

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.
MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS.



ESTERILIZACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO Y
ÁCIDO POLIGLICÓLICO MEDIANTE LA
UTILIZACIÓN DE RADIACIÓN GAMMA Y
RADIACIÓN BETA.

ESTEFANÍA J. GULÍN ARIAS.

MADRID 2.014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.
MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS.



ESTERILIZACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO Y
ÁCIDO POLIGLICÓLICO MEDIANTE LA
UTILIZACIÓN DE RADIACIÓN GAMMA Y
RADIACIÓN BETA.

ESTEFANÍA J. GULÍN ARIAS.
Tutor: Prof. Dr. José M^a. Martínez González.

MADRID 2.014



AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo quiero hacer mi humilde reconocimiento a todas aquellas personas que han contribuido en mi formación humana y profesional a lo largo de mi vida. No sería lo mismo sin todos aquellos a quienes he conocido, a quienes aprecio y admiro, de quienes he recibido grandes lecciones. Aseguro que no sería mejor de lo que soy sin ellos.

Mi sincero agradecimiento al *Prof. Dr. José M^a Martínez González*, tutor de este proyecto, por su consejo, ayuda y dedicación durante el desarrollo de este trabajo. A quien considero un Maestro en lo sublime de la palabra.

Un agradecimiento especial al *Dr. Francisco J. García Saban*. Sin él, este proyecto no hubiera sido posible, por el material proporcionado, apoyo y tiempo incondicional durante la realización de este proyecto.

A todos mis profesores de la licenciatura en Odontología que me enseñaron tanto de la profesión como de la vida, impulsándome siempre a seguir adelante.

A todos muchas gracias, por su tiempo, experiencia, conocimientos y orientación.

“Si he logrado ver mas lejos, ha sido porque me he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton



DEDICATORIA

A *Dios*, fuente de todo bien, por permitirme el suficiente entendimiento para llegar a este punto de la vida, por concederme salud para disfrutar estos momentos, conciencia para discernir lo bueno que he recibido y principalmente, por darme la fuerza necesaria para continuar en las situaciones difíciles.

A *Jacqueline, Raimundo, Raimundo José y María Teresa*, que integran mi familia. Pues sin el cariño, apoyo y confianza de mis padres y hermanos, haber llegado a donde estoy no hubiera sido posible. En la distancia, su presencia está siempre presente en mi persona. De igual manera, a mis tíos, primos y en especial a mi abuela, unas de las mujeres más fuertes que he conocido, que me ha de la que aprendí que no importa que tan fuerte sea el camino siempre podremos levantarnos y continuar.

A *Raquel Arias Rodríguez*, mi tía, madrina y mi segunda madre. Una gran luchadora, una mujer valiente que me cuida desde el cielo. Que me enseñó que una sonrisa puede contra cualquier adversidad.

A *Juan Ignacio Serrano Martínez*, por su apoyo, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por no solo ser mi novio sino mi mejor amigo y compañero de batallas. Por su comprensión, paciencia y amor, dándome ánimos de fuerza y valor para seguir adelante.

A mis viejos y nuevos amigos, que sin importar el tiempo que nos conocemos, la amistad que ha surgido se ha fortalecido, permitiéndome citar a Aristóteles: “sin amigos nadie escogería vivir, aunque tuviese todos los bienes restantes”



“Un ser sin estudio, es un ser incompleto”

Simón Bolívar



IV. RESULTADOS	25
IV.1 Primera Fase	26
IV.2 Segunda Fase	27
Resultados Del Control De Esterilidad	29
Resultados De La Detección De Endotoxinas	29
V. <u>DISCUSIÓN</u>	30
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	35
VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	37



I. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN



Las tendencias actuales tanto en medicina como en odontología sugieren que el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros son materiales con una amplia aplicación en el futuro. Se han encontrado una multitud de usos de los polímeros preparados a partir de ácido glicólico y láctico en la industria médica, comenzando con las suturas biodegradables aprobadas en la década de los '60. Desde entonces, han demostrado una cantidad de aplicaciones en donde se incluyen la fijación ósea de dispositivos tales como placas, tornillos, pernos, clavos, etc., así como su utilización como andamios para la reparación de tejidos blandos y duros.¹

Estos biomateriales se degradan *in vivo* mediante hidrólisis en ácido láctico y ácido glicólico y luego se incorporan en el ciclo del ácido tricarbóxico y se excretan. El término degradación denota una pérdida de masa debido a la resorción o disolución del material, precipitado o acompañado por una reducción en el peso molecular, los cambios en la configuración estructural del implante, y cambios en las propiedades mecánicas tales como la reducción en la resistencia y rigidez. Diversos factores que pueden influir en la degradación *in vivo* de PLA-PGA como lo son las características del material físicas y geométricas, tejido anfitrión, condiciones hemodinámicas, enzimas y carga funcional.²

Todos los materiales que van a ser utilizados en el campo médico/odontológicos deben ser esterilizados después de su fabricación y antes de su colocación quirúrgica para así reducir el riesgo de infecciones y



complicaciones asociadas.² No obstante, la esterilización puede afectar sustancialmente las propiedades físicas de los polímeros bioabsorbibles.³⁻⁴

La esterilización constituye el proceso de destrucción o eliminación de todas las formas vivientes (patógenas o no) de la superficie de un material. Éste proceso destruye microorganismos causando una alteración de sus componentes esenciales; en particular el mecanismo de la esterilización causa la desnaturalización de las proteínas y del ácido nucleico así como el deterioro de la membrana celular. El proceso de esterilización ideal debe asegurar la esterilización de las superficies por un largo periodo de tiempo, ser de coste reducido, fácil y seguro de aplicar, rápido y lo primordial, no causar alteración alguna en las propiedades del material a esterilizar.⁵

No importa cuan óptimo sea un biomaterial, siempre necesitará resistir al último paso de esterilización antes de ser utilizado. La esterilización y estabilidad de sus propiedades, son necesarias para cualquier material utilizados en la aplicación médica.⁶ De igual manera, la esterilización puede ser utilizada como tratamiento para mejorar propiedades mecánicas y ajustar/adaptar las propiedades superficiales de polímeros (biomateriales).^{2,7}

En la actualidad, existen diversos métodos de esterilización en donde encontramos la esterilización por presión de vapor, calor seco, gas de óxido de etileno (EtO), formaldehído, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido paracético, radiación gamma (γ), radiación beta/e-beam (β), etc. En la tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de los principales métodos de esterilización.^{1-2,8-9}



TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>Esterilización por vapor (presión alta de vapor, 120-135°C)</p>	<p>No deja residuos tóxicos. Tiempo de procesamiento económico y corto. Seguro para el medio ambiente.</p>	<p>Deformación y degradación debido al vapor de agua. Limitado uso para PLA-PGA. Los materiales que son sensibles a altas temperaturas y a la humedad, materiales oleosos, materiales líquidos y dispositivos eléctricos no se pueden esterilizar por este método.</p>
<p>Esterilización por calor seco (160-190°C)</p>	<p>No tóxico y seguro para el medio ambiente. Polvos, parafina blanda y glicerina se puede esterilizar por este método. Capacidad de penetrar sólidos. La falta de la corrosión en el caso de los metales de acero no inoxidable</p>	<p>Altas temperaturas durante largos períodos. La penetración de calor tarda mucho tiempo en dispositivos grandes. No adecuado para polímeros ni telas.</p>
<p>Esterilización con óxido de etileno (EtO)</p>	<p>Es preferible para aquellos materiales que son sensibles al calor. Ofrece una penetración completa dependiendo del uso del gas permeable. Bajo rango de temperatura</p>	<p>Tiempo de esterilización y ventilación largos debido a la desgasificación.. EtO es tóxico, cancerígeno, inflamable y explosivo.</p>
<p>Esterilización con Formaldehído</p>	<p>Es preferible para aquellos materiales que son sensibles al calor. No requiere periodos de ventilación tras su uso.</p>	<p>Es tóxico y cancerígeno por lo cual no debe utilizarse para la esterilización de líquidos.</p>
<p>Esterilización con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)</p>	<p>Seguro para el medio ambiente y es menos peligroso de manipular. Periodo de esterilización: 28 min a 74 min. No es necesaria la ventilación. Adecuado para la esterilización de materiales que son sensibles a la temperatura.</p>	<p>No debe utilizarse para la esterilización de líquidos.</p>

Tabla 1. Técnicas de esterilización y su aplicación. *SAL: Nivel de garantía de esterilidad* ^{1-2, 8-9}



TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Esterilización con ácido peracético	No es peligroso para el personal y ni para el medio ambiente. Proceso menos perjudicial que la esterilización de vapor para materiales delicados. Compatible con una amplia variedad de materiales plásticos, caucho, y los elementos sensibles al calor. Es un proceso de un solo uso, no hay posibilidad de contaminación.	Sólo uno o un pequeño número de instrumentos se pueden procesar en un ciclo. El uso de los materiales inmediatamente después del proceso de esterilización no es posible.
Radiación Gamma	Es un método tecnológico avanzado. Es un método en frío, con un aumento de la temperatura es tan leve. Tiene un alto SAL. El control del método es muy fácil.	La tasa de dosis es más baja que los rayos de e-beam (β). No tiene ninguna flexibilidad de dosis.
Radiación Beta (β)/e-beam	Método muy seguro. Método de tecnología avanzada. Método en frío (aumento de la temperatura es muy leve). Tiene un alto SAL. El control del método es muy fácil.	Se necesita un acelerador de electrones que es muy raro.

Tabla 2. Técnicas de esterilización y su aplicación. SAL: Nivel de garantía de esterilidad CONTINUACIÓN^{1-2, 8-9}

La literatura demuestra que los polímeros PLA-PGA, además de ser susceptibles al daño por la humedad y la radiación, son sensibles al calor debido a su naturaleza termoplástica. Por lo tanto, la selección de la técnica de esterilización correcta para PLA-PGA es crucial para mantener estables sus propiedades físicas y mecánicas, y por lo tanto a su rendimiento *in vivo*.²



La esterilización por radiación tiene más de 50 años; durante este período, el mercado de materiales y/o productos médicos han tenido un enorme crecimiento, y con ello el uso de la radiación como método de esterilización. De igual forma, el proceso de radiación ha sido utilizado en muchos sectores de la economía internacional. En la actualidad, existen tecnologías bien establecidas en el campo de la esterilización, creación polímeros (tubos, cables, etc.), vulcanización y la irradiación para la higiene de ciertos alimentos. Entre el 40-50% de los productos médicos manufacturados en países desarrollados son esterilizados mediante radiación. Gran parte del atractivo de la esterilización por radiación se debe a la disminución de la toxicidad a consecuencia de la eliminación de productos químicos.^{8,10}

Existen 2 tipos de radiación que se utilizan para la esterilización, la radiación ionizante y la radiación no ionizante. La radiación ionizante se utilizó por primera vez en 1985 y fue patentada en 1921.⁸ Se basa en el uso de ondas de longitud corta y radiación de alta intensidad para destruir los microorganismos. Esta radiación puede venir en forma de rayos gamma (γ), rayos beta/e-beam (β) o los rayos X, que reaccionan con el ADN del microorganismo causándole daño celular. La radiación no ionizante utiliza una longitud de ondas largas y menor energía. Como resultado, la radiación no ionizante pierde la capacidad de penetrar sustancias, y sólo se puede utilizar para la esterilización de superficies. La forma más común de la radiación no ionizante es la luz ultravioleta, que se utiliza de diferentes maneras.^{8,11-12}

La esterilización por radiación inactiva a los microorganismos bien sea por destrucción del ADN microbiana (muerte) o por una reacción química



indirecta. La esterilización por radiación es por lo tanto, el único proceso que permite que los productos, incluyendo su embalaje, ser esterilizado sin ningún aumento apreciable de la temperatura y sin el uso de productos químicos, que usualmente implica residuos tóxicos.^{8,11}

La radiación beta y gamma son adecuadas para la esterilización. La principal diferencia entre ellos reside en su profundidad de penetración de los materiales y sus tasas de dosis.⁸

La esterilización por *rayos beta* es un proceso basado en electricidad; es dada a altas dosis y se aplica a través de un haz de electrones de alta tensión de un acelerador lineal. Estos electrones libres, penetran en el material antes de ser detenidos por colisiones con otros átomos. Es por esto, que su utilidad en la esterilización se ve limitada al espesor (densidad) del objeto y a la energía de los electrones. Estos electrones libres producen su efecto ionizando los átomos que lleguen, produciendo electrones secundarios que matan los microorganismos. No obstante, tiene la ventaja de que al ser aplicada a alta dosis (fuente de energía alta) la esterilización que se puede administrar individualmente y en pocos segundos.^{8,11-13} (Fig. 1)

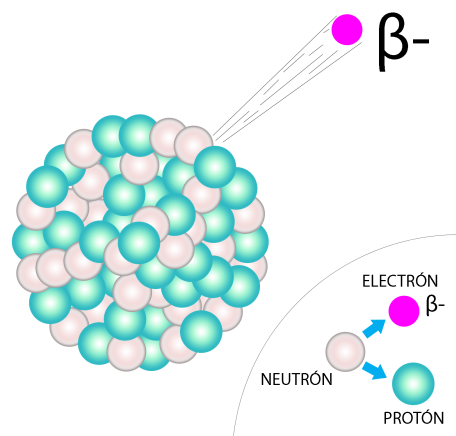


Fig 1. Partícula de radiación beta



La radiación gamma es la aplicación de radiación electromagnética (rayos gamma) emitida desde isótopos radiactivos tales como cobalto 60 (^{60}Co) y el cesio 137 (^{137}Cs). Son ondas electromagnéticas, que tienen la capacidad de penetrar una distancia mucho mayor que los rayos beta antes de perder su energía de colisión debido a que viajan con la velocidad de la luz, que debe pasar a través de un espesor que mide varios metros antes de hacer colisiones suficientes para perder toda su energía. Tiene alta capacidad de penetración a dosis bajas, sin embargo, dependiendo de la cantidad de cobalto 60, el proceso de esterilización puede tardar varias horas e incluso días para acumular una dosis alta; por lo tanto una esterilización individual de materiales no es posible.^{8, 11-12, 14} (Fig 2).

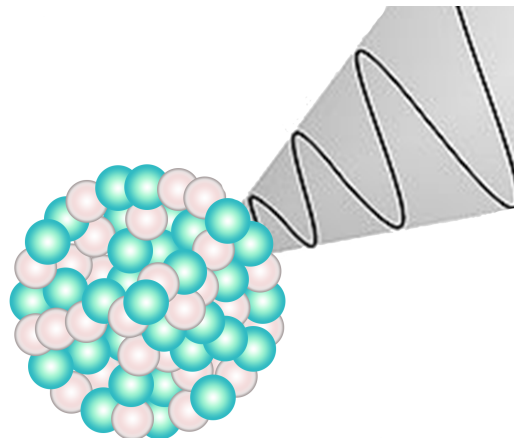


Fig 2. Ondas electromagnéticas de rayos gamma

En general, para ambas radiaciones 25 kGy se define como la dosis de referencia que garantiza un SAL de 10^6 .^{13,15} Ésta dosis se mide en kiloGray (kGy) unidades, que cuantifican la energía absorbida de la radiación (un Gray es la absorción de un Joule de energía de radiación por un kilogramo de la materia (uno kGy = un joule/gramo)).¹⁴ Diferentes estudios, han demostrado que



irradiaciones a dosis >20 kGy causan deterioro de las propiedades estructurales y biomecánicas de injertos de tejido blando.¹⁶⁻¹⁷ Por otra parte, estudios como el de Pruss y cols.¹⁸ indican que una irradiación <20 kGy es suficiente para eliminar los agentes patógenos bacterianos, pero que dosis superiores a los 30 kGy aseguran la esterilidad del tejido, en especial contra ciertos patógenos. Sin embargo, autores como Lietman y cols.¹⁹ encontraron que en aloinjertos irradiados a 25 kGy aumentó drásticamente la tasa de fracturas de aloinjertos (39%) en comparación con los aloinjertos no irradiados (18%). De igual manera, la irradiación a la dosis estándar también reduce la osteoinducción y osteoconducción²⁰⁻²¹ de aloinjertos, provocando retrasos significativos en la incorporación del aloinjerto al huésped.²² Por otra parte, Özer y cols.²³ demostraron en su estudio que no son necesarias dosis de 25 kGy de radiación gamma para el proceso de esterilización de fármacos como el diclofenac sódico.

La interacción de estas radiaciones con la materia es básicamente la misma para los rayos gamma como para los rayos beta. La diferencia reside, en el hecho, de que la rayos gamma son una forma de radiación electromagnética que se caracteriza por una alta penetración en la materia, a una dosis muy baja (kGy/h). Por el contrario, los rayos beta son una forma de radiación caracterizada por una baja penetración en la materia, pero a una tasa de dosis muy alta (kGy/s).²⁴

Debido a que la esterilización por rayos beta se puede llevar a cabo en segundos se convierte en un proceso de esterilización más rentable siendo entre el 30% a 40% menos costoso que el procesamiento por rayos gamma el cual puede tomar desde minutos a días enteros para completar el proceso.^{1,8,10, 25}



No obstante, Kaminski y cols.²⁶ en su estudio sobre la irradiación gamma en aloinjertos encontraron que debido a la mejor penetrabilidad de estos rayos al interior del material, existe una distribución más uniforme de la dosis en el interior de los injertos.

Algunos materiales y productos sensibles a efectos oxidativos, muestran los niveles de tolerancia a la radiación por e-beam ligeramente superiores a la exposición a radiación gamma. Esto es debido a las tasas de dosis más altas y tiempos de exposición más cortos de la irradiación por rayos beta ha demostrado ser útil para reducir los efectos degradantes de oxígeno.

De igual forma, en debido a los problemas crecientes relacionados con la gestión de los radioisótopos (suministro, transporte, eliminación, imposibilidad para revertir la radiación), se espera que la esterilización gamma será reemplazado gradualmente por rayos beta y rayos x.^{1,8}

La efectividad de éstos métodos de esterilización sobre distintos tipos de materiales ha sido evaluada por diversos autores; la mayoría de éstos estudios han examinado la aplicación de estas radiaciones sobre aloinjertos (tejido duro y/o blando), pero debido al alto incremento de materiales nuevos en el mercado éstas técnicas se han venido aplicando sobre ellos para comprobar su fiabilidad.

En 1999, Hamer y cols.²⁷ encontraron que el hueso irradiado a -78 °C era menos frágil y mostrando menos daño del colágeno que cuando se irradian a temperatura ambiente, mientras que Grieb y cols.²⁸ en 2005 concluyeron que la irradiación gamma a muy bajas temperaturas reduce la generación y difusión de los radicales libres. En 2008, Baisly y cols.²⁹ evaluaron las distintas dosis (18.3-28.5 kGy) de radiación gamma en presencia de bajas temperaturas en el proceso



de esterilización de injertos de tejido blando y duro. Concluyeron que la aplicación de dosis bajas es mejor para los tejidos blandos y que no hay diferencias significativas entre las dos dosis cuando se le aplican al tejido duro.

Kaminski y cols.³⁰ en 2012, evaluaron la acción de la temperatura sobre los rayos beta a dosis entre 25-35 kGy únicamente tejidos duros de fémur, concluyendo que la utilización de hielo seco en este proceso no tiene efectos significativos consistentes sobre las propiedades mecánicas evaluadas de anillos de hueso compacto.

En 2013, Nguyen y cols.³¹ a través de la inoculación de bacterias sobre aloinjertos demostraron que dosis de radiación gamma entre 5 y 15 kGy mejoran el rendimiento mecánico del injerto así como la promoción de su integración concluyendo que no son necesarias dosis de 25 kGy para mantener la calidad del tejido óseo como unos niveles de esterilidad satisfactorios.

Según Nguyen y cols.³² en la actualidad, no existe un consenso internacional sobre cual es el método de esterilización óptimo para los aloinjertos. La radiación gamma a dosis entre 15 y 35 kGy ha sido adoptada debido a su eficacia en la esterilización y porque posee buena capacidad penetración.

En 1996, Zhang y cols.³³ analizaron la composición química/física y la respuesta biológica de dos materiales poliméricos (silicona y poliuretano) esterilizados mediante rayos beta, vapor o óxido de etileno, tras su implantación en ratas. Encontraron que ninguna de los dos materiales se habían degradado o reticulado en un grado apreciable bajo ninguno de los tres métodos de



esterilización. En cuanto a la respuesta biológica, a los 10 días, hallaron diferencias en cuanto a número de células y grosor de la cápsula periimplantaria, ésta cápsula era más delgada en aquellos materiales esterilizados con EtO y e-beam que en los esterilizados por vapor. A los 90 días, no había evidencia de reacción inflamatoria.

En un estudio *in vitro* realizado por Nuutinen y cols. en 2002,³ evaluaron los diversos efectos en las propiedades mecánicas y físicas de fibras autoreforzadas de ácido poliláctico (PLA) cuando a estas se le aplicaban 4 métodos de esterilización diferentes -plasma, oxido de etileno, radiación gamma (25kGy a temperatura ambiente, 25 kGy + hielo seco y doble irradiación a 25 kGy) y radiación beta (15 , 25 y 55 kGy). Concluyendo en cuanto a los métodos de radiación, que la esterilización por este medio tiene un efecto considerable sobre las propiedades mecánicas y la viscosidad intrínseca del PLA y que la dosis de gamma y e-beam con el tiempo provoca una mayor pérdida en las propiedades mecánicas durante la degradación *in vitro*. De igual forma, la disminución de la temperatura tiene un mínimo efecto durante el tratamiento por rayos gamma.

Montanari y cols.³⁴ en 2003 compararon el efecto de irradiación beta y gamma (25kGy) sobre microesferas de poliláctico-glicólico (PLGA) que contenían diferentes concentraciones de bupivacaina. Obtuvieron que las microesferas tratadas con rayos gamma fueron más sensible; pero que los efectos sobre la esterilización son básicamente los mismos con ambos métodos.



De igual forma, en 2004 se realizó un estudio que analizó la influencia de la esterilización por rayos beta sobre las propiedades sobre la membrana del chitosan/ proteínas de soya; no se detectaron cambios sustanciales en las propiedades estudiadas, con excepción de la energía de superficie que se encontró aumentada ligeramente en aquellos casos en donde se aplicaron dosis más altas.³⁵ Éste mismo año, el equipo de Oliveira y cols.,⁶ evaluó la influencia de diferentes dosis de rayos beta sobre polímeros biodegradables de base de almidón concluyendo que las distintas dosis de radiación no afectan significativamente las propiedades mecánicas.

Varios autores concluyen que debido a que la penetración de la radiación beta es menor que en el caso de radiación gamma, la utilización del e-beam sería ventajoso para preservar las propiedades mecánicas de los polímeros biodegradables.³⁶⁻³⁷

A través de este recorrido bibliográfico, queda puesto en evidencia que las técnicas de esterilización por radiación pueden afectar las propiedades mecánicas y físicas de los distintos polímeros, en nuestro caso PLA-PGA. Es por ello que es importante investigar la estabilidad del material después de la esterilización para determinar cual es el método de esterilización más conveniente.

De esta forma, consideramos conveniente y justificado la realización de este proyecto de investigación con dos diferentes técnicas de esterilización por radiación para conocer si alguna de ellas ofrecen ventaja en cuanto eficacia/precio respecto a la otra.



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



II.1 HIPÓTESIS:

La esterilización por radiación beta proporciona un SAL (*Nivel de garantía de esterilidad*) eficaz sin alterar las propiedades del biopolímero a un menor periodo de tiempo en comparación a la radiación gamma.

II.2 OBJETIVOS:

1. Validar el método para la determinación de endotoxinas en los copolímeros de ácido láctico/glicólico y copolímeros de ácido láctico/láctico mediante el método cinético cromogénico.
2. Verificar la eficacia de esterilización mediante radiación gamma y radiación beta a diferentes dosis de radiación.



III. MATERIAL Y MÉTODO

III.1 MATERIALES

III.1.1 Biopolímeros:

En el presente estudio se utilizaron dos copolímeros:

- 75/25 DL-láctico/glicólico (**PURASORB® PDLA 7502A**).
- 70/30 L-láctico/DL-láctico (**PURASORB® PLDL 7028**).

En una *primera fase* se utilizaron 9 viales de copolímero 75/25 DL-láctico/glicólico.

En una *segunda fase* se analizaron 30 muestras de cada copolímeros.

(Fig. 3)



Fig. 3. Muestras láctico/glicólico y láctico/láctico

III.1.2 Reactivos:

- *Lisado liofilizado.*
- *Lisado reconstituido.*
- *Endotoxina E.coli 055:B5 liofilizada.*
- *Agua LAL.*



III.1.3 Medios de cultivo

- Placas de Agar de Caseína y Soja (TSA).
- Caldo de Caseína y Soja en frascos de 100ml.
- Medio fluido de Thioglicolato en frascos de 100mL.

III.1.4 Microorganismos de ensayo

- *Bacillus pumilus* ATCC 27142 en solución al 40% de etanol.
Concentración teórica de $2,0 \times 10^6$ UFC/0,1mL.

III.1.5 Radiación:

- Radiación Gamma a dosis de 15 y 25 kGy (ARAGOGAMMA S. A Barcelona- España).
- Radiación beta (electrones) a dosis de 10, 15 y 25 kGy con una energía de 10 MeV (MEVION TECHNOLOGY SL Soria – España).

III.1.6 Aparatos:

- Cabina de flujo laminar.
- Rampa de filtración.
- Estufa de incubación 20-25°C y 30-35°C.
- Lector de placas ELx808 cse; preparado para incubar, a 37 °C, placas conteniendo distintas muestras y realizar medidas de densidad óptica a 405nm a intervalos regulares (Software WinKQCL Versión 5.1.1) (Fig.4)



Fig. 4 Lector de placas Elx808



- Pipetas.
- Agitador tipo “Vórtex”. (Fig 5)
- Cronómetro
- Estufa regulable (SELECTA)



Fig. 5 Agitador tipo Vórtex

III.2 MÉTODO

El siguiente estudio se realizó en dos fases, en una primera fase se validó el método para la determinación de endotoxinas y una segunda fase en la cual se verificó la eficacia de la radiación gamma y radiación beta a diferentes dosis de radiación.

III.2.1 PRIMERA FASE

Se utilizaron 9 viales con el mismo contenido de copolímero 75/25 DL-láctico/glicólico (**PURASORB® PDLA 7502A**) y copolímero 70/30 L-láctico/DL-láctico (**PURASORB® PLDL 7028**) (Corbion Purac Biomaterials – Holanda) distribuidos en 3 muestras A, B y C de 3 viales cada una.

III.2.1.1 Preparación de la muestra

1. Se realizó un lavado del contenido de cada vial añadiendo 2mL de agua LAL, obteniendo así una concentración del agua de extracción (vial/mL).
2. Se cerró el vial a analizar y se agitó vigorosamente durante 2 minutos para favorecer la extracción de la endotoxina de la superficie del material objeto de estudio al agua LAL.



3. La detección de endotoxinas se realizó directamente sobre el agua de extracción (o lavado) de cada una de las tres muestras A, B y C; y sobre un mínimo de 3 diluciones de cada una de ellas. Éstas diluciones no debían superar la máxima dilución válida (M. D. V.).

La *M. D. V* se define como la dilución del producto más alta que nos permite un resultado inferior a la concentración de endotoxina expresado por vial.

En nuestro caso, la *M. D. V* fue: 1/10

III.2.1.2 Control positivo (PPC)

PPC: control positivo del producto. Se obtuvo añadiendo una concentración conocida de endotoxina a la solución de ensayo. De esta forma se pudo detectar si existían interferencias (inhibición o activación) del producto objeto de estudio sobre la reacción de ensayo. En el presente estudio el PPC fue de 0,5 EU/mL.

Recuperación de endotoxina: el valor de endotoxina detectado en el PPC al que se le resta el valor de endotoxina detectado en el producto. Según Farmacopea Europea debía ser superior al 50% e inferior al 200% del valor de endotoxina añadido.

III.2.1.3 Criterios del ensayo: aceptación/rechazo

El siguiente estudio se consideró válido cuando se cumplieron las siguientes condiciones en cuanto a la curva de calibración y el control de calidad: (ver TABLA 1).

		ACEPTACIÓN	RECHAZO
CURVA DE CALIBRACIÓN	El resultado del blanco	<0,005 EU/mL	>0,005 EU/mL
	El coeficiente de correlación (r) de la curva	r ≥ 0,980.	r ≤ 0,980.
	El coeficiente de variación entre los resultados de las réplicas	≤ 10%.	≥ 10%
CONTROL DE CALIDAD	El coeficiente de variación entre los resultados de las réplicas de cada solución	≤ 10%.	≥ 10%
	El coeficiente de variación entre los resultados de las réplicas del PPC de cada solución	≤ 10%.	≥ 10%
	El valor de endotoxina detectado en el control positivo (PPC) de cada dilución	Entre 50- 200%	<50 >200%

TABLA 1. Criterios de aceptación/rechazo en curva de calibración y control de calidad

III.2.2 SEGUNDA FASE

Una vez validado el procedimiento para la determinación de endotoxinas, se procedió a una segunda fase en la cual se utilizaron 30 muestras de copolímeros de ácido láctico/glicólico y 30 muestras de copolímeros de ácido láctico/láctico ambas en envases vial 4mL. Se comenzó por:

III.2.2.1 Inoculación de las piezas

Las piezas fueron inoculadas con 0,1 mL de una suspensión de esporas de *Bacillus pumilus*, a una concentración teórica de $2,0 \times 10^6$ UCF/0,1mL, siendo remitidas para que fueran sometidas a las dosis de radiación definidas. (**Fig 6**)



Fig 6. Inoculación de las muestras.

Al momento de la inoculación se realizó un recuento de la suspensión inoculada en placas de TSA incubadas durante 72 horas. El resultado fue de $3,8 \times 10^6$ UFC/0,1mL.

III.2.2.2 Análisis realizados sobre las piezas inoculadas tras ser irradiadas.

Las 60 muestras analizadas fueron sometidas a diferentes dosis de radiación.

- Radiación Gamma (15 y 25 kGy). (ver TABLA 2)
- Radiación Beta (10, 15 y 25 kGy). (ver TABLA 3)

La esterilización se llevo a cabo a una temperatura ambiente de 25°C.

El control de esterilidad se realizó según el **ISO 11737-2** (Fig. 7 y 8) mientras que el control de las endotoxinas se realizó utilizando el método cinético cromogénico según Farmacopea Europea. Ambos controles se realizaron de acuerdo con la validación realizada en la primera fase de éste estudio.



Fig 7. Test de esterilidad para detectar la presencia de bacterias viables en el producto después de la esterilización.



Fig 8. Incubación de las muestras de Láctico-láctico irradiadas con (a) rayos beta y (b) rayos gamma a dosis de 15 kGy.

**RADIACIÓN GAMMA (TABLA 2)**

MUESTRA	RADIACIÓN	MUESTRAS PARA BIOBURDEN	MUESTRAS PARA ENDOTOXINAS	MUESTRAS PARA CONTROL DE ESTERILIDAD	TIEMPO	TOTAL
Láctico/glicólico	15 KGY	1	3	2	5h 55'	6
Láctico/láctico	15 KGY	1	3	2	5h 55'	6
Láctico/glicólico	25 KGY	1	3	2	6h 52'	6
Láctico/láctico	25 KGY	1	3	2	6h 52'	6
						24

RADIACIÓN ELECTRONES (BETA) (TABLA 3)

MUESTRA	RADIACIÓN	MUESTRAS PARA BIOBURDEN	MUESTRAS PARA ENDOTOXINAS	MUESTRAS PARA CONTROL DE ESTERILIDAD	TIEMPO	TOTAL
Láctico/glicólico	10 KGY	1	3	2	5 min	6
Láctico/láctico	10 KGY	1	3	2	5 min	6
Láctico/glicólico	15 KGY	1	3	2	5 min	6
Láctico/láctico	15 KGY	1	3	2	5 min	6
Láctico/glicólico	25 KGY	1	3	2	5 min	6
Láctico/láctico	25 KGY	1	3	2	5 min	6
						36



IV. RESULTADOS



IV.1 PRIMERA FASE

La primera aproximación se realizó con un único vial de la muestra A hidratado con 2 mL de agua LAL. Se probaron las diluciones 1/10 y 1/100 en agua LAL del agua de extracción. El coeficiente de correlación de la curva fue de -0,999.

Una vez obtenidos estos resultados, se eligieron las diluciones 1/5, 1/10, 1/100 y se probó directamente el agua de extracción sin diluir de todos los viales.

Un mes después, se procesaron las soluciones de extracción homogeneizadas y sus diluciones de las muestras B y C. En este ensayo, también se analizó la solución de extracción homogeneizada de la muestra A y su dilución 1/5. El coeficiente de correlación de la curva fue de -0,999.

El control fue <0,005 EU/mL para el agua LAL en todos los ensayos de esta validación.

A continuación se indican los valores de recuperación de endotoxina:

DILUCIÓN		DIRECTA	1/5	1/10	1/100
MUESTRA A	<i>Recuperación Endotoxina (EU/mL)</i>	0,472	0,510	0,547	0,558
	<i>% Recuperación</i>	9%	51%	109%	112%
MUESTRA B	<i>Recuperación Endotoxina (EU/mL)</i>	0,537	0,525	0,512	0,488
	<i>% Recuperación</i>	107%	105%	102%	98%
MUESTRA C	<i>Recuperación Endotoxina (EU/mL)</i>	0,0667	0,488	0,498	0,513
	<i>% Recuperación</i>	13%	98%	100%	103%

TABLA 4. Valores de recuperación de endotoxina



Obtenidos estos valores, se concluyó que para los ensayos rutinarios de los copolímeros 75/25 DL-láctico/glicólico y 70/30 L-láctico/DL-láctico se debe realizar el ensayo a una dilución de $1/10$ del agua de extracción homogeneizada obtenida del lavado del contenido de cada uno de los tres viales con 2mL de agua LAL.

Una vez concluido este proceso experimental, quedó demostrado la no interferencia del diluyente utilizado en el ensayo.

IV.1 SEGUNDA FASE

Concluida la fase de radiación de las 60 muestras se obtuvieron los siguientes resultados: (TABLAS 5 y 6).

En cuanto a las dosis de radiación, a 10 kGy no se cumplieron los criterios de esterilidad obteniendo $<0,1 \text{ EU/VIAL}$ para ambos copolímeros.

Transcurridas las 5 horas 55 minutos de *radiación gamma* a dosis de 15 kGy se encontró que el ácido láctico/glicólico cumplió el control de esterilidad mientras que el ácido láctico/láctico no lo cumplió consiguiendo cifras de 0,116 y 0,157 EU/VIAL respectivamente. En cuanto a la *radiación beta* a esta misma dosis de irradiación ocurrió exactamente lo mismo que con la radiación gamma; el ácido láctico/glicólico cumplió el control de esterilidad con una cifra $<0,1 \text{ EU/VIAL}$ mientras que el ácido láctico/láctico no lo cumplió encontrando una cifra de 0,222 EU/VIAL.

Finalmente, la primera dosis de *radiación gamma* (6 horas 52 minutos) y *radiación beta* que consiguió asegurar la esterilidad de las 2 muestras para los



dos copolímeros fue la de 25K Gy. Obteniendo en ambas radiaciones cifras $<0,1$ EU/VIAL. No obstante, aunque la dosis de radiación fue la adecuada, se halló que algunas muestras se había plastificado debido al tipo de vial utilizado (vidrio) ya que este material paso su Tg (temperatura de transición vítrea). De igual forma, algunas de estas muestras se encontraron pegadas a las paredes del vial debido a la carga electrostática ya que el vidrio transfirió y mantuvo el calor. (Fig 9)

La detección de endotoxinas, mayoritariamente fue de $<0,1$ EU/VIAL. En tres casos se detectaron endotoxinas, pero no parece haber relación entre estos casos y la presencia de contaminación detectada en el correspondiente control de esterilidad. Esto se debe a que las endotoxinas son sustancias lipopolisacáridas liberadas de la pared celular externa de las bacterias Gram negativas. Los microorganismos inoculados en este ensayo eran bacilos Gram positivos, por lo tanto no podían generar endotoxinas. Las endotoxinas detectadas podrían provenir de otras bacterias presentes antes de inocular las muestras.

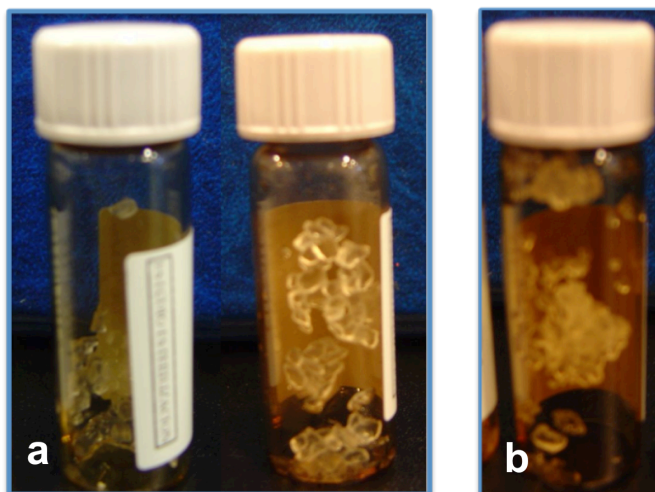


Fig 9. Ácido Láctico-láctico

(a) Radiación Beta 25 kGy.

(b) Radiación Gamma 25 kGy.



RESULTADOS DEL CONTROL DE ESTERILIDAD (TABLA 5)

MUESTRA	RADIACIÓN	CONTROL DE ESTERILIDAD	
		CUMPLE	NO CUMPLE
Láctico/glicólico	Electrones 10 KGy		X
Láctico/láctico	Electrones 10 KGy		X
Láctico/glicólico	Electrones 15 KGy	✓	
Láctico/láctico	Electrones 15 KGy		X
Láctico/glicólico	Electrones 25 KGy	✓	
Láctico/láctico	Electrones 25 KGy	✓	
Láctico/glicólico	Gamma 15 KGy	✓	
Láctico/láctico	Gamma 15 KGy		X
Láctico/glicólico	Gamma 25 KGy	✓	
Láctico/láctico	Gamma 25 KGy	✓	

RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS (TABLA 6)

MUESTRA	RADIACIÓN	CONTROL DE ESTERILIDAD
Láctico/glicólico	Electrones 10 KGy	<0,1 EU/VIAL
Láctico/láctico	Electrones 10 KGy	<0,1 EU/VIAL
Láctico/glicólico	Electrones 15 KGy	<0,1 EU/VIAL
Láctico/láctico	Electrones 15 KGy	0,222 EU/VIAL*
Láctico/glicólico	Electrones 25 KGy	<0,1 EU/VIAL
Láctico/láctico	Electrones 25 KGy	<0,1 EU/VIAL
Láctico/glicólico	Gamma 15 KGy	0,116 EU/VIAL*
Láctico/láctico	Gamma 15 KGy	0,157 EU/VIAL*
Láctico/glicólico	Gamma 25 KGy	<0,1 EU/VIAL
Láctico/láctico	Gamma 25 KGy	<0,1 EU/VIAL

* detección de endotoxinas



V. DISCUSIÓN



La esterilización es proceso fundamental al que deben someterse todos los productos sanitarios. La elección de un proceso de esterilización adecuado es esencial cuando los biomateriales son considerados para uso clínico.³⁸

La radiación es un método que durante los últimos años ha ido ganando terreno en el campo de la esterilización principalmente en productos farmacológicos, dispositivos médicos y alimentación.^{8, 10, 39} La radiación beta y gamma son adecuadas para la esterilización. La principal diferencia entre ellos reside en su profundidad de penetración de los materiales y sus tasas de dosis.⁸

Es importante, establecer el tipo de radiación, dosis, vial, temperatura de la habitación y tiempo de exposición a los que se somete un material ya que son factores determinantes para el proceso de esterilización debido a que pueden causar beneficios o daños en el biomaterial de estudio.³⁹

En el presente estudio, las muestras de PLA-PGA se sometieron a diferentes dosis de radiación gamma (15 y 25 kGy) y radiación beta (10, 15 y 25 kGy). Es conocido que dosis entre 5 y 25 kGy son suficientes para proporcionar la esterilización. A menores dosis existe menor posibilidad de daños en el material, no obstante no proporcionan un SAL de 10^{-6} .³⁸ De la misma manera, sucedió en estudios como el de Montanari y cols,³⁴ Faraj y cols³⁸ y Dorati y cols⁴⁰ en donde sometieron diferentes copolímeros a una dosis de radiación gamma y/o radiación beta máxima de 25 kGy basándose en que esta dosis es la que proporciona una esterilización, la aprueba Agencia Europea de Medicina y es la más utilizada en la industria farmacéutica.^{13,15,42} Demostrando así la concordancia que se encontró en cuanto a la dosis de esterilización mínima que



proporcionó la esterilización de los biomateriales utilizados en este estudio.

No obstante, es importante recalcar que en estudios como el de Jo y cols⁴¹ se llegaron a usar dosis de radiación entre los 25 y 500 kGy ya que buscaban demostrar el comportamiento en degradación de un copolímero polilactido-glicólico dependiendo de las diferentes dosis de irradiación.

Como se observó en este estudio, el tipo de vial en donde se irradia la muestra es muy importante ya que puede alterar las características físico-químicas del biomaterial. En nuestro caso, algunas muestras se plastificaron y pegaron a la pared del vial debido a la Tg (temperatura de transición vítrea). Numerosos estudios certifican que la temperatura o condiciones ambientales no tienen un efecto significativo en el proceso de esterilización.²⁸⁻³⁰ Sin embargo, es importante tener en cuenta que autores como Dorati y cols,⁴⁰ muestran evidencia de como el vial y el ambiente influyen en el resultado de una esterilización. En su estudio, tenían 3 grupos experimentales a los cuales se les sometió a radiación gamma a dosis de 25 kGy en viales de vidrio. A un grupo se le colocó a 4°C y a los dos grupos restantes, inmediatamente concluida la fase de radiación, se le abrieron las tapas dejando así que las muestras se oxigenaran unas a temperatura ambiente y otro a 4°C concluyendo que la presencia de oxígeno durante el proceso de irradiación influye en la entidad del daño de la radiación y la estabilidad de los polímeros después de la esterilización. De la misma forma, en otro estudio se asegura que la presencia de oxígeno en el proceso de radiación puede causar degradación del producto debido a que el oxígeno puede acelerar el proceso de enfriamiento del material. Dependiendo de las propiedades del polímero, éste puede cambiar de color debido a la formación de enlaces dobles.³⁹ En 2004, Çolak y cols, realizaron un estudio donde evaluaron



cuales eran los efectos de diferentes temperaturas de ambiente cuando se aplicaban dosis de entre 5 y 50 kGy de radiación gamma a sulfacetamida sódica encontrando que éste material era generalmente estable a temperatura ambiente pero ligeramente inestable cuando esta temperatura era superior.

La radiación beta a una dosis de 10 kGy no alcanzó una esterilización aceptable para ninguno de los dos grupos de estudio; la esterilización por radiación por ambos métodos a 15 kGy solo fue válida para el caso del copolímero de ácido láctico-glicólico; esto puede deberse a que éste producto posee un menor peso molecular que el ácido láctico-láctico. La dosis de 25kGy de radiación gamma y radiación beta fue la que logró la esterilización de ambos copolímeros pero con una significativa diferencia en cuanto al tiempo de exposición. El tiempo de exposición necesario para concluir un proceso de esterilización es un factor importante ya que podría conllevar grandes beneficios tanto para los profesionales como industrias. En nuestro estudio, la radiación por rayos gamma para una dosis de 15 y 25 kGy necesitó 5 horas 55 minutos y 6 horas 52 minutos respectivamente para terminar su ciclo de esterilización. (>dosis>tiempo de exposición). Por otra parte, las 3 dosis de radiación beta utilizadas en éste estudio solamente necesitaron entre 3 y 5 minutos para finalizar la fase de esterilización.

La radiación gamma necesitó 6 horas 52 minutos para finalizar el proceso de esterilización; no obstante, la radiación beta logró lo mismos resultados a una misma dosis de irradiación pero únicamente con 3-5 minutos de exposición. Éste dato es un resultado bastante favorable para la radiación beta, ya que la convierte en un proceso de esterilización más rentable en relación a la radiación gamma. Hay que tener el cuenta, que el proceso de esterilización de polímero por

radiación no es económico en muchos países por lo que reducir el tiempo de exposición posiblemente abarataría los costes de esterilización.^{39, 43}

Sin embargo, la radiación gamma puede lograr penetrar dentro de estructuras de mayor tamaño y de formas más complejas con la ventaja de no tener que exponer materiales/equipos delicados a altas temperaturas.⁸ La radiación gamma se propaga a través de ondas mientras que la radiación beta se propaga a través de partículas, es por ésta razón que los rayos gamma son capaces de penetrar superficies más gruesas.^{8,11-13} (Fig. 11)

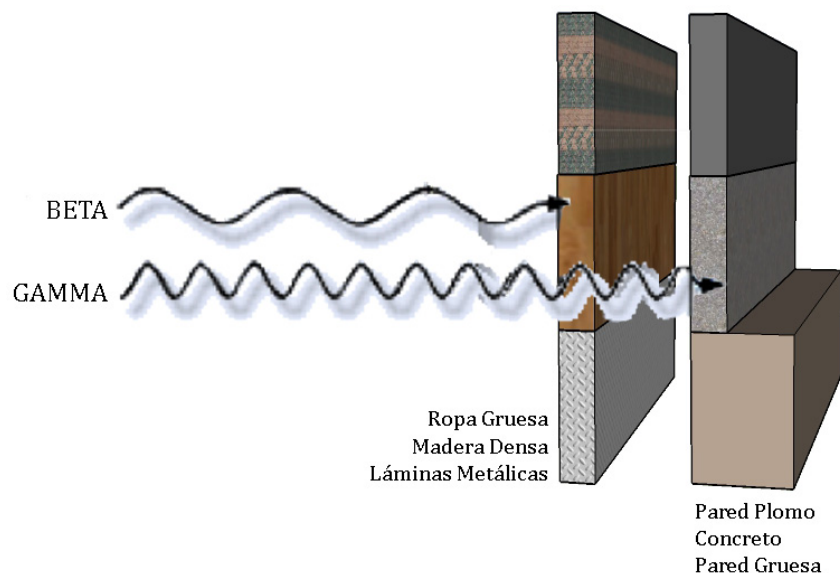


Fig 11. Capacidad de penetración de la radiación gamma y la radiación beta.

Con este estudio preliminar se pretendió determinar la dosis de radiación (gamma y beta) ideal para la esterilización de los copolímeros de ácido láctico/glicólico y láctico/láctico. En un futuro, es necesario la realización de un trabajo de investigación que estudie a profundidad las alteraciones físico-químicas que sufren estos biomateriales al ser irradiados a diferentes dosis de rayos gamma y rayos beta.



V. CONCLUSIONES



1. La radiación beta proporciona un SAL (Nivel de garantía de esterilidad) eficaz a 25 kGy a un menor periodo de tiempo en comparación a la radiación beta; pero altera las propiedades de los biopolímeros estudiados.
2. El método para la determinación de endotoxina en los copolímeros de ácido láctico/láctico y copolímeros de ácido láctico/glicólico mediante el método cinético cromogénico es válido.
3. La dosis eficaz para proporcionar la esterilización de los copolímeros de ácido láctico/láctico y láctico/glicólico tanto con radiación beta como con radiación gamma es de 25 kGy.



VI. BIBLIOGRAFÍA



1. Domb AJ, Khan W. **Focal Controlled Drug Delivery: Advances in Delivery Science and Technology**. Springer. 2014. 42-3
2. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. **Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers**. *Biomaterials*. 1996;17(2):93-102.
3. Nuutinen JP, Clerc C, Virta T, Tormala P. **Effect of gamma, ethylene oxide, electron beam, and plasma sterilization on the behavior of SR-PLLA fibres in vitro**. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2002;13:1325-36.
4. Smit TH, Thomas KA, Hoogendoorn RJ, Strijkers GJ, Helder MN, Wuisman PI. **Sterilization and strength of 70/30 polylactide cages: e-beam versus ethylene oxide**. *Spine*. 2007;32:742-7.
5. Ferraris S, Pan G, Cassinelli C, Mazzucco L, Vernè E, Spriano S. **Effects of sterilization and storage on the properties of ALP-grafted biomaterials for prosthetic and bone tissue engineering applications**. *Biomed Mater*. 2012;7(5):1-13.
6. Oliveira AL, Mano JF, Román JS, Reis RL. **Study of the influence of beta-radiation on the properties and mineralization of different starch-based biomaterials**. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74(1):560-9.
7. Hartman LC, Meenaghan MA, Schaaf NG, Hawker PB. **Effects of pretreatment sterilization and cleaning methods on materials properties and osseointegration of a threaded implant**. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(1):11-8.



8. Silindir M, Özer AY. **Sterilization Methods And The Comparison Of E-Beam Sterilization With Gamma Radiation Sterilization.** FABAD J Pharm Sci. 2009;34, 43-53.
9. European Pharmacopoeia. General texts on sterility, Council of Europe, Edom, Strasbourg, (EP) 5, Vol 1. 445-9, 2005.
10. Morrissey RF, Herring CM. **Radiation sterilization: past, present and future.** Radiat Phys Chem. 2002;63:217-21.
11. Trends in radiation sterilization of health care products. — Vienna: International Atomic Energy Agency. 2008.
12. Woo L, Sandford CL. **Comparison of electron beam irradiation with gamma processing for medical packaging materials.** Radiat. Phys Chem. 2002;63:845-50.
13. Boyd C. **E-beam sterilizes the industry.** J Student Res. 2002;1:39-43.
14. The Irradiation and Sterilization Subcommittee of the Bio-Process Systems Alliance. **Guide to Irradiation and Sterilization Validation of Single- Use Bioprocess Systems.** 2008. Suplemento.
15. Maquille A, Slegers C, Habib JL, Tilquin B. **Electron beam and gamma radiolysis of solid-state metoclopramide.** Pharm Res. 2006;23:1343- 9.
16. McGilvray KC, Santoni BG, Turner AS, Bogdansky S, Wheeler DL, Puttlitz CM. **Effects of (60)Co gamma radiation dose on initial structural biomechanical properties of ovine bone--patellar tendon--bone allografts.** Cell Tissue Bank. 2011;12(2):89-98
17. Schmidt T, Hoburg A, Broziat C, Smith MD, Gohs U, Pruss A. **Sterilization with electron beam irradiation influences the biomechanical properties and the early remodeling of tendon allografts for reconstruction of the**



- anterior cruciate ligament (ACL).** Cell Tissue Bank. 2012;13(3):387-400.
18. Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, von Versen R, Pauli G. **Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses.** Biologicals. 2002; 30:125–33.
19. Lietman SA, Tomford WW, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. **Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery.** Clin Orthop Relat Res. 2000;(375):214-7
20. Kluger R, Bouhon W, Freudenberger H, Kroner A, Engel A, Hoffmann O. **Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage.** Bone. 2003;32:291–6.
21. Munting E, Wilmart JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C. **Effect of sterilization on osteoinduction — comparison of 5 methods in demineralized rat bone.** Acta Orthop Scand. 1988;59:34–8.
22. Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G, SchmitNeuerburg KP. **Extracorporeal irradiation and incorporation of bone grafts — autogeneic cortical grafts studied in rats.** Acta Orthop Scand. 1996;67:583–8.
23. Özer AY, Turker S, Colak S, Korkmaz M, Kiliç E, Ozalp M. **The effects of gamma irradiation on diclofenac sodium, liposome and niosome ingredients for rheumatoid arthritis.** Interv Med Appl Sci. 2013;5(3):122-30.
24. Kroeze RJ, Helder MN, Roos WH, Wuite GJ, Bank RA, Smit TH. **The effect of ethylene oxide, glow discharge and electron beam on the surface characteristics of poly(L-lactide-co-caprolactone) and the corresponding cellular response of adipose stem cells.** Acta Biomater. 2010;6(6):2060-5.
25. Cohen A. **Dental Sterilization Solutions.** Dental Assessment. 2010



26. Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Stachowicz W. **Sterilisation by irradiation. In: Galea G. Essentials of tissue banking. 2010;123–38.**
27. Hamer AJ, Stockley I, Elson RA. **Changes in allograft bone irradiated at different temperatures. J Bone Jt Surg Br. 1999;81:342–4.**
28. Grieb TA, Fornig RY, Stafford RE, Lin J, Almeida J, Bogdansky S, et al. **Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. Biomaterials. 2005;26(14):2033-42.**
29. Balsly CR, Cotter AT, Williams LA, Gaskins BD, Moore MA, Wolfenbarger L Jr. **Effect of low dose and moderate dose gamma irradiation on the mechanical properties of bone and soft tissue allografts. Cell Tissue Bank. 2008;9(4):289-98.**
30. Kaminski A, Grazka E, Jastrzebska A, Marowska J, Gut G, Wojciechowski A. et al. **Effect of accelerated electron beam on mechanical properties of human cortical bone: influence of different processing methods. Cell Tissue Bank. 2012;13(3):375-86.**
31. Nguyen H, Cassady AI, Bennett MB, Gineyts E, Wu A, Morgan DA, et. al. **Reducing the radiation sterilization dose improves mechanical and biological quality while retaining sterility assurance levels of bone allografts. Bone. 2013;57(1):194-200**
32. Nguyen, H, Morgan, DA., Forwood, MR. **Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation?. Cell and Tissue Banking 2007;8(2):81–91.**
33. Zhang YZ1, Bjursten LM, Freij-Larsson C, Kober M, Wesslén B. **Tissue response to commercial silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures. Biomaterials. 1996;17(23):2265-72.**



34. Montanari L, Cilurzo F, Selmin F, Conti B, Genta I, Poletti G et. al. **Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects.** J Control Release. 2003;90(3):281-90.
35. Silva RM, Elvira C, Mano JF, San Román J, Reis RL. **Influence of beta-radiation sterilisation in properties of new chitosan/soybean protein isolate membranes for guided bone regeneration.** J Mater Sci Mater Med. 2004;15(4):523-8.
36. Woo L, Sandford CL. **Comparison of electron beam irradiation with gamma processing for medical packaging materials.** Radiat Phys Chem 2002;63:845– 50.
37. Kowalski JB, Morrissey R. **An Introduction to Materials in Medicine** Academic Press, San Diego (1996). 415.
38. Faraj KA, Brouwer KM, Geutjes PJ, Versteeg EM, Wismans RG, Deprest JA, et al. **The effect of Ethylene Oxide Sterilization, beta irradiation and gamma irradiation on collagen fibril based scaffolds.** J Tissue Eng Regen Med. 2011;9(7):460-70
39. Silindir M, Özer Y. **The effect of Radiation on Variety of Pharmaceuticals and Materials Containing Polymers.** PDA J Pharm Sci Technol. 2012;66(2):184-99.
40. Dorati R, Colonna C, Tomasi C, Genta I, Modena T, Faucitano A, et al. **γ -irradiation of PEGd, IPLA and PEG-PLGA Multiblock Copolymers: II. Effects of Oxygen and EPR Investigation.** Pharm Sci Tech. 2008;9(4):1110-8.
41. Jo SY, Park JS, Gwon HJ, Shin YM, Khil MS, Nho YC et al. **Degradation behavior of poly (L-lactide-co-glycolide) films through gamma-ray irradiation.**



Radiat Phys Chem. 2012;81:846-50.

42. European Medicines Agency. **The use of ionizing radiation in the manufacture of medicinal products European Guidelines 3AQ4a.** 1991.

43. Hegazy EA, Abdel-Rehim H, Diia DA, El-Barbary A. **Controlling of degradation Effects in Radiation Processing of Polymers.** IAEA-TEC-DOC-1617; IAEA. Austria. 2009;67-84.