

Artigo Original

recebido: 30/05/2001 e aceito em 14/12/2001

Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósito hidroxiapatita: colágeno

Preliminary studies of ciprofloxacin delivery in hydroxyapatite: collagen composite

Claudia Akemi Ogawa

ogawa@iqsc.sc.usp.br

Ana Maria de Guzzi Plepis

Laboratório de Bioquímica e Biomateriais

Instituto de Química de São Carlos

Universidade de São Paulo

Av. Trabalhador São-carlense, 400 – Centro

Caixa Postal 780 – 13566-590 – São Carlos - SP

e-mail: amplepis@iqsc.sc.usp.br

Resumo

Compósitos hidroxiapatita:colágeno foram preparados em diferentes proporções a fim de se determinar qual a melhor proporção para a incorporação de antibiótico. A melhor proporção de HA:colágeno obtida foi de 10:1 (m/m), a qual foi caracterizada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), espectroscopia no Infravermelho (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e teste de hidrofiliabilidade, sendo então posteriormente utilizada na incorporação e liberação de ciprofloxacina. As curvas calorimétricas mostraram transições em torno de 40°C, referentes à desnaturação do colágeno. A razão A_{1235}/A_{1450} do espectro no infravermelho do compósito HA:col (10:1) foi de 1,12 e mostra que o colágeno está preservado neste compósito. As fotomicrografias mostram fibras de colágeno uniformemente distribuídas em torno da hidroxiapatita. O teste de hidrofiliabilidade do compósito mostrou que o material foi capaz de absorver 183,2% de água em relação à sua massa seca. Para os estudos preliminares de liberação de antibiótico incorporou-se cerca de 5% de cloridrato de ciprofloxacina em massa no compósito HA:col (10:1), no momento de preparo do mesmo. O experimento de liberação *in vitro* foi realizado em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, a 37°C, durante 72 horas, mostrando uma liberação máxima em torno de 90%, após 10 horas de imersão. A liberação da droga nas primeiras quatro horas obedece ao modelo de Higuchi, sendo indicativo de processo de difusão pelos poros da matriz.

Palavras-chave: Compósitos, Colágeno, Hidroxiapatita, Liberação controlada.

Abstract

*Hydroxyapatite:collagen composites were prepared in different proportions to assess the best ratio for incorporation of ciprofloxacin. The best proportion HA:collagen was 10:1 (w/w) and it was characterized by DSC, IR, SEM and hydrophilicity test and utilized for ciprofloxacin incorporation and liberation. DSC data showed transitions at 40°C, which are ascribed to the collagen denaturation. Ratio A_{1235}/A_{1450} from IR spectrum of the composite HA:col (10:1) was 1.12, showing that collagen is preserved in the composite. Micrographs of the material show collagen fibers, which are uniformly distributed among hydroxyapatite. Hydrophilicity test of composite showed water absorption of 183.2% related to the dry weight of the material. The preliminary liberation study was performed on a composite with incorporated antibiotic at 5% in mass. The *in vitro* liberation experiment, which was conducted on phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, at 37 °C, presented a maximum liberation of about 90% after 10 hours of immersion. The drug delivery appears to be controlled by the porosity of the matrix as it follows the Higuchi model.*

Keywords: Collagen, Composites, Drug delivery, Hydroxyapatite.

Extended Abstract

Introduction

Hydroxyapatite:collagen composites (HA:col) were developed as biomaterials in potential for osseous reconstruction since they have a similar composition to bone (Du et al., 1998; Bakos et al., 1999). The individual components of these composites have essential characteristics to biomaterial, like biocompatibility and biodegradability. Collagen promotes cicatrization, osseous regeneration and is a haemostatic agent (Lawson et al., 1998). The most important aspect of utilization of collagen in composites with ceramics is that the former is the matrix where calcium phosphate salts deposit to originate osseous tissue (Mann et al., 1989).

Hydroxyapatite has been widely utilized in composite preparations with gelatin (Bigi et al., 1998) or collagen (Rhee et al., 1998; Du et al., 1998). The wide utilization of hydroxyapatite is due to the similarity with calcified tissue of human bone. A disadvantage limiting the use of hydroxyapatite as a biomaterial is its low mechanical properties (Metsger et al., 1999). Therefore, its combination with collagen is advantageous.

In this work, we prepared hydroxyapatite:collagen (HA:col) composites in different proportions in order to obtain the best one for the ciprofloxacin incorporation. Ciprofloxacin is a known antibiotic for osteomyelitis treatment (Ramchandani et al., 1998). It does not have teratologic effect but when utilized in the oral form it can induce collateral effects (nausea, vomits, diarrhea, abdominal aches, headaches, etc). Therefore, the utilization of ciprofloxacin in implantable biomaterials is advantageous because the drug is delivered directly in the site of action minimizing the collateral effects. Drug incorporation in implantable biomaterials shows the advantage of maintaining constant level of drug in the organism and a minor frequency of drug administration that results in more comfort to the patient and best effectiveness of treatment.

Methodology

Hydroxyapatite was synthesized (Jarcho et al., 1976) and characterized by FT-IR, X-ray dispersion spectroscopy, X-ray diffraction spectroscopy and Ca/P rate. Collagen was obtained by extraction of porcine serosa in alkaline medium (24 h) (Goissis et al., 1996). Molecular weight of collagen was determined by electrophoresis in polyacrylamide/SDS gel (Laemmli, 1970). HA:col composites were prepared by mixing hydroxyapatite and collagen in different proportions, formatted, frozen, lyophilized and characterized by IR spectroscopy, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electronic microscopy (SEM). HA:col composite 10:1 (w/w) was used for the antibiotic liberation studies because it gives homogeneous composites and collagen is totally incorporated to the hydroxyapatite.

Antibiotic incorporation was made by mixing 5% of ciprofloxacin in the hydroxyapatite:collagen mixture. The composite was frozen and lyophilized. Drug delivery was accomplished by immersion of an amount of composite in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (37°C). Aliquots were taken at some times and the absorbance was measured in UV spectrophotometer (270.6 nm).

Results and Discussion

Characterization. X-ray dispersion spectrum of synthesized hydroxyapatite (HA) shows 3 peaks, referred to the excitement of one electron of phosphorus and two electrons of calcium. There were no contaminant elements with atomic number higher or equal to 11, since this technique is not useful for atoms minor atomic number. Hydroxyapatite IR spectrum (Figure 1a) shows bands corresponding to phosphate ions and structural or adsorbed water molecules. IR spectrum of collagen (Figure 1b) shows characteristic bands corresponding to amides I, II and III and C-H bond of pirrolidinic ring (1658, 1552, 1235 and 1450 cm⁻¹ respectively). Integrity of triple helix structure is showed when the absorbance ratio from bands at 1235 and 1450 cm⁻¹ is bigger or equal than 1 (Silvester et al., 1989). Obtained absorbance ratio (1.12) shows that collagen is preserved in the composite. X-ray diffraction pattern from hydroxyapatite and composite are similar to X-ray pattern expected for non-crystalline hydroxyapatite (Takechi et al., 1998). Calorimetric curves (Figure 2) show transitions around 40°C which prove that collagen is preserved in the composite. Scanning electron micrographs (Figure 3) show collagen fibrils attached to hydroxyapatite granules and a non-compact morphology. Composite was able to absorb 183% of water, based on dry weight of matrix. Water absorption increases very fast at the beginning and becomes constant after 1 hour of immersion (Figure 4).

Antibiotic delivery. Drug delivery was very fast in the first hours reaching about 96% after 10h and becoming very slow after that, reaching about 90% after 80 h of experiment (Figures 5 and 6). Drug delivery from HA:col (24h) composite have showed faster delivery than the release from HA:col (72h) composite (Martins et al., 1998). A very slow drug delivery may be not advantageous since it does not promote an expected therapeutic effect or may cause a bacterial resistance (Dash et al., 1998). Figure 7 shows that Higuchi's model is observed at the first 4 hours of liberation, showing that the release is controlled by matrix porous in this time interval.

Conclusion

These preliminary studies of drug delivery using collagen with 24h of alkaline treatment to prepare HA:Col composites show promising results since the release is fast in the first hours of experiment. This fact avoids a low antibiotic concentration at the beginning of an infection, an inefficient therapeutic effect and bacterial resistance.

Introdução

O desenvolvimento de biomateriais cerâmicos se deve à necessidade de se obter um material artificial para a reconstrução óssea em cirurgias de correção odontológica e ortopédica, visto que nem sempre é possível realizar um implante utilizando tecidos humanos ou de animais. Recentemente, alguns compósitos hidroxiapatita/colágeno (HA/col) foram desenvolvidos como biomateriais em potencial para a reconstrução óssea por apresentarem uma composição similar à do osso (Du *et al.*, 1998; Bakos *et al.*, 1999). Os componentes individuais destes compósitos possuem características essenciais a um biomaterial, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade.

O colágeno promove cicatrização de fraturas e regeneração óssea e é também um agente hemostático (Lawson *et al.*, 1998). Outras vantagens do colágeno como biomaterial são: baixo índice de irritabilidade ou alergenicidade (2%), biodegradabilidade, habilidade em promover crescimento celular e facilidade de obtenção. O colágeno é quebrado no organismo pela enzima collagenase. A razão da degradação é controlada pelo grau de reticulação entre as moléculas de colágeno (Weadock *et al.*, 1984). Como isto é um processo que ocorre naturalmente, os produtos de degradação também devem ser biocompatíveis. O aspecto mais importante na utilização de colágeno na forma de compósitos com biocerâmicas é o fato desta proteína ser a matriz em que os sais de fosfato de cálcio se depositam para dar origem ao tecido ósseo (Mann *et al.*, 1989).

A hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada na preparação de compósitos, seja combinada com filmes de gelatina (Bigi *et al.*, 1998), ou com membranas (Rhee *et al.*, 1998) ou soluções de colágeno (Du *et al.*, 1998). Seu amplo uso se deve à sua similaridade com o tecido calcificado do osso humano. Uma desvantagem que limitaria seu uso como biomaterial é o fato de apresentar a fragilidade característica das cerâmicas (Metsger *et al.*, 1999). Assim, sua combinação com colágeno torna seu uso como biomaterial mais vantajoso.

Neste trabalho, foram preparados compósitos hidroxiapatita:colágeno em diferentes proporções a fim de se obter a melhor proporção para incorporação de antibióticos. O cloridrato de ciprofloxacina foi o antibiótico escolhido neste trabalho em virtude de sua conhecida utilização no tratamento de osteomielite (Ramchandani *et al.*, 1998). A ciprofloxacina pertence à família das fluoroquinolonas, antibióticos que exibem um largo espectro de atividade contra bactérias gram-

positivas e gram-negativas. Apesar de não se ter observado efeito teratológico na utilização de ciprofloxacina, seu emprego na forma oral pode causar efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais, dores de cabeça, entre outros. Assim, no caso de osteomielite, por exemplo, sua utilização em biomateriais implantáveis é vantajosa por minimizar esse tipo de desconforto para o paciente, visto que a droga é liberada diretamente no sítio de ação. Além disso, a incorporação de drogas em compósitos a serem utilizados em implantes apresenta a vantagem de manter níveis constantes de droga no organismo e possibilitar menor frequência de administração do agente ativo, resultando em maior conforto para o paciente e melhor eficácia do tratamento.

Metodologia

A hidroxiapatita utilizada foi sintetizada em laboratório a partir de nitrato de cálcio e fosfato de amônia (Jarcho *et al.*, 1976) e foi caracterizada através de espectrofotometria no infravermelho (IV), espectroscopia de dispersão de raios X, espectroscopia de difração de raios X e razão cálcio/fósforo (Ca/P). A razão Ca/P foi obtida através de análises de fósforo por espectrofotometria no ultravioleta/visível e análises de cálcio por espectrofotometria de absorção atômica. O colágeno foi extraído de serosa porcina após tratamento em meio alcalino por 24 h (Goissis *et al.*, 1996). Seu peso molecular foi determinado através de eletroforese em gel de poliácridamida/SDS (Laemmli, 1970), referindo-se às cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ que compõem a tripla hélice do colágeno e sua concentração foi determinada por liofilização. Os compósitos HA:col (hidroxiapatita:colágeno) foram preparados adicionando-se hidroxiapatita a uma solução de colágeno 2,1% obedecendo-se as proporções 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1 (m/m) de hidroxiapatita em colágeno. Os compósitos foram colocados em formas, congelados e liofilizados. Observou-se que as proporções 5:1 e 10:1 renderam mantas homogêneas, em que o colágeno estava totalmente agregado à HA e que a proporção de 5:1 encolheu após a liofilização. Os compósitos de proporções 15:1 e 20:1 se mostraram mais quebradiços, inclusive apresentando liberação de partículas de HA. Assim, a proporção escolhida para incorporação de antibiótico foi a de HA:col 10:1.

As mantas (10:1) foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (IV), difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Deter-

minou-se a quantidade de água absorvida pelo compósito 10:1 através da imersão do mesmo em água destilada por determinados períodos de tempo (10, 30, 60, 120 min e 5 dias). A absorção de água foi estudada com amostras do compósito previamente secas em dessecador, sob atmosfera de hidróxido de sódio (NaOH), a vácuo.

Os espectros no infravermelho foram realizados através de um equipamento de FTIR Bomem modelo MB 102, 4 cm⁻¹ de resolução, com número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹. As amostras foram analisadas na forma de pastilhas com KBr. Os difratogramas de raios-X foram obtidos através de um Difratômetro automático (ânodo rotatório) de Raios X RIGAKU ROTAFLEX modelo RU-200B. Curvas de calorimetria exploratória diferencial foram medidas através de um DSC 2010 da TA Instruments. As fotomicrografias e os espectros de dispersão de raios-X foram tirados por meio de um equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd, Cambridge, England), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc., Concord, USA) utilizando-se feixe de 20 keV.

A incorporação do cloridrato de ciprofloxacina no compósito foi realizada no momento de preparo do mesmo. Foi adicionada uma quantidade equivalente a 5% em massa de HA:col. O compósito foi então congelado e liofilizado. O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em triplicata, imergindo-se uma amostra do compósito na forma de um disco de 1,4 cm de diâmetro, em uma cela de acrílico termostatizada (37°C) contendo 100 ml de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, sob agitação constante. Alíquotas de 1 ml foram retiradas em determinados períodos de tempo e repostas com tampão fresco. As alíquotas foram diluídas para 10 ml com PBS e, para estimar a quantidade de ciprofloxacina liberada, mediu-se a absorvância no UV, em 270,6 nm através de um espectrofotômetro de UV-visível Hitachi modelo U3000. Os resultados foram analisados como porcentagem cumulativa de ciprofloxacina liberada no meio em função do tempo. Devido às diluições subseqüentes do tampão em que foi liberado o antibiótico, tornou-se necessário corrigir a massa obtida pelas leituras no espectrofotômetro utilizando-se a equação:

$$M_n = m_n - (m_{n-1} \times 0,99) + M_{n-1} \quad (1)$$

onde: M_n = massa de antibiótico presente na solução no momento da retirada da alíquota; m_n = massa de antibiótico considerando-se a diluição devido à reposição com tampão (com diluição para 10 ml já

corrigida); M_{n-1} = massa de antibiótico obtida na leitura imediatamente anterior.

Para a curva de calibração diluiu-se uma solução estoque de cloridrato de ciprofloxacina (150 µg/ml) para concentrações variando entre 0,6 e 15 µg/ml, com PBS.

Resultados e Discussão

Caracterização

O espectro de dispersão de raios X (EDX) da hidroxiapatita sintetizada apresenta 3 picos, sendo um referente à excitação de um elétron da camada K do fósforo e dois picos referentes à excitação de dois elétrons da camada K do cálcio. Através deste espectro pode-se verificar que a amostra não contém traços de elementos contaminantes com número atômico maior ou igual a 11 (já que a técnica é limitada para átomos com número atômico inferior).

A razão Ca/P obtida para a hidroxiapatita sintetizada foi de 1,54, que está abaixo do valor teórico de 1,67 (Aoki, 1991), mostrando uma pequena deficiência em cálcio, semelhante, porém, à hidroxiapatita encontrada em ossos em seu estágio inicial.

O espectro no infravermelho da hidroxiapatita (HA) (Figura 1a) mostra bandas próximas a 600 e 1100 cm⁻¹, correspondentes a íons fosfato. A banda larga na região de 3400 cm⁻¹ é característica de moléculas de água estruturais ou adsorvidas na amostra. Uma banda estreita em cerca de 3560 cm⁻¹ se deve aos íons OH estruturais. A banda referente à OH- da ligação P-OH está em cerca de 870 cm⁻¹. O perfil do espectro obtido mostra concordância com espectros de HA da literatura (Bet, 1995). O espectro de absorção no infravermelho obtido da amostra de colágeno (Figura 1b) mostra bandas em cerca de 1658 cm⁻¹ e 1552 cm⁻¹, respectivamente correspondentes à deformação axial da ligação C=O e à deformação angular da ligação N-H, ambas referentes às bandas de amidas I e II. O espectro também apresenta bandas características em 1235 e 1450 cm⁻¹ referentes, respectivamente, à amida III e à ligação C-H do anel pirrolidínico. O valor calculado da razão dessas absorvâncias (A_{1235}/A_{1450}) foi 1,0 para o colágeno e 1,1 para o compósito, comprovando-se assim que o processo de preparação não degrada a matriz de colágeno. Valores mais baixos para essa relação significariam que a estrutura está desnaturada (Silvester *et al.*, 1989). Enquanto a primeira banda (1235 cm⁻¹) é sensível à presença de estrutura secundária do colágeno, a segunda (1450 cm⁻¹) é independente.

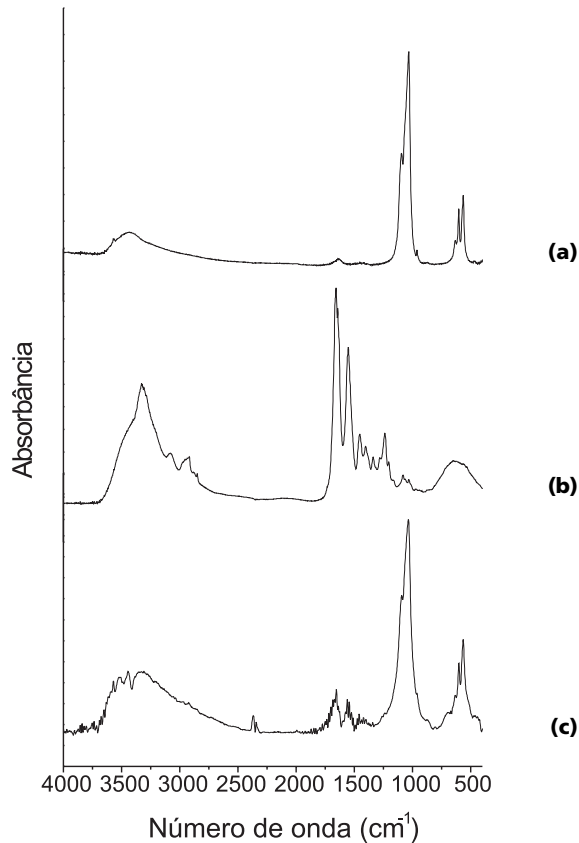


Figura 1. Espectros no infravermelho obtidos (a) da hidroxiapatita (HA), (b) do colágeno e (c) do compósito HA:col (10:1). **Figure 1.** IR spectra of (a) hydroxyapatite, (b) collagen and (c) HA:col (10:1) composite.

O difratograma de raios-X do compósito apresenta perfil semelhante aquele esperado para hidroxiapatita não cristalina (Takechi *et al.*, 1998), mostrando picos característicos em valores de d iguais a 2,8 e 3,4. Não foi possível a obtenção do difratograma de raios-X do colágeno, por não ser este uma matriz cristalina e não apresentar, portanto, difratograma característico.

Na Figura 2 (a e b) são apresentadas as curvas DSC obtidas do colágeno e do compósito (HA:col). A seção destacada na curva calorimétrica do colágeno está ampliada e inserida no gráfico, para melhor visualização da transição, em cerca de 40°C. As análises foram feitas com o objetivo de se determinar a estabilidade do colágeno antes e após a preparação das mantas. A curva do compósito (Figura 2b) apresentou transição em torno de 40°C, referente à desnaturação do colágeno, confirmando o resultado já obtido por espectroscopia no infravermelho, visto que gelatina (colágeno desnaturado) não apresenta transição nesta faixa. A curva também apresentou transições em torno de 100°C, atribuídas à água presente

no compósito, que pode ser proveniente tanto da HA como do colágeno.

Na Figura 3 são apresentadas fotomicrografias da amostra do compósito HA:col (10:1), em duas ampliações diferentes (500 e 2000 vezes). Pode-se notar a presença de fibras de colágeno agregadas às partículas de HA e uma morfologia não compactada.

Absorção de água

A quantidade de água absorvida pelo compósito foi determinada devido à importância da hidrofiliidade para um biomaterial, visto que cerca de 80% do corpo humano é constituído de água e, além disso, a taxa de inchamento da matriz afeta a liberação da droga. Três amostras do compósito 10:1 (HA:col) pesando cerca de 8 a 10 mg foram imersas em 50 ml de água destilada, cada uma. Após determinados períodos de tempo as amostras foram removidas do meio, rapidamente secas com papel de filtro para retirar a água superficial e imediatamente pesadas. A quantidade de água absorvida foi calculada pela equação:

$$\% \text{ de água absorvida} = \frac{(m_u - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (2)$$

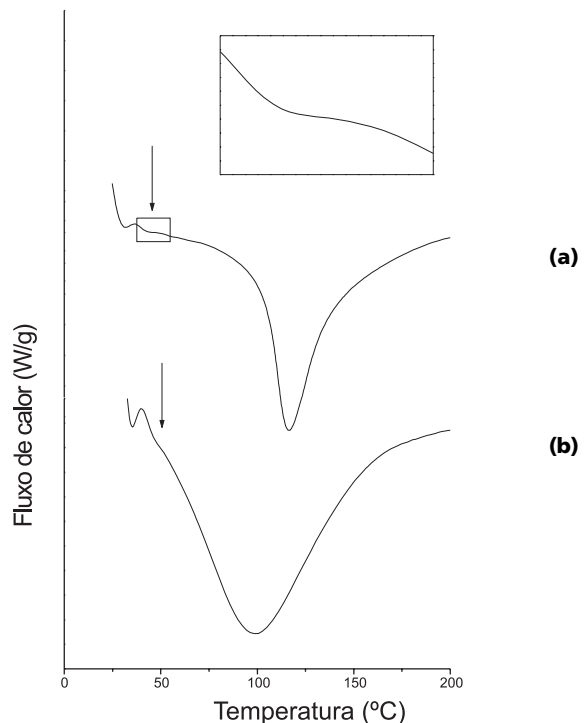


Figura 2. Curvas DSC (a) do colágeno (24h) e (b) do compósito HA:col (10:1). **Figure 2.** DSC curves of (a) collagen (24h) and (b) HA:col (10:1) composite.

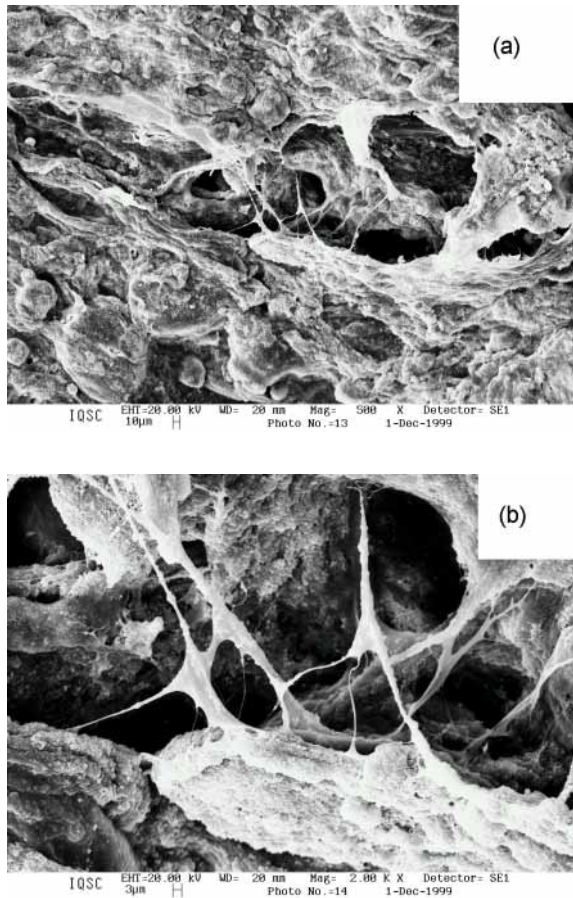


Figura 3. Fotomicrografias do compósito HA:col (10:1) ampliadas (a) 500 vezes e (b) 2000 vezes. **Figure 3.** Scanning electron micrographs of HA:col (10:1) composite amplified (a) 500 x and (b) 2000 x.

A absorção de água aumenta rapidamente no início (Figura 4) e depois se aproxima do conteúdo de equilíbrio de água. A quantidade máxima absorvida é de aproximadamente 183% (m/m) baseada no peso original da matriz e alcançada após cerca de 1 hora de imersão.

Liberação de antibiótico

A liberação de ciprofloxacina no compósito HA:col é mostrada na Figura 5. O comportamento de liberação *in vitro* indica um efeito de liberação prolongado (86% da droga liberada após 10 h).

A ciprofloxacina incorporada ao compósito é liberada rapidamente no início do experimento, atingindo um platô de equilíbrio em cerca de 90%. Observa-se uma liberação bastante lenta após 20 h (Figura 6). A liberação incompleta da droga pode ser atribuída a interações entre a droga e a matriz.

O gráfico da quantidade de antibiótico liberada em

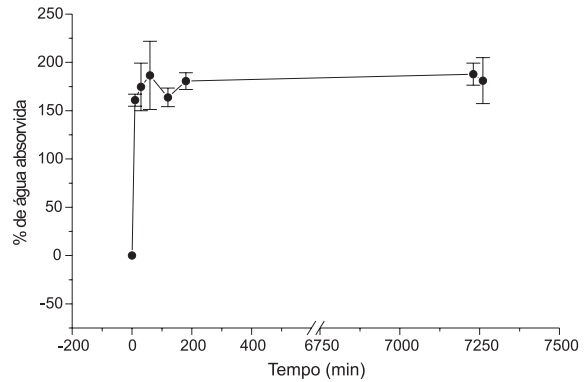


Figura 4. Gráfico apresentando a porcentagem de absorção de água pelo compósito HA:col (10:1) em função do tempo de imersão. **Figure 4.** Water absorption of HA:col (10:1) composite versus immersion time.

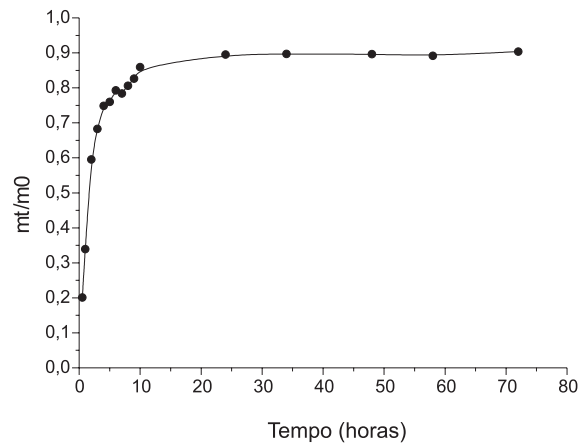


Figura 5. Curva de liberação de ciprofloxacina a partir do compósito HA:col (10:1) com 5% de antibiótico incorporado. **Figure 5.** Release profile of Ciprofloxacin of HA:col (10:1) composite.

função da raiz quadrada do tempo (Figura 7) obedece ao modelo de Higuchi nas quatro horas iniciais de liberação, indicando um mecanismo de liberação de droga do compósito controlado por difusão pelos poros da matriz.

Estudos realizados com compósitos HA:col na forma de pasta na proporção de 20:1, utilizando-se colágeno de serosa porcina com tratamento alcalino de 72 horas (Martins *et al.*, 1998) mostram que cerca de 31% da quantidade total de antibiótico incorporada é liberada após 170 h. No caso do compósito HA:col (10:1), na forma de manta, preparado com colágeno com tratamento alcalino de 24 horas, os estudos preliminares deste presente trabalho mostram que a li-

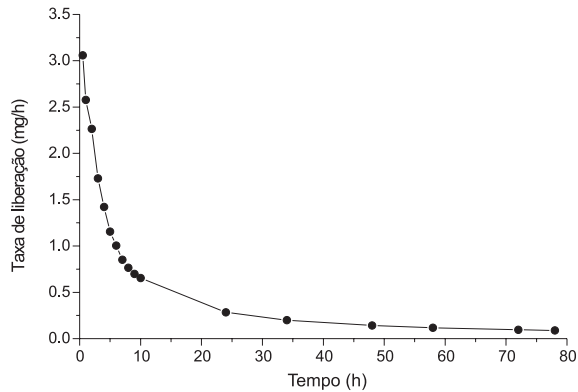


Figura 6. Taxa de liberação de antibiótico do compósito HA:col (10:1). **Figure 6.** Antibiotic liberation rate from HA:col (10:1) composite.

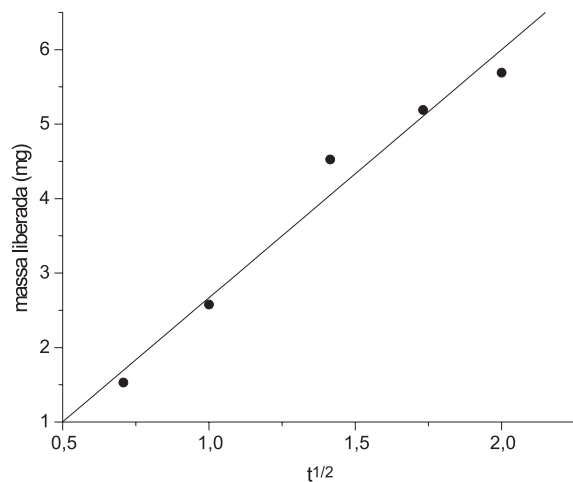


Figura 7. Modelo de Higuchi para as quatro primeiras horas de liberação de ciprofloxacina do compósito HA:col (10:1). **Figure 7.** Higuchi Model for antibiotic liberation from HA:col (10:1) in 4 hours of experiment.

beração parece ser mais rápida, com uma quantidade máxima liberada ocorrendo após as primeiras 10 horas de imersão no tampão. A liberação muito lenta de drogas pode não ser muito vantajosa, visto que poderia não surtir o efeito terapêutico desejado e até mesmo provocar resistência da bactéria ao antibiótico (Dash *et al.*, 1998). Assim, este estudo preliminar mostrando liberação de drogas utilizando a manta HA:col (10:1) preparada com colágeno de 24 h parece bastante promissor visto que apresenta uma liberação relativamente rápida de cerca de 90% nas primeiras 10 horas de imersão.

O compósito HA:col (10:1) (sem incorporação de antibiótico) também está sendo encaminhado para

posteriores estudos biológicos em cães. Também estão sendo realizados testes de liberação com 10% de ciprofloxacina incorporada e testes empregando-se compósitos preparados com colágenos de tratamento alcalino de 48 h.

Conclusão

Os estudos preliminares utilizando mantas HA:col preparadas com colágeno extraído de serosa porcina (com tratamento alcalino de 24 horas) mostram que o emprego deste colágeno apresentou resultados bastante satisfatórios. A melhor proporção verificada foi de 10:1. Este primeiro ensaio de liberação de antibiótico utilizando o compósito HA:col (10:1) é bastante promissor, visto que mostra uma liberação rápida nas primeiras horas de imersão. A vantagem deste tipo de liberação é que se pode impedir uma concentração muito baixa do medicamento no sítio de ação no início do tratamento de uma infecção, evitando efeito terapêutico ineficiente e até mesmo uma possível resistência bacteriana ao antibiótico.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio técnico de Ezer Biazin, Glauco D. Broch e Virginia C. A. Martins. C. A. Ogawa agradece à CAPES pela bolsa concedida.

Referências

- Aoki, H. (1991), "Science and Medical applications in Hydroxyapatite" Japanese Assoc. of Apatite - Sci. Toquio.
- Bakos, D., Soldán, M., Hernández-Fuentes, I. (1999), "Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic-acid composite", *Biomaterials*, v. 20, p. 191-195.
- Bet, M.R. (1995), *Preparação e caracterização de biocerâmicas compostas de colágeno e sais de fosfato de cálcio*, Dissertação de Mestrado, IQSC/USP, São Carlos, 62 p., out.
- Bigi, A., Panzavolta, S., Roveri, N. (1998), "Hydroxyapatite-gelatin films: a structural and mechanical characterization", *Biomaterials*, v. 19, p. 739-744.
- Dash, A. K., Cudworth II, G.C. (1998), "Therapeutic applications of implantable drug delivery systems", *J. Pharmacol. Toxicol. Met.*, v. 40, p. 1-12.
- Du, C., Cui, F.Z., Feng, Q.L., Zhu, X.D., de Groot, K.-J. (1998), "Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity", *Biomed. Mater. Res.*, v. 42, p. 540-548.
- Goissis, G., Plepis, A.M.G., Rocha, J.L. (1996), "Processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxílio de solventes orgânicos e meio alcalino", BR PI 9.405.043-0.
- Jarcho, M., Bolen, C.H., Thomas, M.B., Bobick, J., Kay, J.F., Doremus, R.H. (1976), "Hydroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form", *J. Mater. Sci.*, v. 11, p. 2027-2035.

- Laemmli, U. K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, v. 227, p. 680-685.
- Lawson, A.C., Czernuska, J.T. (1998), "Collagen-calcium phosphate composites", *Proc. Inst. Mech. Eng.*, v. 212, p. 413-425.
- Mann, S., Webb, J., Williams, R.J.P. (1989), *Biomaterialization: chemical and biochemical perspectives*, Weinheim, Germany, VCH.
- Martins, V.C.A., Goissis, G., Ribeiro, A.C., Marcantônio Jr., E., Bet, M. (1998), "The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite:anionic collagen composites", *Artif. Organs*, v. 22, p. 215-221.
- Metsger, D.S., Rieger, M.R., Foreman, D.W. (1999), "Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic", *J. Mater. Sci. – Mater. Med.*, v. 10, p. 9-17.
- Ramchandani, M., Robinson, D. (1998), "In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants", *J. Control. Release*, v. 54, p. 167-175.
- Rhee, S.H., Tanaka, J. (1998), "Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method", *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 81, p. 3029-3031.
- Silvester, M.F., Yannas, I.V., Forbes, M.J. (1989), "Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction", *Thromb. Res.*, v. 55, p.135-148.
- Takechi, M., Miyamoto, Y., Ishikawa, K., Toh, T., Yuasa, T., Nagayama, M., Suzuki, K. (1998), "Initial histological evaluation of anti-washout type fast-setting calcium phosphate cement following subcutaneous implantation", *Biomaterials*, v. 19, p. 2057-2063.
- Waddock, K., Olson, R.M., Silver, F.H. (1984), "Evaluation of collagen crosslinking techniques", *Biomat. Med. Dev., Artif. Organs*, v. 11, p. 293-318.