103/jisp.jisp_656_18).

ROGERS, M.J. Statins: lower lipids and better bone? **Nature**, v.6, n.1, p.21-23, 2000.

SAKODA, K.; YAMAMOTO, M.; NEGISHI, Y.; LIAO, J.k.; NODE, K.; IZUMI, Y.. Simvastatin Decreases IL-6 and IL-8 Production in Epithelial Cells. **Journal Of Dental Research**, [s.l.], v. 85, n. 6, p.520-523, jun. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910608500608>.

SANZ, Mariano; VIGNOLETTI, Fabio. Key aspects on the use of bone substitutes for bone regeneration of edentulous ridges. **Dental Materials**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.640-647, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.03.005>.

SEAL, B. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science And Engineering: R**, [s.l.], v. 34, n. 4-5, p.147-230, 10 out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0927-796x\(01\)00035-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0927-796x(01)00035-3).

SHAPOURGAN, Mona; MOBEDI, Hamid; SHEIKH, Nasrin; BEHNAMGHADER, Aliasghar; MASHAK, Arezou. Leuprolide Acetate Release Study from  $\gamma$ -Irradiated PLGA-based In Situ Forming System. **Current Drug Delivery**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 1170-1177, 13 dez. 2017. Bentham Science Publishers Ltd..  
<http://dx.doi.org/10.2174/1567201814666170329104047>.

SIEGEL, S; KAHN, J; METZGER, K; WINEY, K; WERNER, K; DAN, N. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.287-293, nov. 2006. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.009>.

SODEK, Jaro; MCKEE, Marc D.. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 99-126, out. 2000. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240106.x>.

SONDERGAARD, Te; PEDERSEN, Pt; ANDERSEN, Tl; SOE, K; LUND, T; OSTERGAARD, B; GARNERO, P; DELAISSE, J-m; PLESNER, T. A phase II clinical trial does not show that high dose simvastatin has beneficial effect on markers of bone turnover in multiple myeloma. **Hematological Oncology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.17-22, mar. 2009. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1002/hon.869>.

SOUNDY, R G. Dosimetry for radiation processing by W L McLaughlin, A W Boyd, K H Chadwick, J C McDonald and A Miller pub: taylor & francis (hemisphere publishing corporation), basingstoke, hampshire, uk 1989, 264 pp isbn. : Taylor & Francis (Hemisphere Publishing Corporation), Basingstoke, Hampshire, UK 1989, 264 pp ISBN. **Journal Of Labelled Compounds And Radiopharmaceutics**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 743-744, jun. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jlcr.2580280616>.

SOUSA, Dircilei Nascimento de; FERREIRA, Vânia Moraes; SOUZA, João Antônio Chaves de; STEFANI, Cristine Miron; RORIZ, Virgílio Moreira. Efeito tópico da sinvastatina no metabolismo ósseo: revisão crítica da literatura, **Rev Odontol Bras Central**, Goiânia, v.26, n.77, p.1-8, set. 2017.

SUN, Xiangyang; DAI, Haixue; GUO, Ping; SHA, Xianyi. Biocompatibility of a New Kind of Polyvinyl Alcohol Embolic Microspheres: in vitro and in vivo evaluation. **Molecular Biotechnology**, [S.L.], v. 61, n. 8, p. 610-621, 29 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00166-6>.

TIAN, Huayu; TANG, Zhaohui; ZHUANG, Xiuli; CHEN, Xuesi; JING, Xiabin. Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application.: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 237-280, fev. 2012. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>.

TOMFORD, William W.. Bone allografts: past, present and future. **Cell And Tissue Banking**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.105-109, 2000. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1023/a:1010158731885>.

URIST, M. R.; HUO, Y. K.; BROWNELL, A. G.; HOHL, W. M.; BUYSKE, J.; LIETZE, A.; TEMPST, P.; HUNKAPILLER, M.; DELANGE, R. J.. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 81, n. 2, p. 371-375, 1 jan. 1984. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.2.371>.

URIST, M. R.. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, [s.l.], v. 150, n. 3698, p.893-899, 12 nov. 1965. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.150.3698.893>.

URIST MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. **Clin Orthop Relat Res**. 1967;53:243-283.

VANDEVORD, Pamela J.; NASSER, Sam; WOOLEY, Paul H.. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. **Journal Of Orthopaedic Research**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.1059-1064, set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.orthres.2004.12.004>.

VASTEL, L.; MEUNIER, A.; SINEY, H.; SEDEL, L.; COURPIED, J.-p.. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 11, p. 2105-2110, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.067>.

ZHAO, Yuping; ZHU, Bo; WANG, Yaming; LIU, Chuntai; SHEN, Changyu. Effect of different sterilization methods on the properties of commercial biodegradable polyesters for single-use, disposable medical devices. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 105, p. 11-41, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2019.110041>.

ZHANG, Hao-xuan; XIAO, Gui-yong; WANG, Xia; DONG, Zhao-gang; MA, Zhi-yong; LI, Lei; LI, Yu-hua; PAN, Xin; NIE, Lin. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 103, n. 10, p. 3250-3258, 1 abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35463>.

WONG, R.W.; RABIE, A.B. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. **British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.41, n.4, p.244-248, 2003.

WILLIAMS, D.F., BLACK, J. e DOTHERTY, P.J. Second consensus conference on definitions in biomaterials. *Advances in Biomaterials: Biomaterial-Tissue Interfaces*. Amsterdam, **Elsevier Science Publishers**, pp. 525-53, 1992



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA**

**ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aos 12 dias do mês de abril de 2021, às 11:10 horas, em sessão pública na plataforma RNP, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Ricardo de Souza Magini e pelos examinadores:

1 - Águedo Aragones,

2 - Felipe Perozzo Daltoé,

a aluna Luana Boldori Bernardes apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: INFLUÊNCIA DA ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO GAMA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CITOTOXICIDADE DE MICROESFERAS DE PLGA INCORPORADAS COM 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 ao aluno 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

Ricardo de Souza Magini

Data: 13/04/2021 16:27:53-0300

CPF: 471.383.439-49

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Presidente da Banca Examinadora

DocuSigned by:

*Águedo Aragones*

16/04/2021

8F74CDDC48F44E4...

Examinador 1



Documento assinado digitalmente

Felipe Perozzo Daltoe

Data: 15/04/2021 13:16:39-0300

CPF: 050.993.809-48

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Examinador 2



Documento assinado digitalmente

Luana Boldori Bernardes

Data: 19/04/2021 11:02:18-0300

CPF: 020.220.480-40

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Aluno