



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Raissa Borges Curtarelli

**Influência de diferentes métodos de esterilização em microesferas de
poli(ácido-láctico-co-glicólico) incorporando sinvastatina**

Florianópolis

2024

Raissa Borges Curtarelli

Influência de diferentes métodos de esterilização em microesferas de poli(ácido-láctico-co-glicólico) incorporando sinvastatina

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Florianópolis

2024

Curtarelli, Raissa Borges

Influência de diferentes métodos de esterilização em microesferas de poli(ácido-láctico-co-glicólico) incorporando sinvastatina / Raissa Borges Curtarelli ; orientadora, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, 2024. 47 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Esterilização. 3. Polímeros. 4. Biomateriais. 5. Engenharia tecidual. I. da Cruz, Ariadne Cristiane Cabral. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Raissa Borges Curtarelli

Influência de diferentes métodos de esterilização em microesferas de poli(ácido-láctico-co-glicólico) incorporando sinvastatina

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 03 de Junho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Gabriel Magrin, Dr
UFSC

Profa. Fernanda Boabaid Jordanou, Dra.
Instituto Orbis

Profa. Bruna Barbosa Corrêa, Dra.
Unisul

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Implantodontia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2024.

RESUMO

Os polímeros sintéticos surgiram como substitutos ósseos promissores devido a sua versatilidade, disponibilidade e baixa morbidade ao paciente. Porém, um dos requisitos no processo de fabricação de biomateriais é a condição de esterilidade. Portanto, além do controle rigoroso durante a síntese, é necessário um procedimento de esterilização eficaz que altere minimamente as propriedades físicas, químicas e biológicas do biomaterial. Por esse motivo, este estudo teve como objetivo investigar *in vitro* a influência dos métodos de esterilização nas propriedades físicas, químicas e biológicas de microesferas de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), com ou sem incorporação de sinvastatina a 2%. Microesferas de PLGA e PLGA+2%SIM foram sintetizadas utilizando o método de emulsão e evaporação de solvente. As amostras destinadas à esterilização foram identificadas de acordo com os seguintes grupos: Autoclavagem, Radiação Gama e Óxido de Etileno. O grupo controle não recebeu tratamento. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia das microesferas, enquanto a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para determinar e quantificar os elementos químicos nas composições das amostras. Adicionalmente, a estrutura química das amostras foi analisada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e avaliada por difração de raios X (DRX). A citotoxicidade dos biomateriais foi analisada utilizando células estromais da polpa de dentes decíduos humanos (SHED) com o teste colorimétrico MTT nos dias 1 e 7. A radiação gama não promoveu alterações na forma e superfície das microesferas, bem como na composição química da superfície. Segundo o FTIR, a radiação gama e o óxido de etileno alteraram a composição química das microesferas. Por outro lado, a radiação gama e o óxido de etileno não alteraram as características amorfas das microesferas. No que diz respeito à biocompatibilidade, a radiação gama induziu a maior viabilidade celular para microesferas incorporando sinvastatina, enquanto o óxido de etileno e a autoclave conduziram a um comportamento de citotoxicidade. Em resumo, a radiação gama foi o método que promoveu menor alteração nas propriedades físicas, químicas e biológicas das microesferas à base de PLGA incorporando sinvastatina.

Palavras-chave: Esterilização; Polímeros; Biomateriais; Engenharia tecidual.

ABSTRACT

Synthetic polymers have emerged as prominent bone substitutes due to their versatility, availability, and low morbidity to the patient. However, one of the requirements in the manufacturing process of biomaterials is the condition of sterility. Therefore, in addition to rigorous control during synthesis, an effective sterilization procedure that minimally alters the physical, chemical, and biological properties of the biomaterial is necessary. For this reason, this study aimed to investigate *in vitro* the influence of sterilization methods on the physical, chemical, and biological properties of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, with or without 2% simvastatin incorporation. PLGA and PLGA+2%SIM microspheres were synthesized using the emulsion and solvent evaporation method. The samples designated for sterilization were identified according to the following groups: Autoclaving, Gamma radiation, and Ethylene oxide. The control group received no treatment. Scanning electron microscopy (SEM) was used to analyze the morphology of the microspheres, while energy dispersive spectroscopy (EDS) was employed to determine and quantify the chemical elements in the sample compositions. Additionally, the chemical structure of the samples was analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and evaluated through X-ray diffraction (XRD). The cytotoxicity of the biomaterials was analyzed using stromal cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) with the MTT colorimetric test on days 1 and 7. Gamma radiation did not promote changes in the microsphere shape and surface, as well as surface chemical composition. According to FTIR, gamma radiation and ethylene oxide altered the microsphere chemical composition. Conversely, gamma radiation and ethylene oxide did not alter the amorphous characteristics of the microspheres. Concerning the biocompatibility, gamma radiation induced the highest cellular viability for microspheres incorporating simvastatin, while ethylene oxide and autoclave led to a cytotoxicity behaviour. In summary, gamma radiation was the method that promoted least alteration on the physical, chemical, and biological properties of PLGA-based microspheres incorporating simvastatin.

Keywords: Sterilization; Polymers; Simvastatin; Biomaterials; Tissue engineering.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Autoclave
ALP	Fosfatase alcalina
BMP-2	Proteína morfogenética óssea do tipo 2
DRX	Difração de Raios-X
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
EO	Óxido de etileno
FGF-1	Fator de crescimento de fibroblastos do tipo 1
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GR	Radiação gama
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido-láctico-co-glicólico)
PLLA	Poli(L-ácido láctico)
SHED	Células estromais da polpa de dentes decíduos humanos
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
WO	Não esterilizado / Sem tratamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA NA ODONTOLOGIA	17
2.2	POLÍMEROS	18
2.3	SINVASTATINA.....	19
2.4	MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO	20
2.4.1	Autoclave	21
2.4.2	Óxido de Etileno	22
2.4.3	Radiação Gama.....	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	ARTIGO.....	27
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Os substitutos ósseos sintéticos têm sido um importante alvo de pesquisas na regeneração do tecido ósseo devido à sua versatilidade e alta disponibilidade resultante da possibilidade de controle de sua composição e produção em larga escala, respectivamente (BUSER, 2010). O poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um copolímero sintético, biocompatível e não tóxico formado pela copolimerização de monômeros de ácido láctico e ácido glicólico (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; BAO et al., 2011). As propriedades físicas e mecânicas do PLGA facilitam a adesão e a proliferação celular, demonstrando potencial osteocondutor (MOTTA; DUEK, 2006). Devido à possibilidade de controlar sua taxa de degradação, o uso do PLGA em aplicações clínicas tem crescido nos últimos anos como dispositivo de liberação controlada de medicamentos (MOTTA; DUEK, 2006). Portanto, as microesferas de PLGA podem encapsular e liberar localmente drogas hidrofóbicas ou hidrofílicas em um sistema de liberação controlada. Como resultado, a incorporação de fármacos representa uma possibilidade de associar o polímero a fatores que induzem a osteogênese, conferindo ao sistema um perfil osteoindutor (MAKADIA; SIEGEL, 2011; QI et al., 2018).

As estatinas, frequentemente aplicadas para regular os níveis de colesterol endógeno (MUNDY et al., 1999), foram extensivamente estudadas devido aos seus efeitos pleiotrópicos, como propriedades angiogênicas (GRASSER et al., 2003; MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003; YAMASHITA et al., 2010), imunomoduladoras (MACHADO; MUNHOZ; FERNANDES, 2011) e antiinflamatórias (SAKODA et al., 2006; YAMASHITA et al., 2008). Além disso, foi relatado o potencial osteoindutor de estatinas como a sinvastatina (SIM) para promover a diferenciação osteogênica (GARRETT; GUTIERREZ; MUNDY, 2001; MAEDA et al., 2004; MUNDY et al., 1999), bem como a capacidade de inibir a reabsorção óssea (YAMASHITA et al., 2010). A aplicação local do SIM tem sido relacionada ao aumento da osteogênese (FERREIRA et al., 2014; MUNDY et al., 1999; WU et al., 2008). No entanto, as aplicações no local requerem um transportador adequado para permitir a liberação controlada do medicamento, evitando assim a liberação rápida e a degradação do medicamento. Foi demonstrado que as microesferas baseadas em PLGA que encapsulam o SIM melhoram a formação óssea em defeitos de tamanho crítico com diferentes modelos animais (FERREIRA et al., 2014; NAITO et al., 2014; TERUKINA et al., 2016).

Em termos de biomateriais para regeneração óssea, um aspecto essencial é a condição de esterilização para evitar contaminação. Portanto, apesar dos resultados promissores das pesquisas *in vitro* e *in vivo*, os estudos precisam relatar claramente o método de esterilização utilizado para o biomaterial sintetizado e utilizado. Com isso, o uso clínico desses biomateriais fica inviável até que um método de esterilização adequado seja encontrado, pois, além da esterilidade do biomaterial, é necessário que o método escolhido não produza alterações que comprometam seu desempenho final. Portanto, este estudo se propõe a identificar as possíveis alterações causadas por diferentes métodos de esterilização em microesferas de PLGA incorporando sinvastatina, a fim de possibilitar seu uso clínico na regeneração óssea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA NA ODONTOLOGIA

A busca por biomateriais para restituir estrutura e função ósseas perdidas após a perda de um ou mais elementos dentais tem estimulado pesquisas na área da engenharia tecidual. O substituto ósseo ideal deve dispor de 3 características essenciais da regeneração óssea: (1) a presença de osteoblastos viáveis capazes de iniciar o processo de deposição da matriz óssea (osteogênese); (2) servir como arcabouço, permitindo a adesão e migração dessas células tal como das presentes no sítio receptor (osteocondução); e (3) ser carreador de fatores de crescimento capazes de promover a diferenciação de células osteoprogenitoras em células produtoras de matriz óssea (osteoindução). Perante o apresentado, o único substituto ósseo disponível hoje capaz de oferecer todas as características supracitadas é o osso autógeno. No entanto, sua disponibilidade limitada bem como a morbidade associada a necessidade de dois sítios cirúrgicos (doador e receptor), tornam-se desvantagens do seu uso, incentivando assim, pesquisas acerca do desenvolvimento de materiais aloplásticos, ou também chamados sintéticos (BUSER, 2010; CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012; FARDIN et al., 2010).

A disponibilidade ilimitada, a menor morbidade e, principalmente, a versatilidade dos biomateriais sintéticos são importantes vantagens dessa classe de biomateriais frente às demais fontes existentes. Dentre todas essas vantagens, a sua versatilidade se destaca devido a possibilidade de controle de sua composição e, por

consequência, de suas características físicas e químicas de acordo com o efeito desejado. Torna-se possível, por exemplo, aliar a taxa de reabsorção do biomaterial à incorporação de substâncias com efeito osteoindutor, compondo assim um sistema de liberação controlado.

Entre os biomateriais sintéticos utilizados para regeneração óssea na odontologia estão os fosfatos de cálcio, os vidros bioativos e os polímeros. Os fosfatos mais utilizados são a hidroxiapatita (HA) e o β -tricálcio fosfato (β -TCP). Ambos podem ser associados em variadas proporções conforme a necessidade de prevalência de suas propriedades individuais. Os biovidro, por sua vez, são a base de sílica e são conhecidos por sua biocompatibilidade (BUSER, 2010). Entre os polímeros, o poli(ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA) foi o primeiro a ser empregado em suturas cirúrgicas reabsorvíveis devido a sua característica de degradação pelo organismo receptor sem provocar reações adversas. Atualmente, têm demonstrado boa aplicabilidade clínica sob a forma de membranas para regeneração óssea guiada, bem como na elaboração de sistemas para incorporação e liberação de fármacos (MAKADIA; STEVEN, 2011; MOTTA; DUEK, 2006; SILVA et al., 2015).

2.2 POLÍMEROS

O PLGA é um copolímero reabsorvível fabricado a partir da combinação de dois polímeros em proporções que podem variar de acordo com o efeito desejado de sua aplicação. São eles o poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(ácido láctico) (PLA) que se unem por uma ligação éster e o produto de sua hidrólise gera subprodutos passíveis de eliminação através do ciclo de Krebs sob a forma de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). Além disso, possui capacidade de assumir variados formatos de acordo com o protocolo de fabricação escolhido, sendo possível também a incorporação e a liberação controlada de substâncias de acordo com os objetivos de sua aplicação (BAO et al., 2011; MAKADIA; STEVEN, 2011).

O PGA, quando em maior quantidade na composição do copolímero, confere a ele um menor tempo de degradação devido a sua característica hidrofílica e, portanto, maior disponibilidade para hidrólise. Enquanto o PLA, hidrofóbico devido aos seus grupamentos laterais metila (CH_3 -), quando em maior quantidade permite menor absorção de água e, por consequência, aumenta o tempo de degradação do biomaterial. A possibilidade de variar a proporção de PGA e PLA no processo de

fabricação do PLGA confere a ele grande versatilidade, permitindo alcançar o perfil de liberação desejado do medicamento incorporado (FREIBERG; ZHU, 2004; MAKADIA; STEVEN, 2011; QI et al., 2018; SILVA et al., 2015).

O PLGA tem sido utilizado na área médica regenerativa sob o formato de microesferas para compor um sistema osteocondutor, servindo como uma ampla matriz de suporte para aderência e proliferação celular; contudo, não apresenta bioatividade intrínseca para osteoindução. Sendo assim, torna-se necessário associar ao PLGA substâncias indutoras da reparação óssea que serão liberadas no local alvo à medida que o copolímero é degradado pelo organismo (BAO et al., 2011; LÄNSMAN et al., 2006; MAKADIA; STEVEN, 2011; NATH et al., 2013).

2.3 SINVASTATINA

As estatinas, medicamentos normalmente utilizados para o tratamento da hipercolesterolemia, vêm sendo alvo de estudos na área da regeneração óssea devido ao seu potencial osteoindutor (GARRETT; GUTIERREZ; MUNDY, 2001; MUNDY et al., 1999). Seu mecanismo de ação consiste em inibir a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA), bloqueando a conversão do HMG-CoA em mevalonato e impedindo, assim, a síntese do colesterol hepático (GARRETT; GUTIERREZ; MUNDY, 2001).

Mundy *et al.* (1999), em estudo *in vitro* onde a calvária de camundongos foi exposta a estatinas em cultura por explante, descreveram a atuação desse fármaco sobre o tecido ósseo. Nesse estudo foi observado que o tratamento com estatinas provocou um aumento de 2 à 3 vezes na neoformação óssea. Esses achados podem ser comparados ao tratamento com proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP-2) e com fator de crescimento de fibroblasto-1 (FGF-1). Além disso, foi observado um elevado número de células osteoblásticas em todos os estágios de diferenciação. Em estudo *in vivo*, Mundy *et al.* (1999) observou um aumento quase 50% na neoformação óssea após injeção subcutânea de estatinas (lovastatina e sinvastatina) na calota craniana de roedores, resultado que pôde, novamente, ser comparado ao obtido com o tratamento com BMP-2 e FGF-1.

Estudos subsequentes demonstraram o aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP), da expressão de BMP-2, sialoproteína óssea, osteocalcina e de colágeno tipo I em osteoblastos (BAEK et al., 2005; MAEDA et al., 2004; SONG et al.,

2003). A sinvastatina também apresentou efeito angiogênico por meio do aumento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003), efeito anti-inflamatório pela diminuição da produção de interleucina-6 e interleucina-8 (SAKODA et al., 2006), além de suprimir a atividade osteoclástica (YAMASHITA et al., 2010).

Tendo em vista os resultados osteoindutores promissores, Wu et al. (2008) utilizaram um sistema de liberação de PLGA associado a sinvastatina em alvéolos pós extração de incisivos inferiores de ratos. Os resultados mostraram que a sinvastatina promoveu a manutenção da altura do rebordo bem como maior qualidade e taxa de formação ósseas quando comparadas ao controle. Ferreira et al. (2014) utilizaram microesferas de PLGA com 2,5% de sinvastatina encapsulada em defeitos ósseos críticos (5mm de diâmetro) na calota craniana de ratos e observaram que o fármaco promoveu melhor reparação do defeito e que a matriz óssea mostrou-se mais organizada e madura quando comparada ao grupo que permaneceu apenas com o coágulo. Terukina et al. (2016) preencheu defeitos ósseos críticos na calvária de ratos com micro e nanoesferas de PLGA com sinvastatina. Os resultados mostraram que as nanoesferas liberaram sinvastatina por 5 dias, enquanto as microesferas obtiveram uma liberação sustentada por 4 semanas e induziram a proliferação de células pré-osteoblásticas.

2.4 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Devido aos resultados promissores dos estudos *in vitro* e *in vivo* obtidos com arcabouços de PLGA associados à sinvastatina para reparação óssea e frente à preocupação de manter o ambiente asséptico durante todas as etapas de confecção desse biomaterial, faz-se necessário encontrar um método de esterilização que não interfira nas propriedades físicas, químicas e biológicas desse biomaterial. Os diversos métodos de esterilização disponíveis podem ser divididos de acordo com a sua natureza em métodos físicos, químicos e físicos e químicos. Os meios físicos abrangem o calor seco, o vapor saturado sob pressão e a radiação. Tanto o calor seco das estufas quanto o calor úmido das autoclaves necessitam de temperaturas acima de 120°C para exercer seu poder esterilizante. Entretanto, devido à baixa temperatura de transição vítrea (54 - 60°C) do PLGA (82:18), métodos que utilizam altas temperaturas tornam-se inviáveis por favorecer a sua degradação e instabilidade

(ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; QI et al., 2018; RUTALA; WEBER, 2019). A radiação do tipo gama apresenta boa capacidade de penetração nos produtos e não necessita do aumento da temperatura para desempenhar seu poder esterilizante. No entanto, o alto custo para sua realização representa uma desvantagem desse processo de esterilização (MONTANARI et al., 1998). Os meios químicos atuam a partir da imersão do material em soluções como o glutaraldeído; todavia, a degradabilidade do PLGA em meio aquoso inviabiliza a utilização desses métodos. Os meios físicos e químicos utilizam elementos como o gás de óxido de etileno ou o vapor de formaldeído como agentes esterilizantes. Atuam em baixas temperaturas tornando-se uma opção viável para esterilização de produtos termosensíveis (RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998; RUTALA; WEBER, 2019).

2.4.1 Autoclave

A esterilização por autoclave é muito utilizada no ambiente hospitalar e laboratorial, devido ao seu baixo custo e praticidade (HAN et al., 2018; SASAKI et al., 2018; UGUZ et al., 2016). Esse método físico de esterilização é responsável pela inativação dos microrganismos por meio da elevação da temperatura (121°C), umidade e pressão (ARIAS et al., 2020; KURIBARA et al., 2012). Apesar de a autoclavação ser o método de escolha para a esterilização de instrumentais da área médica e odontológica (ARIAS et al., 2020), é um método que pode causar deterioração, corrosão e destruição de estruturas cristalinas; sendo, portanto, contraindicado para biomateriais sensíveis a altas temperaturas como polímeros (CUSTER; COYLE, 1970; HAN et al., 2018; SASAKI et al., 2018; VENDRELL; HAYDEN; TALOUMIS, 2002).

O processo físico de formação do vapor, chamado condensação, umedece e aquece o material, provocando a esterilização pela troca de calor, sendo a exposição ao vapor o principal mecanismo de ação desse método (GRAZIANO, 2003). A elevação das condições de temperatura e umidade dentro das autoclaves faz com que materiais de base orgânica sofram alterações morfológicas devido à expansão térmica, além de ter a capacidade de promover a hidrólise de polímeros, causando, portanto, a sua degradação (AHMED et al., 2013; KURIBARA et al., 2012; UGUZ et al., 2016). Isso foi observado por Ahmed *et al.* (2013) em membranas poliméricas que ao serem submetidas à esterilização por autoclave não resistiram às condições a que

foram submetidos e perderam a sua integridade estrutural. Em contrapartida, Abuhanoglu *et al.* (2014) afirmaram que a esterilização por autoclave não é capaz de induzir modificações no peso molecular de polímeros.

2.4.2 Óxido de Etileno

O óxido de etileno (C_2H_4O) é um gás incolor à temperatura ambiente que promove a esterilização pela alquilação das proteínas nucleares de células microbianas. Sua ligação irreversível com as bases nitrogenadas impedem a duplicação do material genético e, conseqüentemente, a multiplicação celular (TIPNIS; BURGESS, 2017). As principais vantagens desse método de esterilização é a sua ação esporicida em temperaturas relativamente baixas e o seu alto poder de penetração devido ao pequeno tamanho das suas moléculas (ALFA *et al.*, 1996; RIES; WEAVER; BEALS, 1996; RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998). Dispositivos sensíveis ao calor, à umidade ou a radiação, como materiais médico-hospitalares, materiais poliméricos, plástico termolábil e biomateriais podem ser submetidos à esterilização por óxido de etileno sem sofrer deformação ou ter sua degradação acelerada (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; LEROUGE; SIMMONS, 2012). O método permite ajustes dos parâmetros de acordo com a sensibilidade do material a ser esterilizado. Atua em uma baixa faixa de temperatura (30-60°C) quando comparado à esterilização por calor ou vapor seco e ainda, conta com alto poder de difusão e eficácia comprovada (RUTALA; WEBER, 1999).

Contudo, o óxido de etileno é um gás tóxico, inflamável, irritante para a superfície corpórea e explosivo na presença de oxigênio. Para amenizar os riscos, gases inertes como o dióxido de carbono (CO_2) podem ser associados ao óxido de etileno sem comprometer sua eficácia (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011). Durante o processo de esterilização, pode sofrer reação química com outras substâncias e originar subprodutos tóxicos que, por sua vez, podem ser absorvidos pelo produto que está sendo esterilizado e vir a comprometer a saúde de quem for manuseá-lo ou recebê-lo. Quando em contato com a água, por exemplo, origina o etilenoglicol e na presença de íons cloreto produz etilenocloridrina como subproduto. Por esse motivo, é extremamente importante que após o processo de esterilização os produtos sejam submetidos a aeração mecânica e ambiental para eliminação dos

resíduos de óxido de etileno e seus subprodutos (MENDES; BRANDÃO; SILVA, 2007).

Os produtos a serem esterilizados devem ser acondicionados em embalagens apropriadas que permitam a entrada e saída de óxido de etileno e umidade. O processo de esterilização por óxido de etileno é automático e inicia com uma parada pré-programada para uniformizar a umidade interna e a temperatura do produto. A umidade relativa de 20% a 80% é de extrema importância pois facilita a penetração do gás nas embalagens, aumentando o seu poder esterilizante. O processo segue com a injeção de nitrogênio para eliminar todo o oxigênio presente nos objetos. Em seguida, realiza-se o vácuo para retirada de bolsas de ar dos produtos e elevação da pressão para injeção do óxido de etileno. A concentração de gás recomendada para esterilização é de 500 a 1200mg/L, o tempo de exposição ao gás pode ser de 4 a 6 horas dependendo do tipo, densidade e volume do material. Após a esterilização, a bomba de vácuo é acionada para retirada do óxido de etileno. Uma nova etapa de vácuo é realizada para certificar a retirada de todo o gás. A partir disso, é injetado nitrogênio no interior da câmara e realizado outro ciclo de vácuo. Esse processo visa retirar o excesso do óxido de etileno com segurança, evitando seu contato com o oxigênio presente no ar. Inicia-se então a aeração mecânica no interior da câmara e os produtos, então, seguem para uma sala de aeração ambiental onde permanecem expostos a circulação de ar até que os resíduos tóxicos do gás alcancem níveis seguros de manuseio da equipe e utilização em pacientes (ANGERER; BADER; KRÄMER, 1998; LEROUGE; SIMMONS, 2012; RUTALA; WEBER, 1999).

Holy et al. (2001) verificaram que após a esterilização por óxido de etileno, arcabouços de PLGA (75:25) sofreram uma redução de 50% do seu volume inicial, sem apresentar alteração no peso molecular. Choi et al. (2001) observaram uma alteração na cristalinidade de microesferas de poli(L-ácido láctico) (PLLA) após a esterilização por óxido de etileno, levando a uma agregação excessiva que impossibilitaria a aplicação clínica. Apesar disso, não houve alteração de peso molecular. O mesmo foi relatado por Kohane et al. (2006) em um estudo piloto, onde a esterilização por óxido de etileno resultou na agregação de microesferas de PLGA em grandes massas, o que, posteriormente, pode ser evitado centrifugando-as em 0,25% (m:m) de sacarose e, em seguida, liofilizando-as. Para Moiola et al. (2006) a esterilização por óxido de etileno provocou mínimas alterações morfológicas em microesferas de PLGA (50:50) e não alterou a liberação do fator de crescimento de

fibroblastos (FGF) encapsulado, sugerindo que o óxido de etileno tem se mostrado uma boa escolha para esterilizar microesferas de PLGA.

Jeong et al. (2003) confeccionaram microesferas de PLGA com ácido retinóico encapsulado e concluíram que a esterilização por óxido de etileno a 37°C não afetou significativamente sua morfologia e taxa de liberação do fármaco. Dormer et al. (2013) verificaram que a exposição de microesferas de PLGA (50:50) ao óxido de etileno não alterou a temperatura de transição vítrea do polímero nem a quantidade de proteína liberada a partir das microesferas. Entretanto, ao estudar a influência do método de esterilização na liberação de vancomicina em compósitos de PLGA, Hsiao et al. (2012) verificaram que a quantidade total de antibiótico liberado foi menor quando comparada aos compósitos não esterilizados, sugerindo que o antibiótico pode ter sofrido desativação durante o processo com óxido de etileno.

2.4.3 Radiação Gama

Os raios gama (γ) são um tipo de radiação eletromagnética produzida através do decaimento nuclear de átomos instáveis. São altamente energéticos devido à sua elevada frequência e, conseqüente, baixo comprimento de onda, e possuem elevado poder de penetração na matéria (LIMA, 2014). Devido à sua alta energia, é capaz de remover elétrons ao colidir com outros átomos, motivo pelo qual faz parte do grupo das radiações ionizantes. A radiação gama emitida a partir do decaimento de átomos de Cobalto-60 (^{60}Co) são comumente utilizadas para esterilização de materiais médicos (AQUINO, 2012).

A esterilização através de radiação gama é capaz de eliminar todas as formas de microrganismos, não emite gases e resíduos químicos (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013) e seu processo pode ser efetuado em condições de baixa temperatura e pressão (HAN et al., 2018). A inativação dos microrganismos com os quais a radiação gama entra em contato pode ocorrer por um mecanismo direto através da quebra de cadeias de DNA (RYDBERG, 1996) ou RNA (BLANCO et al., 2018) dos patógenos, ou por um mecanismo indireto, quando a energia é transferida para moléculas de água, formando radicais livres que impedem a reprodução microbiana (DA SILVA; DA SILVA; AQUINO, 2014).

Cada material a ser irradiado com objetivo de esterilização possui uma dose máxima aceitável de radiação a ser recebida, por isso é necessário conhecer suas

propriedades físicas e químicas, visto que podem ocorrer modificações na morfologia, cristalinidade e taxa de degradação interferindo, por consequência, no mecanismo e na taxa de liberação de fármacos (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013; PREEM et al., 2019). Em estudos de liberação com microesferas de PLGA foi observado que quanto maior a dose de radiação aplicada para esterilização maior foi a quantidade de substância ativa liberada (CALIS et al., 2002).

A medida gray (Gy) é comumente utilizada para medir a quantidade de exposição à radiação, assim como o rad, sendo que 1 Gy corresponde a 100 rads. A aplicação de radiação é classificada em doses baixas quando menores que 1kGy, doses médias quando de 1 a 10 kGy e doses altas quando maiores que 10 kGy. Como regra geral, proposta pela Organização Internacional de Padronização (ISO) para dispositivos médicos e tecidos biológicos, tem-se utilizados doses mínimas de 25 kGy (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013). Hu et al. (2014) sugerem que a dose de radiação de 25kGy é capaz de esterilizar de forma eficaz os microrganismos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* os efeitos da esterilização por óxido de etileno e por raios gama nas propriedades físicas, químicas e biológicas de microesferas a base de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) incorporando sinvastatina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a composição e estrutura química de microesferas a base de PLGA incorporando sinvastatina submetidas a diferentes métodos de esterilização.
- b) Analisar a morfologia de superfície de microesferas a base de PLGA incorporando sinvastatina submetidas a diferentes métodos de esterilização.
- c) Determinar a influência de diferentes métodos de esterilização na biocompatibilidade de microesferas a base de PLGA incorporando sinvastatina.

4 ARTIGO

THE INFLUENCE OF STERILIZATION METHODS ON PHYSICAL, CHEMICAL, AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)-BASED MICROSPHERE

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Curityba Biotech® for providing mesenchymal stromal cells from human exfoliated deciduous teeth. Authors appreciate the support from the Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), Laboratório Interdisciplinar para o desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN), and Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) for providing the infrastructure to perform some experimental analyses. The authors also thank the Serviço de Esterilização do Hospital Universitário da UFSC and Centro de Tecnologia das Radiações (CETER) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo (USP) for samples sterilization. The authors are grateful to Prof. Dr. Angela Machado de Campos for her assistance in the fabrication of the microspheres.

Abstract

Synthetic polymers have emerged as prominent bone substitutes due to their versatility, availability, and low morbidity to the patient. However, one of the requirements in the manufacturing process of biomaterials is the condition of sterility. Therefore, in addition to rigorous control during synthesis, an effective sterilization procedure that minimally alters the physical, chemical, and biological properties of the biomaterial is necessary. This study aimed to investigate *in vitro* the influence of sterilization methods on the physical, chemical, and biological properties of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, with or without 2% simvastatin (SIM) incorporation. PLGA and PLGA+2%SIM microspheres were synthesized using the emulsion and solvent evaporation method. The samples designated for sterilization were identified according to the following groups: Autoclaving, Ethylene oxide, and Gamma radiation. The control group received no treatment. Scanning electron microscopy (SEM) was used to analyze the morphology of the microspheres, while energy dispersive spectroscopy (EDS) was employed to determine and quantify the chemical elements in the sample compositions. Additionally, the chemical structure of the samples was analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and evaluated through X-ray diffraction (XRD). The cytotoxicity of the biomaterials was analyzed using stromal cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) with the MTT colorimetric test on days 1 and 7. Gamma radiation did not promote changes in the microsphere shape and surface, as well as surface chemical composition. According to FTIR, gamma radiation and ethylene oxide altered the microsphere chemical composition. Conversely, gamma radiation and ethylene oxide did not alter the amorphous characteristic of the microspheres. Concerning the biocompatibility, gamma radiation induced the highest cellular viability for microspheres incorporating simvastatin, while ethylene oxide and autoclave led to a cytotoxicity behaviour. In conclusion, gamma radiation was the method that promoted least alteration on the physical, chemical, and biological properties of PLGA-based microspheres.

Keywords: Sterilization; Polymers; Simvastatin; Biomaterials; Tissue engineering.

INTRODUCTION

Synthetic bone substitutes have been an important target of research in bone tissue regeneration due to their versatility and high availability resulted from the possibility of controlling their composition and large-scale production, respectively [1]. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a synthetic, biocompatible, and non-toxic copolymer formed by the copolymerization of lactic acid and glycolic acid monomers [2, 3]. Physical and mechanical PLGA properties facilitate adhesion and cell proliferation, demonstrating osteoconductive potential [4]. Due to the possibility of controlling its degradation rate, the use of PLGA in clinical applications has grown in recent years as a device for controlled drug release [4]. Therefore, PLGA microspheres can encapsulate and locally release hydrophobic or hydrophilic drugs in a controlled release system. As a result, the incorporation of drugs represents a possibility to associate the polymer with factors that induce osteogenesis, giving the system an osteoinductive profile [5, 6].

Statins, often applied to regulate endogenous cholesterol levels [7] have been extensively studied due to their pleiotropic effects, such as angiogenic [8–10], immunomodulatory [11], and anti-inflammatory properties [12, 13]. Furthermore, the osteoinductive potential of statins such as simvastatin (SIM) has been reported for promoting osteogenic differentiation [7, 14, 15], as well as the capacity for inhibiting bone resorption [8]. The local application of SIM has been related to the increase the osteogenesis [7, 16, 17]. However, *in-site* applications require a suitable carrier to allow controlled drug release, thus preventing burst release and drug degradation [4]. The PLGA-based microspheres encapsulating SIM has been shown to improve bone formation in critical size defects with different animal models [16, 18, 19].

In terms of biomaterials for bone regeneration, one essential aspect is the sterilization condition to avoid contamination. Therefore, despite promising results from *in vitro* and *in vivo* research, studies need to clearly report the sterilization method used for the biomaterial synthesized and used. As a result, the clinical use of these biomaterials is unfeasible until a suitable sterilization method is found because, in addition to the sterility of the biomaterial, it is necessary that the method of choice does not produce changes that compromise its final performance. Therefore, this study investigated the possible changes caused by different sterilization methods in PLGA microspheres incorporating simvastatin, in order to enable their clinical use in bone regeneration.

MATERIAL AND METHODS

Microspheres synthesis

As depicted in Figure 1, the microspheres were produced using oil-in-water emulsion and solvent evaporation technique [20] in a laminar flow cabinet to avoid microbial contamination. Initially, a 1% polyvinyl alcohol (PVA) solution was prepared (external phase). Then, a solution containing 2.5% (m/v) poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA, 82:18 Resomer® LG 824S, Evonik, Germany) in dichloromethane (Emsure, Merck, Germany) was produced. Subsequently, 2% (m/m) simvastatin (SIM, HPLC, M= 418.57, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added do the PLGA solution (internal phase). After total dissolution (30 minutes) of both solutions, the internal phase was emulsified by dripping in external phase, under vigorous stirring in a magnetic stirrer at room temperature. The mixtures were kept overnight under constant agitation for complete evaporation of the solvent. Then, the agitation was suspended until all microspheres were decanted (30 minutes) and the liquid phase (PVA) were removed by vacuum pump. The washing process, to eliminate PVA, consisting of MiliQ water addition, agitation (10 minutes), and decantation (30 minutes) were repeated three times. Subsequently, the microspheres were dry by overnight evaporation.

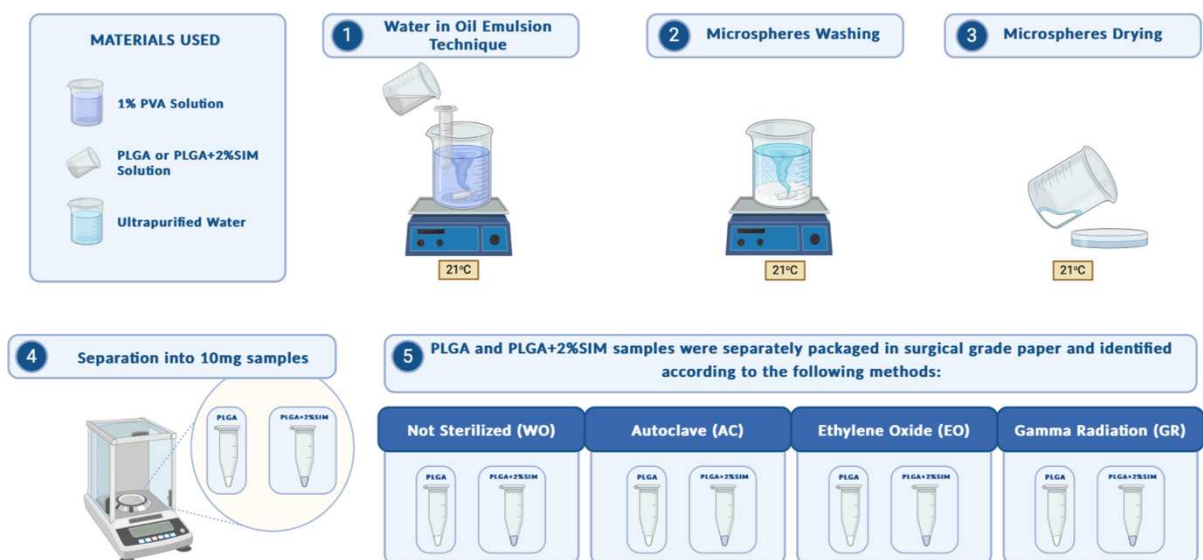


Fig. 1: Microspheres synthesis. Representative image of the microsphere synthesis. Created with BioRender.com

Sterilization methods

The microspheres were separated according to their groups and portioned into 10mg in perforated microtubes, packed in surgical grade paper and sent for sterilization.

Then, the samples received the following classifications: PLGA – PLGA microspheres; and PLGA+2%SIM – PLGA microspheres with 2% simvastatin. Additionally, as depicted in Figure 1, the samples were identified according to the following methods: AC – autoclave; EO – ethylene oxide; and GR – gamma radiation. Sterilization by autoclaving was added to the test groups as a way of evaluating the deleterious effects already expected from this process due to its high temperature and humidity parameters that are known to cause changes in the PLGA. PLGA and PLGA+2%SIM samples that, immediately after their synthesis, were packaged and kept in a sterile environment until its use and were not directed to any sterilization method received the identification as WO - untreated.

Autoclave sterilization was added to prove the deleterious effects of this method on PLGA-based polymeric biomaterials. The autoclaving process occurred under 121°C temperature and 1ATM pressure for 30 minutes at the Sterilization Center of the Dentistry Department of Federal University of Santa Catarina. Ethylene oxide sterilization was performed through the Sterilization Service of the University Hospital of Federal University of Santa Catarina (Sterilab®, Pinhais, Paraná, Brazil). Samples subjected to ethylene oxide received concentrations ranged to 550 from 900mg/L, for 3 hours, at an average temperature of 55°C and humidity between 40 and 90% (Sercon®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). After sterilization, the samples underwent mechanical aeration with twelve pulses of compressed air within the equipment followed by environmental aeration for 1 hour to eliminate the residues generated by the process. In turn, the samples designated for gamma radiation were sent for Radiation Technology Center (CETER) of Institute for Energy and Nuclear Research (IPEN) of São Paulo University (USP). Sterilization was carried out using a Cobalto-60 (^{60}Co) source using 18kGy at a rate of 2kGy/h.

Scanning electron microscopy (SEM)

Three samples (n = 3) of each group (PLGA and PLGA+2%SIM) without (WO) and with treatment (AC, EO, GR), were sent to Central Electronic Microscopy Laboratory (LCME) for surface topography analysis. The samples were metalized with gold and examined using a high-resolution scanning electron microscope (JEOL JSM-6390 LV, Massachusetts, USA) operating at 10 kV. Records were obtained at magnifications of x50, x200, x500, and x1000.

Energy dispersive spectroscopy (EDS)

For the qualitative analysis of the surface chemical composition of the samples, energy dispersive spectroscopy (EDS) was performed at x500 magnification using three samples of each group ($n = 3$). The central portion of microspheres was selected using the high-resolution scanning electron microscope (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope, Massachusetts, USA).

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The absorption spectrum in the infrared region was recorded using an FTIR spectrophotometer (Agilent, model Cary 660, Melbourne, Australia). The samples ($n = 3$) were mixed with potassium bromide and pressed into tablets. For each sample, an average of 32 scans was taken, within a range of 4000 to 400 cm^{-1} and a resolution of 4 cm^{-1} .

X-Ray diffraction (XRD)

Diffraction patterns were obtained at room temperature ($\sim 21^\circ\text{C}$) using an X-ray diffractometer (MiniFlex600, Rigaku, Texas, USA) equipped with a D/teX Ultra detector and a copper source, operating at 40kV and 15mA. The samples ($n = 3$) were analyzed in a range of 5 to 90° (2θ) with a step-size of 0.05° and a speed of 10°/min.

Cellular viability

To determine the biocompatibility of the samples according to ISO 10993: 5 [21], the MTT colorimetric test (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) was employed [22]. Mesenchymal stromal cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED; Curytiba Biotech® Cell Processing Center, Curitiba, Brazil) were cultivated with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Massachusetts, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Massachusetts, USA) at passage 4 to 6. Therefore, using 96-well plates, 2.0×10^4 cells were seeded per well in quadruplicate and cultured at 37 °C and 5% CO_2 . Since the experiments were performed in triplicate, $n = 12$ for each evaluated group [23]. After 24 hours, the samples were added to the plate wells, except for the cellular control group, which did not receive any biomaterial. The experimental periods for analyzing were 1 and 7 days. Then, the samples and culture medium were carefully removed. Cells were exposed to 1mg/mL MTT and incubated for 4h at 37°C. Subsequently, formazan crystals were solubilized using

dimethyl sulfoxide (DMSO; Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil). Absorbances were measured at 540/630 nm (Infinite M200, TECAN, Salzburg, Austria). Cellular viability percentages were calculated comparing to the cellular control group.

Statistical analysis

The experiments were carried out in a minimum of triplicate. Dot plots display the data obtained from all distinct experiments, depicting the median. Analytical methodologies were conducted using GraphPad Prism version 8 (San Diego, California, USA). Statistical assessments encompassed the one-way ANOVA test followed by the Tukey post-test ($p < 0.05$).

RESULTS

Gama radiation did not promoted changes in the microsphere shape and surface

As depicted in Figure 2, microspheres of PLGA and PLGA+2%SIM not submitted to sterilization process showed a spherical shape with a surface free of cracks, and a smooth surface with few changes resulting from the manufacturing process in a small portion of the sample (orange arrows). Conversely, the autoclave method, as expected, induced changes in the spherical shape to an irregular shape, and numerous surface changes with an irregular pattern, both for PLGA and PLGA+2%SIM. The sterilization using ethylene oxide promoted changes in a concave circular pattern on the surface of some microspheres (purple arrows) not related to the presence of simvastatin. The GR microspheres did not show changes in their shape and surface.

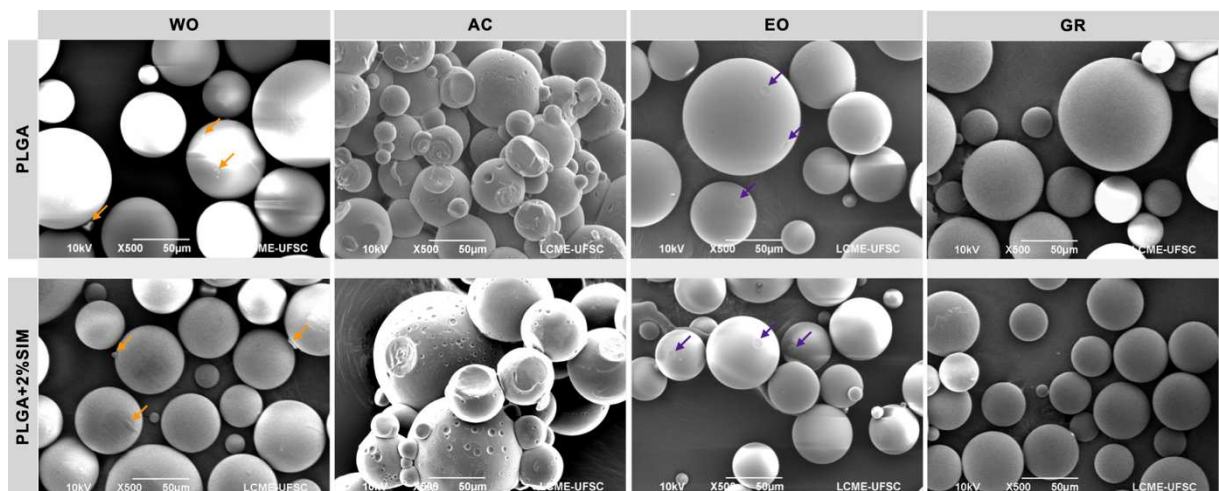


Fig. 2: Representative images of surface topography characteristics of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere without and with simvastatin (PLGA+2%SIM) evidenced by scanning electron microscopy. Non-sterilized (WO); Autoclave (AC); Ethylene oxide (EO); Gamma radiation (GR). WO resulted in microspheres with spherical shape and a smooth surface with few changes resulting from the manufacturing process in a small portion of the sample (orange arrows). AC induced an irregular shape and numerous surface changes with an irregular pattern. EO promoted changes in a concave circular pattern on the surface of some microspheres (purple arrows). GR did not promoted changes in the microspheres.

Gama radiation did not promoted changes in the surface chemical composition

As demonstrated in Figure 3, microspheres, regardless of the sterilization method, were essentially composed of carbon and oxygen elements. Additionally, the sterilization methods did not alter the oxygen content. Conversely, the ethylene oxide method slight increased the presence of the carbon element both for microspheres with and without simvastatin. Gama radiation and autoclave did not alter the microsphere chemical composition.

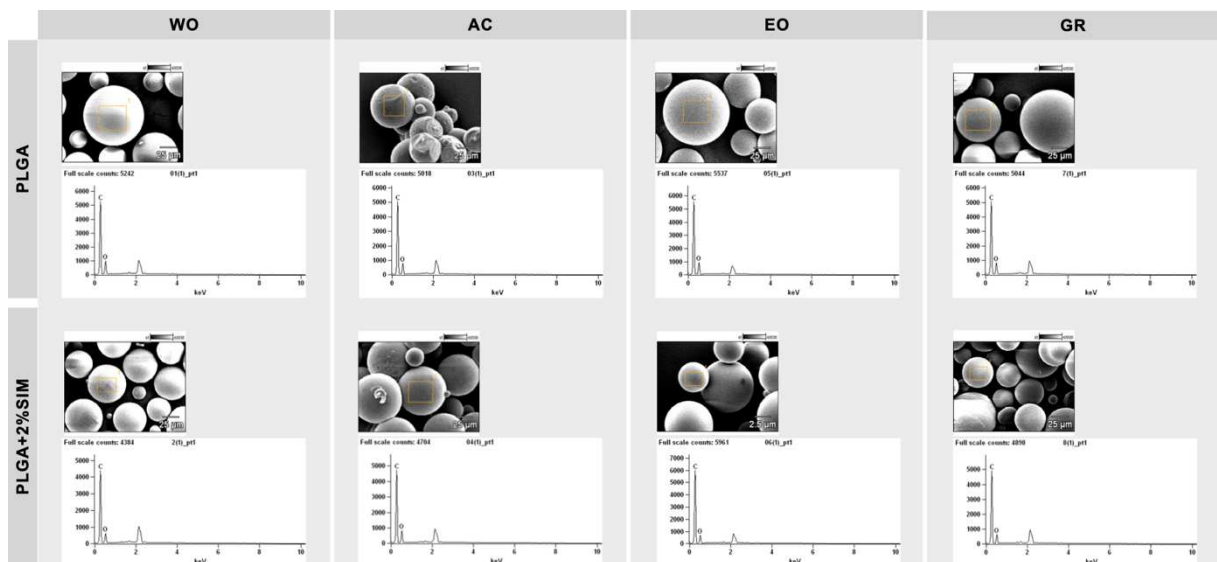


Fig. 3: Representative images of surface chemical composition of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere without and with simvastatin (PLGA+2%SIM) evidenced by energy dispersive spectroscopy. Non-sterilized (WO); Autoclave (AC); Ethylene oxide (EO);Gamma radiation (GR).

Gamma radiation and ethylene oxide altered the chemical composition

Figure 4 shows the FTIR spectrum concerns the absorption bands characteristic of the microspheres functional groups. PLGA microspheres showed peaks corresponding to the following stretching groups: O-H ($3420 - 3500\text{cm}^{-1}$), -CH, -CH₂ and -CH₃ (2930cm^{-1}), C=O ($1730 - 1600\text{cm}^{-1}$) and C-O (1002cm^{-1}). Additionally, for PLGA+2%SIM, the peaks correspond to the stretching groups: O-H (3450cm^{-1}), C-H (2920cm^{-1}), C=O ($1740 - 1600\text{cm}^{-1}$) and C-O (1010cm^{-1}). In all graphs, it is possible to notice a greater variation in the transmittance of the sterilized groups (blue line) compared to the non-sterilized groups (black line). Autoclave sterilization did not cause changes in the chemical bonds of both PLGA and PLGA+2%SIM microspheres. Conversely, ethylene oxide and gamma radiation methods intensified the transmittance peaks of the C=O and C-O stretches, suggesting that these methods chemically altered the biomaterial.

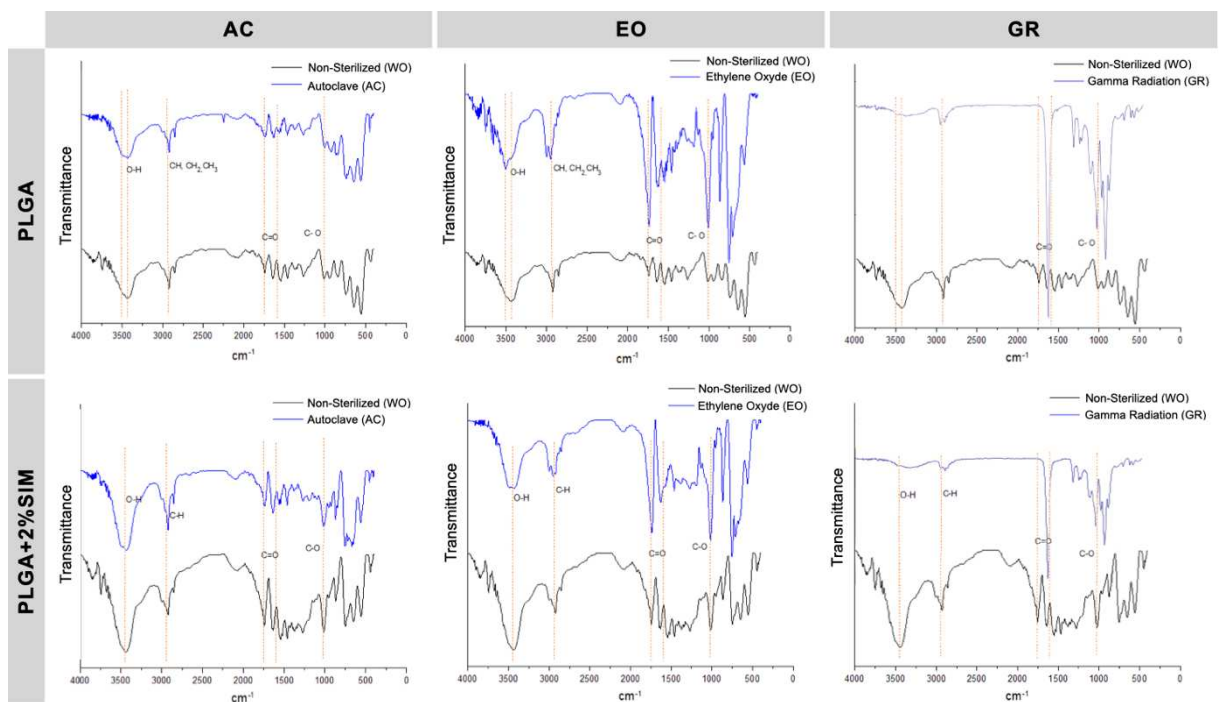


Fig. 4: Representative images of Fourier transform infrared spectroscopy graphs of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere without and with simvastatin (PLGA+2%SIM).

Gamma radiation and ethylene oxide did not alter the amorphous characteristic PLGA and PLGA+2%SIM microspheres presented an amorphous pattern without sterilization as well as with ethylene oxide and gamma radiation, indicating that the temperature and pressure parameters used in both methods did not alter the

microspheres amorphous characteristic. Furthermore, it is possible to observe that even the microspheres with simvastatin, a substance known to have a crystalline character [24, 25], presented an amorphous character. This behavior suggests simvastatin was completely encapsulated into the microsphere. As expected, the autoclave method promoted changes both in PLGA and PLGA+2%SIM microspheres due to the intensity peaks indicating the crystallinity of the material (Figure 5).

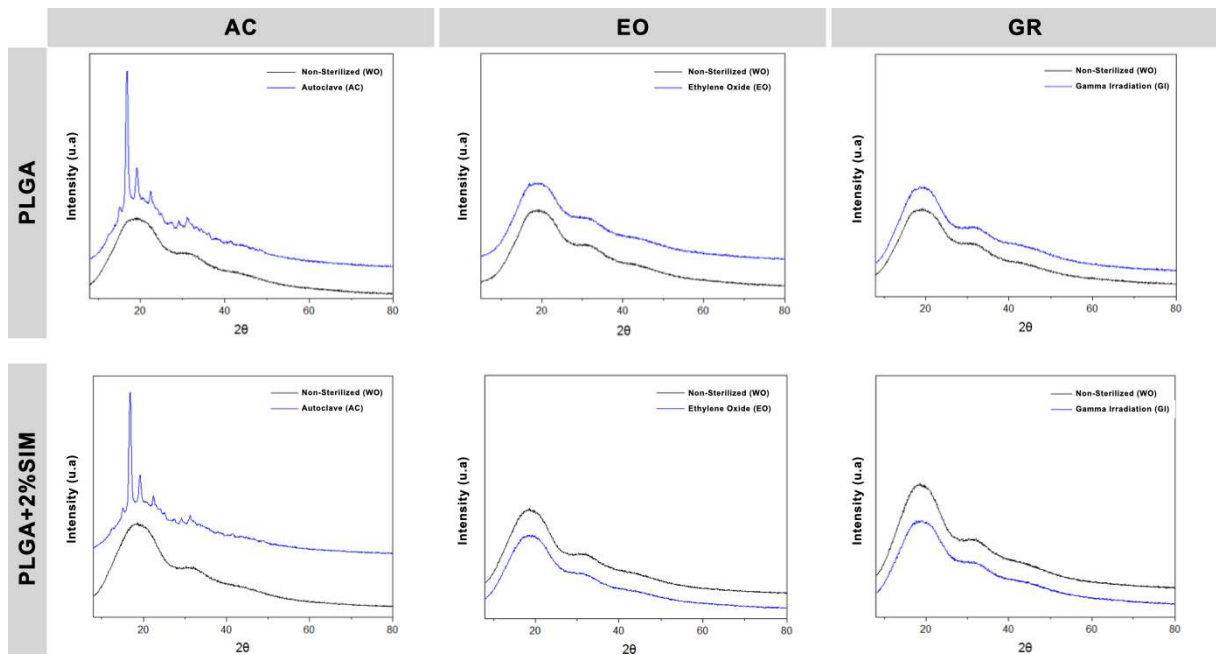


Fig. 5: Representative images of x-ray diffraction of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere without and with simvastatin (PLGA+2%SIM).

Gamma radiation led to a more biocompatible behaviour of microspheres incorporating simvastatin

The cellular viability of SHED exposed to PLGA and PLGA+2%SIM microspheres without sterilization and treated with autoclave, ethylene oxide, and gamma radiation are shown in Figure 6. SHED viability was greater than 70% when exposed to all PLGA microspheres on days 1 and 7, meaning that PLGA samples were not cytotoxic. Additionally, all PLGA+2%SIM samples were also biocompatible on day 1. Conversely, when SHED were exposed to the microspheres incorporating simvastatin for a longer period (day 7), autoclave and ethylene oxide sterilization induced a cytotoxicity behaviour. On the other hand, gamma radiation promoted the highest SHED viabilities for microspheres incorporating simvastatin, similar to microspheres without sterilization ($p = 0.4144$) and cellular control ($p = 0.7240$).

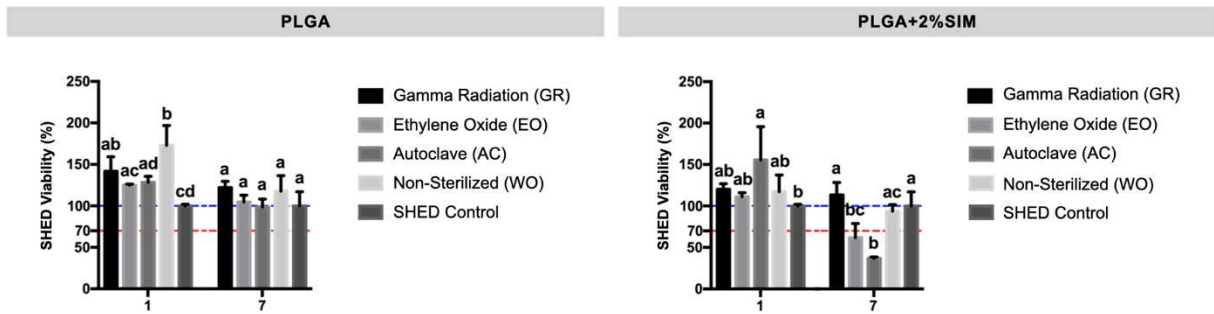


Fig. 6: Cellular viability of stromal cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) exposed to poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere without and with simvastatin (PLGA+2%SIM) on days 1 and 7. Different lowercase letters on the bars represent a statistically significant difference (one-way ANOVA / Tukey post-test, $p < 0.05$) among groups at the same experimental time. Non-sterilized (WO); Autoclave (AC); Ethylene oxide (EO); Gamma radiation (GR).

DISCUSSION

The association of SIM with bioresorbable polymeric materials has demonstrated efficacy in the repair of bone defects *in vivo*. However, there are still few studies regarding the influence of sterilization on PLGA microspheres associated with pharmacological substances behavior. Depending on the chemical composition of the biomaterial, sterilization methods have been reported to induce changes in biomaterial properties. Therefore, finding a method that guarantees its sterility without altering the effectiveness, without leaving toxic residues and without causing an inflammatory response is essential to continue with clinical research. The results obtained from the present study are important to clarify the sterilization effects on PLGA incorporating SIM biomaterials and enable its application in bone regeneration.

SEM analysis of samples physical structure revealed that the PLGA microspheres (82L:18G) with or without simvastatin maintained their spherical shape and free porosities after sterilization with ethylene oxide at 55°C for 180min and gamma radiation at a dose of radiation of 18kGy (2kGy/h). Previous studies also obtained similar results regarding the maintenance of the physical properties of PLGA biomaterials after sterilization by ethylene oxide [26, 27], and gamma radiation [28]. Small surface changes in a concave circular shape observed in the present study after microspheres exposure to ethylene oxide were possibly due to contact between the microspheres and not due to surface degradation. Moiola et al., (2006) [29] also

observed that minimal morphological changes on PLGA microspheres (50:50) after sterilization by ethylene oxide did not compromise the drug release rate. Dhal and Mishra (2020) [27] sterilized PLGA membranes with encapsulated gentamicin with ethylene oxide at 37°C for 100min and observed by SEM analysis a surface uniformity and absence of imperfections. The *in vivo* results showed that the membrane facilitated the growth of fibroblasts, anticipating the repair of the surgical incision without causing an inflammatory response. However, some studies observed agglomeration and an increase in the degradation rate of the microspheres due to the temperature used in the process of ethylene oxide sterilization and suggests that this may occur due to the increase in pressure during the sterilization process [30].

PLGA and PLGA+2%SIM samples sterilized by autoclave, as expected, showed the greatest changes at microspheres spherical shape as well as numerous surface irregularities. This was observed by Ahmed et al. (2013) in polyurethane membranes that, when subjected to autoclave sterilization, did not resist the conditions to which they were subjected and lost their structural integrity. In contrast, Abuhanoglu et al. (2014) stated that autoclave sterilization is not capable of inducing changes in the molecular weight of polymers.

The EDS revealed that the microspheres are formed by carbon and oxygen. PLGA is composed of carbon, oxygen and hydrogen, just like SIM. The presence of these two elements in PLGA microspheres is in accordance with the literature [31]. The hydrogen element cannot be visualized using the EDS as the equipment does not detect chemical elements with an atomic number lower than 5. In this study, sterilization by autoclave and gamma radiation did not cause changes in the chemical composition of PLGA and PLGA+2%SIM microspheres. However, there was an increase in carbon after sterilization by ethylene oxide and this may be associated with the alkylating power of the gas, suggesting that it left residues in the biomaterial. Ethylene oxide is capable of promoting reactions that add hydroxyethyl ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) to functional groups such as hydroxyl (-OH), present in the PLGA and SIM molecule [32]. However, repeating the experiment is necessary to confirm the results.

In the FTIR analysis, the characteristic absorption bands of the functional groups present in the PLGA copolymer could be observed at 2930cm^{-1} , $1730 - 1600\text{cm}^{-1}$ and peaks at 1002cm^{-1} . These spectra agree with data described in the literature for PLGA [4, 33, 34]. The presence of peaks in the range 3420 and 3500cm^{-1} , was also observed in PLGA samples [3, 24, 25]. In the analysis of the microspheres of PLGA+2%SIM,

absorption bands were observed at 3450cm^{-1} , at 2920cm^{-1} and peaks in the range of $1740 - 1600\text{cm}^{-1}$. According to FTIR spectra of SIM found in the literature, the last two peaks are characteristic of the drug, suggesting that SIM was incorporated into the copolymer [3, 24, 25].

Saalman (1985) [35] sterilized polyethylene and poly(vinyl chloride) with ethylene oxide and used FTIR to evaluate the presence of gas residues. The materials did not undergo an aeration period and the presence of ethylene oxide was detectable at 870cm^{-1} and 866cm^{-1} . In contrast, Friess and Schlapp (2006) [30], when sterilizing PLGA microspheres (50:50) at 32°C for 6 h, using ethylene oxide associated with carbon dioxide (15:85), found no significant differences between the spectra before and after sterilization. Furthermore, according to the authors, the difference in the transmittance of some peaks is related to the viscosity of the polymeric solutions. In the present study, peaks were observed at 863cm^{-1} and 867cm^{-1} for PLGA and PLGA+2%SIM, respectively. These peaks are compatible with C-H bonds and suggest the presence of ethylene oxide residues in the samples, which corroborates the increase in carbon found in the EDS analysis.

In the present study, sterilization by gamma radiation intensified the transmittance peaks of the C=O and C-O sections. Ahmed et al. (2013) [36], when exposing polyurethane membranes to gamma irradiation, also observed changes in the infrared spectrum, and reported significant reductions in peak intensity at 1245, 1540 and 1740cm^{-1} in samples and an increase in peak intensity at 1095cm^{-1} . In contrast, Keles et al. (2014) [37] observed no noticeable change in infrared spectra after gamma radiation sterilization of PLGA or PLA microparticles. Therefore, it is necessary to repeat the experiment to guarantee the reproducibility of the data.

According to Ratner, Schoen and Lemons (1996) [38], PLA presents irregularities in its polymer chain that are characteristic of an amorphous polymer. In contrast, PGA is highly crystalline but its crystallinity disappears significantly when combined with PLA. According to the literature, the PLGA copolymer with less than 85% PGA is in amorphous form [39]. The results of XRD analysis of PLGA microspheres with and without SIM of non-sterile, ethylene oxide and gamma radiation groups, proved to be amorphous biomaterial, agreeing with the data described above. The use of PLGA in the amorphous state is preferable as it allows the homogeneous dispersion of SIM in the polymeric matrix [2].

The crystalline structure of SIM, when observed through XRD, gives rise to several peaks due to the different diffraction angles of the molecule [25]. The absence of these peaks after association with PLGA was also observed in other studies that suggest the probable incorporation of the drug into the polymer [24, 25, 40].

An amorphous polymer can go from the glassy state to the rubbery state when it exceeds its glass transition temperature (T_g). Above T_g , the thermal movement that polymer chains acquire leads to the formation of stable ordered regions, making the polymer potentially crystallizable [41]. According to Motta and Duek (2006) [4], the T_g of PLGA 80:20, a ratio very close to that used in this study (82:18), is 57°C. At the present study, the copolymer maintained its amorphous nature after exposure to ethylene oxide or gamma radiation.

In the analysis of cell viability of SHED, all PLGA microspheres were not cytotoxic at both experimental times. The same result was found by Jeong et al. (2003) when performing the MTT test on malignant glioma cell lines, PLGA microspheres with encapsulated retinoic acid sterilized by ethylene oxide at 37°C for 220 min were not cytotoxic. According to Sahoo et al. (2002), the hydrophobic portion of PVA – emulsifier used in the synthesis of MPS – can remain associated with the surface of the spheres even after repeated washing, thus causing cytotoxicity. Another factor that could reduce cell viability over the days is the presence of residual dichloromethane and its release into the medium as the PLGA was hydrolyzed. Both conditions reported in the studies cited above possibly did not occur in the present study.

However, regarding the PLGA+2%SIM samples, all the groups were not cytotoxic on day 1, while, on day 7, there was a reduction in cell viability for the autoclaved and ethylene oxide groups. This reduction in viability is possibly related to the waste generated by the ethylene oxide sterilization process of microspheres and the numerous structural changes caused by autoclave sterilization. Furthermore, Ahmed et al. (2013) [36] sterilized polyurethane membranes by gamma radiation and observed that it had a cytotoxic effect when testing the viability of endothelial progenitor cells. On the other hand, at the present study, SHED maintained cell viability for longer when in contact with the PLGA+2%SIM group sterilized by gamma radiation, demonstrating that this method did not make the biomaterial cytotoxic.

In view of the information presented, it was possible to observe that the gamma radiation sterilization method proved to be effective for the sterilization of PLGA and PLGA+2%SIM microspheres, not resulting in a cytotoxic product and causing minimal

chemical changes that must be investigated in future studies to ensure the safety of the biomaterial for clinical application.

CONCLUSIONS

Based on the findings of this study, gamma radiation is the preferred sterilization method for PLGA-based microspheres incorporating simvastatin, as gamma radiation caused the least alteration in their physical, chemical, and biological properties. Further *in vitro* studies are necessary to evaluate the influence of sterilization methods on osteogenic process, along with additional *in vivo* studies.

References

1. Buser D (2010) 20 Anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia, 2nd ed. São Paulo
2. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM (1996) Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17:93–102. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85754-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85754-1)
3. Bao TQ, Hiep NT, Kim YH, et al (2011) Fabrication and characterization of porous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. *Journal of Materials Science* 46:2510–2517. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-5101-4>
4. Motta AC, Duek EAR (2006) Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria* 11:340–350. <https://doi.org/10.1590/s1517-70762006000300024>
5. Makadia HK, Siegel SJ (2011) Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 3:1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
6. Qi F, Wu J, Li H, Ma G (2018) Recent research and development of PLGA / PLA microspheres / nanoparticles : A review in scientific and industrial aspects. *Frontiers Of Chemical Science And Engineering* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1729-4>
7. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al (1999) Stimulation of Bone Formation In vitro and in Rodents by Statins. *Science* 286:1946–1949
8. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, et al (2010) Simvastatin inhibits osteoclast

- differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling. *Regulatory Peptides* 162:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.03.003>
9. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N (2003) Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 144:681–692. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220682>
 10. Grasser WA, Baumann AP, Petras SF, et al (2003) Regulation of osteoclast differentiation by statins. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* 3:53–62
 11. Machado WM, Munhoz ACM, Fernandes D (2011) Estatinas: efeitos pleiotrópicos. Statins: pleiotropic effects. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde* 17:141–150. <https://doi.org/10.5212/Publ.Biologicas.v.17i2.0008>
 12. Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, et al (2006) Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *Journal of Dental Research* 85:520–523. <https://doi.org/10.1177/154405910608500608>
 13. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, et al (2008) Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Endocrinology* 196:601–613. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0532>
 14. Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR (2001) Statins and Bone Formation. *Current Pharmaceutical Design* 7:715–736
 15. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, et al (2004) Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *Journal of cellular biochemistry* 92:458–471. <https://doi.org/10.1002/jcb.20074>
 16. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, et al (2014) 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*. <https://doi.org/10.1177/0885328214550897>
 17. Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H (2008) The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 37:170–176
 18. Naito Y, Terukina T, Galli S, et al (2014) The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria.

- International Journal of Pharmaceutics 461:157–162.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.046>
19. Terukina T, Naito Y, Tagami T, et al (2016) The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.03.005>
 20. Pinto NPJ (2017) Síntese, caracterização e liberação in vitro de sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA. Universidade Federal de Santa Catarina
 21. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2009) Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. 3:
 22. Sordi MB, Fredel MC, da Cruz ACC, et al (2022) Enhanced bone tissue regeneration with hydrogel-based scaffolds by embedding parathyroid hormone in mesoporous bioactive glass. *Clinical Oral Investigations* 27:125–137.
<https://doi.org/10.1007/s00784-022-04696-3>
 23. Sordi MB, Curtarelli RB, da Silva IT, et al (2021) Effect of dexamethasone as osteogenic supplementation in in vitro osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 32:1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06475-6>
 24. Nath SD, Son S, Sadiasa A, et al (2013) Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. *International Journal of Pharmaceutics* 443:87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.037>
 25. Masaeli R, Kashi TSJ, Dinarvand R, et al (2016) Preparation, Characterization and Evaluation of Drug Release Properties of Simvastatin-loaded PLGA Microspheres. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 15:205–211
 26. Jeong Y Il, Song JG, Kang SS, et al (2003) Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 259:79–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00207-2)
 27. Dhal C, Mishra R (2020) In vitro and in vivo evaluation of gentamicin sulphate-loaded PLGA nanoparticle-based film for the treatment of surgical site infection.

- Drug Delivery and Translational Research 10:1032–1043.
<https://doi.org/10.1007/s13346-020-00730-7>
28. Hsiao CY, Liu SJ, Wen-Neng Ueng S, Chan EC (2012) The influence of γ irradiation and ethylene oxide treatment on the release characteristics of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) composites. *Polymer Degradation and Stability* 97:715–720. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.02.015>
 29. Moiola EK, Hong L, Guardado J, et al (2006) Sustained release of TGF β 3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering* 12:537–546. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.537>
 30. Friess W, Schlapp M (2006) Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63:176–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.11.007>
 31. Khalil KA, Fouad H, Elsarnagawy T, Almajhdi FN (2013) Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications. *International Journal of Electrochemical Science* 8:3483–3493. [https://doi.org/10.1016/s1452-3981\(23\)14406-3](https://doi.org/10.1016/s1452-3981(23)14406-3)
 32. França R, Mbeh DA, Samani TD, et al (2013) The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jbmb.32964>
 33. Silva ATCR, Cardoso BCO, Silva MESR e, et al (2015) Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in vitro Degradation. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 6:8–19. <https://doi.org/10.4236/jbmb.2015.61002>
 34. D'Avila Carvalho Erbeta C (2012) Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 03:208–225. <https://doi.org/10.4236/jbmb.2012.32027>
 35. Saalman E (1985) Infrared spectroscopic study of polymers exposed to ethylene oxide. *Biomaterials* 6:225–230. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(85\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(85)90017-1)
 36. Ahmed M, Punshon G, Darbyshire A, Seifalian AM (2013) Effects of sterilization treatments on bulk and surface properties of nanocomposite biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*

- 101:1182–1190. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32928>
37. Keles H, Naylor A, Clegg F, Sammon C (2014) Studying the release of hGH from gamma-irradiated PLGA microparticles using ATR-FTIR imaging. *Vibrational Spectroscopy* 71:76–84. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2014.01.012>
 38. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (2013) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed. Elsevier
 39. Kumar V, Banker GS (1993) Chemically-modified cellulosic polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19:1–31. <https://doi.org/10.3109/03639049309038760>
 40. Qiao F, Zhang J, Wang J, et al (2017) Silk fibroin-coated PLGA dimpled microspheres for retarded release of simvastatin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 158:112–118. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.038>
 41. Cowie JMG (1991) *Polymers: chemistry & physics of modern materials*, 2nd ed. Nelson Thornes, London

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

AUTHORS CONTRIBUTION

All authors contributed to the conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by F.W., G.S.F., P.B., L.B.B., R.B.C., and A.C.C.C. The first draft of the manuscript was written by R.B.C and A.C.C.C., and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Not applicable.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados deste estudo, a radiação gama é o método de esterilização de escolha para microesferas à base de PLGA que incorporam sinvastatina, uma vez que a radiação gama causou a menor alteração nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Mais estudos *in vitro* são necessários para avaliar a influência dos métodos de esterilização no processo osteogênico, juntamente com estudos adicionais *in vivo*.

REFERÊNCIAS

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

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

ALFA, M. J. et al. Comparison of Ion Plasma, Vaporized Hydrogen Peroxide, and 100% Ethylene Oxide Sterilizers to the 12/88 Ethylene Oxide Gas Sterilizer. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, n. 2, p. 92–100, 1996.

ANGERER, J.; BADER, M.; KRÄMER, A. Ambient and biochemical effect monitoring of workers exposed to ethylene oxide. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 71, n. 1, p. 14–18, 1998.

AQUINO, K. A. DA S. Sterilization by Gamma Irradiation. In: ADROVIC, F. (Ed.). . **Gamma Radiation**. [s.l.] InTech, 2012. p. 171–206.

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

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

BAEK, K. H. et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. **Journal of Korean Medical Science**, v. 20, n. 3, p. 438–444, 2005.

BAO, T. Q. et al. Fabrication and characterization of porous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. **Journal of Materials**

Science, v. 46, n. 8, p. 2510–2517, 2011.

BLANCO, Y. et al. Effects of Gamma and Electron Radiation on the Structural Integrity of Organic Molecules and Macromolecular Biomarkers Measured by Microarray Immunoassays and Their Astrobiological Implications. **Astrobiology**, v. 18, n. 12, p. 1497–1516, 2018.

BUSER, D. **20 Anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. 2. ed. São Paulo: [s.n.].

CALIS, S. et al. Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs. **Farmaco**, v. 57, n. 1, p. 55–62, 2002.

CHOI, Y. et al. Poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) diblock copolymer prevents aggregation of poly(L-lactide) microspheres during ethylene oxide gas sterilization. **Biomaterials**, v. 22, n. 9, p. 995–1004, 2001.

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

CUSTER, F.; COYLE, T. Instrument Changes During Sterilization. **Journal of Dental Research**, v. 49, n. 3, p. 487–495, 1970.

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

DESAI, K. G. H.; KADOUS, S.; SCHWENDEMAN, S. P. Gamma irradiation of active self-healing PLGA microspheres for efficient aqueous encapsulation of vaccine antigens. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 7, p. 1768–1778, 2013.

FARDIN, A. C. et al. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov.**

Implant J, Biomater Esthet, v. 5, n. 3, p. 48–52, 2010.

FERREIRA, L. B. et al. 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**, 2014.

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

GARRETT, I. R.; GUTIERREZ, G.; MUNDY, G. R. Statins and Bone Formation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 8, p. 715–736, 2001.

GRASSER, W. A. et al. Regulation of osteoclast differentiation by statins. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 3, n. 1, p. 53–62, 2003.

GRAZIANO, K. U. Processos de limpeza, desinfecção e esterilização de artigos odonto-médico-hospitalares e cuidados com o ambiente de centro cirúrgico. In: **Controle de infecção em centro cirurgico: fatos, mitos e controvérsias**. São Paulo: Atheneu, 2003.

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

HOLY, C. E. et al. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 22, n. 1, p. 25–31, 2001.

HSIAO, C. Y. et al. The influence of γ irradiation and ethylene oxide treatment on the release characteristics of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) composites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 5, p. 715–720, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological evaluation of medical devices". Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. v. 3, n. ISO 10993-5, 2009.

JEONG, Y. IL et al. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, n. 1–2, p. 79–91, 2003.

KOHANE, D. S. et al. Biodegradable polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 77, n. 2, p. 351–361, 2006.

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

LAMBERT, B. J.; MENDELSON, T. A.; CRAVEN, M. D. Radiation and ethylene oxide terminal sterilization experiences with drug eluting stent products. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1116–1126, 2011.

LÄNSMAN, S. et al. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: Histological evaluation in the subcutis of experimental design. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p. 1121–1128, 2006.

LEROUGE, S.; SIMMONS, A. **Sterilization of Biomaterials and Medical Devices**. 1. ed. Cambridge: [s.n.].

LIMA, L. S. Radiação gama. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 4, p. 1–2, 2014.

MACHADO, W. M.; MUNHOZ, A. C. M.; FERNANDES, D. Estatinas: efeitos pleiotrópicos. Statins: pleiotropic effects. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saude**, v. 17, n. 2, p. 141–150, 2011.

MAEDA, T. et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 92, n. 3, p. 458–471, jun. 2004.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 681–692, 2003.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 2011.

MAKADIA, H.; STEVEN, J. S. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1–19, 2011.

MASAEELI, R. et al. Preparation, Characterization and Evaluation of Drug Release Properties of Simvastatin-loaded PLGA Microspheres. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. SI, p. 205–211, 2016.

MENDES, G. C. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. **American Journal of Infection Control**, v. 35, n. 9, p. 574–581, 2007.

MOIOLI, E. K. et al. Sustained release of TGF β 3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 3, p. 537–546, 2006.

MONTANARI, L. et al. Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1–3, p. 219–229, 1998.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v. 11, n. 3, p. 340–350, 2006.

MUNDY, G. et al. Stimulation of Bone Formation In vitro and in Rodents by Statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946–1949, 1999.

NAITO, Y. et al. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1–2, p. 157–162, 2014.

NATH, S. D. et al. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electro spraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. **International**

Journal of Pharmaceutics, v. 443, n. 1–2, p. 87–94, 2013.

PINTO, N. P. J. **Síntese, caracterização e liberação in vitro de sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

PREEM, L. et al. Effects and efficacy of different sterilization and disinfection methods on electrospun drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, p. 1–13, 2019.

QI, F. et al. Recent research and development of PLGA / PLA microspheres / nanoparticles : A review in scientific and industrial aspects. **Frontiers Of Chemical Science And Engineering**, p. 1–14, 2018.

RIES, M. D.; WEAVER, K.; BEALS, N. Safety and efficacy of ethylene oxide sterilized polyethylene in total knee arthroplasty. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 331, p. 159–163, 1996.

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

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection of Endoscopes: Review of New Chemical Sterilants Used for High-Level Disinfection. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 20, n. 01, p. 69–76, 1999.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Guideline for Disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. **Centers for Disease Control and Prevention**, v. 6, n. May, p. 1–163, 2019.

RYDBERG, B. Clusters of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation: Formation of Short DNA Fragments. II. Experimental Detection. **Radiation Research**, v. 145, n. 2, p. 200–209, 1996.

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

SASAKI, S. et al. Effect of gamma ray irradiation on friction property of poly(Vinyl alcohol) cast-drying on freeze-thawed hybrid gel. **Gels**, v. 4, n. 2, 2018.

SILVA, A. T. C. R. et al. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in vitro Degradation. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, n. January, p. 8–19, 2015.

SONG, C. et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 458–462, 2003.

SORDI, M. B. et al. Enhanced bone tissue regeneration with hydrogel-based scaffolds by embedding parathyroid hormone in mesoporous bioactive glass. **Clinical Oral Investigations**, v. 27, n. 1, p. 125–137, 26 ago. 2022.

TERUKINA, T. et al. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2016.

TIPNIS, N. P.; BURGESS, D. J. Sterilization of implantable polymer-based medical devices: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017.

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

VENDRELL, R. J.; HAYDEN, C. L.; TALOUMIS, L. J. Effect of steam versus dry-heat sterilization on the wear of orthodontic ligature-cutting pliers. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 121, n. 5, p. 467–471, 2002.

WU, Z. et al. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 37, n. 2, p. 170–176, 2008.

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

YAMASHITA, M. et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling. **Regulatory Peptides**, v. 162, n. 1–3, p. 99–108, 2010.