

Bruna Zacharias Horbylon

Estudo *in vitro* da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local.

Dissertação apresentada á Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero

Uberlândia, 2008

Bruna Zacharias Horbylon

Estudo *in vitro* da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local.

Dissertação apresentada á Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero
Prof. Dr. César Bataglione
Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo

Uberlândia, 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

H811e Horbylon, Bruna Zacharias, 1982-

Estudo in vitro da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local / Bruna Zacharias Horbylon. - 2008.

50 f. : il.

Orientador: Denildo de Magalhães.

Co-orientador: Reinaldo Ruggiero.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Periodontia - Teses. 2. Periodontite - Teses. 3. Tetraciclina - Teses. I. Magalhães, Denildo de. II. Ruggiero, Reinaldo. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU:

616.314.17-008.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AV. Pará, 1720, bloco 2u – sala 2U09 – Campus Umuarama - UBERLÂNDIA –MG – 38400-902
(0XX) 034 –3218-2550

RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA PROVA DEFESA DE MESTRADO DA CD BRUNA ZACHARIAS HORBYLON, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.

Às nove horas do vinte e um de fevereiro do ano de dois mil e oito, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação desta Faculdade, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata, BRUNA ZACHARIAS HORBYLON, com o título: *Estudo in vitro da cinética e desorção da doxiciclina e tetraciclina incorporadas a membranas utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local*. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador expressou o seu julgamento em sessão secreta e exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

Uberlândia 21 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

aprovada "A"
Aprovado/Reprovado/Conceito

Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia. - UFU

Aprovada A
Aprovado/Reprovado/Conceito

Prof. Dr. César Bataglion
Titulação: Doutor
Universidade de São Paulo – FORP/USP

Aprovada - A
Aprovado/Reprovado/Conceito

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades e, especialmente pelas provas a mim concedidas, tão fundamentais para meu crescimento espiritual.

À minha família, em especial aos meus pais, cuja ausência torna-se insignificante diante do amor e dos princípios que me foram transmitidos e que trago comigo. Divido com eles a alegria de concluir mais uma etapa em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Denildo de Magalhães, pelo empenho em me transmitir, ao longo dos anos, o seu imenso conhecimento, e ainda pelo carinho e amizade que tem para comigo e pela competência e seriedade, sendo para mim exemplo de amor e dedicação pela nossa profissão.

Ao Prof. Ms. Helder Henrique M. de Menezes pela confiança, carinho e consideração e, em especial por ser o grande motivador da minha busca por respostas e, acima de tudo, por acreditar na minha capacidade, em todos os momentos.... não cabe aqui minha gratidão...

Ao Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero pelo enorme aprendizado, e por estimular em mim a cada dia a busca por novos conhecimentos e, ainda, pela paciência e carinho para comigo nestes dois anos.

Ao Leandro, por ter se mostrado mais que um colega, caminhando ao meu lado durante a execução deste trabalho, sempre paciente e pronto a me ajudar em todos os momentos... Obrigada pelo aprendizado, carinho e amizade.

A Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia por ter me acolhido, oferecendo-me a oportunidade de fazer parte da valiosa vida acadêmica

Ao Instituto de Química pela oportunidade de compartilhar conhecimentos fundamentais para minha formação.

A CAPES pelo apoio financeiro fornecido para a realização deste trabalho durante o curso de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O êxito é fácil de obter. O difícil é merecê-lo”.

Albert Camus

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Dispositivos de liberação local (DLL)	6
2.2 Colágeno como biomaterial	8
2.3 Tetraciclina	10
2.3.1 - Propriedades físico-químicas	10
2.3.2 - Aspectos clínicos e microbiológicos	11
2.3.3 – Administração local de Tetraciclina	13
2.4 Doxíciclina	14
2.4.1 - Propriedades físico-químicas	14
2.4.2 - Aspectos clínicos e microbiológicos	15
2.4.3 – Administração local de Doxíciclina	17
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Confeção e preparo dos dispositivos de liberação local (DLL) de tetraciclina e doxíciclina para o experimento	21
4.2 Imersão das membranas em solução tampão de fosfato	22
4.3 Construção de curvas de calibração para doxíciclina e tetraciclina em solução tampão de fosfato	22
4.4 Medidas das absorbâncias (Abs) das soluções tampão contendo DOX e TET e determinação de parâmetros da cinética de desorção de doxíciclina e tetraciclina	25
5 RESULTADOS	27
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

RESUMO

Embora a terapia mecânica promova resultados satisfatórios no controle da doença periodontal, a completa remoção do biofilme bacteriano é rara. Assim, antimicrobianos de uso local, como a doxiciclina e a tetraciclina, têm sido propostos como coadjuvantes da terapia convencional. O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, a cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a dois dispositivos de liberação local (DLLs) de colágeno: DOX e TET. Para tanto, tais dispositivos foram imersos em 25ml de solução tampão de fosfato, permanecendo em banho termostatizado a 36,5 °C durante 15 dias. As soluções foram analisadas no espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 2501 PC) em comprimento de onda 275nm, nos tempos de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 168, 240 e 360 horas após o início do experimento. Em seguida, foram construídas curvas de calibração para a doxiciclina e tetraciclina em solução tampão de fosfato. Para o estudo da cinética de desorção, foram aplicados modelos de primeira ordem, através de gráficos do logaritmo neperiano (ln) da massa dos fármacos liberada versus tempo. Os resultados demonstraram que os fármacos foram liberados por 96 horas, sendo observada maior velocidade de desorção nas primeiras doze horas. TET liberou maior quantidade de antimicrobiano quando comparado a DOX em todos os períodos analisados.

Unitermos: colágeno, doxiciclina, tetraciclina, desorção, cinética

ABSTRACT

Although mechanical treatment promotes satisfactory results in the control of periodontal disease, complete removal of the bacterial biofilm is rare. Local antimicrobials like doxycycline and tetracycline have therefore been proposed as coadjuvants of conventional treatment. The objective of this work is to evaluate, *in vitro*, the desorption kinetic of doxycycline and tetracycline incorporated into two controlled release devices (CRDs) of collagen: DOX and TET. For this, the devices were introduced to 25ml of phosphate buffer and maintained in a thermostated bath at 36,5 °C for 15 days. The solutions were analyzed in a spectrophotometer (Shimadzu, model UV 2501 PC) at wavelength 275nm, at intervals of 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 168, 240 and 360 hours after the start of the experiment. Next, calibration curves were constructed for the doxycycline and tetracycline in phosphate buffer. For the desorption kinetic study, first order models were applied, through neperian logarithm graphs (ln) of drug mass released versus time. The results demonstrate that the drugs were released for 48 hours, with higher speed of desorption observed in the first four hours. TET released a higher quantity of antimicrobial than DOX in all the periods analyzed.

Keywords: collagen, doxycycline, tetracycline, desorption, kinetics.

1 INTRODUÇÃO

Embora a doença periodontal possua reconhecida natureza multifatorial (Socransky & Haffajee, 1993; Armitage et al., 1994), o biofilme dental bacteriano ainda é considerado o fator etiológico primário para seu estabelecimento e progressão (Løe et al., 1965; Lindhe et al., 1973; Socransky & Haffajee, 2002).

Diferente do conceito de placa bacteriana, originado a partir da Microbiologia acadêmica e definido como depósitos firmemente aderidos aos dentes não podendo ser removidos por jato de água ou ar (Dawes et al., 1973); o termo biofilme foi designado para comunidades bacterianas que se estabelecem em ambientes úmidos como encanamentos de água e esgoto, rios e lagos, sendo inicialmente descritos por Costerton et al., (1999) e, mais recentemente, por Donlan (2002).

As bactérias periodontopatogênicas residem em biofilmes existentes nos dentes ou em superfícies epiteliais. Tais biofilmes conferem proteção aos microrganismos colonizadores contra as defesas naturais do organismo, permitem propriedades metabólicas que não seriam possíveis se as espécies existissem em estado livre (planctônico) e aumentam a resistência das bactérias presentes no biofilme a antimicrobianos (Socransky & Haffajee, 1993).

Inicialmente, a relação direta entre o número total de bactérias e a amplitude do efeito patogênico foi aceita, sendo que, diferenças biológicas relevantes na composição do biofilme não eram consideradas (hipótese da placa inespecífica) (Theilade, 1986).

Posteriormente, estudos longitudinais como de Slots (1976) e Newman et al., (1977) indicaram maior risco de destruição periodontal nos sítios colonizados por algumas espécies de microrganismos potencialmente patogênicos, evidenciando a especificidade dos biofilmes bacterianos atualmente aceita (hipótese da placa específica) (Löesche, 1979).

Apesar de evidências indicarem a especificidade bacteriana da doença periodontal e alguns fatores adicionais associados com o curso das

periodontopatias como a influência genética (Walker et al., 2004), resposta imune do hospedeiro (Slots & Jorgensen, 2002) e fatores ambientais (Roberts, 2002), a terapia periodontal ainda se baseia na redução da microbiota supra e subgengival a quantidade compatível com a saúde dos tecidos.

Estudos demonstram que, embora a terapia mecânica não-cirúrgica de raspagem e alisamento radicular, considerada terapia padrão, promova resultados satisfatórios no controle da inflamação periodontal, a completa remoção do biofilme e de depósitos subgengivais é rara, principalmente em sítios profundos (Walker & Ash, 1976; Eickholz et al., 2005).

Dessa forma, agentes antimicrobianos têm sido propostos como coadjuvantes da terapia mecânica convencional com o intuito de auxiliar no combate aos patógenos periodontais e na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro, reduzindo a destruição tecidual (Xajigeorgiou et al., 2006).

A administração de antimicrobianos pode ser feita por via sistêmica ou pela sua aplicação direta na bolsa periodontal (via local). Cada método de administração possui vantagens e desvantagens. A terapia local permite a aplicação de antimicrobianos em níveis que não podem ser alcançados pela via sistêmica. Além disso, não são observados efeitos colaterais adversos (Greenstein & Polson, 1998; Wennström et al., 2001). Por outro lado, antibióticos sistêmicos podem alcançar microrganismos amplamente distribuídos pela cavidade oral (Haffajee et al., 1995; Addy & Martin, 2003).

A tetraciclina e a doxiciclina (derivado sintético da tetraciclina) são bacteriostáticos com amplo espectro de ação que atuam contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas por inibição específica do ribossoma procariótico (bacteriano). A síntese de proteínas é, portanto, inibida na bactéria, impedindo a replicação e ocasionando a morte celular (Cunha et al., 1982).

Além do efeito anti-bacteriano, tais fármacos possuem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, uma vez que reduzem a atividade fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos. Apresentam, ainda, ação anti-colagenase e anti-lipase, favorecendo o reparo do tecido conjuntivo, que é clinicamente traduzido pelo aumento da resistência à sondagem (Delaissé et al., 2000).

O colágeno tipo I, obtido a partir de cortical óssea bovina, tem sido utilizado na Odontologia como material para fabricação de membranas ou barreiras biológicas, empregadas nas técnicas de regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada devido a várias propriedades como biocompatibilidade, capacidade de ser quimiotático para fibroblastos humanos, é absorvível fisiologicamente pelos tecidos (Bunyaratavej & Wang, 2001), atua como suporte (material carreador) para crescimento celular na engenharia de tecidos (Li & Wosney, 2001), está presente em abundância na natureza, possui afinidade por outros polímeros sintéticos e é de fácil manuseio podendo ser modelados de diversas formas (Lee et al., 2001).

Como as tetraciclinas tem sido amplamente utilizadas em procedimentos periodontais com o objetivo de auxiliar na descontaminação local, parece bastante lógico utilizar membranas de colágeno impregnadas por tais fármacos como dispositivos de liberação medicamentosa local em bolsas profundas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dispositivos de liberação local (DLL)

Para Langer & Peppas (1981), os dispositivos de liberação local de drogas estão classificados como sistemas de liberação sustentada e controlada. O sistema de liberação sustentada promove a liberação do fármaco por um período de menos de 24 horas, enquanto que o sistema de liberação controlada o faz por um período maior que 24 horas.

Em 1984, Addy & Langeroudi estudaram o metronidazol e a clorexidina em tiras de metilmetacrilato e verificaram a efetividade deste dispositivo, marcadamente com o uso do metronidazol, na redução da microbiota subgengival.

Addy et al. (1988), compararam o uso de tiras de acrílico contendo diferentes antimicrobianos (clorexedina, metronidazol e tetraciclina) com raspagem e alisamento radicular somente e a não realização de tratamento em 75 pacientes com bolsas periodontais = 6mm. As tiras permaneceram nos sítios por uma semana, quando foram colocadas novas tiras, as quais permaneceram por mais sete dias. Profundidade de sondagem, sangramento á sondagem e perda de inserção foram avaliados no início e após 3 meses. No final do estudo, foi verificado que houve melhora clínica para os quatro tipos de tratamentos avaliados, entretanto, melhores resultados foram obtidos para o grupo que recebeu somente terapia mecânica e o grupo que recebeu tiras de acrílico contendo metronidazol.

Rams & Slots (1996) afirmaram que os procedimentos terapêuticos atuais indicam que as doenças periodontais poderiam ser controladas pela supressão de algumas espécies de microrganismos do biofilme subgengival que são considerados patogênicos e pela interferência na recolonização destes sítios por estas bactérias. Observaram que o debridamento mecânico/cirúrgico na região radicular usualmente não erradica certos microorganismos como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *B. forsythus* do ecossistema subgengival devido ao seu potencial invasivo para as células

epiteliais e tecido conjuntivo. Com o intuito de intensificar a ação da raspagem e alisamento radicular no tratamento das periodontopatias, o emprego de agentes antimicrobianos tópicos como os bochechos bucais ou a irrigação do sulco gengival e a colocação de dispositivos que liberem lenta e gradualmente essas substâncias foram propostos.

Segundo Killoy & Polson (1998) dentre os sistemas de liberação de antimicrobianos podemos citar os que empregam fitas ou fibras não degradáveis de tetraciclina (Actisite ®); géis de minociclina (Periocrine ®) e metronidazol (Elyzol ®); sistema pó-líquido de doxiciclina (Atridox ®) e pastilhas de clorexidina (Periochip ®).

De acordo com Ciancio, em 1999, algumas características deveriam ser consideradas na escolha de um antimicrobiano de liberação local na terapia periodontal como: alcançar o sítio da doença (base da bolsa), atingir concentração adequada, ser mantido no local por um período adequado de tempo durante o tratamento, ser efetivo contra patógenos periodontais, ser clinicamente efetivo como terapia coadjuvante, seguro para os dentes e tecidos moles, ter efeitos colaterais adversos mínimos, não causar resistência bacteriana, ser de fácil aplicação e biodegradável.

Rosling et al. (2001) realizaram estudo longitudinal em 223 indivíduos portadores de doença periodontal com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação tópica de PVP como adjunto no tratamento periodontal não cirúrgico e na terapia periodontal de suporte. Todos os pacientes foram submetidos à terapia não-cirúrgica, sendo que, no grupo teste foi aplicado PVP a 1%. Os pacientes foram novamente examinados 3, 6 e 12 meses após a terapia e foram submetidos a 3, 5 e 13 anos de terapia de periodontal de suporte. Embora tenha sido constatada melhora nos pacientes do grupo teste, muitos indivíduos apresentaram recorrência da doença. Para explicar tal recorrência os autores sugerem algumas razões como controle de placa não-adequado, neoformação de placa subgengival e incompleta remoção da microbiota subgengival durante a fase inicial de tratamento.

Wennstrom et al. (2001), em estudo multi-cêntrico, avaliaram a ação da terapia local com doxiciclina associada à raspagem e alisamento radicular ou

associada ao debridamento mecânico por meio de ultra-som. Estes autores encontraram reduções nos parâmetros clínicos significativamente maiores para o grupo debridamento+doxíciclina aos 3 meses. Porém, aos 6 meses, foi encontrada somente maior redução em sangramento à sondagem para este mesmo grupo. Os autores concluíram que a forma simplificada de tratamento mecânico (debridamento com ultra-som) associada à terapia local com doxíciclina pode ser considerada uma abordagem terapêutica mais prática, já que o tempo clínico para a conclusão da mesma é menor.

Salvi et al. (2002) realizaram estudo clínico, cego, randomizado com o objetivo de avaliar clínica e microbiologicamente o efeito de três dispositivos de liberação controlada após terapia periodontal inicial: Atridox[®], Elyzol[®] e PerioChip[®] em 47 pacientes por 18 semanas. Os resultados indicaram ganho significativo do nível de inserção clínica para Atridox[®] e diminuição da profundidade de sondagem para os três dispositivos. Além disso, os sítios tratados com Atridox[®] quando comparados com os sítios tratados com Elyzol[®] apresentaram ganho de 0,3 mm de inserção clínica.

2.2 Colágeno como biomaterial

O colágeno é uma proteína fibrosa formada por três cadeias polipeptídicas em tripla hélice chamadas cadeias α . Sendo este um dos principais constituintes da matriz extracelular de vários tecidos. Existem cerca de 19 tipos de colágeno, dos quais os mais conhecidos e abundantes são o colágeno tipo I e II (Lee et al., 2001; Seal et al., 2001).

O colágeno representa a principal macromolécula extracelular do tecido conjuntivo periodontal. Cerca de 90% do colágeno humano é do tipo I, o qual é encontrado principalmente em ossos e pele, sendo o colágeno tipo II o maior constituinte da cartilagem (Delaissé et al., 2000; Seal et al., 2001).

Há alguns anos o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso de colágeno xenogênico (obtido principalmente de bovinos) como material para uso clínico. Frequentemente o colágeno é obtido do couro do animal ou tendão. Contudo, a confecção de membranas a partir desse tipo de colágeno com vistas à RTG exige tratamento químico à base de glutaraldeído, por exemplo, a

fim de aumentar o número de ligações cruzadas do colágeno e, por conseguinte, o tempo de permanência no tecido e dificultar a passagem de células (Rocha et al., 2002). Uma alternativa é utilizar a cortical óssea bovina desmineralizada, cuja parte orgânica é constituída principalmente por colágeno tipo I densamente organizado (Taga et al., 1997).

Segundo alguns autores este material apresenta baixo potencial imune quanto implantado em animais e humanos (Hyder et al., 1992; Benqué et al., 1997).

Yamatogi et al., (2005) testaram a permeabilidade e integridade da membrana de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina em associação com a membrana de pericárdio bovino liofilizado. Em 15 ratos Wistar, machos, adultos, implantou-se no subcutâneo da região cérvico-torácica dorsal a combinação de duas membranas de cortical óssea desmineralizada tendo no interior a membrana de pericárdio bovino. Os animais (cinco ratos/grupo) foram submetidos à eutanásia aos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. A avaliação microscópica mostrou que a membrana de cortical óssea bovina é rapidamente absorvida e não confere proteção à membrana de pericárdio bovino liofilizado.

Lekovic (2001) e Takeishi et al., (2001) observaram a presença de pequenas áreas de absorção da membrana óssea bovina nos locais referentes aos antigos canais nutritivos, sugerindo que esses locais podem apresentar grande influência nas propriedades mecânicas da membrana. Por ser originária da matriz orgânica de osso cortical bovino, a localização e número desses canais em cada membrana provavelmente apresentam variações, o que poderia representar uma desvantagem do material, porque haveria uma variação no tempo de absorção da membrana de acordo com o lote.

Na degradação do colágeno estão envolvidas várias enzimas, no entanto as principais são as enzimas chamadas de collagenases, que são especializadas em hidrolisar o colágeno. As collagenases pertencem a família das enzimas chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs), estas formam uma grande família de enzimas zinco dependentes responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo e, recentemente foi demonstrada sua ação em momentos da modelação e remodelação óssea (Bord et al., 1996).

Somente as MMP-1 e MMP-8 podem clivar o colágeno tipo I. Essas collagenases podem ser produzidas por diversos tipos celulares, entre elas estão os fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e osteoclastos, bem como por algumas bactérias que estão presentes na cavidade oral como a *Porphyromonas gingivalis* (Wang & McNeil, 1998).

2.3 Tetraciclina

2.3.1 - Propriedades físico-químicas

A clortetraciclina (7-clortetraciclina) foi o primeiro antibiótico da família das tetraciclinas utilizado clinicamente, sendo descoberta em 1948 pelo micologista Benjamin M. Duggar, que observou atividade antimicrobiana incomum em organismos que formavam uma colônia amarelo-ouro. Tais organismos foram designados como *Streptomyces aureofaciens* e o produto aureomicina (Roberts, 1996). Em 1950, a oxitetraciclina foi isolada de *Streptomyces rimosus* e três anos depois, a tetraciclina foi produzida pela desalogenação catalítica da clortetraciclina (Chopra & Roberts, 2001).

A tetraciclina possui peso molecular de 444,45g e apresenta estrutura química que consiste em um núcleo hidronaftaceno com quatro anéis fundidos, sendo que o nome genérico dos análogos é determinado a partir de substituições na estrutura básica (Chopra & Roberts, 2001).

A absorção por via oral da tetraciclina varia entre 75% e 77% da dose ingerida e, sua distribuição ocorre facilmente pela maioria dos líquidos do organismo, inclusive bile e líquidos sinovial, ascítico e pleural. Apresenta, ainda, tendência a localizar-se nos ossos, fígado, baço, tumores e dentes (Morejon et al., 2003).

Sua absorção não é marcadamente influenciada pela ingestão simultânea de alimentos, mas pode ser prejudicada por antiácidos contendo alumínio, cálcio ou magnésio e ainda por preparações contendo ferro. Além disso, a ingestão de álcool, barbitúricos, carbamazepina e fenitoína diminuem a meia-vida da tetraciclina (Chopra & Roberts, 2001; Morejon et al., 2003).

A meia-vida normal da tetraciclina é de 6 a 11 horas, sendo que as concentrações terapêuticas podem ser alcançadas após 2 a 3 dias. Sua eliminação ocorre de forma inalterada por via renal e fecal, podendo ser excretada também pelo leite materno. Sua união às proteínas é baixa a moderada (Morejon et al., 2003).

Como a tetraciclina possui a capacidade de atravessar a placenta, seu uso não é recomendado durante a segunda metade da gravidez, pois pode causar descoloração permanente dos dentes, hipoplasia do esmalte e inibição do crescimento ósseo do feto. (Roberts, 1996; Morejon et al., 2003; Ribera, 2004).

A tetraciclina pode causar alguns efeitos adversos característicos das tetraciclinas como reações de hipersensibilidade (urticária, edema angioneurótico, anafilaxia, lesões eritematosas e maculopapulares); náusea, vômito, diarreia, enterocolite, esofagite, Trombocitopenia, neutropenia e eosinofilia, reações de fotossensibilidade (Roberts, 1996; Chopra & Roberts, 2001; Ribera, 2004).

2.3.2 - Aspectos clínicos e microbiológicos

A tetraciclina é um bacteriostático com amplo espectro de ação que atua por inibição específica do ribossoma procariótico (bacteriano), a partir do bloqueio do receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica. Como o ribossoma eucariota das células humanas é substancialmente diferente, não é afetado. A síntese de proteínas é, portanto, inibida na bactéria, impedindo a replicação e levando à morte celular (Cunha et al., 1982).

Apresentando um amplo espectro de ação, a tetraciclina é eficaz contra muitas espécies, tanto Gram-negativas quanto positivas, e até contra alguns protozoários. Os microorganismos podem ser considerados sensíveis se a C.I.M. (Concentração Inibitória Mínima) não for superior a 4,0 µg/ml, e intermediários se a C.I.M. estiver entre 4,0 e 12,5 µg/ml (Roberts, 1996).

Estudos como de Christersson & Zambon (1993) e Gordon & Walker (1993) tem demonstrado que a raspagem e alisamento radiculares por si só

foram ineficientes para eliminar o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e, coadjuvada com a tetraciclina e controles periódicos, apresenta resultados clínicos e microbiológicos melhores.

MacNeill et al., (1997) avaliaram os efeitos da tetraciclina hidrocloreídica (TCN) e do gluconato de clorexedina (CHX) no crescimento e viabilidade de *Candida albicans*. Subculturas de *Candida albicans* foram divididos em cinco grupos: grupo T (controle), grupo 2 (tratamento com 0,12% de CHX), grupo 3 (tratamento com 3mg/ml de TCN com pH 4,5), grupos 4 e 5 (tratamento com solução tampão livre de NaN_3 , com pH 4,5 e pH 7,4 respectivamente). Todos os grupos foram incubados por dez dias e amostras diárias eram colhidas para se determinar a viabilidade de cada grupo. As amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de transmissão e varredura ao final do período experimental. Os resultados mostraram que utilizado em altas concentrações TCN inibe o crescimento de *Candida albicans*, enquanto que CHX inibe a replicação e o crescimento celular dos microorganismos avaliados.

É sabido que as tetraciclinas possuem forte afinidade a cátions bivalentes e trivalentes, o que permite a formação de complexos com cálcio encontrado no tecido ósseo, esmalte e dentina durante o processo de calcificação destes tecidos. Sua união com o cálcio parece ser reversível, conferindo-lhe substantividade, ou seja, capacidade de ser liberada lentamente, exercendo sua atividade antimicrobiana (Roberts, 1996; Thomas et al., 2000).

Além do efeito anti-bacteriano, a tetraciclina possui propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, uma vez que reduz a atividade fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos (Thomas et al., 2000). Apresenta ainda, ação anti-colagenase e anti-lipase, favorecendo o reparo do tecido conjuntivo, que é clinicamente traduzido pelo aumento da resistência à sondagem (Ramamurthy et al., 2000).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm relatado o potencial da tetraciclina e seus análogos na indução da produção de matriz óssea por osteoblastos (incluindo síntese de novo colágeno), inibição a função dos osteoclastos ou mesmo indução de apoptose em osteoclastos (Bettany et al., 2000).

2.3.3 - Administração local de Tetraciclina

O Actisite® foi um dos primeiros dispositivos de liberação local de tetraciclina utilizados em humanos. É um sistema constituído por fibras (copolímeros plásticos, não reabsorvíveis e biologicamente inertes) impregnadas com pó de tetraciclina hidrocloreídrica 25% (Goodson et al., 1983).

A fibra é introduzida subgengivalmente até ocupar completamente o interior da bolsa periodontal e mantida *in situ* com o auxílio de um adesivo a base de cianocrilato por 7 a 10 dias (Goodson et al., 1991). O antibiótico é, então, liberado através do mecanismo de difusão e osmose. Esse sistema de liberação controlada é capaz de manter concentrações de tetraciclina no fluido gengival excedendo 1.300 mg/mL por um período de sete dias, com concentrações médias de 43 mg/mL nas porções superficiais da parede de tecido mole da bolsa (Ciancio et al., 1992).

A fibra de tetraciclina combinada com raspagem dental e aplainamento radicular apresentou resultados significativamente melhores nos parâmetros de profundidade de sondagem e ganho clínico de inserção conjuntiva quando comparado ao tratamento convencional em pacientes incluídos na terapia periodontal de manutenção (Newman et al., 1994; Kinane & Radvar, 1999).

Em estudo avaliando a utilização da fibra de tetraciclina em lesões de furca classe II associada a sangramento persistente, Tonetti et al., (1998) observou redução significativa na profundidade de sondagem e sangramento à sondagem após 3 meses, entretanto esses resultados não se mostraram significativos após 6 meses.

Nos últimos anos, novos veículos para liberação local de tetraciclina tem sido desenvolvidos. Jones et al., (2000) publicaram estudo no qual descrevem as características e avaliações clínicas preliminares de um gel de tetraciclina hidrocloreídrica (5%) com capacidade de aderir aos tecidos gengivais e a superfície dental, permitindo a liberação lenta da droga no interior da bolsa periodontal. A pré-avaliação do desempenho clínico mostrou que o gel, associado a raspagem e alisamento radicular, promove diminuição da

profundidade de sondagem e reduz a o número de patógenos periodontais no interior da bolsa.

2.4 Doxiciclina

2.4.1 - Propriedades físico-químicas

Ao manipularem quimicamente a tetraciclina, Stephens et al., (1958) observaram que a remoção do grupo 6-hidroxila da tetraciclina resultaria na formação da 6-deoxitetraciclina, composto com propriedades farmacocinéticas únicas e com atividade antibacteriana maior que as tetraciclina originais.

Em 1962, Schach Von Wittenau et al. relataram o processo de síntese da a-6-deoxi-5-oxitetraciclina, denominada doxiciclina. O fármaco é obtido semi-sinteticamente a partir da oxitetraciclina ou metaciclina, sendo isolado como cloridrato com peso molecular de 462,46g. Segundo os autores a doxiciclina é um isômero estrutural da tetraciclina, diferindo apenas quanto a posição do grupo hidroxila 1: situado no carbono 6 na tetraciclina e no carbono 5 na doxiciclina característica que lhe confere maior estabilidade que as tetraciclina.

Fabre et al., (1966) relatam que, ao contrário das demais tetraciclina, pouco absorvidas pelo organismo, a doxiciclina é quase completamente absorvida (93%) na porção superior do trato gastrointestinal após administração oral. Seu ponto isoelétrico e máxima lipossolubilidade ocorrem em Ph 5.5, sugerindo um pico de absorção no duodeno. A meia vida de absorção da droga é de aproximadamente 50 minutos, sendo possível detectá-la em soro 30 minutos após administração oral.

Além dos efeitos adversos característicos das tetraciclina, a doxiciclina pode promover hepatotoxicidade, quando administrada em pacientes com insuficiência hepática ou renal (Okhubo et al., 1969).

Em 1971, Fabre et al. relataram que a doxiciclina é parcialmente inativada pelo metabolismo hepático, sendo eliminada por via renal (glomérulos renais) e fecal; podendo ser excretada também no leite materno.

Segundo Franklin & Snow (1975), a doxiciclina apresenta elevado grau de lipossolubilidade (5 a 10 vezes mais lipossolúvel que as demais tetraciclinas), alta capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas e pouca afinidade de ligação ao cálcio, sendo altamente estável no soro humano, não se degradando para forma epianidro.

Thadepalli et al. (1978) avaliaram os níveis séricos da doxiciclina administrada por via oral em várias doses: 100 mg, duas vezes ao dia ($< 4 \mu\text{g/ml}$); 100 mg, três vezes ao dia ($7 \mu\text{g/ml}$); 200mg, duas vezes ao dia (aproximadamente $15 \mu\text{g/ml}$). O pico sérico da droga ocorre 2 horas após sua ingestão, com meia-vida entre 18 e 22 horas.

2.4.2 - Aspectos clínicos e microbiológicos

Cunha et al. (1982) relatam que, usada como cloridrato, a doxiciclina é uma tetraciclina bacteriostática de amplo espectro que atua por inibição da síntese de proteínas e bloqueia a união do RNA de transferência ao complexo ribossômico do RNA mensageiro. A união reversível é produzida na subunidade ribossômica 30S dos organismos sensíveis.

Segundo Riond & Rivieri (1988) a doxiciclina é um antibiótico com amplo espectro de ação, atuando contra microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, gram-positivos e negativos, sendo que os patógenos periodontais apresentariam susceptibilidade a concentrações de 0,1 a 2.0 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina.

Golub et al. (1994) demonstraram que a doxiciclina, aplicada via sistêmica e em baixas concentrações, possui propriedades não-antibacterianas, porém têm a capacidade de inibir metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) em tecido gengival humano inflamado.

Feres et al. (1999) avaliaram a proporção e prevalência de bactérias periodontopatogênicas resistentes à doxiciclina. Foram selecionados 20 indivíduos portadores de periodontite e divididos em dois grupos: grupo controle (pacientes receberam raspagem e alisamento radicular – RAR) e grupo teste (pacientes receberam RAR e administração sistêmica de doxiciclina, 100mg/dia por 14 dias). Os resultados mostraram que as espécies

bacterianas mais resistentes foram: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces gerencseriae*, *Streptococcus constellatus*, *Actinomyces naeslundii* genospecies 2, *Streptococcus gordonii*, *Eikenella corrodens* and *Actinomyces naeslundii* genospecies 1. Aproximadamente 50% dos microrganismos presentes nos sítios periodontais ao final dos 14 dias de administração de doxiciclina mostraram-se sensíveis ao fármaco.

Jorgensen et al. (2004) avaliaram a capacidade do gel de doxiciclina a 10% (Atridox®) de suprimir bactérias periodontopatogênicas subgengivais após a raspagem e alisamento radicular. Quinze pacientes portadores de periodontite moderada e avançada com bolsas periodontais de 6 – 7 mm receberam duas formas de tratamento: raspagem e alisamento radicular e doxiciclina (Atridox®) associada a raspagem e alisamento radicular. Os patógenos periodontais avaliados foram: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Dialister pneumosintes*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*, *Campylobacter species*, *Eubacterium species*, *Fusobacterium species*, *Peptostreptococcus micros*, *Eikenella corrodens* e espécies de *Staphylococcus*. Os resultados mostraram que o dispositivo de liberação controlada de doxiciclina associado à raspagem e alisamento radicular não causou significativa redução da microbiota patogênica subgengival quando comparada à raspagem e alisamento radicular.

Takahashi et al. (2006) avaliaram, por meio da mínima concentração inibitória (MIC), os efeitos da tetraciclina, minociclina, doxiciclina e ofloxacina, administrados por via local e sistêmica em biofilmes de *Prevotella intermedia* (bactéria gram-negativa, anaeróbica e periodontopatogênica). Os biofilmes foram submetidos as seguintes concentrações dos antimicrobianos testados: MIC, 2x MIC, 5x MIC, 10x MIC, 50x MIC e 100x MIC. Os resultados indicaram que apenas a doxiciclina apresentou atividade inibitória a MIC. Os demais antibióticos analisados apresentaram atividade inibitória aos biofilmes de *Prevotella intermedia* à concentrações entre 5x MIC e 100x MIC.

2.4.3 - Administração local de Doxíciclina

O primeiro estudo que demonstrou a efetividade e biocompatibilidade do dispositivo de liberação local de doxíciclina foi o estudo em animais de Polson et al. (1996). Estes autores avaliaram o efeito do gel contendo hclato de doxíciclina a 8,5%, como terapia isolada, em periodontite experimental em cães. Foram encontradas reduções médias de 2,5mm para profundidade de sondagem e 14 e 2mm em ganho de inserção clínica ao final de 4 meses de avaliação. Este estudo foi o precursor para os estudos clínicos conseguintes.

Polson et al. (1997) realizaram o primeiro estudo clínico em humanos com sistema de liberação local de doxíciclina. Os autores explicam a forma de aplicação local da doxíciclina, feita através de um dispositivo de liberação controlada (Atridox[®]) composto por duas seringas: uma delas, contendo o hclato de doxíciclina a 8,5% e a outra, veículo, contendo 37% de poli-DL-lactídeo, dissolvido em 63% de NMP (N-metil-2-pirrolidona). As duas seringas são acopladas e seus conteúdos misturados, de forma a obter-se um gel homogêneo, de coloração amarelada. O gel, em contato com o fluido crevicular, se solidifica e é reabsorvido em um período de 7 a 10 dias. Foi observada maior efetividade do gel de doxíciclina quando comparado à sanguinarina 5% ou veículo controle (50% DL-lactídeo e 50% NMP), aplicados isoladamente, quanto à profundidade de sondagem e nível de inserção clínica.

Stoller et al. (1998), estudaram as concentrações encontradas no fluido crevicular, após aplicação local de doxíciclina a 8,5%. Os autores encontraram uma concentração de 1493µg/ml (700 vezes maior que a concentração inibitória mínima) no fluido crevicular em 2 horas. Esta concentração permanecia alta (acima de 1000µg/ml) após 18 horas, e caía para 309µg/ml ao sétimo dia, sendo esta última concentração ainda 150 vezes maior que a concentração inibitória mínima. A concentração mais alta deste medicamento encontrada na saliva foi de 8,78µg/ml em 2 horas e caiu para menos de 2µg/ml ao final do dia. As concentrações séricas não excederam 0,1µg/ml.

Comparando a liberação local de doxíciclina com a raspagem e alisamento radicular, Garrett et al. (1999), em estudo multi-cêntrico, verificaram que o gel de doxíciclina, aplicado isoladamente, apresentou resultados

similares à terapia mecânica convencional e superiores ao veículo controle e higiene oral, quanto aos ganhos em profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Estes resultados seguiram um acompanhamento de nove meses e a aplicação do gel, bem como a instrumentação periodontal, foram feitas inicialmente e após 4 meses. Os pacientes tratados neste estudo não receberam terapia mecânica inicial.

Já em estudo subsequente Garrett et al. (2000) verificaram a ação do gel de doxiciclina em pacientes sob terapia de manutenção, portadores da doença periodontal refratária. O mesmo protocolo do estudo de 1999 foi utilizado. Os resultados demonstraram que a terapia isolada com o gel de doxiciclina foi novamente similar à terapia mecânica convencional e estes resultados se mantiveram por nove meses.

Já Eickholz et al. (2005) avaliaram os efeitos clínicos da aplicação local de gel de doxiciclina a 15% como adjunto a terapia periodontal não-cirúrgica em 111 pacientes portadores de periodontite moderada e severa. Em cada paciente foram realizadas três modalidades de tratamento: raspagem e alisamento radicular (SRP), SRP associada à um veículo subgengival de controle (VEH) e SRP associada a aplicação subgengival de gel de doxiciclina a 15% (DOXI). Ao final do estudo os autores observaram que a utilização de gel de doxiciclina a 15% como adjunto a raspagem e alisamento radicular promoveu aumento do nível de inserção relativo e diminuiu a profundidade de sondagem.

Em estudo clínico realizado em 2004, Akalin et al. compararam a eficácia clínica da utilização de doxiciclina sistêmica (SD) e local (LD) no tratamento da periodontite crônica. Quarenta e cinco pacientes foram divididos em três grupos com cinco tratamentos: doxiciclina sistêmica (SD), raspagem e alisamento radicular (RAR) e doxiciclina sistêmica (SD), doxiciclina local (LD), raspagem e alisamento radicular (RAR) e doxiciclina local (LD), raspagem e alisamento radicular (RAR). Ao final de sete semanas os autores observaram que o tratamento realizado apenas LD pareceu ser mais efetivo na redução da profundidade de sondagem que o tratamento realizado apenas com SD. Entretanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes

entre as duas terapias associadas à RAR. O uso local de doxiciclina parece ser preferível ao sistêmico, uma vez que se mostrou mais efetivo na redução da profundidade de sondagem e não apresenta efeitos colaterais.

Pappalardo et al. (2006) realizaram estudo com objetivo de avaliar os resultados clínicos e microbiológicos promovidos pela liberação local de antimicrobianos no tratamento da periodontite. Trinta e três indivíduos, portadores de periodontite crônica foram selecionados para este estudo. Onze pacientes receberam aplicação local de gel de doxiciclina (10%) em bolsas periodontais, 11 receberam aplicação de gel de clorexedina (1,5%) e 11 receberam apenas raspagem e alisamento radicular (RAR). Os pacientes que receberam doxiciclina apresentaram redução da perda de inserção e redução da profundidade de sondagem de 1,4mm; os pacientes que receberam clorexedina apresentaram redução da perda de inserção e redução da profundidade de sondagem de 0,9mm e os pacientes que receberam RAR apresentaram índices de redução menores que os demais grupos. Os resultados sugerem que a liberação local de antimicrobianos pode promover benefícios adicionais à terapia mecânica convencional. A associação de RAR e gel de doxiciclina (10%) apresentou os melhores resultados.

3. PROPOSIÇÃO

Considerando a hipótese de utilização do colágeno ósseo bovino como carreador para liberação de antimicrobianos, este estudo se propõe a avaliar *in vitro* a cinética de desorção dos dois fármacos, doxiciclina e tetraciclina, impregnados a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação local medicamentosa na terapia periodontal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Confeção e preparo dos dispositivos de liberação local (DLL) de tetraciclina e doxiciclina para o experimento

Membranas de colágeno com espessura aproximada de 200 μ m e área de 2cm², foram obtidas a partir da descalcificação e posterior liofilização de tecido cortical ósseo bovino. Em seguida, foram imersas, a baixas temperaturas, em solução contendo hclato de doxiciclina ou tetraciclina hidrocloreídrica para que tais fármacos fossem impregnados à matriz de colágeno, dando origem a dois dispositivos de liberação local: DOX (membrana de colágeno incorporada com doxiciclina) e TET (membrana de colágeno incorporada com tetraciclina). Tais DLLs foram confeccionados e gentilmente cedidos pelo Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Ambos os dispositivos foram cortados em formato circular com diâmetro aproximado de 1cm e em seguida pesados em balança de precisão 0,001g, sendo observada massa de 0,012g para TET e 0,014g para DOX (figura 1).

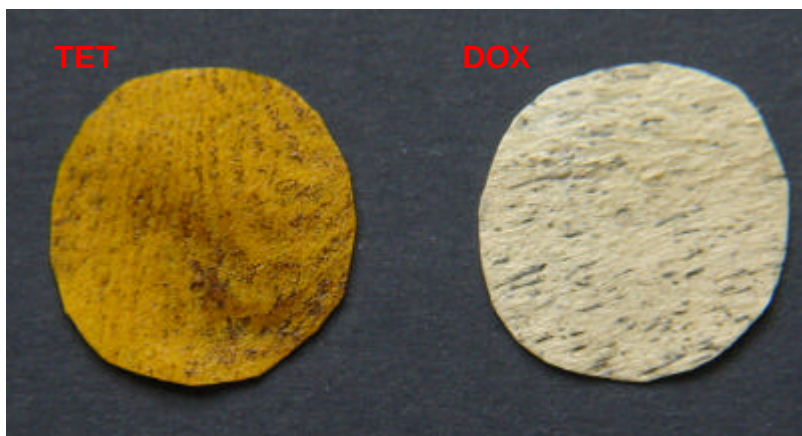


Figura 1- Membranas de colágeno impregnadas com doxiciclina (DOX) e tetraciclina (TET).

4.2 Imersão das membranas em solução tampão de fosfato

Sabendo que as condições ambientais, como pH e temperatura, podem interferir na liberação local dos fármacos e, com o intuito de simular tais variáveis no organismo humano, DOX e TET foram imersos em solução tampão de fosfato, cujo pH=7,2 é semelhante ao do sangue (pH=7,35) à temperatura constante de 36,5 °C (temperatura do corpo humano).

A solução tampão de fosfato foi preparada a partir da diluição de 2g de hidróxido de sódio (NaOH) e 19,8g de dihidrogeno fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 1L de água destilada.

Cada um dos dispositivos de liberação local foi introduzido em um erlenmeyer contendo 25ml de solução tampão de fosfato, permanecendo em banho termostatzado a 36,5 °C durante todo o período experimental (15 dias) (figura 2).

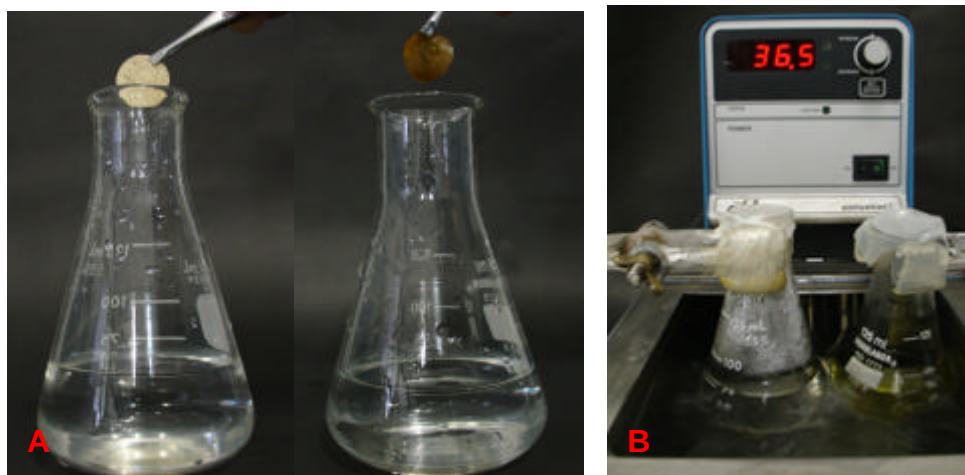


Figura 2- A. Imersão de DOX e TET em solução tampão fosfato; B. Imersão das soluções em banho termostatzado.

4.3 Construção de curvas de calibração para doxiciclina e tetraciclina em solução tampão de fosfato

Para de se determinar a quantidade de fármaco liberada nas soluções tampão contendo DOX e TET, utilizou-se o espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 2501 PC) (figura 3).

Neste aparelho uma amostra das soluções é inserida no caminho óptico e um feixe de luz ultravioleta e/ou visível em determinado comprimento de onda (ou uma faixa de comprimentos de ondas) atravessa a solução. O espectrofotômetro determina, então, o quanto de luz foi absorvida pela amostra, ou seja, a absorbância desta.



Figura 3- Espectrofotômetro.

Como a correlação entre a absorbância e a concentração das soluções tampão contendo DOX e TET não era conhecida inicialmente foi necessário determiná-la a partir da construção de curvas de calibração em concentrações que variaram de $1,86 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a $5,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para a tetraciclina e $6,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a $4,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para a doxiciclina (figura 4 e figura 5).

Para tanto, foram confeccionadas duas soluções com concentrações conhecidas, sendo uma de doxiciclina (S_D), na qual, 0,050g de hclato de doxiciclina em pó foram diluídos em 100,00 ml de tampão fosfato e, outra de tetraciclina (S_T), onde 0,020g de tetraciclina hidrocloreídrica em pó foram diluídos em 100,00 ml de solução tampão de fosfato.

S_D e S_T foram, então, diluídas em diversas concentrações e levadas ao espectrofotômetro com o objetivo de medir suas absorbâncias dentro da validade da lei de Lambert-Beer. Segundo tal lei, a absorbância é proporcional a concentração da solução.

O conhecimento das concentrações e da absorbância das soluções tornou possível a construção de uma reta: $y = ax + b$, onde y é a absorbância medida, x a concentração da solução a ser quantificada e a e b os coeficientes angular e linear da reta, respectivamente. Tais retas são conhecidas como curvas de calibração (figura 4 e figura 5) e a partir delas foi possível quantificar a doxíciclina e tetracícliclina liberadas em tampão fosfato 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 168, 240 e 360 horas após o início do experimento.

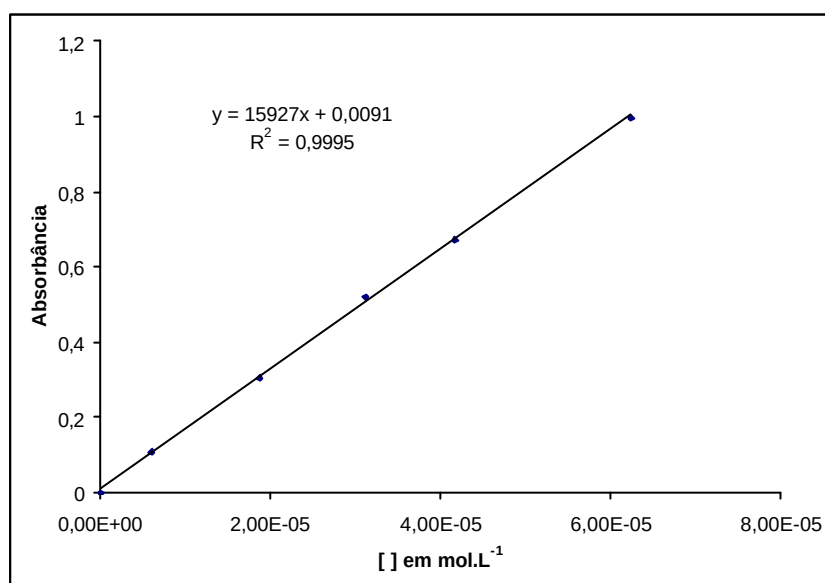


Figura 4 - Curva de calibração da doxíciclina em tampão fosfato

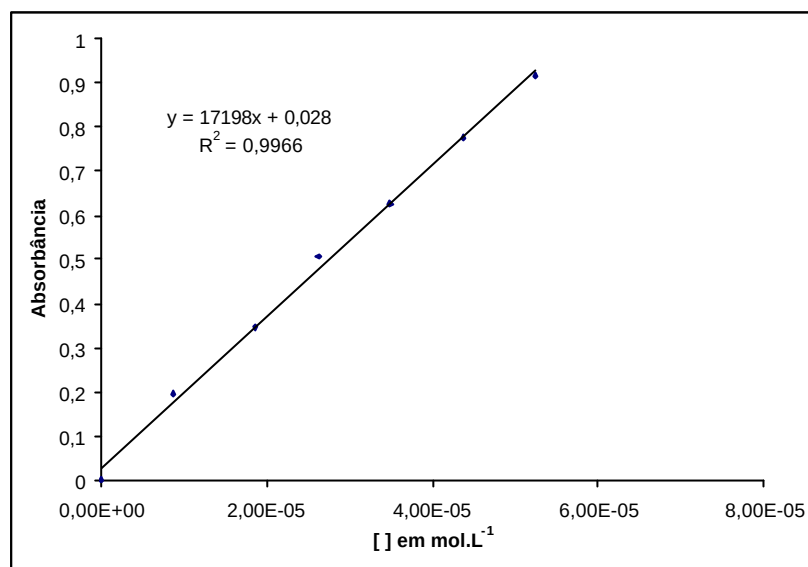


Figura 5- Curva de calibração da tetraciclina em tampão fosfato

4.4 Medidas das absorbâncias (Abs) das soluções tampão contendo DOX e TET e determinação de parâmetros da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina

A absorbância das soluções tampão contendo DOX e TET foi determinada pelo espectrofotômetro em um comprimento de onda fixado anteriormente ao se obter o espectro completo das duas amostras desde 190nm até 800nm (região do ultravioleta e do visível). O comprimento de onda específico comum aos dois farmacos foi de 275nm e a solução tampão fosfato foi utilizada como referência.

A absorbância foi determinada em tempos de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 168, 240 e 360 horas após o início do experimento, em processos em que se evitava o estabelecimento de equilíbrio, ou seja, trocando a cada medida o solvente em contato com a membrana. Desta forma supõe-se liberação continua do fármaco na solução.

Cuidados especiais com parametros como concentração, posição da leitura no espectro e ruídos instrumentais foram tomados para que não ocorressem desvios significativos da Lei de Lambert-Beer. Neste caso a absorbância é proporcional a concentração da solução, sendo possível

determinar a quantidade de doxiciclina ou tetraciclina liberadas no tampão fosfato a partir da confecção de curvas de calibração.

Para o estudo da cinética de desorção, foi aplicado o modelo de primeira ordem, no qual a velocidade de desorção de doxiciclina e tetraciclina é proporcional a massa inicial destes na membrana, sendo possível calcular a massa liberada dos fármacos na solução a partir da fórmula: $Kt = \ln [A]_0 / [A]_0 - x$, onde K é a constante de velocidade de desorção, t é o tempo, $\ln$ é logaritmo neperiano, $[A]_0$ é a massa inicial do fármaco presente na membrana e x é a massa liberada (El Yazigi, 1981). A constante de velocidade de desorção K foi determinada para doxiciclina e tetraciclina (k_{dox} e K_{tet}).

5. RESULTADOS

Após a primeira hora do experimento, a massa de doxiciclina presente na solução foi de $2,3 \cdot 10^{-5}$ g. A massa total de doxiciclina liberada atingiu o pico de $663,6 \cdot 10^{-6}$ g após 96 horas (tabela 1).

Tabela 1 - Massa total (g) de doxiciclina e tetraciclina liberadas em tampão fosfato ao final de cada período analisado (cumulativa).

TEMPO (h)	Mdoxiciclina (g)	Mtetraciclina (g)
1	$2,30 \cdot 10^{-4}$	$3,80 \cdot 10^{-4}$
2	$3,00 \cdot 10^{-4}$	$6,00 \cdot 10^{-4}$
4	$3,40 \cdot 10^{-4}$	$7,50 \cdot 10^{-4}$
8	$4,10 \cdot 10^{-4}$	$8,80 \cdot 10^{-4}$
12	$5,40 \cdot 10^{-4}$	$9,60 \cdot 10^{-4}$
24	$6,30 \cdot 10^{-4}$	$10,40 \cdot 10^{-4}$
48	$6,31 \cdot 10^{-4}$	$10,70 \cdot 10^{-4}$

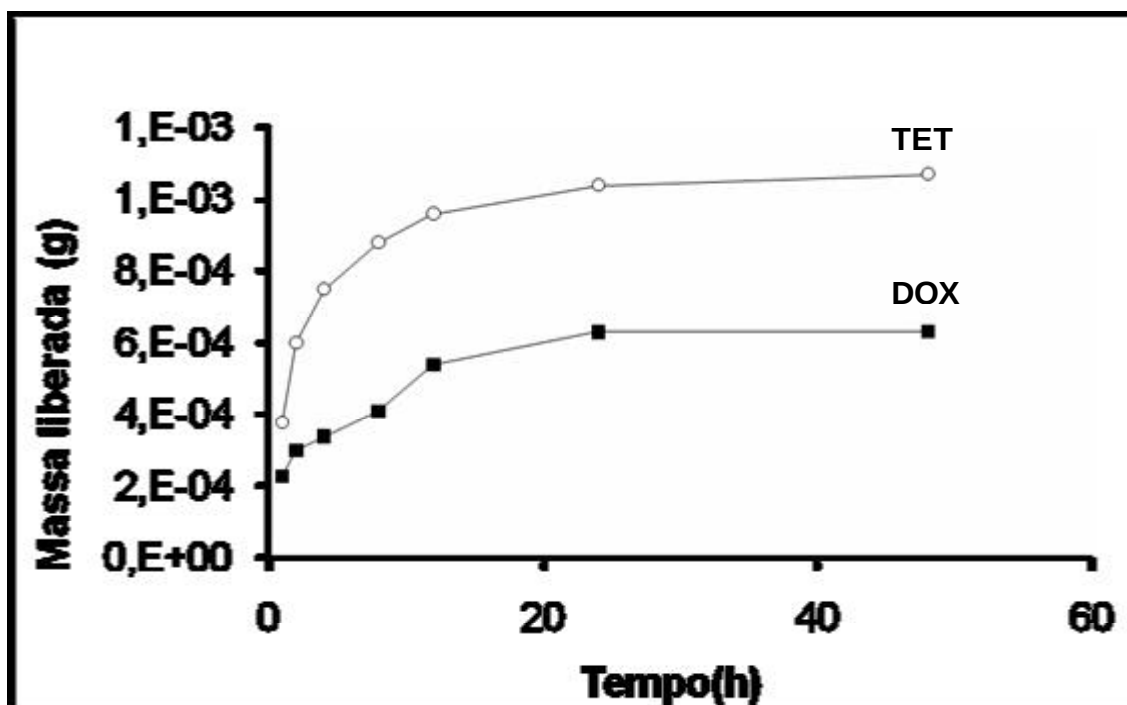


Figura 6 - A massa (mg) de doxiciclina e tetraciclina nas condições experimentais adotadas está ilustrado no gráfico acima, comparativamente.

Foi observada $3,80.10^{-4}$ g de tetraciclina na solução após a primeira hora do experimento. O fármaco continuou sendo liberado durante 48 horas e a massa total liberada foi de $10,80.10^{-4}$ g (tabela 1 e figura 6).

A concentração das soluções mostrou-se crescente nas primeiras 48 horas, após este período manteve-se constante até o final do experimento, sendo que a concentração final da solução com doxiciclina foi de $25,2.10^{-4}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de $42,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a solução com tetraciclina.(tabela 2).

Tabela 2 - Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de doxiciclina e tetraciclina nas soluções tampão fosfato nos diversos períodos avaliados.

TEMPO (h)	Cdoxiciclina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ctetraciclina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	9,2	15,2
2	12	24
4	13,6	30
8	16,4	35,2
12	21,6	38,4
24	25,2	41,6
48	$25,2.10^{-4}$	42,8

A figura 7 apresenta as retas resultantes da aplicação do modelo matemático de primeira ordem às massas de doxiciclina e tetraciclina liberadas por DOX e TET em tampão fosfato. Foram incluídos os pontos correspondentes aos tempos de 0 a 48 horas uma vez que, após esse período, observa-se a presença de constância nos perfis de liberação dos fármacos, indicando o término do processo de desorção.

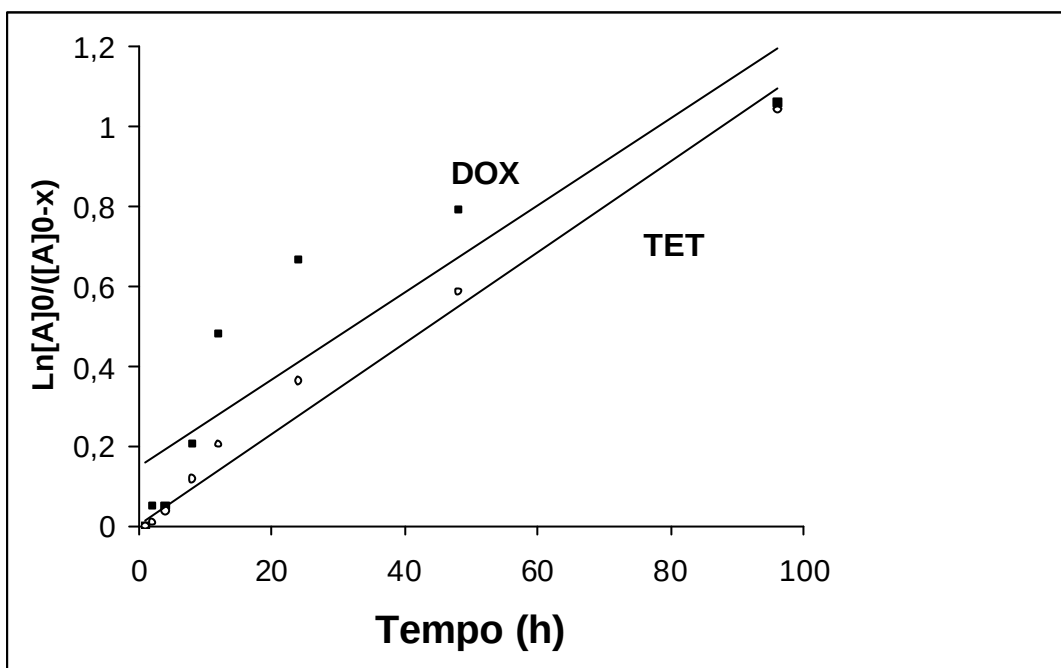


Figura 7 - Transformação logarítmica da massa de doxiciclina e tetraciclina liberada (g) em função do tempo (h), ao introduzir DOX e TET em tampão fosfato . Aplicação do modelo de primeira ordem.

Como o comportamento de liberação dos fármacos mostrou-se diferente entre os intervalos de tempo 0 a 4 horas e de 8 a 48 horas, foram confeccionadas quatro retas de primeira ordem no gráfico 2, onde: DOX₁ e TET₁ correspondem a cinética de desorção da doxiciclina e tetraciclina, respectivamente, no período de 0 a 4 horas e, DOX₂ e TET₂ correspondem a cinética de desorção da doxiciclina e tetraciclina, respectivamente, no período de 8 a 48 horas (Figura 8).

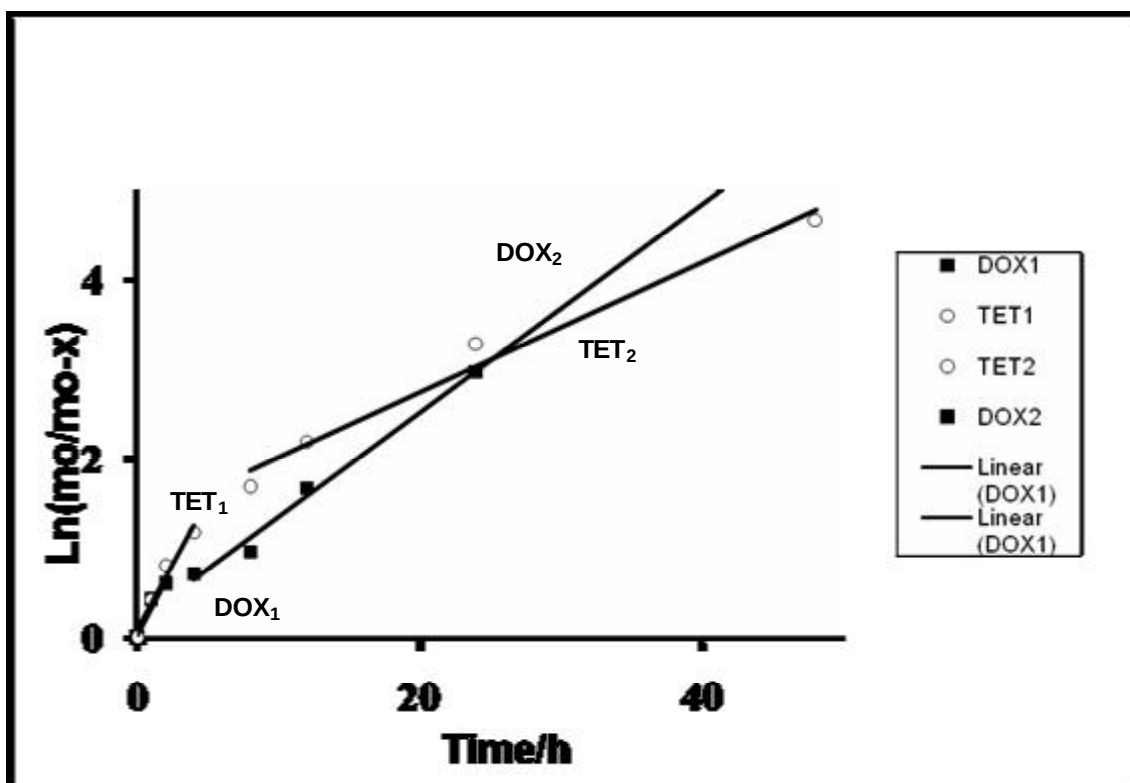


Figura 8 - Aplicação do modelo de primeira ordem.

A tabela 3 mostra os respectivos coeficientes de determinação (R^2) para as quatro retas.

Tabela 3 - Coeficientes de determinação (R^2) relativos às retas resultantes da aplicação do modelo matemático de primeira ordem às massas de doxiciclina e tetraciclina liberadas em tampão fosfato.

	<i>Doxiciclina1</i>	<i>Doxiciclina2</i>	<i>Tetraciclina1</i>	<i>Tetraciclina2</i>
R^2	0,945	0,987	0,955	0,978

Com base nos parâmetros obtidos pela cinética de primeira ordem, calculou-se a constante de velocidade de desorção (k_{dox} e k_{tet}) da doxiciclina e tetraciclina presente nos dispositivos de liberação local avaliados.

Foi observada maior velocidade de liberação de DOX ($K_{DOX1}=0,945$) e TET ($K_{TET1}=0,955$) no intervalo de tempo 0 a 4 horas que no intervalo de 8 a 48 horas: TET ($K_{TET2}=0,978$) e DOX ($K_{DOX2}=0,987$) (Tabela 4).

Tabela 4 Valores de constante de velocidade de desorção (k_{dox} e K_{tet}) da doxiciclina e tetraciclina em tampão fosfato.

	<i>Doxiciclina1</i>	<i>Doxiciclina2</i>	<i>Tetraciclina1</i>	<i>Tetraciclina2</i>
K (horas)	0,300	0,117	0,291	0,072

6. DISCUSSÃO

Os dispositivos de liberação local DOX e TET ainda se encontram em fase experimental, não estando disponíveis para estudos clínicos em seres humanos. Portanto, a cinética de desorção da doxiciclina e tetraciclina foi avaliada neste estudo por meio de experimento *in vitro*.

A espectroscopia UV/VIS, método adotado neste estudo, mostrou-se apropriado para quantificação da massa de doxiciclina e tetraciclina liberadas em tampão fosfato pelos dispositivos avaliados. O pico de absorbância obtido para as soluções de doxiciclina (S_d) e tetraciclina (S_t) foi em 275 nm, comprimento de onda utilizado no estudo.

O estudo da cinética de desorção, empregando-se o modelo matemático de primeira ordem, foi efetuado para os dispositivos analisados. Através da linearização das curvas de liberação da massa de doxiciclina e tetraciclina, foram obtidos os respectivos coeficientes de determinação (R^2). Observou-se que este modelo foi adequado, uma vez que ele forneceu valores de R^2 muito próximos a 1 para DOX1, DOX2 e TET1 e igual a 1 para TET2 (tabela 3), o que é esperado para formas farmacêuticas sólidas de liberação convencional (Ishi et al., 1996).

Dentro das condições propostas pelo experimento, observou-se liberação contínua tanto de doxiciclina quanto de tetraciclina nas primeiras 96 horas do estudo, caracterizando DOX e TET como dispositivos de liberação controlada, ou seja, dispositivos cuja desorção do fármaco ocorre por um período maior que 24 horas (Langer & Peppas, 1981; Langer, 1990).

O dispositivo TET liberou maior quantidade de antimicrobiano em tampão fosfato quando comparado a DOX em todos os períodos analisados, sendo que após a primeira hora do experimento a massa de tetraciclina encontrada na solução foi de $3,80 \cdot 10^{-4}g$ e a massa total do fármaco liberada permaneceu em $10,80 \cdot 10^{-4}g$ (tabela 1 e figura 6).

Os dados presentes no tabela 1 e na figura 6 mostram que houve liberação de doxiciclina em tampão fosfato dentro das condições ambientais propostas por este estudo, sendo que, a massa de doxiciclina presente na solução após a primeira hora do experimento foi de $2,3 \cdot 10^{-5}g$. A desorção do

fármaco mostrou-se contínua nas primeiras 48 horas, quando a massa total de doxiciclina liberada atingiu o pico de $6,3 \cdot 10^{-8} \text{g}$.

Observa-se que, assim como a doxiciclina houve liberação contínua de tetraciclina em tampão fosfato durante as primeiras 48 horas do experimento, quando atingiu o pico de $10,7 \cdot 10^{-4} \text{g}$.

Observa-se maior velocidade de liberação de DOX ($K_{DOX1}=0,300$) quando comparada a TET ($K_{TET1}=0,291$) no intervalo de tempo 0 a 4 horas. O contrário ocorre no intervalo de 8 a 48 horas, onde a liberação de TET ($K_{TET2}=0,072$) mostra-se mais rápida que de DOX ($K_{DOX2}=0,117$) (figura 4 e a tabela 4).

Em Periodontia, o principal objetivo dos DLLs é liberar o fármaco no sítio de ação durante o maior período possível e em concentrações inibitórias para os microorganismos periodontopatogênicos, sem que estas sejam, entretanto, citotóxicas ou promovam efeitos sistêmicos adversos (Marsh, 2003).

Os patógenos periodontais apresentam susceptibilidade a concentrações de $0,1$ a $2,0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de doxiciclina e tetraciclina (Riond & Rivieri, 1988). Os dados obtidos neste estudo (tabela 2) mostram que, mesmo as menores concentrações alcançadas pelos fármacos em tampão fosfato ($9,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ para doxiciclina e $15,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ para tetraciclina - 1 hora após o início do experimento), são suficientes para inibir a ação de tais patógenos.

Embora alguns estudos relatem que concentrações muito altas de antimicrobianos em um curto período de tempo podem promover danos teciduais no sítio de ação (Riond & Rivieri, 1988; Pavia et al., 2003), ainda não está estabelecido na literatura em quais quantidades a doxiciclina e a tetraciclina liberadas localmente podem ser causar efeitos citotóxicos.

Alguns autores relatam que, para que um DLL exerça ação antibacteriana efetiva em bolsas periodontais é necessário que o fármaco seja liberado gradualmente por pelo menos 21 dias, auxiliando, não só o combate aos patógenos periodontais, mas evitando também, a recolonização bacteriana destes sítios (Langer & Peppas, 1981; Langer, 1990). Neste estudo foi observada liberação de doxiciclina e tetraciclina por 48 horas (2 dias), logo, para que os fármacos alcancem o período mínimo de ação proposto na

literatura seria necessário a introdução de pelo menos 10 dispositivos ao final dos 21 dias. Além de aumentar o custo financeiro do tratamento, a utilização de tais DLLs exige maior número de visitas do paciente ao consultório, quando comparado a dispositivos com liberação prolongada (pelo menos 21 dias).

As propriedades mecânicas das membranas como entrelaçamento e disposição das fibras de colágeno, presença de canais de nutrição, espessura e porosidade estão entre os fatores que podem interferir na integridade e na cinética de adsorção e desorção dos antimicrobianos (Lekovic, 2001; Takeishi et al., 2001), principalmente porque a incorporação destes ocorre, em grande parte, pelo embricamento mecânico das partículas de doxiciclina e tetraciclina à superfície da membrana.

Apesar de possuírem o mesmo processamento, os dispositivos avaliados neste estudo apresentam variações estruturais, dessa forma, é possível que as partículas mais superficiais dos fármacos tenham sido facilmente liberadas nas primeiras 4 horas, caracterizando a rápida desorção de doxiciclina e tetraciclina neste período. Já as partículas firmemente aderidas às membranas, em função das retenções mecânicas das mesmas, teriam sua liberação dificultada no meio, retardando, assim o processo de desorção no período de 8 a 48 horas.

7. CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo é possível concluir que os dispositivos de liberação local avaliados liberaram doxiciclina e tetraciclina por um período de 48 horas, sendo observada maior velocidade de desorção dos fármacos nas primeiras 4 horas.

Observou-se maior velocidade de liberação de DOX quando comparada a TET no intervalo de tempo 0 a 4 horas. O contrário ocorre no intervalo de 8 a 48 horas, onde a liberação de TET mostra-se mais rápida que de DOX.

O dispositivo TET liberou maior quantidade de antimicrobiano em tampão fosfato quando comparado a DOX em todos os períodos analisados.

Mesmo as menores concentrações alcançadas pelos fármacos em tampão fosfato mostraram-se suficientes para inibir a ação dos patógenos periodontais.

REFERENCIAS*

Addy M, Hassan H, Moran J, Wade W, Newcombe R. Use of antimicrobial containing acrylic strips in the treatment of chronic periodontal disease. A three month follow-up study. **J Periodontol.** 1988 Sep;59(9):557-64.

Addy M, Langeroudi M. Comparison of the immediate effects on the subgingival microbiota of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. **J Clin Periodontol.** 1984 Jul;11(6):379-86.

Addy M, Martin MV. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. **Oral Dis.** 2003;9 Suppl 1:38-44.

Akalin FA, Baltacioglu E, Sengün D, Hekimoglu S, Taskin M, Etikan I, et al. A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. **J Oral Sci.** 2004 Mar;46(1):25-35.

Armitage GC, Jeffcoat MK, Chadwick, DE. Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis. **J Periodontol.** 1994;65:120-28.

Benqué E, Zahedi S, Brocard D, Oscaby F, Justum P, Brunel G. Guided tissue regeneration using a collagen membrane in chronic adult and rapidly progressive periodontitis patients in the treatment of 3-wall intrabony defects. **J Clin Periodontol.** 1997 Aug;24(8):544-9.

Bettany JT, Peet NM, Wolowacz RG, Skerry TM, Grabowski PS. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone.** 2000 Jul;27(1):75-80.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. **Bone.** 1996 Jul;19(1):35-40.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. **J Periodontol.** 2001 Feb;72(2):215-29.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2001;65:232-60.

Christersson LA, Zambon JJ. Suppression of subgingival *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. **J Clin Periodontol.** 1993 Jul;20(6):395-401.

Ciancio SG. Site specific delivery of antimicrobial agents for periodontal disease. **Gen Dent.** 1999 Mar-Apr;47(2):172-8, 181.

Ciancio SG, Ashley R. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. **Adv Dent Res.** 1998 Nov;12(2):27-31.

Ciancio SG, Cobb CM, Leung M. Tissue concentration and localization of tetracycline following site-specific tetracycline fiber therapy. **J Periodontol.** 1992 Oct;63(10):849-53.

Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN, Wilson M. **Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease.** London, Cardiff: Bioline; 1999. p.5-13.

Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. **Ther Drug Monit.** 1982;4(2):115-35.

Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. **Brit Dent J.** 1973;115:65-68.

Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, Ovejero MC. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clin Chim Acta.** 2000;291:223-34.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.** 2002 Apr;15(2):167-93.

Drisko CH. The use of locally delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. **J Clin Periodontol.** 1998 Nov;25(11 Pt 2):947-52; discussion 978-9

Eickholz P, Kim TS, Schacher B, Reitmeir P, Bürklin T, Ratka-Krüger P. Subgingival topical doxycycline versus mechanical debridement for supportive periodontal therapy: a single blind randomized controlled two-center study. **Am J Dent.** 2005 Dec;18(6):341-6.

El-Yazigi A. Disintegration: dissolution analysis of percent dissolved time data. **J Pharm Sci.** 1981;70(5):535-37.

Fabre J, Pitton JS, Kunz JP. Distribution and excretion of doxycycline in man. **Chemotherapy.** 1966;11(2):73-85.

Feres M, Haffajee AD, Goncalves C, Allard KA, Som S, Smith C, et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. **J Clin Periodontol.** 1999 Dec;26(12):784-92.

Franklin TJ, Snow GA. **Biochemistry of antimicrobial action**, ed. 2. London: CHAPMAN & HALL,1975;123-26.

Garrett S, Adams DF, Bogle G, Donly K. The effect of locally delivered controlled-release doxycycline or scaling and root planing on periodontal maintenance patients over 9 months. **J Periodontol.** 2000 Jan;71(1):22-30.

Garrett S, Johnson L, Drisko CH, Adams DF, Bandt C, Beiswanger B, et al. Two multi-center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planing in the treatment of periodontitis. **J Periodontol.** 1999 May;70(5):490-503.

Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. **J Am Dent Assoc.** 1994 Feb;125(2):163-9; discussion 169-71.

Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan P, Dunham S. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. **J Periodontol.** 1983;54(10):575-79.

Goodson JM, Tanner A, McArdle S, Dix K, Watanabe SM. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. III. Microbiological response. **J Periodontal Res.** 1991 Sep;26(5):440-51

Gordon MJ, Walker BC. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. **J Periodontol.** 1993;64:760-71.

Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. **J Periodontol.** 1998 May;69(5):507-20.

Haffajee AD, Dibart S, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. **J Clin Periodontol.** 1995 Aug;22(8):618-27.

Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE. Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: analysis of properties. **J Periodontol.** 1992 Mar;63(3):182-6.

Ishi K, Saitou R, Yamada R, Itai S, Nemoto M. Novel approach determination of correlation between in vivo and in vitro dissolution using the optimization technique. **Chem Pharm Bull.** 1996;44(8):1550-55.

Jones DS, Woolfson AD, Brown AF, Coulter WA, McClelland C, Irwin CR. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J Control Release.** 2000 Jul 3;67(2-3):357-68.

Jorgensen MG, Safarian A, Daneshmand N, Keim RJ, Slots J. Initial antimicrobial effect of controlled-release doxycycline in subgingival sites. **J Periodontal Res.** 2004 Oct;39(5):315-9.

Killooy WJ, Polson AM. Controlled local delivery of antimicrobials in the treatment of periodontitis. **Dent Clin North Am.** 1998 Apr; 42(2);263-83.

Kinane DF, Radvar M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. **J Periodontol.** 1999 Jan;70(1):1-7.

Langer RS, Peppas NA. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**. 1981 Oct;2(4):201-14.

Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol**. 2001 May;72(5):583-9.

Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. **Trends Biotechnol**. 2001 Jul;19(7):255-65.

Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. **Int Dent J**. 1973 Sep;23(3):432-37.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**. 1965 Sep;36:177-87.

Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. **J Dent Res**. 1979 Dec;58(12):2404-12.

MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study, **J Clin Periodontol**. 1997;24:753-60.

Morejon MG, Salup RD, Cue MB. Actualización en tetraciclinas. **Rev Cubana Farm**. 2003;37(3):1.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. **J Periodontal Res**. 1977 Mar;12(2):120-8.

Newman MG, Kornman KS, Doherty FM. A 6-month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planing in maintenance patients: clinical results. **J Periodontol**. 1994 Jul;65(7):685-91.

Okhubo H, Fujimoto Y, Okamoto Y. Fundamental and clinical studies on doxycycline. **Chemotherapy**. 1969;17:216-19.

Pappalardo S, Baglio OA, Cappello C, Guarrera S, De Benedittis M, Petruzzi M, et al. Local delivery of antimicrobial drugs in the treatment of chronic adult periodontitis. **Minerva Stomatol.** 2006 Nov-Dec;55(11-12):655-

Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Bandt CL, Hanes PJ, Killoy WJ, et al. Multi-center comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. II. Clinical results. **J Periodontol.** 1997 Feb;68(2):119-26.

Polson AM, Southard L, Dunn RL, Yewey GL. Periodontal pocket treatment in beagle dogs using subgingival doxycycline from a biodegradable system. I. Initial clinical responses. **J Periodontol.** 1996 Nov;67(11):1176-84.

Rachlin G, Koubi G, Dejou J, Franquin JC. The use of a resorbable membrane in mucogingival surgery. Case series. **J Periodontol.** 1996 Jun;67(6):621-6.

Ramamurthy NS, Liu Y, Turner G, Rifkin BR, Goulb LM. Therapeutic inhibition of experimental periodontal breakdown in rats: comparison of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). **J Dent Res.** 2000;79:403.

Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontol 2000.** 1996 Feb;10:139-59.

Ribera A. Tetracyclines. **Treballs de la SCB.** 2004;55:121-134.

Riond JL, Riviere JE. Pharmacology and toxicology of doxycycline. **Vet Human Toxicol.** 1988 Oct;30(5):431-43.

Roberts MC. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. **Periodontol 2000.** 2002;28:280-97.

Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol Rev** 1996;19:1-24.

Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials.** 2002;23(2):449-56.

Rosling B, Hellström MK, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2001 Nov;28(11):1023-31.

Salvi GE, Mombelli A, Mayfield L, Rutar A, Suvan J, Garrett S, et al. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. A randomized clinical trial comparing three biodegradable sustained release polymers. **J Clin Periodontol.** 2002;29:540-50.

Schach Von Wittenau M, Beereboom JJ, Blackwood RK, Stephens CR. 6-deoxytetracyclines. III. Stereochemistry at C6. **J Ame Chem Soc.** 1962;84:2645-47.

Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering R.** 2001;34:147-230.

Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. **Scand J Dent Res.** 1976 Jan;84(1):1-10.

Slots J, Jorgensen MG. Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? **Periodontol 2000.** 2002;28:298-312.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000.** 2002;28:12-55.

Stephens CR, Murai K, Rennhard HH, Gonover LH, Brunings KJ. Hydrogenolysis studies in the tetracycline series: 6-deoxytetracyclines. **J Ame Chem Soc.** 1958;80:5324-25.

Stoller NH, Johnson LR, Trapnell S, Harrold CQ, Garrett S. The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva, and serum. **J Periodontol.** 1998 Oct;69(10):1085-91.

Taga R, Hassunuma CY, Cestari TM, Ferreira PM. Destino de membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperióstica na calvária de cobaia. **Rev Bras Implant.** 1997;24-9.

Takahashi N, Ishihara K, Kimizuka R, Okuda K, Kato T. The effects of tetracycline, minocycline, doxycycline and ofloxacin on *Prevotella intermedia* biofilm. **Oral Microbiol Immunol.** 2006 Dec;21(6):366-71.

Takeishi H, Irie K, Okuda K, Ozawa H, Yajima T, Ejiri S. Molded bone augmentation by a combination of barrier membrane and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Oral Dis.** 2001 Sep;7(5):281-6.

Thadepalli H, Webb D, Huang JT. Anaerobic lung infections treated with doxycycline. **Bull N Y Acad Med.** 1978 Feb;54(2):165-76.

Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **J Clin Periodontol.** 1986 Nov;13(10):905-11.

Thomas J, Karakiozis J, Powala C, Dawson-Ahdoh D, Van Kyke L. Establishing the non-antimicrobial activity of chemically modified tetracyclines (CMTs) versus doxycycline. **J Dent Res.** 2000;79:403.

Tonetti MS, Cortellini P, Carnevale G, Cattabriga M, de Sanctis M, Pini Prato GP. A controlled multicenter study of adjunctive use of tetracycline periodontal fibers in mandibular class II furcations with persistent bleeding. **J Clin Periodontol.** 1998 Sep;25(9):728-36.

Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2006 Apr;33(4):254-64.

Walker CB, Karpinia K, Baehni P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. **Periodontol 2000.** 2004;36:146-65.

Walker SL, Ash MM. A study of root planning by scanning electron microscopy. **Dent Hyg (Chic).** 1976 Mar;50(3):109-14.

Wang HL, MacNeil RL. Guided tissue regeneration. Absorbable barriers. **Dent Clin North Am.** 1998 Jul;42(3):505-22

Wennström JL, Newman HN, MacNeill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, Gillam DG, et al. Utilisation of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis. A comparative multi-centre trial of 2 treatment approaches. **J Clin Periodontol**. 2001 Aug;28(8):753-61.

Yamatogi RS, Rahal SC, Granjeiro JM, Taga R, Cestari TM, Lima AFM. Microscopic evaluation of biologic membrane association from bovine origin implanted subcutaneously in rats. **Ciência Rural**. 2005 Jul-Ago;35(4):837-42.