UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

CAMILA FRACALOSSI REDIGUIERI

**Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico
e potencial de uso no tratamento da doença periodontal**

Ribeirão Preto

- 2008 -

CAMILA FRACALOSSİ REDIGUIERI

**Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico
e potencial de uso no tratamento da doença periodontal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Ribeirão Preto

- 2008 -

Redigueri, Camila Fracalossi

Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico e potencial de uso no tratamento da doença periodontal./ Camila Fracalossi Redigueri; orientador Osvaldo de Freitas.

– Ribeirão Preto, 2008.

147 f. il. 30cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Pectina – Caseína. 2. Microencapsulação. 3. Doença periodontal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Fracalossi Redigueri

Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico e potencial de uso no tratamento da doença periodontal.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, de de 2008.

*Aos meus pais, Reinildes e Luiz,
Que sempre me apoiaram, de todas as formas que puderam,
E torceram para que tudo se concretizasse.*

À minha irmã, Carolina,

Por sua presença confortante nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu amor, Rafael,

Que esteve sempre ao meu lado, mesmo quando a distância tentava impedir.

*À minha querida vovó, Nair,
Que em suas orações rezava por mim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar no meu caminho as pessoas certas.

Ao Prof. Osvaldo, por todos esses anos de orientação conduzidos com muita sabedoria e serenidade, recheados com boas histórias, risos e surpresas, que renderam muitas reflexões e grande aprendizado.

Aos amigos Dr. Remco Tuinier e Dr. Pavlik Lettinga pelos conhecimentos transmitidos com júbilo e paciência e, sobretudo, pela bonita amizade construída em tão pouco tempo.

Às amigas Camila, Priscila, Renata, Alessandra e Rosiane pela maravilhosa convivência no laboratório (e fora dele) que jamais será esquecida.

Às amigas Katyana e Flávia pela colaboração e pelas proveitosas discussões que ajudaram a ampliar nossos conhecimentos.

À Rafaela pela dedicação e esforço que auxiliaram na finalização deste trabalho.

Ao Zé Maria pela amizade, carinho e presteza.

À Tatiana C. Sá Lowande pelo apoio e incentivo.

Ao José Orestes, ao Mário e ao Jabor pelas grandiosas ajudas oferecidas na execução das atividades laboratoriais.

Ao Franklin pela montagem do equipamento utilizado nos estudos *in vitro* de liberação e por inúmeros outros auxílios prestados.

À Profa. Elza Helena Guimarães Lara por permitir o uso do seu laboratório e dos seus equipamentos.

Ao Forschungszentrum Jülich, em especial ao Prof. Jan Dhont, pelo acolhimento e disponibilização de todos os recursos necessários para a condução dos estudos.

Aos amigos do Forschungszentrum Jülich pelas discussões, distrações e boas lembranças.

Ao amigo Fabio Santos, pela gentileza de emprestar-me sua bicicleta, principal meio de transporte dos estudantes do Forschungszentrum.

Aos amigos Mireli, Thomas e Everaldo pela força e suporte emocional que contribuíram para que a estadia na Alemanha fosse a mais prazerosa possível.

À amiga Adriana pela torcida sincera para o sucesso deste trabalho.

À Dona Alzira e Sr. Júlio pelo apoio durante minhas estadas em Ribeirão Preto no último ano.

À CPKelco pelo fornecimento gratuito da pectina utilizada nos experimentos.

À Fapesp pela bolsa de Doutorado Direto e à Capes pela bolsa de Estágio de Doutorando no Exterior, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

*“Science has great beauty.
A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural
phenomena which impress him like a fairy tale.”*

*Marie Curie
(1867 - 1934)*

RESUMO

REDIGUIERI, C. F. **Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico e potencial de uso no tratamento da doença periodontal.** 2008. 147 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Misturas aquosas de polissacarídeos e proteínas são normalmente instáveis e separam-se em fases devido às interações repulsivas ou atrativas existentes entre os polímeros. O efeito da temperatura, do pH e da concentração polimérica no comportamento de misturas de pectina/caseína foi estudado nesse trabalho. Um diagrama de fases construído em pH 7 revelou que a mistura é estável apenas em baixas concentrações. Concentrações mais elevadas levam à incompatibilidade termodinâmica, governada por forças puramente entrópicas, e ao aparecimento de duas fases: uma rica em caseína (inferior) e outra rica em pectina (superior). A decomposição espinodal pôde ser visualizada nos estágios iniciais da separação de fases e, nos estágios intermediários, observou-se a formação de emulsões água/água. Quando o pH dessas emulsões é reduzido para abaixo de 6, a pectina é atraída para a fase de caseína, resultando na formação de partículas de complexo pectina/caseína que não coalescem e são resistentes à adição de sal (NaCl 100 mM), apresentando um diâmetro médio aproximado de 4 μm . As micropartículas de pectina/caseína produzidas por este método demonstraram ser capazes de encapsular com alta eficiência tanto substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas, possibilitando sua aplicação na encapsulação de compostos variados para fins diversos. Neste trabalho, as micropartículas foram utilizadas para encapsular cristais de metronidazol e sua utilização na obtenção de filmes de aplicação intra-bolsa periodontal foi avaliada *in vitro*. As dispersões de pectina/caseína contendo as micropartículas carregadas foram submetidas à secagem para a obtenção dos filmes. Estes, reticulados ou não com cálcio, sustentaram a liberação *in vitro* do fármaco por pelo menos 7 dias *in vitro*. A reticulação foi importante para reduzir a desintegração dos filmes, contribuindo para aumentar o tempo de permanência deles no local de aplicação e para melhorar suas propriedades mecânicas, facilitando seu manuseio e inserção na bolsa periodontal. Com esses resultados, conclui-se que os filmes de micropartículas de complexo pectina/caseína contendo metronidazol desenvolvidos neste trabalho são excelentes candidatos a sistemas de liberação local para o tratamento da doença periodontal.

Palavras-chave: Pectina, caseína, microencapsulação, doença periodontal.

ABSTRACT

REDIGUIERI, C. F. **Pectin/casein aqueous mixtures: physical-chemical studies and potential use in periodontal disease treatment.** 2008. 147 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Aqueous mixtures of polysaccharides and proteins are usually unstable and phase-separate either because of repulsive or attractive interactions. The effect of temperature, pH, and biopolymer concentration on the phase behavior of pectin/casein mixtures was investigated. A phase diagram built at pH 7 revealed that the mixture is stable at low polymer concentrations. Higher concentrations lead to thermodynamic incompatibility, driven purely by entropic forces, and to the appearance of two phases: one enriched with casein (lower) and the other, with pectin (upper). Spinodal decomposition was visualized in the early stages of phase separation. In the intermediate stages, water-in-water emulsions were observed. When the pH of these emulsions was lowered below 6, pectin was attracted by casein-rich phase, resulting in the formation of particles (diameter $\sim 4\ \mu\text{m}$) of pectin/casein complex, which do not coalesce and are insensitive to salt addition (100 mM NaCl). Pectin/casein microparticles obtained by this method were able to encapsulate with high efficiency either hydrophobic or hydrophilic substances and, due to that, could be applied in the encapsulation of a great variety of compounds for different purposes. In this work, the pectin/casein microparticles were used to encapsulate metronidazole crystals and the preparation of intra-periodontal pocket films with them was evaluated. Therefore, dispersions of loaded pectin/casein microparticles were dried in an oven. Films cross-linked or not with calcium sustained the *in vitro* drug release at least for 7 days. The cross-linking with calcium was important to reduce film disintegration, accounting for its permanence in the applied region, and to improve the mechanical properties, which facilitates manipulation and insertion into the periodontal pocket. With these results we conclude that the films formed by microparticles of pectin/casein complex loaded with metronidazole are excellent candidates for local drug delivery systems for the treatment of periodontal disease.

Keywords: Pectin; casein; microencapsulation; periodontal disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema das principais estruturas que compõem o dente e o periodonto	22
Figura 2. Principais tendências no comportamento de misturas de polissacarídeos e proteínas ..	38
Figura 3. Representação esquemática de uma rede idealizada na teoria de Flory-Huggins.....	41
Figura 4. Mecanismo de depleção de interação.....	42
Figura 5. Representação esquemática da separação de fases por coacervação complexa	43
Figura 6. Estrutura química do metronidazol	49
Figura 7. Aparelho utilizado para estudos <i>in vitro</i> de liberação.	65
Figura 8. Perfil eletroforético da caseína em gel de poliacrilamida na presença de SDS.	69
Figura 9. Representação esquemática de uma emulsão água/água observada microscopicamente (1) e macroscopicamente após a completa separação das fases (2).	70
Figura 10. Diagrama de fases de misturas pectina/caseína em pH 7.....	71
Figura 11. Efeito da temperatura no diagrama de fases de misturas pectina/caseína em pH 7.....	73
Figura 12. Comparação entre o diagrama de fases da mistura pectina/caseína obtido experimentalmente em pH 7 (A) e o obtido por cálculos teóricos (B) para misturas de esferas rígidas e cadeias de polímeros com interação de volume de exclusão.....	74
Figura 13. Viscosidade intrínseca da pectina em tampão fosfato pH 7.....	75
Figura 14. Imagens em microscópio de transmissão (primeira coluna) e confocal (segunda coluna) de misturas de CMC/caseína em pH 7.....	76
Figura 15. Esquema de um diagrama de fases (temperatura <i>versus</i> composição) para sistemas binários.	78
Figura 16. Imagens adquiridas em microscópio de fluorescência da decomposição espinodal da mistura de pectina/caseína com frações volumétricas de 50% (tempo em segundos). 79	
Figura 17. Decomposição espinodal da mistura pectina/caseína com frações volumétricas de 50%.....	80
Figura 18. Tempo de separação das fases em pH 7 em diferentes temperaturas.	82

Figura 19. Viscosidade da mistura de pectina/caseína (30/30 g/L) pH 7 (painel A) e tempo de armazenamento necessário até completa separação de fases (painel B) em função da temperatura.	83
Figura 20. A) Concentração de pectina nas fases superior e inferior relativa à concentração inicial de pectina na mistura em função do pH. B,C) Conteúdo da fase inferior em diferentes valores de pH. Painel B se refere à razão de massa pectina/caseína e painel C se refere à concentração total de polímeros (pectina + caseína) na fase inferior.	85
Figura 21. Imagens do microscópio óptico de transmissão (linha A) e confocal (linhas B e C) de misturas de pectina/caseína (30/30 g/L) em diferentes valores de pH. Linhas A e B se referem a imagens da mistura imediatamente após a agitação. Linha C se refere a imagens da fase inferior após a centrifugação.....	86
Figura 22. Imagens CLSM de misturas pectina/caseína em três diferentes pontos no diagrama de fases, antes e após a acidificação.....	90
Figura 23. Comportamento reológico de uma solução de pectina 3% (p/p) e da mistura 6% (p/p) em pH 7.	92
Figura 24. Comportamento reológico de misturas de pectina/caseína (1:1) em concentrações totais de 4, 6, 8 e 10 % (p/p) em pH 7 (painel superior) e pH 5 (painel inferior)..	94
Figura 25. Parâmetros G' e G'' em misturas pectina/caseína 6% (p/p) em pH 7 e 5 a 30°C.	95
Figura 26. Parâmetros G' e G'' em soluções de pectina 3% (p/p) em pH 7 e 5 a 30°C.	95
Figura 27. Distribuição do tamanho de partículas numa mistura de pectina/caseína 6% (p/p) em função do pH.	97
Figura 28. Distribuição do tamanho de partículas em misturas de pectina/caseína 4% (p/p) pH 5. Painel A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; painel B, 700 rpm.	99
Figura 29. Distribuição do tamanho de partículas em misturas de pectina/caseína 6% (p/p) pH 5. Painel A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; painel B, 700 rpm.	100
Figura 30. Distribuição do tamanho de partículas em misturas pectina/caseína 8% (p/p) pH 5. Painel A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; painel B, 700 rpm.	101
Figura 31. Distribuição do tamanho de partículas em misturas pectina/caseína 10% (p/p) pH 5. Painel A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; painel B, 700 rpm.	102

Figura 32. Imagens de microscopia de fluorescência (A e C) associada com transmissão (B e D) de misturas de pectina/caseína 6% (p/p) contendo <i>beads</i> de látex (A e B) e <i>beads</i> de sílica (C e D) em pH 7 (A e C) e pH 5 (B e D).	104
Figura 33. Fotomicrografia óptica de transmissão de misturas de pectina/caseína 6% (p/p) em pH 7 contendo 1,5 % de fármaco. MDZ, (A); BMDZ, (B); MDZ + BMDZ, (C).	106
Figura 34. Fotomicrografia óptica de transmissão de misturas de pectina/caseína 6% (p/p) em pH 5 contendo 1,5 % de fármaco. MDZ, (A); BMDZ, (B).	107
Figura 35. Curva analítica do metronidazol em solução aquosa (λ 320 nm).	108
Figura 36. Fotomicrografia óptica de transmissão do filme de pectina/caseína 6% (p/V) parcialmente umedecido com água.	110
Figura 37. Fotomicrografia óptica de transmissão de partículas de pectina/caseína em pH 5 contendo MDZ+BMDZ preparadas com diferentes velocidades de agitação. A, 8000 rpm; B, 13500 rpm; C 20400 rpm. As setas auxiliam a visualização de partículas carregadas com pequenos cristais.	112
Figura 38. Perfil de liberação dos filmes à base de micropartículas de pectina/caseína carregadas com MDZ+BMDZ preparadas com diferentes velocidades de agitação.	113
Figura 39. Desintegração dos filmes de pectina/caseína em tampão fosfato pH 7 no decorrer do tempo. A: filmes não-reticulados; B: filmes reticulados com solução de cálcio 5% por 5 minutos.	115
Figura 40. Quantidade de fármaco cedida para as soluções de cálcio (5 ou 10%) durante o processo de reticulação dos filmes.	116
Figura 41. Perfil de liberação, em pH 7, dos filmes de pectina/caseína contendo 25% de MDZ+BMDZ.	117
Figura 42. Perfil de liberação, em pH 7, dos filmes de pectina/caseína contendo 50% de MDZ+BMDZ.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das bactérias comumente encontradas no periodonto	25
Tabela 2- Atividade, contra-indicações e efeitos adversos de antimicrobianos utilizados no tratamento da doença periodontal.....	27
Tabela 3- Formas farmacêuticas estudadas como sistemas de liberação intra-bolsa periodontal .	30
Tabela 4- Composição das dispersões utilizadas na preparação dos filmes.....	62
Tabela 5- Distribuição do tamanho de partícula em misturas de pectina/caseína 6% (p/p) em função do pH	98
Tabela 6- Distribuição do tamanho de partícula em misturas de pectina/caseína em pH 5 em função da concentração polimérica e velocidade de agitação durante o processo de acidificação.....	103
Tabela 7- Precisão e exatidão do método de quantificação do metronidazol.....	109
Tabela 8- Espessura dos filmes de pectina/caseína 6% (p/V) contendo 20% de glicerina	110
Tabela 9- Propriedades mecânicas os filmes de pectina/caseína.....	121
Tabela 10- Conteúdo de umidade no equilíbrio de filmes de pectina/caseína reticulados ou não com cálcio.....	122

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A DOENÇA PERIODONTAL.....	21
1.2. A BOLSA PERIODONTAL E O FLUIDO CREVICULAR	23
1.3. A PLACA DENTAL	23
1.4. O TRATAMENTO	26
1.5. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NA BOLSA PERIODONTAL.....	27
1.5.1. FILMES	32
1.6. MISTURAS DE POLISSACARÍDEOS E PROTEÍNAS	36
1.6.1. INCOMPATIBILIDADE TERMODINÂMICA.....	39
1.6.1.1. Modelo de Flory-Huggins	39
1.6.1.2. Depleção de interação	41
1.6.2. COMPLEXAÇÃO	43
1.6.2.1. Coacervação complexa e microencapsulação	45
1.7. PECTINA E CASEÍNA	46
1.8. METRONIDAZOL.....	49
2. OBJETIVOS.....	50
2.1. OBJETIVO GERAL	51
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. MATERIAL	53
3.2. MÉTODOS.....	53
3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASEÍNA	53
3.2.2. MARCAÇÃO COM CORANTES FLUORESCENTES	54
3.2.3. DIAGRAMA DE FASES	55
3.2.4. EFEITO DO PESO MOLECULAR DO POLISSACARÍDEO NA INCOMPATIBILIDADE TERMODINÂMICA ...	57
3.2.5. EFEITO DO pH NAS MISTURAS DE PECTINA/CASEÍNA.....	57
3.2.6. ESTABILIDADE DAS MISTURAS DE PECTINA/CASEÍNA	58
3.2.7. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DAS MISTURAS.....	58
3.2.8. OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS	59
3.2.9. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	60

3.2.10. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO METRONIDAZOL	60
3.2.11. PREPARAÇÃO DAS MISTURAS CONTENDO FÁRMACO	61
3.2.12. OBTENÇÃO DOS FILMES DE PECTINA/CASEÍNA	63
3.2.13. ESPESSURA DOS FILMES	63
3.2.14. RETICULAÇÃO DOS FILMES COM CÁLCIO	63
3.2.15. CONTEÚDO DE UMIDADE DOS FILMES	63
3.2.16. TEOR DE FÁRMACO DOS FILMES	64
3.2.17. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	64
3.2.18. PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES	66
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 68
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASEÍNA	69
4.2. DIAGRAMA DE FASES	70
4.3. EFEITO DO PESO MOLECULAR DO POLISSACARÍDEO NA INCOMPATIBILIDADE TERMODINÂMICA	75
4.4. CINÉTICA DE SEPARAÇÃO DE FASES	77
4.5. ESTABILIDADE DA MISTURA	81
4.6. EFEITO DO PH NA MISTURA PECTINA/CASEÍNA	84
4.7. COMPORTAMENTO REOLÓGICO DAS MISTURAS	91
4.8. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	96
4.9. MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACO PELO SISTEMA PECTINA/CASEÍNA	103
4.10. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO METRONIDAZOL	107
4.11. OBTENÇÃO DOS FILMES DE PECTINA/CASEÍNA	109
4.12. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PERFIL DE LIBERAÇÃO	111
4.13. PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES	120
 5. CONCLUSÕES	 123
 REFERÊNCIAS	 126
 ANEXO	 141

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é um processo inflamatório e infeccioso que resulta em destruição das estruturas de suporte do dente. Se ela progride, a mobilidade do dente aumenta, podendo acarretar a sua perda.

De acordo com o censo norte americano de 1990, aproximadamente 40% da população adulta sofria de doença periodontal, sendo a prevalência, entre outras, maior que a de câncer, doenças cardíacas e artrite, representando um gasto de aproximadamente 18 bilhões de dólares anuais (SOUTHARD; GODOWSKI, 1998). A incidência é maior (duas a três vezes) em pessoas portadoras de diabetes tipo I (SALVI et al., 1998; STEIN et al., 1997).

No Brasil, segundo dados da Faculdade de Saúde Pública, em 1998 cerca de 70% das pessoas adultas apresentavam problemas nas gengivas, resultando desde a perda do dente até problemas cardíacos graves. Dentre os pacientes com endocardite bacteriana atendidos no Incor, em cerca de 40% deles a causa primária é a má higienização bucal (FALTA..., 2003). A doença periodontal, além de ser considerada fator de risco para doenças cardiovasculares, incluindo o infarto (BECK et al., 1996; HERZBERG; MEYER, 1996; OFFENBACHER et al., 1999), também tem sido associada ao parto prematuro (LOPEZ; SMITH; GUTIERREZ, 2002; OFFENBACHER et al., 1996).

Um crescente interesse pela terapia com antimicrobianos como um adjuvante no tratamento da periodontite teve início no final da década de 70, quando se percebeu que algumas bactérias eram frequentemente associadas à doença. A limpeza mecânica e a cirurgia, combinadas a uma higiene oral cuidadosa, normalmente geravam resultados satisfatórios no controle da destruição periodontal. Todavia, com o tempo, observou-se que alguns pacientes continuavam apresentando destruição tecidual, apesar da boa higienização. Nesses casos, a

combinação com antibióticos resultou em respostas clínicas favoráveis, não obtidas com a terapia convencional isolada.

Inicialmente, a administração de antibióticos era quase que exclusivamente sistêmica. Recentemente, vários antimicrobianos vêm sendo utilizados em sistemas de liberação local, desenvolvidos especificamente para serem inseridos dentro da bolsa periodontal. A administração local, entre outras vantagens, possibilita que concentrações muito maiores de fármaco atinjam a região infeccionada.

Deve-se mencionar, no entanto, que o uso de antimicrobianos não substitui a limpeza mecânica. O biofilme formado pelas bactérias é relativamente impervio aos antimicrobianos. Para se ter uma idéia, seriam necessárias concentrações 500 a 1000 vezes maiores que as obtidas normalmente com administração sistêmica para que o biofilme fosse eliminado sem prévia destruição mecânica (WALKER; KARPINIA, 2002).

A presente investigação teve como objetivo central o desenvolvimento de um sistema de liberação para aplicação local que auxiliasse no tratamento da doença periodontal. Esse sistema, à base de polímeros naturais biodegradáveis, deveria, portanto, proporcionar concentrações inibitórias mínimas do antimicrobiano no local afetado por um longo período de tempo.

1.1. A doença periodontal

A doença periodontal acomete as estruturas de suporte do dente, denominadas de periodonto. O periodonto é formado, entre outros, pela gengiva, pelo ligamento periodontal, pelo cemento e pelo osso alveolar.

A gengiva é uma membrana mucosa composta por epitélio pavimentoso estratificado e lâmina própria que recobre os ossos maxila e mandíbula e abraça firmemente o dente em seu colo. O ligamento periodontal são feixes de fibras de tecido conjuntivo que ancoram os dentes dentro do osso alveolar. Uma extremidade de cada feixe está inserida no cemento e a outra está inserida na cavidade do osso de suporte (alvéolo). Esses feixes de fibras, presentes num espaço de 0,4 a 1,5 mm entre a superfície do dente e o osso, funcionam como amortecedores e permitem que o dente suporte as forças exercidas na mordida e na mastigação. O cemento é a estrutura calcificada que recobre as raízes do dente. O osso alveolar é uma extensão do osso da mandíbula e da maxila. Trata-se de um tipo de osso imaturo onde as fibras colágenas não estão arranjadas no padrão lamelar típico do osso adulto. Ele está presente ao redor dos alvéolos e é “perfurado” para permitir a passagem de nervos e vasos sanguíneos (PERRY; BEENSTERBOER, 1996). Essas estruturas estão representadas de forma esquemática na figura 1.

O primeiro estágio da doença periodontal é conhecido como gengivite. O acúmulo de placa bacteriana na margem da gengiva é o que induz a resposta inflamatória no tecido. A gengiva se torna avermelhada, edemaciada e pode sangrar quando levemente tocada. A gengivite é uma doença bastante comum e é facilmente tratada e controlada. No entanto, por ser indolor, muitos pacientes não percebem que possuem a doença e não procuram o dentista (PERRY; BEENSTERBOER, 1996).

Figura 1. Esquema das principais estruturas que compõem o dente e o periodonto (DENTES, 2001).

Devido às ações diretas da placa e da resposta inflamatória no tecido, a gengivite não tratada pode evoluir para a periodontite. Neste caso, a inflamação atinge outros tecidos de sustentação, como o ligamento periodontal, o cimento e o osso alveolar. O epitélio juncional da gengiva se desprende do cimento e migra pela superfície do dente, resultando em exposição da raiz e formação da bolsa periodontal. Essa bolsa formada entre o tecido mole da gengiva e o dente proporciona um meio ideal para a implantação e proliferação microbiana (SOSKOLONE; FRIEDMAN, 1996). Em estágios mais avançados da doença, o colágeno que suporta o periodonto é destruído. O osso alveolar começa a ser reabsorvido e a mobilidade do dente aumenta, podendo até levar à perda do mesmo (MEDLICOTT et al., 1994).

1.2. A bolsa periodontal e o fluido crevicular

A bolsa periodontal corresponde ao espaço que se forma entre o epitélio gengival e o cimento do dente quando a doença periodontal atinge graus mais avançados.

Em regiões saudáveis, esse espaço entre a gengiva e o dente é muito estreito, sendo denominado sulco gengival. Geralmente a profundidade do sulco gengival é menor que 3 mm. Na doença periodontal, com a migração do epitélio juncional em direção à raiz, essa profundidade pode variar de 4 a 12 mm (MEDLICOTT et al., 1994).

Tanto o sulco gengival quanto a bolsa periodontal são constantemente lavados pelo fluido crevicular ou fluido gengival. Este flui a partir do tecido gengival, passa pelo sulco gengival, ou pela bolsa, e cai na cavidade oral. Sua composição é semelhante à do plasma, mas seus constituintes estão em menor concentração. Normalmente, o volume de fluido crevicular encontrado no sulco gengival é 0,04 μL e seu fluxo é de 0,03 $\mu\text{L}/\text{min}$. Na bolsa periodontal esse volume e esse fluxo aumentam para 0,5 μL e 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectivamente (HATTING; HO, 1980), podendo chegar a 150 $\mu\text{L}/\text{h}$ (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

1.3. A placa dental

A placa dental ou biofilme periodonto patogênico é uma agregação bacteriana não calcificada que está firmemente aderida à superfície do dente ou de qualquer outra estrutura sólida presente na boca. Essa densa massa bacteriana está inserida em uma matriz formada a partir de glicoproteínas da saliva do hospedeiro e/ou de polissacarídeos extracelulares das bactérias (SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

A placa bacteriana tende a se acumular em regiões onde a limpeza é mais difícil. Geralmente a colonização bacteriana se inicia em irregularidades ou áreas rugosas presentes na

superfície do dente. A superfície do dente é coberta por uma película de glicoproteínas originárias da saliva. Essas glicoproteínas provavelmente se adsorvem à superfície do dente por interações iônicas com os íons cálcio ou fosfato da hidroxiapatita (material que compõe o dente). Algumas bactérias, como por exemplo, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*, possuem mecanismos que as tornam capazes de se ligar a essa película. Elas são, portanto, as responsáveis por dar início à colonização e conseqüente formação da placa bacteriana. (SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

As bactérias presentes na placa podem iniciar a resposta inflamatória no periodonto através de dois mecanismos. O primeiro seria por inativação da resposta de defesa do hospedeiro, através da produção de fatores que reduzem a fagocitose e a morte intracelular das bactérias, fatores estes que degradam imunoglobulinas e complemento e que eliminam as células de defesa do hospedeiro. O segundo mecanismo seria a produção de fatores que teriam um efeito destrutivo direto sobre os tecidos, como enzimas proteolíticas, metabólicos tóxicos e componentes lipídicos da membrana celular que se acumulariam na placa formando um reservatório de substâncias antigênicas (SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

Apesar dos mecanismos que produzem a inflamação serem conhecidos, não se sabe ainda ao certo por que ela se inicia. Duas teorias tentam explicar a etiologia microbiana na periodontite. A clássica, que é a teoria específica, sugere que entre 6 e 12 espécies microbianas são as responsáveis pela maioria das doenças periodontais e que, removendo essas bactérias patogênicas, a doença poderia ser controlada. A outra teoria, a não-específica, sugere que todas as bactérias orais são capazes de produzir fatores de virulência e a doença só ocorre quando o acúmulo de placa é tão grande que a resposta imune do organismo se torna incapaz de proteger os tecidos (SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

O que tem sido observado é a associação das duas teorias. Primeiramente, há um aumento do número de bactérias subgengivais e, depois, uma mudança na composição da microbiota (LOESCHE et al., 1985; NEWMAN, 1990; SLOTS, 1979). A microbiota inicial, formada por bacilos e cocos Gram positivos e cocos Gram negativos, se torna mais complexa, ocorrendo um aumento de bactérias filamentosas como *Actinomyces*, anaeróbias Gram negativas como *Fusobacterium*, bacilos móveis e espiroquetas (SLOTS, 1979).

As bactérias comumente encontradas no periodonto estão classificadas na tabela 1. Dentre as principais espécies associadas a alguma forma de periodontite, estão as Gram negativas facultativas *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Eikenella corrodens* e anaeróbias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus* (WOLFF; DAHLEN; AEPPLI, 1994).

Tabela 1- Classificação das bactérias comumente encontradas no periodonto

		Facultativas	Anaeróbias
Gram -	Bacilos imóveis	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Capnocytophaga ochraceus</i> , <i>Eikenella corrodens</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Leptotrichia buccalis</i>
	Bacilos móveis	<i>Campylobacter (Wolinella recta)</i>	<i>Selenomonas</i>
	Cocos		<i>Veillonella alcalescens</i>
	Espiroquetas		<i>Treponema denticola</i>
Gram +	Bacilos irregulares	<i>Actinomyces viscosus</i> , <i>israelii</i> e <i>naeslundii</i> ; <i>Corynebacterium</i> <i>matruchotii</i>	<i>Eubacterium</i>
	Bacilos retos	<i>Lactobacillus</i>	
	Cocos	<i>Streptococcus</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>

1.4. O tratamento

O tratamento da doença periodontal é feito principalmente através da limpeza mecânica ou raspagem do dente para remoção da placa bacteriana. No entanto, existem microrganismos, como os pertencentes às espécies *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, que são mais difíceis de serem removidos, provavelmente por colonizarem também tecidos gengivais e outras áreas inacessíveis à limpeza mecânica. Nesses casos, o tratamento envolve também o uso de antimicrobianos.

Os antimicrobianos utilizados no tratamento da periodontite são as tetraciclinas, o metronidazol, os macrolídeos e as lincosamidas. A clorexidina, presente em vários enxaguatórios bucais, também vem sendo bastante utilizada, mas somente em tratamentos tópicos. Já a penicilina é menos efetiva, porque muitos patógenos periodontais são resistentes a ela. Além disso, devido à possibilidade de provocar reações de hipersensibilidade, ela vem sendo substituída pelos macrolídeos, cujo espectro de ação é similar.

Dentre os antimicrobianos mencionados, as tetraciclinas e o metronidazol são os mais utilizados devido ao amplo espectro de ação que eles possuem (tabela 2). As tetraciclinas, além da ação bacteriostática, possuem atividade anti-colagenase, o que ajuda a controlar a destruição tecidual (YU et al., 1993). Também são capazes de se adsorverem na superfície do dente, garantindo uma ação mais prolongada na bolsa periodontal (STABHOLZ et al., 1993). O metronidazol é específico contra anaeróbios estritos, portanto não é efetivo *in vitro* contra *A. actinomycetemcomitans*, que é uma espécie anaeróbica facultativa presente desde os estágios iniciais da doença periodontal. Todavia, *in vivo*, tem-se demonstrado eficiente contra esses organismos, fato atribuído ao seu metabólito ativo 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (JOUSIMIES-SOMER et al., 1988).

Tabela 2- Atividade, contra-indicações e efeitos adversos de antimicrobianos utilizados no tratamento da doença periodontal

Antimicrobiano	Atividade	Contra-indicações	Efeitos adversos
Tetraciclinas (doxiciclina, minociclina, etc)	Contra bactérias Gram+ e Gram-, várias bactérias anaeróbias e facultativas e espiroquetas	Disfunção renal, gravidez, crianças menores de 12 anos	Náusea, vômito, diarreia, mancha nos dentes, candidíase, colite pseudomembranosa (raro), retardo no fechamento das fontanelas. Minociclina e doxiciclina causam febre renal e minociclina provoca vertigem, tontura, ataxia e tinnitus
Metronidazol	Ampla espectro de ação contra protozoários e bactérias anaeróbias Gram+ e Gram- (cocos e bacilos) e espiroquetas	Desordem do sistema nervoso central, primeiro semestre da gravidez, uso concomitante com álcool	Gosto metálico e amargo, náusea, vômito, indigestão, diarreia, constipação. Tontura e dores de cabeça são menos comuns
Lincosamidas (clindamicina, lincomicina)	Contra bactérias Gram+ e algumas bactérias anaeróbias	Disfunção renal e hepática, estados diarreicos	Náusea, vômito, diarreia, colite pseudomembranosa
Macrolídeos (espiramicina, eritromicina)	Contra bactérias Gram+ e espiroquetas	Disfunção hepática	Náusea, vômito e diarreia.

A administração sistêmica desses antimicrobianos provoca vários efeitos adversos (tabela 2) e por essa razão ela vem sendo substituída pela administração local desses fármacos. O grande desafio é manter uma concentração alta de fármaco no local por um período prolongado de tempo.

1.5. Sistemas de liberação de fármacos na bolsa periodontal

Como vimos no item 1.2, a bolsa periodontal é constantemente lavada pelo fluido crevicular numa direção que vai dos tecidos gengivais para a cavidade oral. O fluxo de fluido crevicular depende do grau de inflamação local e do volume da bolsa.

Com simples enxagüatórios bucais ou irrigações supragengivais, os antimicrobianos não são capazes de penetrar na bolsa periodontal (PITCHER; NEWMAN; STRAHAN, 1980). Numa irrigação subgengival, os agentes são introduzidos na bolsa, mas são rapidamente lavados pelo fluido crevicular, sendo metade do fármaco já eliminada no primeiro minuto (GOODSON, 1989).

Para manter a concentração necessária de fármaco na bolsa periodontal deve haver um balanço entre a quantidade do fármaco liberado e a quantidade perdida tanto pela ação lavatória do fluido crevicular quanto pela absorção através do epitélio para a corrente sangüínea. Um sistema de liberação ideal deveria proporcionar uma liberação rápida no início (“*burst*”) e, à medida que o fluxo do fluido crevicular fosse diminuindo pelo próprio efeito do fármaco na inflamação, a liberação também fosse reduzida, mantendo o nível terapêutico por um tempo prolongado dentro da bolsa.

O primeiro sistema de liberação de fármaco intra-bolsa periodontal foi proposto por Goodson e colaboradores (1979). Eles aprisionaram tetraciclina em tubos de diálise de acetato de celulose com 250 µm de diâmetro, sendo que um comprimento apropriado do tubo era inserido dentro da bolsa. A liberação do fármaco, no entanto, ocorreu rapidamente, sendo 95% liberado em 2 horas. Apesar desse modelo não ter sido eficiente em manter a concentração inibitória mínima por um longo período de tempo, ele serviu de base para o desenvolvimento de outros sistemas de liberação.

O próprio Goodson e seus colaboradores avaliaram a liberação da tetraciclina incorporada em diversos outros polímeros como polietileno, polipropileno, policaprolactona, poliuretano, acetato-propionato de celulose e etileno vinil acetato (GOODSON et al., 1983). O último originou fibras flexíveis e proporcionou uma liberação prolongada por 9 dias, o que o levou a ser comercializado com o nome de Actisite® (Alza Corporation, Palo Alto, Califórnia).

As desvantagens do uso dessas fibras são o tempo relativamente longo de inserção da fibra, já que ela é empurrada gentilmente e dobrada sobre si à medida que é inserida na bolsa até completo preenchimento da cavidade (7-10 minutos/dente) (GOODSON, 1994¹ apud SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996, p.366), e a necessidade de utilização de um adesivo de cianoacrilato para reter o sistema dentro da bolsa. Além disso, o fato de o polímero não ser biodegradável implica a sua remoção ao final da liberação, o que compromete a adesão do paciente ao tratamento.

Outras formas de apresentação dos sistemas de liberação local para tratamento da doença periodontal vêm sendo bem mais estudadas. Elas se dividem entre formas semi-sólidas/injetáveis e filmes. A tabela 3 resume grande parte desses sistemas intra-bolsa estudados até o presente.

Para os sistemas semi-sólidos, o procedimento de injeção é simples e traz pouco ou nenhum desconforto ao paciente no ato da inserção da forma farmacêutica. A natureza fluida da formulação, emulsão ou gel, contendo ou não microesferas, possibilita sua espalhabilidade por todo o interior da bolsa. No entanto, para que fique retida dentro da bolsa e não seja lavada pelo fluido crevicular, a formulação deve possuir uma boa bioadesividade e/ou passar por mudança de fase, tornando-se mais rígida ou sólida no interior da bolsa.

Já a utilização de filmes como sistemas de liberação na bolsa periodontal possui uma série de vantagens como, por exemplo, suas dimensões e formas, que podem ser facilmente controladas para corresponder às dimensões da bolsa a ser tratada; são rapidamente inseridos com o mínimo de desconforto ao paciente; dependendo da espessura e da bioadesividade do material, os filmes podem permanecer submersos entre a gengiva e o dente sem qualquer interferência nos hábitos alimentares e higiênicos do paciente.

¹ GOODSON, J.M. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. **Perio.** 2000, v.5, p.142, 1994

Tabela 3- Formas farmacêuticas estudadas como sistemas de liberação intra-bolsa periodontal

Forma	Polímero	Fármaco	Teor de fármaco	Duração da liberação	Referência
Filme	Metilmetacrilato	Clorexidina, metronidazol ou tetraciclina	30%	14 dias <i>in vitro</i>	Addy et al., 1982
Filme	EC	Clorexidina	5-20%	205 dias <i>in vitro</i>	Friedman ; Golomb, 1982
Filme	HPC	Clorexidina ou tetraciclina	5% e 1%	1-2 h <i>in vitro</i>	Noguchi et al., 1984
Filme	PMA + HPC	Ofloxacin	10%	8 h <i>in vitro</i> ; 7 dias <i>in vivo</i>	Higashi et al., 1990
Filme	PHBA	Metronidazol ou tetraciclina HCL	25%	5 dias <i>in vitro</i>	Deasy et al., 1989
Filme	PHBA	Tetraciclina HCL	50%	10 dias <i>in vivo</i>	Collins et al., 1989
Filme	PLGA	Tetraciclina HCL	25%	14 dias <i>in vivo</i>	Agarwal et al., 1993
Filme	CAP + Pluronic L101	Metronidazol	10%	1 dia <i>in vivo</i>	Gates et al., 1994
Filme e gel	POE _x LA _x	Tetraciclina	5%	14 dias <i>in vitro</i>	Schwach-Abdellaoui et al., 2001
Filme	EVA	Tetraciclina ou minociclina	10%	30% e 1% respect. em 15 dias <i>in vitro</i>	Kalachandra et al., 2002
Filme	Byco®	Clorexidina HCL	NR	4-80 h <i>in vitro</i>	Steinberg et al., 1990
Filme	Atelocolágeno	Tetraciclina HCL	50%	10 dias <i>in vivo</i>	Minabe et al., 1989
Filme Periochip®	Gelatina hidrolisada + glicerina	Digluconato de clorexidina	33%	7 dias <i>in vivo</i>	Soskolne et al., 1998
Filme	Acetato de celulose	Digluconato de clorexidina	50%	40% em 5 dias <i>in vitro</i>	Çetin et al., 2004
Filme	PVA + CMCS	Ornidazol	10µg/mm ²	3-4 h <i>in vitro</i> ; 5 dias <i>in vivo</i>	Wang et al., 2007
Filme de microesferas	Quitosana + PCL	Benzoato de metronidazol	34-73%	64% em 7 h <i>in vitro</i>	El-Kamel et al., 2007
Microesferas	PLGA	Minociclina	25%	NR	Jones et al., 1994
Microesferas	PLGA	Tetraciclina HCL	20%	50-70% em 12 dias <i>in vitro</i>	Esposito et al., 1997

(Continua)

(Continuação)

Forma	Polímero	Fármaco	Teor de fármaco	Duração da liberação	Referência
Microesferas	PLGA + alginato	Tetraciclina	20%	70% em 12 dias <i>in vitro</i>	Liu et al., 2004
Microesferas	PLGA + ciclodextrina	Clorexidina	40%	15 dias <i>in vitro</i>	Yue et al., 2004
Microesferas	PLGA + PCL	Doxiciclina	60%	90% em 11 dias <i>in vitro</i> ; 11 dias <i>in vivo</i>	Mundargi et al., 2007
Nanopartícula	PLGA ou PLA ou CAP	Triclosan	1,23-33,33 %	1-2 h <i>in vitro</i>	Piñón-Segundo et al., 2005
Gel lipídico Periocline® Dentomycin®	HEC + aminoalquilmetacrilato	Minociclina	2%	NR	Nakagawa et al., 1991
Gel	Carbopol	Clindamicina	1%	NR	Sauvetre et al., 1993
Gel	HEC + PC (1) ou Carbopol + PC (2)	Metronidazol	5%	(1) 50% em 10-30 h <i>in vitro</i> ; (2) 50% em 1-15 h <i>in vitro</i>	Jones et al., 1997
Gel	PVP + HEC	Tetraciclina	5%	> 54 h <i>in vitro</i>	Jones et al., 1996
Gel lipídico Elyzol®	Monooleato de glicerol + óleo sésame	Metronidazol	25%	6 h <i>in vitro</i> ; 2-3 dias <i>in vivo</i>	Norling et al., 1992; Stoltze, 1992
Gel	Poloxamer 407 ou monoglicerideo	Tetraciclina	2%	65% e 18% respect. após 7h <i>in vitro</i>	Espósito et al., 1996
Gel Atrigel®	PLA + NMP	Hiclato de doxaciiclina	10%	7 dias	Yewey et al., 1997
Gel	Poloxamer 407 + halloysite	Tetraciclina	0,3%	6 semanas <i>in vivo</i>	Kelly et al., 2004
Gel	Pluronic 127 + Aerosil	Tetraciclina/serratiopeptidase	3-9% / 0,5%	60-70% em 8 h <i>in vitro</i>	Maheshwari et al., 2006
Gel	Poloxamer 407 + carbopol	Extrato de própolis	4%	> 7 dias <i>in vitro</i>	Bruschi et al., 2007

Legenda: CAP, acetato ftalato de celulose; CMCS, carboximetil-quitosana; EC, etilcelulose; EVA, etileno vinil acetato; HEC, hidroxietilcelulose; HPC, hidroxipropilcelulose; NMP, (N-metil-2-pirrolidona); PC, policarbophil; PCL, poli(ε-caprolactona); PHBA, poli(ácido hidroxibutírico); PLA, poli(lactideo); PLGA, poli(lactideo-co-glicolideo); PMA, poli(ácido metacrílico); POE_xLA_x, poli(orto éster) autocatalisável; PVA, álcool polivinílico; PVP, polivinilpirrolidona; NR, não-reportado.

1.5.1. Filmes

As primeiras descrições de filmes como sistemas de liberação intra-bolsa surgiram em 1982. Addy e colaboradores (1982) desenvolveram filmes de metilmetacrilato para a liberação de tetraciclina, metronidazol e clorexidina. Os filmes foram produzidos por compressão direta sob 7000 kg/cm^2 por 4 minutos. Segundo os autores, a liberação era dependente da natureza do fármaco e de sua concentração na formulação. Filmes de $10 \times 1 \times 0,5 \text{ mm}$ sustentaram a liberação dos três fármacos por mais de 14 dias *in vitro*.

No mesmo ano, Friedman e Golomb obtiveram, através do método de “casting”/evaporação do solvente, filmes de etilcelulose contendo clorexidina. A liberação *in vitro* dependia do solvente e da porcentagem de fármaco utilizados. Esses sistemas possuíam o inconveniente de não serem biodegradáveis e tinham que ser removidos ao final da liberação.

Noguchi e colaboradores (1984) desenvolveram filmes de hidroxipropilcelulose (HPC) contendo clorexidina e tetraciclina. A vantagem desses filmes é que eles eram erodíveis e não necessitavam ser removidos após a liberação. A HPC, apesar de não ser biodegradável, é solúvel em água, o que ocasionou a rápida desintegração dos filmes *in vitro* e liberação dos fármacos em duas horas. No fluido crevicular, 24 horas após a inserção do filme, foram encontradas concentrações de tetraciclina acima da concentração inibitória mínima (MIC) para a maioria dos microrganismos. Os níveis de clorexidina no fluido não foram medidos, mas resultados clínicos mostraram redução da profundidade de sondagem, índice de placa, índice gengival e sangramento à sondagem.

Uma modificação desse sistema foi realizada incorporando-se copolímero do ácido metacrílico nos filmes de HPC. A liberação de ofloxacino foi sustentada por mais de 8 horas *in*

vitro. Análises *in vivo* mostraram que concentrações terapêuticas foram mantidas no fluido crevicular por 7 dias (HIGASHI et al., 1990).

Filmes de poli(ácido-3-hidroxibutírico) (PHBA) contendo 25% de cloridrato de tetraciclina ou metronidazol apresentaram liberação sustentada por 5 dias *in vitro* (DEASY et al., 1989). Os mesmos autores estudaram os efeitos da porcentagem de cloridrato de tetraciclina na formulação e os do peso molecular do PHBA na liberação (COLLINS et al., 1989). Um aumento da concentração de tetraciclina de 30% para 60% provocou aumento da velocidade de liberação. Em contrapartida, a redução do peso molecular do PHBA levou à redução da velocidade. Filmes com 50% de fármaco proporcionaram concentrações terapêuticas durante 10 dias. Nos dois trabalhos, porém, a melhora clínica não se manteve após o término do tratamento.

Em outro estudo, filmes de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) contendo 25% de cloridrato de tetraciclina mostraram possuir baixa retenção na bolsa periodontal, sendo necessária a utilização de um adesivo de cianoacrilato para conter o filme (AGARWAL et al., 1993). Nesse estudo, feito com 8 pacientes, as concentrações terapêuticas foram mantidas no fluido crevicular por pelo menos 14 dias.

Uma associação de acetato ftalato de celulose (CAP) e copolímero do polioxietileno e polioxipropileno (Pluronic L101) foi utilizada para a liberação modificada de metronidazol. Devido às características hidrofóbicas do Pluronic L101 e sua capacidade de formar cristal-líquido, quanto maior a sua concentração na mistura, menor a velocidade de erosão do CAP e de liberação do fármaco. Misturas de 50/50 CAP/Pluronic L101, liberaram 100% do fármaco em 1h *in vivo*, enquanto misturas na proporção 50/70, o fizeram em 24 horas (GATES, et al., 1994).

Poliortoésteres autocatalisáveis (POE_xLA_x) também foram estudados como sistemas de liberação intra-bolsa. Os (POE_xLA_x) contêm dímeros de lactoil lactil na estrutura da cadeia polimérica. Quando sofrem hidrólise, originam ácido láctico que catalisa a hidrólise das ligações

orto-ésteres. Quanto maior a proporção de ácido lático no polímero, mais rápida é a sua degradação. A liberação de tetraciclina a partir desses materiais possuiu uma duração de até 14 dias *in vitro*, dependendo da proporção de ácido lático empregada (SCHWACH-ABDELLAOUI et al., 2001).

Outro polímero sintético que também foi proposto para a preparação de filmes foi o etileno acetato de vinila (EVA). Os filmes contendo 10% de tetraciclina ou minociclina apresentaram um “burst” inicial de liberação que durou 1 dia e depois a velocidade se manteve constante ($56,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $0,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente) por mais de 15 dias (KALACHANDRA; DONGMING; OFFENBACHER, 2002).

Larsen (1990) utilizou diferentes materiais biodegradáveis de uso odontológico e também filmes de acrílico e avaliou seus potenciais como sistemas de liberação. Esses materiais incluíam Surgicel[®], gaze hemostática à base de celulose oxidada; CollaCote[®], membrana para cicatrização de ferimentos e Tissel[®], cola biológica composta de fibrina, fibrinogênio e fator XIII. Todas as formulações continham 40% de doxaciiclina. Os materiais foram incubados em 1 mL de água ou soro humano que eram trocados a cada dia por um período de 9 dias. A Surgicel[®] proporcionou altas concentrações do fármaco durante todo o período do experimento e alta atividade antimicrobiana. Com a CollaCote[®] e o filme de acrílico, a concentração do fármaco diminuiu rapidamente em poucos dias, assim como a sua atividade antimicrobiana. A Tissel[®] foi intermediária, com uma contínua diminuição da concentração, mas altos níveis de atividade antimicrobiana.

Alguns polímeros naturais também foram testados como sistemas de liberação intra-bolsa. Filmes compostos de uma proteína do peixe comercializada como Byco[®] sustentaram a liberação de cloridrato de clorexidina por um período que variou de 4 a 80 horas *in vitro* (STEINBERG et

al., 1990). Outro sistema à base de atelocolágeno proporcionou concentrações terapêuticas de tetraciclina no fluido crevicular mesmo 10 dias após a inserção do filme (MINABE et al., 1989).

Um filme à base de um cross-link de gelatina hidrolizada e glicerina contendo digluconato de clorexidina está sendo comercializado com o nome de Periochip[®] (Perio Products Ltd, Jerusalém, Israel). Esse filme biodegradável possui um efeito “burst”, sendo observadas concentrações de 2007 µg/mL no fluido crevicular nas primeiras 2 horas após sua aplicação e concentrações de 1300 a 1900 µg/mL nas próximas 96 horas, seguindo de liberação mais lenta nos outros dias (SOSKOLNE et al, 1998). Esse sistema é capaz de proporcionar, considerando a MIC de clorexidina de 125 µg/mL (STANLEY; WILSON; NEWMAN, 1989), concentrações terapêuticas na bolsa periodontal por uma semana.

Mais recentemente, o acetato de celulose sem qualquer associação mostrou maior eficiência em controlar a liberação de gluconato de clorexidina do que o Periochip[®]. Os filmes contendo, além do antimicrobiano, indometacina e meloxicam, liberaram apenas 40% do fármaco em 5 dias, enquanto o Periochip[®] liberou 96% já em seis horas, nas mesmas condições de experimentação (ÇETIN et al., 2004).

Em 2007, El-Kamel e colaboradores avaliaram o desempenho de filmes contendo micropartículas de quitosana (CH) e poli(ε-caprolactona) (PCL) no controle da liberação de benzoato de metronidazol. As micropartículas foram produzidas por emulsificação óleo/água e posterior evaporação da fase orgânica, realizada durante o processo de secagem do filme. Filmes contendo CH: PCL na proporção 1:0,625 (p/p) liberaram *in vitro* 64% do fármaco em 7 horas. *In vivo*, concentrações de 5 a 15 µg/mL (ver MIC no item 1.8) foram encontradas na saliva durante 6 horas.

No mesmo ano, diferentes misturas de quitosana modificada (carboximetil-quitosana) (CMCS) e álcool polivinílico (PVA) também foram estudadas (WANG et al., 2007). Quanto maior a proporção de PVA na mistura, menor era o grau de intumescimento dos filmes e a velocidade de liberação do fármaco ornidazol. Em contrapartida, as propriedades biológicas como atividade antimicrobiana e biocompatibilidade melhoravam quanto maior fosse a proporção de CMCS na mistura. Filmes, na proporção 2:1 de PVA e CMCS, respectivamente, liberaram *in vitro* todo o fármaco em aproximadamente 3,5 horas; na proporção 1:2, em 80 minutos. Estudos *in vivo* demonstraram que a mistura não apresentou toxicidade ao periodonto de ratos. Além disso, o filme apresentou boa retenção no local implantado e manteve altas concentrações do fármaco por 5 dias.

1.6. Misturas de polissacarídeos e proteínas

Objetivando o desenvolvimento de sistemas de liberação específicos para serem utilizados no interior da bolsa periodontal, diversas estratégias e polímeros vêm sendo avaliados, como mostrado de forma sistematizada na Tabela 3.

Nos últimos anos, a pesquisa de materiais alternativos obtidos de fontes naturais renováveis tem aumentado marcadamente. Há uma constante necessidade de se modificarem propriedades de polímeros naturais para melhorar suas características funcionais ou possibilitar novos usos. Entre os vários polímeros naturais, as proteínas e os polissacarídeos que formam hidrogéis têm recebido maior atenção, em parte, por serem biodegradáveis e atóxicos, tanto antes quanto após sua degradação.

Os polissacarídeos são polímeros naturais de alto peso molecular. Também conhecidos como carboidratos, são formados de poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou substâncias que

liberam esses compostos por hidrólise. Os polissacarídeos diferem entre si na identidade das suas unidades monossacarídicas e nos tipos de ligação que as une, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas, podendo ser solúveis ou insolúveis em água. Funcionam tanto como fontes de energia, quanto como elementos estruturais das células e elementos de proteção nas paredes das células bacterianas e vegetais. Agem ainda como lubrificantes das articulações esqueléticas e fornecem coesão entre as células, entre outras funções. São polissacarídeos o amido, o glicogênio, o ácido hialurônico, a celulose, a pectina, a quitina, entre outros (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995a).

Proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos. São 20 os aminoácidos presentes na natureza e todos eles possuem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono. Eles diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais, as quais variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e influenciam na solubilidade da proteína em água. Dependendo da sequência dos aminoácidos, as proteínas adquirem diferentes estruturas e conformações, indispensáveis à sua funcionalidade. Exemplos de proteínas são as enzimas, a hemoglobina, a queratina, o colágeno, a ovalbumina (proteína da clara do ovo), caseína (proteína do leite), etc (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995b).

Misturas de polissacarídeos e proteínas em meio aquoso são geralmente instáveis. A separação de fases, que é uma consequência da instabilidade do sistema, ocorre devido a interações repulsivas (segregativas) ou atrativas (associativas) (DOUBLIER et al., 2000; SCHMITT et al., 1998; TOLZTOGUZOV, 1991; TURGEON et al., 2003). No primeiro caso, também conhecido como incompatibilidade termodinâmica, os dois biopolímeros não se atraem e, depois de cessada a agitação, a dispersão se separa em duas fases, cada uma contendo predominantemente um dos polímeros. No outro caso, que inclui coacervação complexa, os biopolímeros se atraem porque possuem cargas opostas, resultando em uma fase que contém os

biopolímeros complexados e outra que contém principalmente solvente. A co-solubilidade entre polissacarídeos e proteínas é uma situação pouco típica (TOLZTOGUZOV, 1991). Essas tendências estão esquematizadas na figura 2.

Figura 2. Principais tendências no comportamento de misturas de polissacarídeos e proteínas (traduzido de WEINBRECK, 2004).

Na natureza, a associação entre proteínas e polissacarídeos é importante para manutenção da integridade da célula (membranas e organelas) ou para indução da divisão celular (complexos histonas/DNA, catálise enzimática). A incompatibilidade entre eles se faz presente, por exemplo, durante a partição das células (TURGEON et al., 2003).

Sendo a separação de fases geralmente induzida pelas interações eletrostáticas entre os polímeros, é previsível que parâmetros como estrutura dos polímeros, massa molar, densidade de cargas, concentração, pH e força iônica, sejam determinantes do comportamento do sistema.

1.6.1. Incompatibilidade termodinâmica

A incompatibilidade termodinâmica entre biopolímeros é conhecida desde 1896, quando Beijerinck² descobriu a separação entre gelatina e amido (apud TOLSTOGUZOV, 2006, p. 626). Durante o século passado, a incompatibilidade entre polímeros foi assunto de diversos estudos, o que resultou em uma enorme quantidade de dados experimentais (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 2002). Esses dados são, principalmente, descrições qualitativas das condições de separação de fases. Descrições quantitativas são bem mais escassas. Essa situação se deve à característica dos biopolímeros de serem polidispersos em sua massa molar, o que acarreta geleificação mesmo em baixas concentrações e arrasta a separação de fases (DURRANI et al., 1993; DURRANI; DONALD, 1994).

De acordo com a Segunda Lei da Termodinâmica, um ou mais polímeros só se misturam com um solvente se a energia livre de mistura for negativa:

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M < 0 \quad (1)$$

onde ΔH_M e ΔS_M são a entalpia e a entropia de mistura, respectivamente, e T é a temperatura absoluta (K). Se $\Delta G_M > 0$, o sistema se separa em duas fases, cada uma contendo um polímero.

1.6.1.1. Modelo de Flory-Huggins

A termodinâmica de soluções poliméricas é tratada de acordo com uma teoria desenvolvida, independentemente, por J. P. Flory e M. L. Huggins, em meados do século passado. Essa teoria é notavelmente simples, mas explica várias observações experimentais e serve de base para outras teorias mais sofisticadas. Conhecida como teoria de Flory-Huggins (1953), descreve um modelo em que se calcula a distribuição de moléculas em uma rede (*lattice*).

² BEIJERINCK, M. W. *Centbl Bakteriöl Parasitenkd Infektkrankh.* Abteilung 2, 2, p. 697-9, 1896.

Considerando uma mistura simples de dois componentes (solvente-polímero), a energia livre de mistura, ΔG_M , pode ser definida como:

$$\Delta G_M / RTV = (\phi_1 \ln \phi_1) / V_1 + (\phi_2 \ln \phi_2) / V_2 + (\chi_{12}/V_1) \phi_1 \phi_2 \quad (2)$$

onde ϕ_i é a fração volumétrica do componente i na mistura, V_i é o volume molar do componente i , V é o volume total da mistura, R é a constante de gás ($8,3144 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K) e χ_{12} é o parâmetro de interação entre solvente e biopolímero.

Os primeiros termos da equação se referem à entropia de mistura e o último, à entalpia.

A entropia de mistura, ΔS_M , representa o número de possíveis permutações que as moléculas dos componentes da mistura podem sofrer considerando todos os sítios do sistema em seu “*quasilattice-state*” (ver esquema na figura 3). Considerando uma cadeia polimérica, o primeiro monômero pode ocupar qualquer lugar da grade. O segundo monômero deverá ocupar somente sítios ao redor do primeiro, uma vez que eles estão conectados. O terceiro monômero poderá ocupar todos os sítios ao redor do segundo menos o ocupado pelo primeiro, e assim por diante. Ou seja, quanto maior o tamanho da cadeia polimérica, menor o número de permutações possíveis. Com a redução de ΔS_M , a incompatibilidade da mistura aumenta porque a energia livre de mistura tende a ser maior que zero.

A entalpia de mistura, ΔH_M , é baseada na existência de forças repulsivas ou atrativas ao redor de cada átomo e molécula. A energia de interação entre os segmentos dos componentes da mistura contribui proporcionalmente para obtenção do parâmetro de interação χ . Numa mistura binária, o parâmetro de interação entre solvente e biopolímero, χ_{12} , mede o poder solvente do sistema. Quanto menor χ_{12} , melhor o solvente e a solubilização do polímero. Para misturas exotérmicas, $\chi_{12} < 0$ e para misturas endotérmicas $\chi_{12} > 0$.

Figura 3. Representação esquemática de uma grade idealizada na teoria de Flory-Huggins. Cada quadrado é um sítio que pode ser ocupado. Círculos brancos representam moléculas de solvente. Círculos pretos, monômeros de uma cadeia polimérica.

Em misturas ternárias (solvente-polímero-polímero), três parâmetros de interação de Flory-Huggins são apresentados: χ_{12} e χ_{13} , que se referem às interações entre o solvente e os dois polímeros e χ_{23} , referente às interações entre os dois polímeros. A incompatibilidade entre misturas de polímeros se dá quando $\chi_{23} > 0$, ou seja, as interações polímero-solvente são favorecidas em detrimento das interações polímero-polímero. Nesse caso eles se repelem e ocorre a separação em duas fases.

1.6.1.2. Depleção de interação

Quando os dois polímeros possuem estruturas similares, a incompatibilidade entre eles pode ser explicada pelo modelo de Flory-Huggins. No entanto, se os dois polímeros são diferentes quanto às suas formas e estruturas, como no caso de misturas de polissacarídeos e proteínas globulares ou proteínas que formam micelas, a teoria de depleção de interação é a mais adequada. Apesar do resultado ser o mesmo (separação em duas fases), este mecanismo difere

daquele uma vez que envolve uma suspensão coloidal, que é termodinamicamente instável por natureza (TOLZTOGUZOV, 1997b).

A explicação termodinâmica para a separação de fases entre proteínas e polissacarídeos, dada pela teoria da depleção de interação, foi primeiramente idealizada por Asakura e Oosawa em 1954. Seguindo essa teoria, partículas coloidais (proteínas), na presença de outras partículas menores (cadeias de polímeros como polissacarídeos), carregam uma zona ao seu redor denominada de zona de depleção (figura 4). Quando duas partículas coloidais se aproximam, as zonas se sobrepõem, impedindo a presença de partículas menores entre elas. Esse espaço livre gera um gradiente de pressão osmótica que leva à efetiva atração entre as duas partículas. Com isso, o volume disponível para as partículas menores aumenta, reduzindo a energia livre do sistema, que termina por separar em duas fases.

Figura 4. Mecanismo de depleção de interação (traduzido de EDELMAN, 2003).

A figura 4 mostra partículas coloidais maiores que as cadeias de polímeros. No entanto, esse modelo é também utilizado para sistemas em que as cadeias de polímeros são maiores que as partículas coloidais (VAN DER SCHOOT, 1998; WANG et al., 2001).

1.6.2. Complexação

Quando dois biopolímeros em solução possuem cargas opostas, eles se atraem, levando a uma separação de fases associativa. O termo “separação de fases associativa” abrange tanto a coacervação complexa quanto a precipitação. Na coacervação complexa, a fase que contém os polímeros complexados é líquida, enquanto que na precipitação, essa fase é sólida (DE KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004).

“Coacervação” deriva do latim “acervus”, que significa agregação. O prefixo “co” significa junto. Portanto, coacervação se refere à união de partículas coloidais, termo introduzido por Bungenberg de Jong e Kruyt³ em 1929 (apud DE KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004, p. 340). Neste caso, entende-se por partículas coloidais, as gotículas de fase polimérica formadas durante a separação de fases, também chamadas de coacervados. Esses coacervados depois coalescem e formam uma fase continua de complexo insolúvel (figura 5).

Figura 5. Representação esquemática da separação de fases por coacervação complexa (traduzido de WEINBRECK, 2004).

³ BUNGENBERG DE JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). **Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap**, v. 32, p. 849-856, 1929.

A coacervação também pode ser simples, quando ela envolver somente um polímero. Nesse caso, o solvente utilizado é fraco ou incompatível com o polímero ($\chi_{12} > 0$), levando à separação de fases (BUNGENBERG DE JONG, 1949a).

Várias teorias tentam explicar, quantitativamente, o fenômeno da coacervação complexa e serão aqui abordadas de forma simplificada (maiores detalhes em Schmitt et al., 1998). A primeira delas, idealizada por Overbeek e Voorn (1957) para explicar o sistema gelatina/goma arábica, trata a coacervação como um fenômeno espontâneo. Basicamente, as cadeias de dois polímeros com cargas opostas se atraem para formar o coacervado, aprisionando também moléculas de solvente. O solvente presente na fase de coacervado contribui para aumentar a entropia do sistema, pois permite grande número de arranjos entre as macromoléculas. No entanto, para ocorrer a coacervação, a densidade de carga e o peso molecular dos polímeros devem ser elevados. Para os casos em que essas condições não são atingidas, outra teoria foi elaborada: a de Veis-Aranyi (1960).

A teoria de Veis-Aranyi, baseada na complexação entre gelatinas de cargas opostas em baixas temperaturas, considera que a coacervação complexa é um processo de duas etapas, podendo levar horas ou dias. Primeiramente, as gelatinas interagem entre si eletrostaticamente, dando origem a agregados de baixa entropia configuracional. Posteriormente, esses agregados se reorganizam lentamente para formar a fase de coacervado. Veis modificou a teoria de Voorn-Overbeek, incluindo o parâmetro de interação de Flory-Huggins entre polímero-solvente, χ_{12} , que aumenta significativamente com a redução da temperatura.

Além dessas, outras duas teorias são conhecidas: a de Nakajima-Sato (1972) e a de Tainaka (1979, 1980). A primeira também é uma adaptação da teoria de Voorn-Overbeek, incluindo o parâmetro de interação de Flory-Huggins e modificando o termo eletrostático para

explicar a complexação de macromoléculas de álcool polivinílico de cargas opostas na presença de sal. A segunda concorda com a teoria de Veis-Aranyi, em que a coacervação acontece em duas etapas, mas discorda que a formação de agregados se dê por pareamento de cargas específico. Os agregados presentes na fase inicial se condensam, dando origem a uma fase concentrada. Nesta fase, os agregados sobrepostos geram um ganho de energia eletrostática devido ao aumento de densidade de poliíons no domínio sobreposto, formando os coacervados. As forças que governam a separação de fases são, portanto, eletrostáticas e atrativas. A teoria de Tainaka é a mais geral e é aplicável tanto para sistemas com alta quanto com baixa densidade de cargas.

1.6.2.1. Coacervação complexa e microencapsulação

Uma das aplicações industriais mais importantes da coacervação complexa é a microencapsulação. As microcápsulas são utilizadas nas agroindústrias, nas indústrias aeroespaciais, de impressão, de alimentos, de cosméticos e, principalmente, nas de medicamentos (NAIRN, 1995); para proteger substâncias sensíveis (voláteis, corantes, enzimas, fármacos, etc) ou para modificar sua liberação.

O potencial de encapsulação dos coacervados foi reconhecido pela primeira vez por Bungenberg de Jong (1949b), que observou que partículas sólidas e líquidos orgânicos eram englobados pelos sistemas coacervados de gelatina/goma arábica. De acordo com Bungenberg de Jong, para que a encapsulação acontecesse, os coacervados deveriam ser capazes de molhar a superfície das partículas ou gotículas de óleo. Assim, se materiais como esses estivessem presentes na mistura de biopolímeros e uma agitação suficiente para evitar a sedimentação dos coacervados fosse aplicada, o material disperso ficaria homogeneamente coberto por uma camada de coacervado.

Desde então, uma série de sistemas à base de gelatina e goma arábica foi investigada na encapsulação de fragrâncias (FLORES et al., 1992), óleos (LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR, 2000a, 2000b, 2001) e fármacos (JIZOMOTO et al., 1993; PALMIERI et al., 1996, 1999; TAKEDA et al., 1981; TAKENAKA et al., 1980, 1981); abrindo caminho para estudos com outros polímeros (SCHMITT et al., 1998).

Baracat (2004) observou, em misturas de pectina e caseína, a formação de sistemas organizados capazes de encapsular cristais de indometacina e de paracetamol e sugeriu que eles pudessem controlar a liberação desses fármacos.

1.7. Pectina e caseína

Dentre os biopolímeros e suas interações, a caseína e a pectina tem sido alvo de inúmeros estudos, devido a sua importância na área alimentícia para a estabilização de produtos lácteos acidificados (TROMP et al., 2002).

As pectinas constituem uma família de polissacarídeos complexos e heterogêneos, encontrados nas paredes celulares das plantas inferiores e superiores, onde contribuem, associadas a outros polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e proteínas, para a firmeza da estrutura do tecido vegetal (SMART et al., 1984; SCHMIDGALL; HENSEL, 2002). É um polissacarídeo aniônico, constituído, predominantemente, de polímeros lineares de ácido α -(1-4)-D-galacturônico com açúcares neutros como L-ramnose inseridos ou anexados às cadeias principais (SINHÁ; KUMRIA, 2003). A propriedade mais atrativa da pectina para a indústria é a sua capacidade de formar gel.

A caseína é uma glicofosfoproteína encontrada no leite. Quando de origem bovina, apresenta maior disponibilidade comercial, sendo constituída de quatro cadeias (α_{s1} , α_{s2} , β e κ),

com massa molecular de aproximadamente 86.240 Da e ponto isoelétrico de 4,6 (CAMILO, 2007; FIAT; JOLLÈS, 1989). As cadeias diferem entre si na sua composição e estrutura. A fração α_{s1} é constituída de dois blocos de aminoácidos altamente hidrofóbicos na porção C e N-terminal separados por um bloco hidrofílico. A fração α_{s2} é constituída de dois blocos hidrofílicos e dois hidrofóbicos que se alternam entre si. As cadeias β e κ possuem apenas dois blocos, sendo a fração β a mais anfifílica das caseínas, apresentando propriedade detergente. Quanto à precipitação com cálcio, a sensibilidade aumenta na ordem $\kappa < \beta < \alpha_{s1} \approx \alpha_{s2}$, sendo a caseína κ a mais resistente por possuir apenas um grupo fosfato, enquanto as demais possuem 5 (fração β) e 8-10 (fração α_s) grupos por molécula. Portanto, a caseína κ é responsável pela estabilização micelar (MORRIS, 2002).

A capacidade das caseínas de formarem estruturas similares a micelas quando em solução, advém da natureza anfifílica das suas moléculas. No leite, as caseínas são associadas por meio de ligação de seus grupos fosfato com cálcio, formando micelas com diâmetro aproximado de 200 nm (DE KRUIF, 1998). Quando o fosfato de cálcio é removido, as micelas se dissociam em monômeros e/ou submicelas de caseína (WALSTRA, 1990).

A estabilidade das micelas se deve principalmente à caseína κ . Em pH 6,7 (pH do leite), as cadeias κ se encontram estendidas, perpendiculares à superfície das micelas. Essa conformação impede que outras micelas vizinhas se aproximem, porque a sobreposição das cadeias κ resultaria em perda de entropia. Esse fenômeno é chamado de estabilização estérica. Com a redução do pH, os grupos carboxílicos presentes na cadeia κ , deixam de se repelir; a conformação estendida colapsa e, sem o mecanismo de estabilização, as micelas se agregam e precipitam.

A caseína, intacta ou modificada, vem sendo estudada como polímero formador de filmes (BULGARELLI et al., 2000), para revestimento de formas sólidas e na preparação de microcápsulas (CHEN et al., 1987; LATHA; JAYAKRISHNAN, 1994; SANTINHO et al., 1999).

Misturas de pectina e caseína em solução aquosa são incompatíveis em pH acima de 6,5 a uma determinada concentração biopolimérica (ANTONOV; GRINBERG; TOLSTOUZOV, 1976). Em valores de pH mais baixos, a pectina tem sido usada para estabilizar bebidas lácteas devido à sua adsorção às micelas de caseína, prevenindo a agregação destas micelas durante o processo de acidificação. As interações entre pectinas e micelas de caseína em bebidas lácteas acidificadas vêm sendo bastante estudadas (AMICE-QUEMENEUR et al., 1995; MAROZIENE; DE KRUIF, 2000; TUINIER et al., 2002; TROMP et al., 2004), mas muito pouco foi relatado sobre misturas pectina/caseína em pH ácido e em soluções aquosas livres de cálcio (PEREYRA et al., 1997; MATIA-MERINO; DICKINSON, 2004). Nenhum desses estudos, entretanto, utilizou concentrações de pectina acima de 1% (p/p), pois o interesse estava focado na estabilização de bebidas lácteas, o que requer pequenas quantidades de pectina.

Nesta tese foi estudado o comportamento de misturas aquosas de pectina e caseína em amplo intervalo de pH e diferentes concentrações dos biopolímeros. Essa investigação visou definir como ocorre a formação de “sistemas organizados” nessas misturas, bem como avaliar a possibilidade de sua utilização na encapsulação de cristais de metronidazol e no controle da liberação do fármaco como estratégia para tratamento da doença periodontal.

1.8. Metronidazol

O metronidazol pertence à classe dos nitroimidazóis, que são substâncias que apresentam um radical nitroso ligado ao núcleo imidazólico (figura 6). Apresenta alta potência antimicrobiana contra a maioria dos cocos e bacilos anaeróbios, além de ser clinicamente eficaz contra a tricomoniase, amebíase e giardíase. A atividade bactericida do metronidazol resulta da redução do grupo nitro à amina. No interior da célula alvo, o grupo nitro recebe elétrons provenientes de substratos endógenos como NADPH. Os produtos intermediários gerados se ligam ao DNA, formando complexos que inibem a sua replicação e o inativam, impedindo as sínteses enzimáticas e causando a morte celular. O fato dos germes aeróbios não possuírem enzimas capazes de reduzir o metronidazol explica a sua insensibilidade ao fármaco (MULLER, 1983).

Figura 6. Estrutura química do metronidazol

O metronidazol vem sendo bastante utilizado no tratamento da periodontite devido ao seu efeito seletivo contra bactérias anaeróbias, principais espécies patogênicas presentes na bolsa periodontal. Sua concentração inibitória mínima contra a maioria dos anaeróbios é cerca de 1µg/mL, mas pode chegar a 128 µg/mL para algumas bactérias facultativas (SUTTER; JONES; GHONEIM, 1983).

Melhoras clínicas significativas foram obtidas com a administração local de metronidazol (AINAMO et al., 1992; KLINGE et al., 1992; LOESCHE et al., 1996; PEDRAZZOLI; KILIAN; KARRING, 1992), mostrando ser este fármaco eficaz como adjunto no tratamento da periodontite.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar o comportamento físico-químico de misturas aquosas de pectina e caseína em diferentes valores de pH e concentrações dos biopolímeros, visando definir a formação de “sistemas organizados” e avaliar a possibilidade de sua utilização na encapsulação de cristais de metronidazol e controle de liberação do fármaco como estratégia para tratamento da doença periodontal.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos compreenderam:

- 1) Estudar a formação de micropartículas em misturas de pectina/caseína.
- 2) Avaliar o comportamento reológico das misturas de pectina/caseína.
- 3) Encapsular cristais de metronidazol pelas micropartículas de pectina/caseína.
- 4) Preparar filmes à base de micropartículas de pectina/caseína contendo metronidazol.
- 5) Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes.
- 6) Avaliar *in vitro* o perfil de liberação dos filmes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Pectina GENU[®] tipo USP-B com alto grau de metoxilação (68%) e massa molar entre 110 e 130 kg/mol foi doada por CP Kelco Limeira - Brasil. Caseinato de sódio comercial de origem bovina foi doado por Kauffmann & Co., Alemanha. Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) e rodamina B foram adquiridos da Sigma-Aldrich, dibutiltin dilaurato e piridina da Fluka. Metronidazol base foi adquirido da All Chemistry do Brasil Ltda e benzoato de metronidazol da Valdequímica Produtos Químicos Ltda. Todos os demais reagentes possuíam grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização da caseína

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi utilizada para a separação das proteínas. A eletroforese foi realizada em sistema vertical (Hoefer SE 600, Amersham Biosciences), utilizando-se gel homogêneo composto de 12,5% de acrilamida no gel separador e 5% no gel de empilhamento (LAEMMLI, 1970), ambos com 1,0 mm de espessura. Após a polimerização do gel, os poços e a cuba de eletroforese foram preenchidos com a solução tampão de Tris-HCl 0,025 M pH 6,8, contendo glicina na concentração de 0,192 M e 0,1% de SDS.

A partir de uma solução aquosa de caseína em pH 7, foram preparadas amostras com diferentes concentrações de proteína, diluídas em Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02% e ditionitrito (DTT) 0,2 M. As amostras diluídas foram fervidas por 5 minutos a 100 °C e aplicadas no gel em quantidades correspondentes a 10, 20 e 40 µg de proteína. A corrida foi realizada com 12 mA, até que o indicador saísse da placa.

Para a detecção das proteínas, foi utilizada a técnica de coloração com Coomassie coloidal (NEUHOFF et al., 1988), que utiliza o “Coomassie Brilliant Blue” G-250 como pigmento. Os géis foram incubados durante 1 hora na solução de fixação (etanol 40% (V/V); ácido acético 10% (V/V)) e durante mais 12 horas na solução de coloração (coomassie G-250 0,1% (p/V), ácido fosfórico 2% (p/V); sulfato de amônio 10% (p/V); metanol 20% (V/V)). Após a coloração, o gel foi colocado em solução descorante contendo 25% de metanol (V/V) e as imagens adquiridas pelo equipamento scanner ImageScanner II (Amersham Biosciences).

Um padrão de peso molecular com uma massa de 2 µg (Low Molecular Weight calibration Kit for SDS electrophoresis, lote 195078, GE Healthcare), incluindo as proteínas fosforilase-b (97 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -Lactoalbumina (14,4 kDa), foi aplicado no gel para a correta identificação das bandas de proteína.

3.2.2. Marcação com corantes fluorescentes

Com o objetivo de visualizar os biopolímeros utilizando microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), eles foram marcados com corantes fluorescentes. A pectina foi marcada covalentemente com FITC de acordo com o procedimento descrito por Tromp *et al.* (2001). Pectina (1 g), FITC (0,14 g), piridina (400 µL) e dibutiltin dilaurato (80 µl) foram dissolvidos em 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A mistura reativa foi aquecida por 4 horas a 100°C, vertida em álcool isopropílico (400 mL) e centrifugada durante 55 min a 9500 g a 20°C. Em seguida, o polissacarídeo foi redissolvido em 200 mL de água quente e dialisado frente a uma solução de NaCl 0,1M (4 x 4 L) e água destilada (2 x 4 L), para que fosse removido o excesso de corante e o de sal. Depois disso, a amostra foi liofilizada.

Para calcular o número de moléculas de FITC em cada molécula de ácido galacturônico, foi construída uma curva de analítica. Uma quantidade de 10 mg de FITC foi dissolvida em 100 mL de DMSO e diluições, a partir dessa solução, foram realizadas em tampão fosfato 0,01M pH 7, tomando-se o cuidado de manter as amostras ao abrigo de luz. A absorbância foi medida em 490 nm, e o coeficiente de extinção molar (ϵ) calculado foi igual a $73789 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para determinar o número de moléculas de corante por monômeros de pectina, dissolveu-se uma quantidade conhecida de pectina-FITC em tampão e mediu-se a absorbância da solução, tendo como branco uma solução de pectina na mesma concentração. Foi determinado que para cada miligrama de pectina marcada havia $20,45 \mu\text{g}$ de FITC. Considerando que a pectina consiste, basicamente, de monômeros de ácido galacturônico com massa molar de 200 g/mol , estimou-se que o número de moléculas de FITC em cada molécula de ácido galacturônico era igual a 0,01. O fato de se ter uma molécula do corante para cada 100 monômeros de pectina, e de a quantidade de pectina marcada utilizada na mistura com caseína ser muito pequena, não é esperado que a presença de FITC influencie nas propriedades físicas da mistura.

A caseína foi marcada, sem ligação covalente, com rodamina pela adição de uma gota de solução 0,02% (p/p) em 10 mL da mistura de biopolímeros.

3.2.3. Diagrama de fases

Pectina e caseína foram dispersas separadamente em 0,01 M de tampão fosfato pH 7,0 contendo azida sódica (NaN_3) 0,03% (p/p) para prevenir contaminação bacteriana. Soluções-estoque de pectina 1,76% (p/p) e caseína 10% (p/p) foram preparadas para estabelecer o diagrama de fases. Volumes iguais de soluções diluídas foram misturados/agitados e o valor do pH ajustado

para 7,0 com solução de NaOH 4 M. Um grama da mistura foi pesado em pequenos tubos de vidro que foram armazenados *overnight* a 45, 20 ou 5 °C para separação de fases.

As concentrações dos biopolímeros em ambas as fases foram determinadas por espectrofotometria. Duas séries de amostras foram preparadas, uma contendo pectina marcada (na proporção de 0,05 g de pectina-FITC/g pectina não marcada) e outra contendo apenas pectina não marcada para quantificação de caseína. Não foram observadas diferenças entre os volumes das fases das amostras marcadas e das não marcadas. Para determinar as concentrações de pectina e caseína, curvas analíticas para ambos os polímeros foram construídas em pH 7,0. Os valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 490 nm para soluções de pectina-FITC/pectina ($\epsilon = 0.21 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para a quantificação da caseína, o reagente Bradford foi usado (Bradford, 1976) e os valores de absorbância foram obtidos a 595 nm, onde $\epsilon = 0.63 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A *tie-line* superior do diagrama de fases foi obtida a partir de soluções de pectina 6% (p/p) e caseína 6% (p/p). Neste caso, a separação de fases foi muito lenta e, por isso, as amostras foram centrifugadas na centrífuga Microfuge18 (Beckman Coulter) a 2296 g por 1 hora. Além disso, como a fase inferior dessas amostras era muito viscosa e difícil de ser pipetada, a concentração polimérica naquela fase foi obtida subtraindo-se a quantidade de pectina ou caseína presente na fase superior da quantidade total de cada polímero na mistura. Os volumes foram determinados marcando-se os tubos na altura da interface e, depois de esvaziados, pesando-se a quantidade de água correspondente àqueles volumes, conforme descrito por Blonk e colaboradores (1995).

3.2.4. Efeito do peso molecular do polissacarídeo na incompatibilidade termodinâmica

Esse experimento foi realizado com misturas de carboximetil celulose (CMC) e caseína, por não possuímos pectina com diferentes pesos moleculares. Portanto, CMC com pesos moleculares de 510, 470, 170 e 100 kg/mol foram preparadas pela Akzo Nobel Central Research, seguindo o método utilizado por Hoogendam e colaboradores (1998). As misturas de CMC/caseína, na concentração de 13 g/L de CMC e 20 g/L de caseína, foram obtidas conforme os procedimentos descritos no item 3.2.3 para misturas de pectina e caseína. As amostras foram observadas por microscopia óptica de transmissão e CSLM (ver item 3.2.8), marcando-se a caseína com rodamina.

3.2.5. Efeito do pH nas misturas de pectina/caseína

Volumes iguais de soluções de pectina e caseína 6 % (p/p) foram misturados/agitados e o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 4 M. Sob agitação magnética, a mistura foi acidificada com ácido cítrico 1 M para valores de pH entre 8 e 3. Para cada valor de pH, 5 g do complexo foram coletados e centrifugados em centrífuga TJ-25 (Beckman Coulter) a 5000 g por 3 horas. Novamente, duas séries de amostras foram preparadas para quantificação de pectina e caseína nas fases superiores (de acordo com o item 3.2.3). Curvas analíticas foram estabelecidas em cada valor de pH. As concentrações na fase inferior foram obtidas pela subtração da quantidade presente na fase superior do total de biopolímeros presente na mistura. Os volumes das fases foram medidos conforme descrito no item 3.2.3.

3.2.6. Estabilidade das misturas de pectina/caseína

A estabilidade das misturas de pectina/caseína em pH 7,0 com diferentes proporções poliméricas foi estudada nas temperaturas 5, 15, 30 e 45 °C. Um grama de cada mistura foi pesado em pequenos tubos de vidro, que foram fechados com o objetivo de evitar evaporação do solvente. Os tubos foram mantidos em banho termostático ou geladeira por uma semana. As amostras foram checadas a cada 24 horas. A separação de fases era considerada completa quando o menisco entre as duas fases aparecia.

3.2.7. Características reológicas das misturas

Experimentos reológicos foram realizados com o auxílio do reômetro Rheometric Scientific (Ares) em modo estacionário e oscilatório com duplos cilindros geométricos (*spindle* 32 mm e *cup* 34 mm). As medidas de viscosidade foram obtidas em temperaturas controladas de 5, 15, 30 e 45 °C. Uma tampa cobria os cilindros para evitar evaporação. No modo oscilatório, os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram determinados utilizando amplitude de oscilação de 3% e frequências de 0,1 a 10 Hz, sob regime viscoelástico linear.

Os gráficos de tensão de cisalhamento *versus* gradiente de cisalhamento, traçados para diferentes concentrações de mistura e de solução de pectina, foram obtidos utilizando-se reômetro modelo Rheotest, dispositivo de medição com cilindros (diâmetro *spindle/cup* = 0,98). As análises foram realizadas a 25 °C.

A viscosidade intrínseca da pectina foi determinada a 25 °C usando um viscosímetro de Ostwald. Uma quantidade de 15 mL de cada solução de pectina preparada em tampão fosfato pH 7 foi vertida para dentro do viscosímetro. Com um cronômetro, o tempo de escoamento das amostras em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 e 2% (p/p)) foi medido. A

densidade (ρ) foi obtida usando-se um picnômetro. As viscosidades relativas (η_{rel}) foram calculadas através da formula:

$$\eta_{rel} = \frac{\rho_{pectina} \text{ (g/L)} \times t_{pectina} \text{ (s)}}{\rho_{\text{água}} \text{ (g/L)} \times t_{\text{água}} \text{ (s)}} \quad (3)$$

onde t é o tempo de escoamento da amostra no viscosímetro.

Para determinar a viscosidade intrínseca $[\eta]$, um gráfico de η_{sp}/c versus c foi construindo, onde $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$ e c = concentração. A viscosidade intrínseca é o valor do eixo das ordenadas obtido quando a curva é extrapolada para diluição infinita.

3.2.8. Observações microscópicas

Microscopia óptica de transmissão e microscopia confocal (CSLM) foram conduzidas em Zeiss Axioplan 2 com objetiva 40× em óleo de imersão. Os comprimentos de onda de excitação foram 568 e 488 nm para rodamina e FITC, respectivamente. A emissão máxima foi detectada em 625 e 518 nm.

As observações microscópicas da separação de fases foram realizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan 2 com objetiva 10×. Amostras contendo rodamina foram agitadas em vortex e 50 μ L foram imediatamente pipetados para uma lâmina. Com uma espátula, a amostra foi cisalhada continuamente até sua completa homogeneização. O cisalhamento foi interrompido e deu-se início à retirada de fotos. O tratamento das imagens foi realizado com um programa IDL caseiro, utilizando o padrão de rotina IDL Transformada Rápida de Fourier (Fast-Fourier Transform).

3.2.9. Determinação do tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi determinado pela técnica de espalhamento de luz laser (*Laser Light Scattering*), utilizando-se um analisador Beckman and Coulter modelo LS 13 320. Antes de serem analisadas, as amostras foram diluídas em água purificada (MiliQ). Misturas de pectina/caseína em pH 7 foram acidificadas com ácido cítrico até pH desejado, sob agitação constante de 300 ou 700 rpm. Uma quantidade de 0,5 g dessas misturas foi transferida para balões volumétricos de 10 mL. Água purificada foi gotejada vagarosamente até o menisco, mantendo-se uma agitação vigorosa para evitar a formação de grumos. As amostras diluídas foram transferidas aos poucos para o aparelho até que a obscuração desejada fosse atingida. O modelo óptico utilizado na análise foi o de Fraunhofer, uma aproximação da teoria de Mie que não requer valores de índices de refração e coeficientes de absorção das amostras para o cálculo do tamanho de partícula.

3.2.10. Validação do método de quantificação do metronidazol

Inicialmente, fez-se um espectro de varredura (200 a 400 nm) da solução aquosa do fármaco (5µg/mL) em espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640. O pico de máxima absorção ocorreu em 320 nm. A curva analítica foi realizada nesse comprimento de onda, em triplicatas de diluição, no intervalo de 0,2 a 50 µg/mL.

Os limites de quantificação e detecção foram obtidos de acordo com procedimentos recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) utilizando-se as fórmulas:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{ic} \quad (4) \quad e \quad LD = \frac{DP \times 3,3}{ic} \quad (5)$$

onde LQ é o limite de quantificação, LD é o limite de detecção, DP é o desvio padrão da leitura de um número apropriado de amostras do branco e ic é a inclinação da curva analítica.

A especificidade do método foi avaliada comparando-se os espectros de varredura e a quantificação do metronidazol em solução aquosa e dispersões de pectina, de caseína e do conjugado.

A precisão e a exatidão foram avaliadas em um mesmo dia (intra-dia) e em dias diferentes não consecutivos (inter-dias). Para tanto, foram feitas nove determinações, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada em três dias não consecutivos. Os valores foram obtidos através das fórmulas:

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (6) \qquad Exatidão = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (7)$$

onde DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão, CMD é a concentração média determinada e CT é a concentração teórica.

3.2.11. Preparação das misturas contendo fármaco

As dispersões contendo fármaco foram preparadas em água destilada e sem adição de conservantes, diferentemente das preparações descritas nos itens 3.2.3 e 3.2.5., nas quais foi utilizado tampão fosfato contendo azida sódica.

Desse modo, a dispersão em água de caseína 6% (p/p) pH 7 (pH elevado para 7 com NaOH 4 M) foi adicionada aos cristais de fármaco, previamente triturados por 72 horas em moinho de bolas. Essa mistura foi levada para agitação em dispersor de alta rotação (Turrax, Ika) durante 10 minutos. Velocidades de 8000, 13500 e 20400 rpm foram estudadas. Passado o tempo,

a mistura foi vertida sobre a dispersão de pectina 6% (p/p) e o pH foi ajustado novamente para 7, mantendo-se uma agitação de 300 rpm por mais 30 minutos. Adicionou-se, então, ácido cítrico até pH 5, vagarosamente. Glicerina, na proporção de 20% (p/p) da massa total de polímeros, foi utilizada como plastificante. Sua adição era realizada após a acidificação do sistema, agitando-se a dispersão por mais 30 minutos.

Os filmes obtidos a partir dessas dispersões apresentavam duas concentrações de fármaco: 25 e 50% (p/p), conforme tabela 4. Duas formas do fármaco foram utilizadas: a forma base (metronidazol base) e a forma sal (benzoato de metronidazol). A proporção entre elas foi sempre igual a 1.

Tabela 4 – Composição das dispersões utilizadas na preparação dos filmes

Formulação	Pectina (g)	Caseína (g)	Metronidazol base (g)	Benzoato de metronidazol (g)	Glicerina (g)	Água destilada (g)
Filme sem fármaco	3	3	---	---	1,2	94
Filme com 25% de fármaco	3	3	0,75	0,75	1,2	94
Filme com 50% de fármaco	3	3	1,5	1,5	1,2	94

Além dos cristais de fármaco, foram realizados experimentos também com *beads* fluorescentes à base de sílica ou látex, com o intuito de avaliar a viabilidade de encapsulação tanto de compostos hidrofílicos quanto de hidrofóbicos. As *beads* de sílica (hidrofílicas) apresentavam diâmetro de 0,36 μm e haviam sido produzidas nos laboratórios do IFF - Forschungszentrum Jülich, de acordo com o método descrito por Verhaegh e van Blaaderen (1994). As *beads* de látex (hidrofóbicas) foram adquiridas de Sigma-Aldrich (ref. L3280) e apresentavam diâmetro de 0,5 μm . Um volume de 10 μL de suspensão de *beads* foi adicionada em 1 mL de mistura pectina/caseína 6% (p/p) em pH 7.

3.2.12. Obtenção dos filmes de pectina/caseína

Os filmes de pectina/caseína foram preparados pela técnica de “casting”/evaporação do solvente. Uma quantidade de 50 g das misturas de pectina/caseína em pH 5, contendo ou não fármaco, foram depositadas em placas de policarbonato (12 x 12 cm) e submetidas à secagem em câmara climática Tecnal TE-4003 a 40 °C e 50% de umidade relativa por 12 horas. Após a secagem, as placas foram retiradas da câmara, vedadas e armazenadas ao abrigo da luz.

3.2.13. Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi medida com um micrômetro (Mitutoyo) com precisão de 0,01 mm. Nove pontos diferentes da película foram medidos: os quatro cantos, a região central de cada lado e o centro da película, sendo a média desses valores reportada.

3.2.14. Reticulação dos filmes com cálcio

Filmes com dimensões de 1,3 x 1,7 cm foram colocados em recipiente plástico de 4,32 x 4,32 cm e 5 mL de solução de CaCl_2 contendo 5 e 10% de cálcio foram adicionados. Os filmes permaneceram imersos nas soluções por 5, 10, 20 ou 30 minutos. Passado esse tempo, os filmes foram lavados com 5 mL de água destilada e submetidos à secagem.

3.2.15. Conteúdo de umidade dos filmes

O conteúdo de umidade presente em um sólido em condições ambientais estacionárias, denominado umidade no equilíbrio, foi determinado utilizando-se um analisador de umidade (OHAUS MB45) com fonte de radiação halógena. Filmes reticulados ou não com cálcio foram retirados da câmara climática e deixados por 1 hora sob condições ambientais de 25 °C e UR

entre 60 e 70% antes de serem avaliados. Uma quantidade de 0,5 g de filme foi utilizada em cada determinação. O experimento foi realizado em triplicata. O conteúdo de umidade foi expresso em porcentagem relativa à quantidade de sólido úmido.

3.2.16. Teor de fármaco dos filmes

A quantificação de metronidazol presente nos filmes foi realizada da seguinte maneira: 0,02 g de filme foram pesados e depositados em um balão volumétrico de 100 mL. Aproximadamente 50 mL de tampão fosfato pH 7 foram acrescentados ao balão, efetuando-se uma agitação forte em vortex até que todo o filme estivesse dissolvido. Completou-se o volume do balão e realizaram-se diluições para quantificação em espectrofotômetro (320 nm), respeitando-se os limites da curva analítica do fármaco. O teor, expresso em porcentagem, foi utilizado nos cálculos para determinação dos perfis de liberação.

$$Teor = \frac{m(g)}{0,02} \times 100 \quad (8)$$

onde m é a massa de metronidazol presente em 0,02 g de filme.

3.2.17. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação do fármaco

Os perfis de liberação do fármaco foram obtidos utilizando-se um dispositivo mimetizador da bolsa periodontal cujo protótipo foi primeiramente desenvolvido por Gabarra (2002). Segundo Gabarra, esse dispositivo era capaz de simular as condições de umidade, temperatura e fluxo do fluido crevicular, permitindo melhor conhecimento do sistema carreador e estudo do perfil de liberação. Modificações nesse dispositivo, realizadas por Silva (2005) e posteriormente por Figueiredo (2005) e Bruschi (2007), serviram de base para a criação de um

outro modelo que permitisse a avaliação de um número maior de amostras simultaneamente (figura 7). Ao invés de 4 canais, como no modelo utilizado por Bruschi (2007), o aparelho utilizado nesse estudo possuía 9. Além disso, o motor de passo foi substituído por uma bomba peristáltica, não sendo mais necessárias as seringas para a injeção da solução tampão nas células de liberação. No entanto, em fluxos muito baixos como 60 $\mu\text{L}/\text{hora}$, ocorria acúmulo de bolhas dentro das mangueiras, o que acarretava grande variação no volume coletado. O menor fluxo conseguido sem formação de bolhas foi o de 250 $\mu\text{L}/\text{hora}$, sendo este utilizado em nossos experimentos.

Figura 7. Aparelho utilizado para estudos de *in vitro* liberação. As letras indicam: a, reservatório de solução tampão; b, banho termostático; c, célula de liberação; d, tubo coletor; e, reservatório de água para o banho termostático; f, painel de controle de temperatura e fluxo.

O dispositivo funciona da seguinte maneira: a solução tampão é sugada do reservatório e transferida, através de mangueiras de silicone, para as células de liberação que se encontram em banho termostático a 37 °C. Cada célula de liberação possui dois compartimentos: um inferior, onde é colocada a amostra e um superior, por onde flui o tampão. Não há separação alguma entre os dois compartimentos. A solução tampão contendo o material liberado é coletada em um tubo de ensaio, que é trocado em tempos determinados.

Nesse estudo utilizou-se solução tampão fosfato pH 7. Pelo fato de não conter conservante, a solução contida no reservatório foi trocada a cada 24 horas. Filmes com dimensões de 1,3 x 1,7 cm foram dobrados em forma de “U” e acondicionados nas células de liberação. Os tubos contendo o material liberado eram armazenados em geladeira até a quantificação.

3.2.18. Propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas foram avaliadas em máquina universal de ensaios (EMIC, Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, PR/Brasil), equipada com célula de carga de 2000 g para medir resistência à tração, alongamento até a quebra e módulo de elasticidade. As espessuras dos filmes foram medidas em 5 pontos aleatórios com um micrômetro (Mitutoyo) com precisão de 0,01 mm, sendo a média desses valores reportada. Seis replicatas (tiras de 10 mm x 60 mm) foram avaliadas para cada composição de filme. A distância inicial das garras era de 20 mm e a velocidade com que elas se distanciavam era de 5 mm/minuto. Os cálculos foram realizados pelo software Tesc versão 2.0.

Os filmes que continham cálcio foram preparados cortando-se as tiras nas dimensões descritas acima e mergulhando-as em 30 mL de solução de cálcio 5 ou 10% (p/V) contida em recipiente plástico de tamanho de 14 x 14 cm. Cada recipiente recebeu seis tiras de filme. Após

um determinado tempo, a solução de cálcio foi descartada, os filmes foram lavados com 30 mL de água destilada e submetidos à secagem em câmara climática por 3 horas a 40 °C e 50% de umidade relativa.

Antes de serem alocados no equipamento, todos os filmes permaneceram por 1 hora na temperatura e na umidade relativa controladas do laboratório (25 °C e UR entre 60 e 70%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da caseína

O perfil eletroforético da solução de caseína, mostrado na figura 8, é muito similar a outros perfis de caseína disponíveis na literatura (PANOUILLE et al., 2005; NELSON; BARBANO, 2005; TOMOTAKE et al., 2006). As duas principais bandas que aparecem após a separação das proteínas correspondem às frações de caseína α_s (aproximadamente 32 kDa) e caseína β (aprox. 29 kDa), cujas proporções se mostram equivalentes. A terceira fração, caseína κ (aprox. 27 kDa), aparece em menor quantidade, apresentando uma banda fina e suave. Esse resultado é concordante com a razão 4: 1: 4: 1,3 das frações α_{s1} : α_{s2} : β : κ geralmente encontrada em caseínas bovinas (WALSTRA, 1990).

Figura 8. Perfil eletroforético da caseína em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

4.2. Diagrama de fases

Misturas de pectina e caseína em solução aquosa pH 7 podem se separar em duas fases: uma fase inferior, contendo principalmente proteína e uma fase superior, rica em polissacarídeo. Por se tratar de um sistema constituído de dois líquidos imiscíveis (solução de proteína e solução de polissacarídeo), esse tipo de mistura é conhecido também como emulsão água/água.

O termo “emulsão água/água” foi introduzido por Tolstoguzov em 1988 para distinguir esse sistema das emulsões óleo/água e água/óleo. Ao contrário destas, a emulsão água/água apresenta: 1) baixa tensão interfacial, já que a água é o principal componente das duas fases; 2) baixa densidade do filme interfacial, pelo fato de biopolímeros incompatíveis preferirem estar rodeados por seus semelhantes e 3) alta deformação das gotículas dispersas (TOLSTOGUZOV, 2000). A figura 9 mostra um esquema de emulsão água/água, onde se tem gotículas de uma solução polimérica dispersa em outra. Após a coalescência das gotículas, duas fases são observadas macroscopicamente.

Figura 9. Representação esquemática de uma emulsão água/água observada microscopicamente (1) e macroscopicamente após a completa separação das fases (2).

Com o intuito de se determinar as concentrações em que misturas de pectina/caseína sofrem separação de fases, um diagrama foi construído em pH 7 (figura 10).

Figura 10. Diagrama de fases de misturas pectina/caseína em pH 7. Diamantes, pontos binodais; círculos, concentrações iniciais; quadrado, ponto crítico; curva, binodal; linhas, *tie-lines*. Imagens mostram fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de misturas com diferentes frações volumétricas de fases poliméricas numa mesma *tie-line*: triângulo, 75% pectina/25% caseína; círculo, 50%; asterisco, 25% pectina/75% caseína. Áreas claras correspondem à fase de pectina marcada com FITC. A seta indica a amostra após a separação de fases: fase superior, pectina; inferior, caseína. A escala corresponde a 10 μm .

Num diagrama de fases, a curva que separa a região estável da região instável corresponde à linha binodal. Abaixo da binodal e próximo aos eixos a mistura possui uma única fase. À medida que a concentração dos polímeros aumenta acima da binodal a separação de fases ocorre. A região

compatível é, portanto, pequena em relação à incompatível, como é esperado para misturas de polissacarídeos/proteínas (GRINBERG; TOLZTOGUZOV, 1997) e de acordo com Antonov e colaboradores (1976). As concentrações poliméricas nas duas fases, quando o sistema atinge o equilíbrio, são unidas pelas *tie-lines*. À medida que a mistura é diluída, as *tie-lines* se tornam menores, até o ponto em que as concentrações nas duas fases se tornam iguais, chamado de ponto crítico. Numa mesma *tie-line*, quando a fração volumétrica da fase contendo pectina é maior que a da fase contendo caseína, o sistema é caracterizado microscopicamente por fase de caseína (domínios escuros) dispersa numa fase contínua de pectina (domínios claros) (figura 10). Quando a fração de volume da fase de caseína é maior, ocorre uma inversão e a fase de pectina é que se torna dispersa na fase de caseína. No centro da *tie-line*, as frações volumétricas são iguais, e o sistema é bicontínuo.

Uma mistura de pectina e caseína pode ser considerada como uma mistura de esferas rígidas e polímeros. Caseína (principalmente α e β), em solução aquosa, forma micelas com diâmetro de 30 nm (DE KRUIF et al., 2002). Quando polímeros (pectina) não adsorvem nas partículas esféricas (micelas de caseína), eles são expelidos de uma região ao redor delas, chamada de zona de depleção (ASAKURA; OOSAWA, 1954; VRIJ, 1976), cuja espessura é igual ao raio da molécula de polímero. Quando as partículas de proteína se aproximam, as zonas de depleção se sobrepõem. Assim, como a distância entre as duas esferas é menor que o tamanho das moléculas de polímero, os polímeros não podem mais se posicionar entre as esferas, formando um espaço vazio entre elas. Esse espaço vazio gera uma pressão osmótica que provoca a efetiva união das esferas. Se essa atração é suficientemente forte, o sistema separa de fases e é considerado termodinamicamente incompatível. A força que gera essa incompatibilidade é puramente entrópica e, por isso, não é esperado que a temperatura interfira na composição das duas fases. Como demonstrado na figura 11, misturas incubadas em 3 diferentes temperaturas (45, 20 e 5 °C) obtiveram resultados similares quanto à concentração polimérica nas duas fases.

Figura 11. Efeito da temperatura no diagrama de fases de misturas pectina/caseína em pH 7. As amostras foram incubadas a 45°C (triângulos representam duas séries de experimentos), 20°C (×) e 5°C (+).

Na figura 12, o diagrama de fases obtido experimentalmente (painel A) foi comparado com o obtido através de cálculos teóricos (painel B) para misturas de esferas rígidas e cadeias de polímeros com interação de volume de exclusão entre os segmentos (AARTS, TUINIER, LEKKERKERKER, 2002).

O diagrama teórico foi construído em função de $q = R_g/a$, onde R_g é o raio de giração das cadeias poliméricas e a é o raio das esferas rígidas. Caseínatos em solução se apresentam basicamente em forma de micelas, com raio de aproximadamente 15 nm (DE KRUIF et al., 2002). Para as cadeias de pectina, não se tem informação sobre o tamanho. Por isso, q foi calculado considerando-se o ponto crítico obtido experimentalmente, onde a concentração de caseína é próxima a 40 g/L (ver figura 10). Esta pode ser convertida em fração volumétrica ϕ das micelas, utilizando-se a voluminosidade das micelas de caseína, que é aproximadamente 4 mL/g (DE KRUIF et al., 2002). Assim, para a fração volumétrica no ponto crítico $\phi = 0,17$, $q = R_g/a =$

1,5. A concentração polimérica (no caso pectina) no ponto crítico é estimada em termos de c/c^* , onde c^* é a concentração de *overlap*. Teoricamente, obteve-se $c/c^* \approx 2$ no ponto crítico, para $q = 1,5$. Se a concentração de pectina determinada experimentalmente foi de 5,6 g/L no ponto crítico, c^* seria aproximadamente igual a 2,7 g/L. Sendo $c^* \approx 1/[\eta]$, onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, $[\eta] \approx 0,4$ L/g. Este valor é bastante realístico para soluções aquosas de pectina ($\approx 0,3$ L/g) (KAR; ARSLAN, 1999), como também é mostrado na figura 13, onde $[\eta]$ é a intersecção no eixo y.

Figura 12. Comparação entre o diagrama de fases da mistura pectina/caseína obtido experimentalmente em pH 7 (A) e o obtido por cálculos teóricos (B) para misturas de esferas rígidas e cadeias de polímeros com interação de volume de exclusão (AARTS et al., 2002). Os símbolos identificam binodais experimentais (quadrados) e teóricas (círculos) conectadas por *tie-lines*. Os asteriscos identificam os pontos críticos. O diagrama teórico também está representado no painel A pela curva mais fina.

O diagrama teórico é muito similar ao experimental, o que suporta a idéia de que a separação de fases é governada, principalmente, por forças entrópicas. Para misturas de esferas rígidas e cadeias poliméricas ideais (isto é, sem interação) o gráfico é diferente; a curva binodal parece mais uma função $1/x$ decrescente. A principal diferença entre os painéis A e B é que as *tie-lines* experimentais dependem mais fortemente da concentração da caseína.

Figura 13. Viscosidade intrínseca da pectina em tampão fosfato pH 7. A linha tracejada é a extrapolação da porção linear da curva.

4.3. Efeito do peso molecular do polissacarídeo na incompatibilidade termodinâmica

Sabendo-se que a depleção de interação é responsável pela incompatibilidade termodinâmica entre polissacarídeos e proteínas, pode-se inferir que o tamanho das macromoléculas influencia na compatibilidade entre elas. O efeito do tamanho molecular na formação de emulsões água/água é mostrado na figura 14.

Esse experimento foi realizado com misturas de carboximetil celulose (CMC) e caseína, por não possuímos pectina com diferentes pesos moleculares. CMC de diversos tamanhos foram preparadas pela Akzo Nobel Central Research, seguindo o método utilizado por Hoogendam e colaboradores (1998). As misturas de CMC/caseína foram obtidas conforme os procedimentos descritos para misturas de pectina/caseína.

Figura 14. Imagens em microscópio de transmissão (primeira coluna) e confocal (segunda coluna) de misturas de CMC/caseína em pH 7. CMC 1: 510 kg/mol; CMC 2: 470 kg/mol; CMC 3: 170 kg/mol; CMC 4: 100 kg/mol. Áreas claras correspondem à fase de caseína marcada com rodamina.

Misturas de mesmas concentrações poliméricas formaram ou não emulsões, dependendo do peso molecular da CMC utilizada. A mistura contendo CMC 4 (de menor peso molecular) não formou emulsão, ao contrário das demais que continham CMC de pesos moleculares maiores. Quanto maior o tamanho do polissacarídeo, maior se torna a zona de depleção ao redor das micelas de caseína e, conseqüentemente, a força que as aproxima entre si. Por isso, à medida que o peso molecular de um polissacarídeo linear diminui, a sua compatibilidade com proteínas aumenta e o sistema não separa em fases.

4.4. Cinética de separação de fases

A separação de fases segregativa pode se dar através de dois mecanismos: a) nucleação e crescimento, para misturas na região meta-estável do diagrama de fases, entre as curvas binodal e espinodal e b) decomposição espinodal, para misturas na região instável, além da curva espinodal (DHONT,1996). Perto do ponto crítico, onde as curvas binodal e espinodal se encontram, a transição da região estável para a região instável ocorre sem cruzar a meta-estável. A figura 15 mostra as curvas binodal e espinodal em um sistema binário, isto é, polímero-solvente. À medida que a temperatura diminui, a menos que esteja próximo ao ponto crítico, o sistema passa de estável para meta-estável e depois instável. Para sistemas ternários (polímero-polímero-solvente), ao invés de curvas, têm-se planos e o gráfico torna-se bem mais complexo, formando um diagrama tridimensional.

A diferença entre um mecanismo e outro é que o primeiro precisa ultrapassar uma barreira energética para ocorrer, porque pequenas flutuações de densidade no sistema geram um aumento da energia livre. Na decomposição espinodal, as pequenas flutuações provocam imediatamente a separação de fases. Morfologicamente, a nucleação e crescimento são caracterizados pela

formação inicial de pequenos núcleos que crescem com o tempo, dando origem a gotículas de uma fase dispersa em outra. Durante a decomposição espinodal, tanto a formação de gotículas, quanto a de uma estrutura interconectada pode ser observada, dependendo das frações volumétricas que compõem a mistura.

Figura 15. Esquema de um diagrama de fases (temperatura *versus* composição) para sistemas binários.

Com o intuito de se visualizar a decomposição espinodal nas misturas pectina/caseína, amostras perto do ponto crítico foram investigadas contendo, para uma mesma *tie-line*, frações volumétricas de 50%, 75% pectina/ 25% caseína e 25% caseína/ 75% pectina.

Como se pode ver na figura 16, depois de cessada a agitação para a amostra com 50% de fração volumétrica, ocorre a formação de uma estrutura interconectada nítida que depois cresce com tempo, característico de decomposição espinodal.

Figura 16. Imagens adquiridas em microscópio de fluorescência da decomposição espinodal da mistura de pectina/caseína com frações volumétricas de 50% (tempo em segundos).

As imagens da transformada de Fourier (figura 17 A) revelam o aparecimento de uma estrutura de anel, que também é típico desse mecanismo de separação de fases (BHAT; TUINIER; SCHURTENBERGER, 2006; DHONT, 1996). A maior intensidade do pico é obtida em um determinado comprimento de onda, denominado de Q_{max} .

A figura 17 B mostra $1/Q_{max}$ em função do tempo. Logo após a cessação da agitação, $1/Q_{max}$ é aparentemente constante, o que algumas vezes é observado em misturas viscosas de polissacarídeos e proteínas (BHAT; TUINIER; SCHURTENBERGER, 2006). Acima de $t \approx 1$ s, $1/Q_{max}$ começa a aumentar significativamente com o tempo. No regime em torno de $t \approx 2$ s, $1/Q_{max}$ aumenta em função de $t^{0,52}$. Para $t \approx 10$ s, $1/Q_{max} \sim t^{0,76}$. Esses valores de expoente se aproximam das estimativas teóricas, onde, para a decomposição espinodal, tem-se $1/Q_{max} \sim t^{1/3}$ e para misturas concentradas, em que a hidrodinâmica é dominante, $1/Q_{max} \sim t^1$ (AARTS; DULLENS; LEKKERKERKER, 2005; TUINIER; DHONT; DE KRUIF, 2000).

Figura 17. Decomposição espinodal da mistura pectina/caseína com frações volumétricas de 50%. Painei A, intensidade da transformada de Fourier das imagens de microscopia de fluorescência. Quadrados representam dados de intensidade obtidos 0,3 s após a agitação; estrelas, dados obtidos após 1,7s. Os *insets* mostram as imagens microscópicas e a transformada de Fourier nos tempos indicados. Painei B, tamanho da estrutura ($1/Q_{\max}$) em função do tempo.

Para as amostras pectina/caseína 75%/25% e 25%/75%, mesmo sob altas taxas de cisalhamento, os domínios (gotículas) não desapareceram. Era como se as duas fases não tivessem sido completamente misturadas. De acordo com Onuki (1995), domínios mais viscosos

que a fase contínua tendem a permanecer estruturados durante o cisalhamento enquanto a fase contínua é mais facilmente deformada. Desse modo, a decomposição espinodal para essas misturas não pôde ser visualizada no seu estágio inicial.

4.5. Estabilidade da mistura

A concentração dos polímeros numa mistura afeta a separação de fases de duas formas: alterando as forças termodinâmicas e a viscosidade do sistema. Altas concentrações poliméricas aumentam a incompatibilidade termodinâmica, que induz a separação de fases, mas também aumentam a viscosidade, que desacelera o processo de separação. Portanto, a combinação desses dois fatores determina o comportamento da mistura.

A figura 18 indica o tempo necessário para que duas fases se formem, macroscopicamente, em misturas de pectina/caseína armazenadas em quatro diferentes temperaturas 5, 15, 30 e 45 °C. As amostras foram checadas a cada 24 horas durante uma semana. Nota-se que a separação de fases é retardada quando a concentração de polímeros na mistura aumenta (compare misturas 20/20, 30/30 e 40/40 g/L). O mesmo ocorre quando somente a concentração de pectina na mistura aumenta (veja caseína constante a 10 g/L e 40 g/L). Nesses casos, o aumento da viscosidade nas misturas é o fator dominante que determina a velocidade de separação. No entanto, quando a concentração de pectina é mantida constante e a de caseína aumenta, o processo pode ficar mais lento (pectina 20 g/L a 15 °C) ou acelerar (pectina 30 g/L a 30 e 45 °C). No último caso, forças termodinâmicas (depleção de interação) são dominantes em detrimento das propriedades reológicas do sistema.

No último estágio da decomposição espinodal, a separação de fases é governada pela difusão das gotículas da fase dispersa na fase contínua. Devido à alta viscosidade, dispersões

mais concentradas de polímeros dificultam a difusividade das gotículas e, conseqüentemente, a colisão entre elas. Dessa forma, a coalescência é retardada e a separação macroscópica de fases demora a ser visualizada. O efeito da geleificação na prevenção da coalescência foi reportado em sistemas contendo gelatina (LORÉN; HERMANSSON, 2000; ANDERSON; JONES, 2001; BUTLER, 2002; HOOG; TROMP, 2003) e hidroxipropilmetilcelulose (KITA et al., 1999).

Figura 18. Tempo de separação das fases em pH 7 em diferentes temperaturas. Cruzes, 24 h; asteriscos, 48 h; triângulos, 72 h; diamantes, 96 h; quadrados, 120 h; círculos abertos, 144 h; círculos fechados, estável durante uma semana.

Além da concentração polimérica, outro fator que influencia a viscosidade e, consequentemente, a velocidade de separação de fases, é a temperatura. Em altas temperaturas, o processo de separação de fases ocorre mais rapidamente. A 45 e 30 °C a separação de fases macroscópica ocorreu em 6 dias. A 15 e 5 °C a maioria das amostras permaneceu estável durante uma semana.

A figura 19 A mostra a viscosidade de uma mistura de pectina/caseína em função da temperatura. A mistura com composição 30/30 g/L foi escolhida pra esse experimento. Viscosidades medidas a uma taxa de cisalhamento de $0,1 \text{ s}^{-1}$ foram consideradas para a confecção do gráfico, porque elas representariam a taxa de cisalhamento mais próxima da de repouso.

Figura 19. Viscosidade da mistura de pectina/caseína (30/30 g/L) pH 7 (painel A) e tempo de armazenamento necessário até completa separação de fases (painel B) em função da temperatura.

Como esperado, a viscosidade da mistura aumenta com a redução da temperatura. Essa mudança de viscosidade está fortemente relacionada com a duração da separação de fases (figura

19 B). Apesar da viscosidade não ser o único fator que comanda a velocidade de separação de fases, a tensão interfacial também afeta (AARTS et al., 2005), ficou claro que ela tem papel muito importante. Dependendo da temperatura de armazenamento essas emulsões água/água podem permanecer estáveis por aproximadamente um mês.

4.6. Efeito do pH na mistura pectina/caseína

Quando o pH da mistura foi reduzido até 5, a separação macroscópica de fases a 45 °C levou muito mais tempo (mais de uma semana) do que quando em pH 7, apesar da viscosidade da mistura naquele pH ser menor do que neste (figura 19 A). Isso sugere que a força que leva à separação segregativa de fases se torna mais fraca em pH 5 e a incompatibilidade termodinâmica é suprimida. Se o que ocorre é complexação, as duas fases somente seriam vistas após a sedimentação dos complexos, e isso poderia levar um longo tempo dependendo da densidade e do tamanho das partículas do complexo.

Com o intuito de se investigar o que acontece quando o pH é reduzido, a concentração dos polímeros nas duas fases foi determinada para a mistura 30/30 g/L em diferentes pHs após centrifugação. Primeiro, a mistura foi preparada em pH 8 e depois, adicionando-se ácido cítrico, o pH foi reduzido até o valor desejado. A figura 20 A mostra a concentração de pectina relativa à concentração inicial na mistura em função do pH.

Em valores de pH mais altos, a concentração de pectina na fase superior é maior que a na mistura original. Na fase inferior, somente pequenas quantidades de polissacarídeo são encontradas. Isso reflete uma separação de fases governada por interações segregativas. À medida que o pH é reduzido, a concentração de pectina na fase superior diminui e na inferior, aumenta. Devido ao pequeno volume da fase inferior comparada ao da fase superior (podendo ser

10 vezes menor dependendo do pH), a concentração na fase inferior aumenta substancialmente com o decréscimo do pH. O ponto de *crossover* em pH 5,5 indica que a concentração de pectina é igual nas duas fases e que, abaixo desse pH, a pectina se torna mais concentrada na fase inferior. Ao contrário da pectina, a caseína permanece mais concentrada na fase inferior, independente do pH. Esses resultados sugerem que, entre pH 5,5 e 3, pectina e caseína se concentram em uma só fase, o que é característico de separação de fases associativa ou complexação.

Figura 20. A) Concentração de pectina nas fases superior e inferior relativa à concentração inicial de pectina na mistura em função do pH. B,C) Conteúdo da fase inferior em diferentes valores de pH. Paineis B e C se referem à razão de massa pectina/caseína e à concentração total de polímeros (pectina + caseína) na fase inferior, respectivamente.

A figura 21 mostra as imagens da mistura 30/30 g/L em microscópio de transmissão e no CLSM. Em pH 7 e 6 as misturas (linhas A e B) consistem de fase de caseína dispersa em fase de

pectina. Em pH 5,5, o contraste na imagem CLSM é muito pequeno, indicando que a concentração de pectina na fase dispersa e na contínua é similar. Isso está de acordo com os resultados da figura 20 A, onde a curva da fase superior encontra a da inferior perto do pH 5,5. Reduzindo-se ainda mais o pH para 5, a pectina se torna mais concentrada nas gotículas de caseína do que na fase contínua. A migração da pectina da fase contínua para a dispersa pode explicar a menor viscosidade da mistura em pH 5 comparada à em pH 7 (figura 19 A).

Figura 21. Imagens do microscópio óptico de transmissão (linha A) e confocal (linhas B e C) de misturas de pectina/caseína (30/30 g/L) em diferentes valores de pH. Linhas A e B se referem a imagens da mistura imediatamente após a agitação. Linha C se refere a imagens da fase inferior após a centrifugação. A escala para todas as imagens corresponde a 10 µm. Áreas claras correspondem às fases ricas em pectina marcada com FITC.

Imagens da fase inferior após a separação também foram investigadas (figura 21 C). Em pH 7, a fase inferior consistia principalmente de caseína com algumas pequenas gotículas de fase de pectina. Em pH 6, a fase inferior não era uma fase contínua, mas partículas de caseína interconectadas por áreas ricas em pectina, indicando que a coalescência entre as gotículas não mais ocorria. Em pH 5,5 o contraste desaparece e, em pH 5, as partículas se tornam distinguíveis novamente.

Nas figuras 20 B e C tem-se o conteúdo da fase inferior quantificado em diferentes pHs. No painel B, nota-se que a razão de massa pectina/caseína aumenta com a redução do pH. Em pH 6, apesar da pectina não estar concentrada nas partículas, a quantidade na fase inferior aumenta porque a pectina permanece aprisionada entre as partículas de caseína (figura 21 C). Isso causa um aumento no volume da fase inferior, o que explica a redução da concentração total de polímeros nessa fase em pH 6 (figura 20 C).

A razão pela qual em $\text{pH} > 6$ pectina e caseína se separam em duas fases é que elas se comportam como uma mistura de esferas rígidas e polímeros que não se atraem (rever item 4.2), tornando-se incompatíveis termodinamicamente por depleção de interação. Nesses valores de pH, pectina, que possui potencial zeta igual a zero em $\text{pH} \cong 3$ (CAMILO, 2007) e caseína ($\text{pI} \cong 4.6$) (CAMILO, 2007; FIAT; JOLLÈS, 1989), estão negativamente carregadas. À medida que o pH é reduzido, a carga residual da caseína se altera, chegando a zero em $\text{pH} = \text{pI}$. Sendo uma molécula anfótera, a caseína volta a possuir carga residual em pH abaixo do pI, porém, positiva. Como a pectina está carregada negativamente em $\text{pH} > 3$, os biopolímeros se atraem.

Teoricamente, a complexação entre pectina e caseína só poderia ocorrer em pH entre 3 e 4,6, pois nessas condições as macromoléculas possuem cargas opostas. Todavia, a atração entre elas ocorre também em pH acima do pI, o que é conhecido como complexação “no lado errado”, do inglês “*on the wrong side*” (KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004; VRIES, 2004). A figura

20 A mostra claramente isso. À medida que o pH é reduzido, a pectina vai se concentrando cada vez mais na fase que contém a caseína, mesmo as duas moléculas possuindo cargas residuais negativas. Abaixo do pI (pH 4,6), porém, a interação torna-se mais intensa.

A complexação “no lado errado” tem sido atribuída à existência de “*patches*” carregados nas moléculas de proteínas (KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004; PARK et al., 1992; SCHMITT et al., 1998; TURGEON et al., 2007; VRIES; STUART, 2006). Esses “*patches*” são regiões de uma molécula que possuem carga com sinal contrário ao da carga média dela. Ou seja, uma sequência de aminoácidos básicos que, mesmo em pH acima do pI, estão carregados positivamente.

Quanto maior a heterogeneidade da distribuição de cargas na molécula de proteína, mais forte é a complexação (VRIES, 2004). Portanto, para haver complexação entre polissacarídeos e proteínas quando ambos estão negativos, a proteína deve possuir regiões com densidades de carga positiva tais, que sejam capazes de atrair os poliânions. Se, ao invés de estarem localizados, os aminoácidos básicos estiveram distribuídos por toda a molécula, a interação com o poliânion é fraca, ou mesmo inexistente.

Apesar de pectina e caseína se atraírem em $\text{pH} > \text{pI}$, não há dados na literatura que confirmem a existência desses “*patches*” nas caseínas.

Outra explicação para a complexação “no lado errado” é o fenômeno da regulação de cargas (TURGEON et al., 2007; VRIES; STUART, 2006). Sabe-se que quando um polieletrólito se aproxima de uma superfície carregada, a carga residual do polieletrólito é influenciada pelo campo eletrostático produzido pela superfície (SHEN; FREY, 2005). Assim, quando uma proteína se aproxima de um polissacarídeo carregado negativamente, ela pode sofrer flutuações de carga gerando uma carga induzida positiva próxima ao polissacarídeo, o que provocaria a atração entre eles. Silva e colaboradores (2006) demonstraram, por meio de simulações teóricas,

que a contribuição da interação carga-carga induzida (regulação de cargas) para a complexação entre poliânios e lisosima, α -lactalbumina ou β -lactoglobulina é de mesma magnitude ou ainda maior que a interação íon-dipolo (“*patches*”).

Além das observações microscópicas, as visuais também indicam que a complexação ocorre entre pH 3 e 6. Entre pH 8 e 6,5, a mistura era transparente, assim como as duas fases após a separação. A partir de 6, a mistura se torna mais turva e em 5 se torna opalescente-branca, indicando a presença de matéria insolúvel (complexos). Nesse ponto, a fase inferior após centrifugação era sólida e não líquida como nas amostras em altos pHs.

A acidificação lenta de misturas de polissacarídeo/proteína, a partir de um pH onde interações associativas não ocorrem, já foi realizada anteriormente. Usando-se glucono- δ -lactona (GDL) para reduzir o pH, estudou-se a adsorção eletrostática de pectinas em micelas de caseína no leite (TUINIER et al., 2002) e a complexação eletrostática entre β -lactoglobulina e goma xantana (LANEUVILLE et al., 2005), β -lactoglobulina e pectinas (GIRARD, et al., 2004), e β -lactoglobulina e goma acácia (MEKHLOUFI, et al., 2005). No entanto, o uso de goma xantana ou pectinas como biopolímeros aniônicos não induziu a formação de coacervados, mas resultou em pequenos agregados (TUINIER et al., 2002) com dimensões fractais entre 1,7-2,5 (GIRARD et al., 2004). Gotas líquidas ou vesículas foram observadas somente com goma acácia (SCHMITT et al., 2001; SANCHEZ et al., 2002).

Neste trabalho, partículas esféricas com diâmetro $\approx 4 \mu\text{m}$ (ver item 4.8) foram obtidas após acidificação lenta (~ 1 gota de ácido cítrico/minuto) de pH 7 até 5, para misturas com altas concentrações de pectina (figura 22, situação A). Quando o pH foi reduzido rapidamente, as partículas perderam esfericidade. É como se a pectina precisasse de tempo para se difundir dentro das gotículas e se adsorver nas micelas de caseína para estabilizá-las. Quando a acidificação é

feita rapidamente, nem todas as micelas são estabilizadas pelas moléculas de pectina e algumas delas se agregam, resultando em partículas não esféricas. Isso também ocorre quando a concentração de pectina na mistura é reduzida (figura 22, situações B e C). Nesses casos, a quantidade de pectina é insuficiente para estabilizar todas as micelas de caseína e, apesar da acidificação lenta, as partículas se tornam irregulares. Para amostras cujas frações de volume eram 50% (situação C na figura 22) e 25% pectina/75% caseína (não mostrada), a concentração de pectina era tão baixa comparada à de caseína que, mesmo em pH 5, a pectina estava mais concentrada na fase contínua (as partículas estavam escuras). Devido à pequena quantidade de pectina disponível para complexar com caseína, esta precisava conter mais grupos positivamente carregados (pH abaixo do ponto isoelétrico) para atrair mais pectina, só então as partículas se tornariam mais concentradas em pectina que a fase contínua.

Figura 22. Imagens CLSM de misturas pectina/caseína em três diferentes pontos no diagrama de fases, antes e após a acidificação. A escala corresponde a 10 μm. Áreas claras correspondem a fases ricas em pectina marcada com FITC.

É importante mencionar que essa complexação entre pectina e caseína é reversível. Quando o pH é elevado novamente para 7, as moléculas de pectina migram para fora das partículas, que se tornam flexíveis e voltam a coalescer.

Apesar da sensibilidade ao pH, complexos de pectina/caseína resistem à força iônica de até 100 mM de NaCl. Isso contrasta com o comportamento de outros complexos de polissacarídeo/proteína como goma arábica/gelatina (BURGESS, 1990), goma arábica/proteínas do soro do leite (WEINBRECK et al., 2003) e alginato/albumina (SINGH; BURGESS, 1989). Mesmo nessa concentração de sal, as partículas de pectina/caseína não se tornaram solúveis e não houve segregação entre pectina e caseína. É sabido que a presença de microíons neutraliza as cargas dos polímeros reduzindo as interações associativas e a coacervação (SCHMITT et al., 1998). No entanto, complexos que formam precipitados em vez de coacervados, requerem uma quantidade bem maior de sal pra suprimir a complexação (KRUIF; WEIBRECK; VRIES, 2004), como no caso dos complexos de pectina/caseína. A precipitação, normalmente motivada pela alta densidade de cargas das macromoléculas, é produto da forte atração entre os biopolímeros. Por essa razão, torna-se insensível a concentrações de microíons que, geralmente, inibiriam as interações moderadas presentes na coacervação complexa (KRUIF; WEIBRECK; VRIES, 2004).

4.7. Comportamento reológico das misturas

Numa mistura de polissacarídeos e proteínas, a proporção de cada biopolímero influencia no comportamento reológico do sistema, já que cada um deles possui características reológicas próprias. Nesse trabalho foi utilizada apenas a proporção polimérica 1:1, alterando-se somente a concentração total dos polímeros na mistura.

A figura 23 mostra o comportamento reológico de uma solução de pectina a 3% em pH 7 e da mistura contendo 3% de pectina e 3% de caseína em pH 7.

Figura 23. Comportamento reológico de uma solução de pectina 3% (p/p) e da mistura 6% (p/p) em pH 7. σ , tensão de cisalhamento; γ , gradiente de cisalhamento.

A mistura apresentou uma viscosidade sete vezes maior que a da pectina. Como a viscosidade de soluções de polissacarídeos normalmente é maior que a de soluções de proteínas, nas mesmas concentrações, pode-se dizer que a viscosidade da mistura não foi uma somatória das viscosidades de cada solução polimérica isolada. O efeito sinérgico exibido pela mistura, também foi observado por Bourriot e colaboradores (1999) em misturas de caseína e goma guar. Alguns autores atribuem o aumento da viscosidade das misturas poliméricas às interações eletrostáticas entre os polímeros (BAEZA et al., 2002; OULD ELEYA; TURGEON, 2000), sendo que, quanto

maior a interação entre eles, mais forte se torna o gel. Apesar de possuírem viscosidades tão diferentes, tanto a mistura quanto a solução de pectina exibiram um comportamento Newtoniano.

Mantendo-se a mesma proporção polimérica, mas aumentando-se a concentração total de polímeros, as misturas tendem a um comportamento pseudoplástico, apresentando leve tixotropia (figura 24). Na mesma figura, é possível visualizar, observando-se a inclinação das retas, que as misturas são menos viscosas em pH 5 do que em pH 7, como já havia sido comentado.

Os parâmetros módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') são mostrados nas figuras 25 e 26 para misturas de pectina/caseína 6% (p/p) e solução de pectina 3% (p/p) em pH 7 e 5. Tanto a mistura quanto a solução de pectina em pH 7 se comportaram como líquidos elásticos, ou seja, $G'' \gg G'$, típico de fluidos Newtonianos. Em pH 5, apesar de G'' continuar maior que G' , pode-se dizer que a solução de pectina tendeu a um comportamento mais elástico, visto que G' tornou-se menos dependente da frequência. De fato, é característico de pectinas com alto grau de metoxilação formar géis em pH ácido (OAKENFULL; SCOTT, 1984). Na mistura, no entanto, ocorreu o contrário: G' tornou-se ainda mais dependente da frequência, apresentando características ainda menos elásticas. Isso é explicado pela formação do complexo microparticulado entre pectina e caseína em pH 5, que impede a formação de um gel com uma rede polimérica interconectada, reduzindo G' .

Figura 24. Comportamento reológico de misturas de pectina/caseína (1:1) em concentrações totais de 4, 6, 8 e 10 % (p/p) em pH 7 (painel superior) e pH 5 (painel inferior). σ , tensão de cisalhamento; γ , gradiente de cisalhamento.

Figura 25. Parâmetros G' e G'' em misturas pectina/caseína 6% (p/p) em pH 7 e 5 a 30°C.

Figura 26. Parâmetros G' e G'' em soluções de pectina 3% (p/p) em pH 7 e 5 a 30°C.

4.8. Determinação do tamanho de partícula

Quando o pH de misturas de pectina/caseína é trazido de 7 para 5, as gotículas da emulsão água/água dão lugar às micropartículas de pectina/caseína (REDIGUIERI et al., 2007). Como essas partículas são rígidas e não se desfazem em água, é possível medir o tamanho delas utilizando a técnica de espalhamento de luz laser.

A figura 27 mostra o efeito do pH no tamanho das partículas em mistura de pectina/caseína 6% (p/p). Quando o pH da mistura é reduzido de 5 para 4, o diâmetro das partículas diminui e o gráfico de distribuição de tamanho torna-se mais estreito, indicando maior homogeneidade da amostra. Provavelmente, a maior interação entre pectina e caseína neste pH seja responsável por aumentar a proximidade entre os polímeros, provocando a retração das partículas. Se o pH é reduzido até 3, as partículas não se tornam ainda menores. Ao contrário, é observado o aumento do diâmetro. Isso pode ser explicado pelo fato de mais moléculas de pectina terem migrado para as micropartículas (veja figura 20 A). Se o limite da retração já havia sido atingido em pH 4, era esperado que as partículas começassem a aumentar de tamanho à medida que mais pectina fosse atraída pela caseína. De acordo com Tuinier e colaboradores (2002), a adsorção de pectina a micelas de caseína se dá na forma de multicamadas; quanto menor o pH da mistura, maior a espessura da camada de pectina adsorvida ao redor das micelas.

A tabela 5 mostra os valores dos parâmetros média, mediana, moda, d_{10} (10% do volume de partículas possuem diâmetro menor ou igual a este valor) e d_{90} (90% do volume de partículas possuem diâmetro menor ou igual a este valor) para auxiliar a comparação dos resultados.

Figura 27. Distribuição do tamanho de partículas numa mistura de pectina/caseína 6% (p/p) em função do pH. A primeira coluna mostra imagens de microscopia óptica de transmissão e a segunda, os gráficos correspondentes. A velocidade de agitação durante processo de acidificação foi de 300 rpm.

Tabela 5- Distribuição do tamanho de partícula em misturas de pectina/caseína 6% (p/p) em função do pH

	Diâmetro (μm)		
	pH 5	pH 4	pH3
Média	4,1	3,8	4,3
Mediana	3,7	3,6	3,9
Moda	4,0	3,7	4,0
Desvpad	2,0	1,6	1,9
d10	1,9	1,9	2,1
d90	7,1	6,1	7,0

Além do pH, outros dois fatores que poderiam alterar o tamanho das partículas foram avaliados: concentração polimérica e velocidade de agitação da mistura durante o processo de acidificação. As concentrações investigadas foram 4, 6, 8, e 10 % (p/p) e para cada uma delas, duas velocidades de agitação foram utilizadas: 300 e 700 rpm. Os resultados estão mostrados nas figuras 28, 29, 30 e 31.

Como se pode observar, a agitação de 700 rpm produziu uma mistura mais uniforme em termos de tamanho de partículas. Por isso, a média dos diâmetros com agitação de 300 rpm foi maior do que com a de 700 rpm, mas a moda, ao contrário, aumentou com a maior agitação (ver tabela 6). É como se o gráfico tivesse sido comprimido a partir dos lados e empurrado para cima no centro. A mediana praticamente se manteve.

Em relação à concentração polimérica, misturas com 4% de sólidos produziram partículas menores que as demais. Em misturas com baixas concentrações de polímeros, as duas fases geradas após a separação são mais diluídas do que as de misturas mais concentradas. Na mistura pectina/caseína 4% (p/p), as gotículas de caseína em pH 7 possuem uma concentração tal que, quando o pH é reduzido, pouca proteína está disponível para complexação com pectina, provocando a precipitação de partículas pequenas. Durante a complexação, a interação polímero-

polímero é maior que a polímero-solvente, fazendo com que a água presente nas gotículas seja expelida e o volume delas reduzido. Assim, quanto menor a quantidade de caseína na gotícula, menor é a partícula gerada, dado que foi verificado experimentalmente.

Figura 28. Distribuição do tamanho de partículas em misturas de pectina/caseína 4% (p/p) pH 5. Paine A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; paine B, 700 rpm.

Figura 29. Distribuição do tamanho de partículas em misturas de pectina/caseína 6% (p/p) pH 5. Painel A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; painel B, 700 rpm.

Figura 30. Distribuição do tamanho de partículas em misturas pectina/caseína 8% (p/p) pH 5. Paine A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; paine B, 700 rpm.

Figura 31. Distribuição do tamanho de partículas em misturas pectina/caseína 10% (p/p) pH 5. Painei A, velocidade de agitação durante processo de acidificação de 300 rpm; painei B, 700 rpm.

Entre as misturas com 6, 8 e 10% (p/p) de sólidos totais, considerando a agitação que produziu dispersões mais uniformes (700 rpm), não houve grandes diferenças no tamanho das partículas, mas foi observado um pequeno aumento do diâmetro à medida em que as amostras ficavam mais concentradas. A mistura pectina/caseína 10% (p/p) foi a que produziu as maiores partículas (observe d90 na tabela 6).

Tabela 6- Distribuição do tamanho de partícula em misturas de pectina/caseína em pH 5 em função da concentração polimérica e velocidade de agitação durante o processo de acidificação

	Diâmetro (μm)							
	P/C 4%		P/C 6%		P/C 8%		P/C 10%	
	300 rpm	700 rpm	300 rpm	700 rpm	300 rpm	700 rpm	300 rpm	700 rpm
Média	3,5	2,9	4,1	3,7	6,4	3,7	8,9	5,3
Mediana	2,5	2,7	3,7	3,6	3,7	3,4	4,2	4,2
Moda	2,1	3,1	4,0	4,0	3,4	3,7	3,7	4,4
Desvpad	2,7	1,4	2,0	1,4	8,4	1,6	12,4	5,2
d10	1,2	1,3	1,9	2,0	1,7	1,8	1,9	2,1
d90	7,1	4,9	7,1	5,6	14,2	5,9	24,8	7,9

4.9. Microencapsulação de fármaco pelo sistema pectina/caseína

A utilização de sistemas coacervados na microencapsulação de substâncias é bastante conhecida. Da mesma forma que na coacervação complexa, nas emulsões água/água gotículas de fase polimérica também são formadas, mas ao invés de um complexo, têm-se apenas um polímero na fase dispersa. Partindo-se do mesmo princípio dos sistemas coacervados, utilizamos misturas de pectina/caseína em pH 7 para microencapsulação de metronidazol. Para que isso fosse possível, o fármaco deveria ser adicionado à mistura em condições de incompatibilidade termodinâmica, ou seja, em pH 7, porque após a acidificação, as partículas rígidas não seriam capazes de englobar os cristais.

Para avaliar a viabilidade de encapsulação tanto de substâncias hidrofílicas quanto de hidrofóbicas, *beads* fluorescentes à base de sílica ou de látex foram adicionadas à mistura. O resultado pode ser visualizado na figura 32.

Figura 32. Imagens de microscopia de fluorescência (A e C) associada com transmissão (B e D) de misturas de pectina/caseína 6% (p/p) contendo *beads* de látex (A e B) e *beads* de sílica (C e D) em pH 7 (A e C) e pH 5 (B e D). A escala para todas as imagens corresponde a 10 μm .

Comparando-se as imagens A e C, nota-se que as *beads* de látex (mais hidrofóbicas) se alojam no centro das gotículas e as *beads* de sílica (mais hidrofílicas) possuem uma afinidade maior pela superfície. Ambas, no entanto, preferem a fase de caseína em detrimento da de pectina. É como se a rede formada pelo entrelaçamento das cadeias de pectina impedisse que as *beads* se espalhassem pela fase contínua da emulsão, limitando-se a permanecerem dentro das gotículas. Outra hipótese é que ocorra com as *beads* o mesmo que com as micelas de caseína: incompatibilidade termodinâmica por depleção de interação. Dessa forma tanto as *beads* quanto as micelas de caseína se reúnem numa só fase expelidas pela pectina.

A razão pela qual as *beads* mais hidrofílicas se alojam na superfície é o fato delas não possuírem muita afinidade pela caseína, que possui também centros hidrofóbicos além de hidrofílicos. Como elas não conseguem se dispersar pela fase de pectina, elas se posicionam na interface entre as duas fases, ou seja, na borda das gotículas (figura 32 C).

Quando o pH é reduzido para 5 (figuras 32 B e D), independentemente do caráter hidrofílico ou hidrofóbico das *beads*, elas permanecem dentro das partículas. Esse resultado apresenta um forte indício de que os complexos pectina/caseína se aplicam tanto à encapsulação de substâncias hidrofílicas quanto hidrofóbicas e que, além disso, possuem uma alta eficiência de encapsulação, já que não se observou a presença de *beads* fora das partículas.

Prova de que isso acontece também com cristais de fármaco é a figura 33. Nesse caso, foram utilizados cristais de metronidazol base (MDZ) e de benzoato de metronidazol (BMDZ). Em pH 7, os cristais de MDZ (solubilidade em água de 10 mg/mL) se concentraram na superfície das gotículas (figura 33 A). Cristais de BMDZ, 100 vezes menos solúveis devido à presença de um grupo benzoil na molécula, se alojaram nitidamente no centro delas (figura 33 B). Quando a mistura continha os dois compostos, as gotículas ficavam completamente preenchidas, sendo o centro rico em cristais de BMDZ e as bordas, em cristais de MDZ (figura 33 C).

Figura 33. Fotomicrografia óptica de transmissão de misturas de pectina/caseína 6% (p/p) em pH 7 contendo 1,5 % de fármaco. MDZ, (A); BMDZ, (B); MDZ + BMDZ, (C).

Apesar da diferença na distribuição dos cristais em pH 7, após a acidificação essa diferença desaparece (figura 34). Tanto MDZ quanto BMDZ são encapsulados pelo complexo pectina/caseína.

Figura 34. Fotomicrografia óptica de transmissão de misturas de pectina/caseína 6% (p/p) em pH 5 contendo 1,5 % de fármaco. MDZ, (A); BMDZ, (B).

4.10. Validação do método de quantificação do metronidazol

O espectro de varredura da solução aquosa de metronidazol (5 $\mu\text{g/mL}$) mostrou que a maior absorbância do fármaco ocorreu em 320 nm. Resultados semelhantes foram obtidos por Jones e colaboradores (1997) e por Bari e colaboradores (1998). Nesse comprimento de onda foram realizadas as leituras para a construção da curva analítica.

A curva de analítica do metronidazol ilustrada na figura 35 mostra linearidade entre as concentrações de 0,2 e 25 $\mu\text{g/mL}$ com um R^2 de 0,9999 e equação da reta representada por $y = 0,0536x$, onde y corresponde à absorbância em 320 nm e x corresponde à concentração do fármaco em $\mu\text{g/mL}$.

Figura 35. Curva analítica do metronidazol em solução aquosa (λ 320 nm).

Os limites de quantificação (*LQ*) e detecção (*LD*) obtidos conforme descrito no item 3.2.10 foram 0,20 µg/mL e 0,068 µg/mL respectivamente.

O método apresentou especificidade, pois soluções aquosas de pectina, de caseína e da mistura não apresentaram picos de absorção próximos a 320 nm.

O método foi preciso, apresentando um desvio padrão relativo inferior a 4% nas três concentrações avaliadas (baixa, média e alta), tanto intra como inter-dias; e também apresentou boa exatidão, com valores entre 97,6 e 104,6% nas determinações intra-dias e 100,13 e 101,29% nas inter-dias. Para o *LQ*, os desvios foram menores que 10% na precisão e menores que 20% na exatidão (Tabela 7).

Tabela 7 - Precisão e exatidão do método de quantificação do metronidazol

Concentração (µg/mL)	Desvio padrão relativo (%)				Exatidão (%)			
	Intra-dias		Inter-dias		Intra-dias		Inter-dias	
	1	2	3		1	2	3	
0,20*	3,86	9,50	5,50	5,85	119,76	118,19	118,51	118,82
1,0	4,03	1,86	2,21	3,87	97,56	104,57	101,75	101,29
12,5	0,70	0,85	0,79	0,68	100,36	100,26	100,32	100,31
25,0	0,92	2,60	3,18	2,46	101,18	100,77	98,43	100,13

* Limite de quantificação

4.11. Obtenção dos filmes de pectina/caseína

Misturas em pH 5 com várias concentrações de sólidos totais foram avaliadas na obtenção dos filmes. Quanto maior a concentração de sólidos, mais rápida é a secagem porque o volume de água a ser removido é menor. No entanto, a alta viscosidade das dispersões mais concentradas dificulta a eliminação de bolhas. Por esse motivo, decidiu-se trabalhar com dispersões de pectina caseína 6% (p/p).

Os filmes de pectina/caseína contendo 20% de glicerina soltam-se facilmente das placas depois de secos. São transparentes em baixas concentrações de sólidos, mas à medida que se aumenta essa concentração e, principalmente, adicionando-se fármaco à dispersão, eles se tornam opacos. A opacidade aumenta também quanto maior o volume de dispersão colocado na placa de secagem.

Para a obtenção de filmes com aproximadamente 0,35 mm de espessura (a mesma do Periochip[®]) foi necessário adicionar, em cada placa, 50 g de dispersão 6% (p/p) contendo fármaco (tabela 8).

Tabela 8 – Espessura dos filmes de pectina/caseína 6% (p/V) contendo 20% de glicerina

Formulação	Espessura (mm)
Filme sem fármaco	0,21 ± 0,02
Filme com 25% de fármaco*	0,31 ± 0,02
Filme com 50% de fármaco*	0,40 ± 0,04

* Porcentagem teórica em relação à massa total de polímeros + fármaco.

A figura 36 mostra a extremidade de um filme umedecido com uma gota de água destilada. À medida que ele intumescce, as micropartículas vão se despreendendo da película. O filme é, na realidade, uma forma farmacêutica composta de micropartículas carregadas.

Figura 36. Fotomicrografia óptica de transmissão do filme de pectina/caseína 6% (p/V) parcialmente umedecido com água.

4.12. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação

Filmes de pectina/caseína contendo metronidazol base (MDZ) e benzoato de metronidazol (BMDZ) reticulados ou não com cálcio foram submetidos ao estudo *in vitro* de liberação.

Inicialmente, foi avaliado se a velocidade de agitação no dispersor tipo turrax, durante a preparação da dispersão contendo fármaco (item 3.2.11), poderia influenciar na liberação. A agitação em turrax se fez necessária para destruir os grumos formados pelos cristais de fármaco quando estes entram em contato com a água. A intenção era que os cristais isolados ficassem distribuídos por um maior número de micropartículas, para que fossem cobertos por uma camada polimérica mais espessa, o que reduziria a velocidade de liberação.

Comparando-se as agitações de 8000, 13500 e 20400 rpm (figura 37), observou-se que a menor rotação originou partículas carregadas maiores, indicando menor eficiência em separar os cristais. Entre as rotações de 13500 e 20400 rpm, parece não ter havido diferença; ambas apresentaram algumas partículas grandes, mas muitas partículas bem pequenas contendo praticamente um único cristal.

Apesar da diferença observada microscopicamente, em termos de liberação, os filmes apresentaram-se bastante semelhantes. A figura 38 mostra os perfis dos filmes obtidos pelos três processos.

Dois momentos distintos são observados nos perfis: um até 48 horas de experimento e o outro, de 48 a 168 horas. No primeiro momento, a velocidade de liberação é rápida, sendo que aproximadamente 55% do fármaco abandonam a forma farmacêutica durante os 2 primeiros dias. Em seguida, a inclinação da curva diminui e a liberação torna-se mais lenta, sendo apenas cerca de 7% do fármaco liberado durante os 5 dias restantes.

Figura 37. Fotomicrografia óptica de transmissão de partículas de pectina/caseína em pH 5 contendo MDZ+BMDZ preparadas com diferentes velocidades de agitação. A, 8000 rpm; B, 13500 rpm; C 20400 rpm. As setas auxiliam a visualização de partículas carregadas com pequenos cristais.

Figura 38. Perfil de liberação dos filmes à base de micropartículas de pectina/caseína carregadas com MDZ+BMDZ preparadas com diferentes velocidades de agitação. Círculos representam agitação de 8000 rpm; xis, 13500 rpm; asteriscos, 20400 rpm. A liberação foi avaliada em tampão fosfato pH 7.

Como nesse dispositivo utilizado não se trabalha em *sink conditions*, a solubilidade do fármaco exerce uma forte influência sobre o perfil de liberação. O volume do meio de dissolução passa a ser o fator limitante da liberação. Nesse sentido, concluímos que, nas primeiras 48 horas, a maior parte do fármaco liberado é metronidazol base (MDZ). O pró-fármaco, benzoato de metronidazol (BMDZ), com solubilidade em água 100 vezes menor que a base livre (MATHEW, DAS GUPTA, BETHEA, 1994), compõe uma pequena parcela. Esgotada a liberação da base, permanece somente a do sal, a uma velocidade bem lenta. *In vitro*, essa velocidade gera concentrações em torno de 20 µg/mL por dia, 20 vezes maior que a concentração inibitória mínima para a maioria dos anaeróbios (SUTTER; JONES; GHONEIM, 1983).

Para que seja mantida uma liberação prolongada dentro da bolsa periodontal, é imprescindível que o filme permaneça no local pelo período de tempo desejado. Devido à propriedade de liberar as micropartículas à medida que é molhado, o filme se desintegra rapidamente em tampão, principalmente porque em pH 7 as micropartículas se desfazem, pois pectina e caseína são incompatíveis termodinamicamente.

Com o intuito de melhorar essa desintegração, foi utilizado cálcio como agente de reticulação (*cross-linker*). A reticulação (*cross-linking*) intermolecular se dá entre os íons cálcio e os grupos carboxílicos da pectina carregados negativamente, dando origem a estrutura similar a uma caixa de ovos (*egg-box*) (GRANT et al., 1973). Quanto menor o grau de metoxilação da pectina, mais sensível ela é ao cálcio como agente geleificante (THAKUR et al., 1997). Em nossos experimentos, foi utilizada pectina com alto grau de metoxilação (68%).

Experimentou-se tanto a adição de cálcio à dispersão quanto o banho de cálcio após o filme seco. Para isso foram utilizadas soluções com concentrações de 5 e 10 % de íons cálcio. Durante o gotejamento das soluções de cálcio na dispersão de pectina/caseína em pH 5, ocorreu a formação de grumos, que não se desfaziam mesmo após forte agitação. Provavelmente, a alta concentração de cálcio na região do gotejamento tenha provocado a geleificação da mistura. Por essa razão deu-se continuidade aos experimentos realizando-se o banho de cálcio com o filme seco.

Os banhos de cálcio tiveram duração de 5, 10, 20 e 30 minutos. Passado esse tempo, os filmes eram lavados com água destilada e levados novamente à secagem. Os filmes secos foram mergulhados em tampão fosfato pH 7 por pelos menos 4 horas e a desintegração deles foi assistida.

A figura 39 mostra a desintegração em pH 7 dos filmes contendo ou não cálcio. Como não houve diferença entre os que continham cálcio, apenas o filme reticulado com solução de

cálcio 5% por 5 minutos é mostrado. Após 30 minutos em tampão, o filme sem cálcio (39 A) começou a se desintegrar. Duas horas depois ele havia se desfeito quase que completamente. Os filmes reticulados (39 B), independentemente da concentração da solução de cálcio e do tempo de imersão, resistiram por pelo menos 7 dias em tampão pH 7.

Figura 39. Desintegração dos filmes de pectina/caseína em tampão fosfato pH 7 no decorrer do tempo. A: filmes não-reticulados; B: filmes reticulados com solução de cálcio 5% por 5 minutos.

O efeito da reticulação com cálcio na liberação do fármaco também foi avaliado. Primeiramente, a quantidade de fármaco perdida para a solução de cálcio durante o processo de reticulação foi quantificada (figura 40).

Verificou-se que na solução de cálcio 10% a liberação de fármaco foi menor do que na solução de cálcio 5%. Isso sugere que a solução mais concentrada produza uma reticulação melhor no filme o que poderia se refletir num perfil de liberação mais lento. A duração do banho

Figura 40. Quantidade de fármaco cedida para as soluções de cálcio (5 ou 10%) durante o processo de reticulação dos filmes. Painel A: filmes com 25% (p/p) de fármaco. Painel B: filmes com 50% (p/p) de fármaco. *Inset:* outra representação gráfica de porcentagem de fármaco perdida (ordenadas) *versus* tempo (abscissas).

de cálcio, no entanto, pareceu não influenciar o grau de reticulação, pois a quantidade perdida de fármaco aumentou linearmente com o tempo (observe o *inset* no gráfico).

Aumentando-se a concentração de fármaco no filme de 25% para 50% (figura 40 B), a quantidade liberada representou uma porcentagem menor. Esse resultado era esperado, pois em condições *non-sink*, a solução aceptora (no caso, a solução de cálcio) pode saturar e levar à redução da difusão.

Os perfis de liberação dos filmes reticulados contendo 25 e 50% de fármaco estão mostrados nas figuras 41 e 42, respectivamente. Foi utilizada para a reticulação apenas solução de cálcio 10%, já que a quantidade de fármaco cedida para ela foi menor que para a de cálcio 5%.

Figura 41. Perfil de liberação, em pH 7, dos filmes de pectina/caseína contendo 25% de MDZ+BMDZ. Triângulos, filmes reticulados por 10 min em solução de cálcio 10%; quadrados, filmes reticulados por 30 min em solução de cálcio 10%; círculos, filmes não reticulados; traços, filmes não reticulados contendo 25% de BMDZ.

Analisando-se a figura 41, observa-se que não há diferença entre os perfis de liberação traçados. Tanto os filmes reticulados (por 10 ou 30 minutos) quanto os não reticulados, liberaram aproximadamente 55% do fármaco em 48 horas, seguindo, a partir daí, com uma liberação mais lenta. Comportamento semelhante foi observado em filmes mais concentrados (figura 42), mas para estes a liberação foi ligeiramente menor (menos que 50% em 48 horas).

Figura 42. Perfil de liberação, em pH 7, dos filmes de pectina/caseína contendo 50% de MDZ+BMDZ. Triângulos, filmes reticulados por 10 min em solução de cálcio 10%; quadrados, filmes reticulados por 30 min em solução de cálcio 10%; círculos, filmes não reticulados; traços, filmes não reticulados contendo 25% de BMDZ.

O fato de não se observarem diferenças entre os filmes reticulados demonstraria concordância com os resultados da figura 40, em que a duração da reticulação não reduzia a perda de fármaco para a solução de cálcio. No entanto, diferenças não foram observadas também

entre os filmes reticulados e os não reticulados. Liu e colaboradores (2003) verificaram que formulações à base de pectinato de cálcio foram eficientes em retardar a liberação de compostos pouco solúveis em água, mas a liberação de compostos mais solúveis não foi reduzida pela rede pectina-cálcio-pectina. Da mesma forma, a reticulação com cálcio não alterou o perfil de liberação nos filmes de pectina/caseína.

Vale lembrar, entretanto, que essa afirmativa é válida para as condições de experimentação testadas, ou seja, em condições *non-sink* e fluxo de 6 mL/dia. Em outras condições, de fluxo mais rápido ou em *sink-conditions*, talvez diferenças de liberação entre as formulações seja visualizada.

Os gráficos mostram ainda o perfil de liberação de um filme contendo somente benzoato de metronidazol (BMDZ). Como se pode observar, a liberação é bem lenta e praticamente constante, bastante parecida com a porção final do perfil de liberação dos outros filmes. Isso confirma a idéia de que, nos filmes contendo MDZ+BMDZ, a segunda etapa da liberação se refere à liberação de BMDZ, conforme mencionado anteriormente. A opção de se usar a mistura dos dois fármacos foi para se obter um “*burst*” inicial, proporcionando uma dose de ataque alta com o fármaco mais solúvel, e uma dose de manutenção mais baixa com o fármaco menos solúvel.

Curiosamente, a inclinação da porção final da curva foi maior nos filmes contendo cálcio. Estes liberavam aproximadamente 60 µg/mL de fármaco por dia a partir de 72 horas, enquanto os sem cálcio, três vezes menos. A causa desse efeito não foi investigada nessa tese. Entretanto, um aumento de liberação provocado por excesso de cálcio foi relatado por Wakerly (1996) e Bonini (2000) em matrizes de pectina de baixo grau de metoxilação contendo paracetamol.

Diante disto, a reticulação com cálcio de filmes de pectina/caseína é interessante por 2 motivos: 1) redução da degradabilidade do filme em pH 7 e 2) aumento da liberação do BMDZ na segunda etapa do perfil de liberação, proporcionando concentrações maiores do fármaco.

4.13. Propriedades mecânicas dos filmes

Filmes com e sem fármaco reticulados ou não com cálcio foram avaliados quanto às suas propriedades mecânicas. Os valores de resistência à tração (TS), módulo de elasticidade (EM) e alongamento até a quebra (ETB) são mostrados na tabela 9. TS é uma medida de força, resistência. EM é uma medida de rigidez, dureza e ETB é uma medida de elasticidade.

Primeiramente, comparando-se os filmes sem cálcio, à medida que a quantidade de fármaco na formulação aumenta de 0 para 25 e 50%, a resistência à tração, o módulo de elasticidade e a porcentagem de alongamento diminuem. O filme torna-se ao mesmo tempo menos resistente, menos rígido e mais quebradiço.

Observando-se os filmes sem fármaco que receberam banho de cálcio, podemos inferir que, quanto maior a concentração da solução de cálcio e o tempo de reação, também menos resistentes à tração e mais flexíveis se tornam os filmes. No entanto, a elasticidade aumenta, os filmes se alongam mais, tornando-se menos quebradiços. Esse efeito é observado a partir de certa exposição ao cálcio. Em relação aos que não receberam cálcio, os filmes imersos por 10 minutos mostraram-se mais resistentes, mais rígidos e menos elásticos. Ou seja, até certa exposição, o cálcio reduz a mobilidade das cadeias por uni-las através das ligações cruzadas; mas em excesso, provoca o efeito inverso.

Tabela 9 – Propriedades mecânicas os filmes de pectina/caseína

Formulação	Resistência à tração (kgf/mm ²)	Módulo elasticidade (kgf/mm ²)	Alongamento (%)
<i>Filmes sem fármaco</i>			
Sem banho de cálcio	0,88 ± 0,19	18,85 ± 7,34	22,77 ± 4,53
Banho de cálcio 5% /10 min	1,49 ± 0,41	40,22 ± 10,83	10,19 ± 1,44
Banho de cálcio 10% /10 min	0,97 ± 0,36	21,04 ± 7,68	11,47 ± 0,96
Banho de cálcio 5% /30 min	0,67 ± 0,22	14,46 ± 6,05	12,68 ± 1,55
Banho de cálcio 10% /30 min	0,14 ± 0,04	0,90 ± 0,37	27,24 ± 2,50
<i>Filmes com 25% de fármaco</i>			
Sem banho de cálcio	0,35 ± 0,02	13,9 ± 1,90	9,38 ± 1,25
Banho de cálcio 10% /10 min	0,48 ± 0,08	13,34 ± 8,10	6,12 ± 0,80
<i>Filmes com 50% de fármaco</i>			
Sem banho de cálcio	0,19 ± 0,04	10,33 ± 3,13	8,77 ± 2,85
Sem banho de cálcio *	0,08 ± 0,01	1,68 ± 0,28	9,29 ± 0,81
Banho de cálcio 10% /10 min *	0,32 ± 0,04	10,04 ± 2,68	13,24 ± 2,34

* Filmes contendo 40% de glicerina, ao contrário dos demais que continham 20%. A porcentagem foi calculada em relação à massa total de polímeros no filme.

Isso pode ser explicado observando-se o conteúdo de umidade dos filmes (tabela 10). Os filmes que permaneceram por mais tempo em solução de cálcio e, principalmente, na solução mais concentrada, possuíam um conteúdo de umidade maior no equilíbrio. Provavelmente as moléculas de cálcio presentes nesses filmes tenham capturado as de água por interações iônicas entre elas. Quanto maior a quantidade de cálcio, maior a porcentagem de água retida. A presença de água torna o material menos resistente, mais flexível e elástico.

Tabela 10 - Conteúdo de umidade no equilíbrio de filmes de pectina/caseína reticulados ou não com cálcio

Filmes	Conteúdo de umidade (%)
Sem banho de cálcio	12,0 ± 2,0
Banho de cálcio 5%/10 min	16,3 ± 3,0
Banho de cálcio 5%/30 min	18,0 ± 3,5
Banho de cálcio 10%/10 min	22,8 ± 3,6
Banho de cálcio 10%/30 min	26,9 ± 1,7

Para inserção na bolsa periodontal, é interessante que o filme possua certa rigidez, mas que não seja quebradiço. Dentre os reticulados, os que permaneceram por menos tempo imersos em solução de cálcio é que atendem melhor a esse requisito. Como a liberação de fármaco para a solução de cálcio 5% é maior, os filmes imersos em cálcio 10% parecem ser melhores candidatos.

As propriedades mecânicas dos filmes contendo fármaco, submetidos a essas condições de reticulação, também são mostradas na tabela 9. A presença de cálcio tornou os filmes mais duros e resistentes, reduzindo e aumentando a elasticidade dos filmes com 25 e 50% de fármaco, respectivamente. Principalmente para os filmes com 50% de fármaco e 40% de glicerina, essas mudanças foram bastante pronunciadas. As tiras do filme com 50% de fármaco e 20% de glicerina, também reticuladas em solução de cálcio 10% por 10 minutos, enrolaram-se durante a secagem. Por estarem muito duras e difíceis de serem desenroladas sem serem quebradas, não foi possível avaliar suas características mecânicas.

A melhor condição de preparação dos filmes, no entanto, só poderá ser estabelecida durante a realização de testes *in vivo*, onde as reais condições e dificuldades serão vivenciadas. Os resultados dos testes *in vitro* são importantes para direcionar futuras modificações.

5. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi mostrado que misturas aquosas de pectina/caseína possuem comportamentos distintos dependendo do pH e da concentração polimérica em que se encontram. Um diagrama de fases construído em pH 7, quando os dois polímeros estão negativamente carregados, revelou que a mistura é estável apenas em baixas concentrações. Concentrações mais elevadas levam à incompatibilidade termodinâmica com formação de emulsões água/água. Como a curva binodal se mostrou inalterada em diferentes temperaturas e os cálculos teóricos coincidiram com os resultados práticos, confirmou-se a teoria da depleção de interação governada por forças puramente entrópicas como explicação para a incompatibilidade entre os polímeros. A decomposição espinodal pôde ser visualizada nos estágios iniciais da separação de fases. Esta ocorre mais lentamente com o aumento da concentração de pectina no sistema ou com a redução da temperatura de estocagem, devido à maior viscosidade da mistura nessas condições.

Quando o pH das emulsões água/água é reduzido para entre 6 e 3, a repulsão entre os polímeros dá lugar à atração, pois a caseína se torna positivamente carregada e atrai a pectina carregada negativamente, resultando na formação de partículas de complexo pectina/caseína. Essas partículas não coalescem e são resistentes à adição de sal (NaCl 100 mM), apresentando um diâmetro médio aproximado de 4 μm . Quando a mistura possui altas concentrações de pectina ou quando a acidificação é realizada lentamente, partículas mais esféricas são obtidas.

As micropartículas de pectina/caseína obtidas por este método são capazes de encapsular com alta eficiência tanto substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas, possibilitando sua aplicação na encapsulação de compostos variados para fins diversos.

Além disso, as dispersões de pectina/caseína ricas em micropartículas formam filmes quando submetidas à secagem. Estes, contendo partículas carregadas com cristais de

metronidazol base e benzoato de metronidazol, sustentaram a liberação *in vitro* do ativo por pelo menos 7 dias.

A reticulação dos filmes com cálcio, nas condições empregadas, não altera a liberação do metronidazol base, mas aumenta a liberação do benzoato de metronidazol na porção final do perfil de liberação. Outra vantagem é que a reticulação reduz a desintegração dos filmes e melhora suas propriedades mecânicas, facilitando a inserção na bolsa-periodontal e contribuindo para a permanência deles no local de aplicação.

Com esses resultados, conclui-se que as micropartículas de pectina/caseína, capazes de encapsular materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, são excelentes candidatas a compor sistemas de liberação de fármacos podendo, como foi mostrado, ser veiculadas na forma de filmes de aplicação local para tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

- AARTS, D. G. A. L.; DULLENS, R. P. A.; LEKKERKERKER, H. N. W. Interfacial dynamics in demixing systems with ultralow interfacial tension. **New J. Phys.**, v. 7, 40, 2005.
- AARTS, D. G. A. L.; TUINIER, R.; LEKKERKERKER, H. N. W. Phase behaviour of mixtures of colloidal spheres and excluded-volume polymer chains. **J. Phys. Cond. Matt.**, v. 14, p. 7551-7561, 2002.
- ADDY, M.; RAWLE, L.; HANDLEY, R.; NEWMAN, H. N.; COVENTRY, J. F. The development and in vitro evaluation of acrylic resin strips and dialysis tubing for local drug delivery. **J. Periodont.** v.53, p. 693, 1982.
- AGARWAL, R. K.; ROBINSON, D. H.; MAZE, G. I.; REINHARDT, R. A. Development and characterization of tetracycline-poly(lactide/glycolide) films for treatment of periodontitis. **J. Control. Release**, v.23, p.137-146, 1993.
- AINAMO, J.; LIE, T.; ELLINGSEN, B. H.; HANSEN, B. F.; JOHANSSON, L-A., KARRING, T.; KISCH, J.; PAUNIO, K.; STOLTZE, K. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 19, p.723-729, 1992.
- AMICE-QUEMENEUR, N.; HALUK, J. P.; HARDY, J.; KRAVTCHENKO, T. P. Influence of the acidification process on the colloidal stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk. **J. Dairy Sci.**, v. 78 (12), p. 2683-2690, 1995.
- ANDERSON, V. J.; JONES, R. A. L. The influence of gelation on the mechanism of phase separation of a biopolymer mixture. **Polymer**, v. 42 (23), p. 9601-9610, 2001.
- ANTONOV, Y.A.; GRINBERG, V.Y.; TOLSTOGUZOV, V.B. Incompatibility of proteins and polysaccharides in aqueous media. **Vysokomolek. Soed.**, v. 18 (B), p. 566-569, 1976.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos. Resolução-RE nº 475 de 19 de março de 2002. Disponível em : < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em 09/09/2002
- ASAKURA, S.; OOSAWA, F. On the interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. **J. Chem. Phys.**, v. 22 (7), 1255-1256, 1954.
- BAEZA, R. I.; CARP, D. J.; PÉREZ, O. E.; PILOSOF, A. M. R. κ -carrageenan - protein interactions : effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, v. 35, p. 741-747, 2002.
- BARACAT, M. M. **Preparação e avaliação de microcápsulas à base de pectina**. 2004. 135 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- BARI, V. R.; DHORDA, U. J.; SUNDARESAN, M. Simultaneous estimation of nalidixic acid and metronidazole in dosage forms using packed column supercritical fluid chromatography, **Anal. Chim. Acta**, v. 376, p. 221-225, 1998.

- BECK, J.; GARCIA, R.; HEISS, G.; VEKONAS, P. S.; OFFENBACHER, S. Periodontal disease and cardiovascular disease. **J Periodontol**, v.67, p.1123–37, 1996.
- BHAT, S.; TUINIER, R.; SCHURTENBERGER, P. Spinodal decomposition in a food colloid-biopolymer mixture: evidence for a linear regime. **J. Phys.:Condens. Matter**, v. 18 (26), L339, 2006.
- BLONK, J. C. G.; EENDENBURG, J.; KONING, M. M. G.; WEISENBORN, P. C. M.; WINKEL, C. A new CSLM-based method for determination of the phase behaviour of aqueous mixtures of biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 287-95, 1995.
- BONINI, K. F. **Desenvolvimento de avaliação de sistemas matriciais, à base de pectina, para liberação colônica**. 2000. 49 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- BORRIOUT, S.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J-L. Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. **Int. Dairy J.**, v. 9, p. 353-357, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72 (7), p. 248–254, 1976.
- BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIAO, M. P. D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing própolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 96 (8), p. 2075-2089, 2007.
- BULGARELLI, E.; FORNI, F.; BERNABEI, M. T. Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties. **Int. J. Pharm.**, v. 198, p.157-165, 2000.
- BUNGENBERG DE JONG, H. G. Crystallisation- coacervation- flocculation. In: KRUYT, H. R. **Colloid Science**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1949a, vol. 2, cap. 8, p.232-258.
- BUNGENBERG DE JONG, H. G. Morphology of coacervates. In: KRUYT, H. R. **Colloid Science**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1949b, vol. 2, cap. 11, p.433-480.
- BURGESS, D. J. Practical analysis of complex coacervate systems. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 140 (11), p. 227-238, 1990.
- BUTLER, M. F. Mechanism and kinetics of phase separation in a gelatinymaltodextrin mixture studied by small-angle light scattering. **Biomacromolecules**, v. 3 (4), p. 676 –683, 2002.
- CAMILO, K. F. B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. 2007. 147 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

- ÇETIN, E. Ö.; BUDUNELI, N.; ATLIHAN, E.; KIRILMAZ, L. In vitro studies of controlled-release cellulose acetate films for local delivery of chlorhexidine, indomethacin and meloxicam. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p.1117-1121, 2004.
- CHEN, Y.; WILLMOTT, N.; ANDERSON, J.; FLORENSE, A.T. Comparison of albumin and casein microspheres as carrier for doxorubicin. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 39, p. 978-985, 1987.
- COLLINS, A. E. M.; DEASY, P. B.; MACCARTHY, D. J.; SHANLEY, D. B. Evaluation of a controlled-release compact containing tetracycline hydrochloride bonded to tooth for the treatment of periodontal disease. **Int. J. Pharm.**, v 51, p.103-114, 1989.
- DE KRUIF, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.3019-3028, 1998.
- DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R.; HOLT, C.; TIMMINS, P. A.; ROLLEMA, H. S. Physicochemical Study of κ and β -Casein Dispersions and the Effect of Cross-Linking by Transglutaminase. **Langmuir**, v. 18 (12), p. 4885-4891, 2002.
- DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 9, p. 340-349, 2004.
- DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 9, p. 340-349, 2004.
- DEASY, P. B.; COLLINS, A. E.; MACCARTHY, D. J.; RUSSELL, R. J. Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for the treatment of advanced periodontal disease. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 41, p.694-699, 1989.
- DENTES. São Paulo: Colgate-Palmolive, 2001. Disponível em: <http://colgate.com.br/fase2/int_partesdosdentes.htm>. Acesso em 14/01/2004.
- DHONT J. K. G. Phase separation kinetics. In: DHONT J. K. G. **An introduction of dynamics of colloids**. Amsterdam: Elsevier, 1996, cap. 9, p. 559.
- DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.** v. 5 (3), p. 202-214, 2000.
- DURRANI, C. M.; DONALD, A. M. Fourier transform infrared microspectroscopy of phase-separated mixed biopolymer gels. **Macromolecules**, v. 27, p.110-119, 1994.
- DURRANI, C. M.; PRYSTUPA, D. A.; DONALD, A. M.; CLARK, A. H. Phase diagram of mixtures of polymers in aqueous solution using fourier transform infrared spectroscopy. **Macromolecules**, v. 26, p. 981-987, 1993.
- EDELMAN, M. W. **Segregative phase separation in aqueous mixtures of polydisperse biopolymers**. 2003. 94 f. Tese de Doutorado – Wageningen University, Wageningen, 2003.

EL-KAMEL, A. H.; ASHRI, L. Y.; ALSARRA, I. A. Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases. **AAPS PharmSciTech**, v. 8 (3), 75, 2007.

ESPOSITO, E.; CAROTTA, V.; SCABBIA, A.; TROMBELLI, L.; D'ANTONA, P.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: poloxamer- and monoglyceride-based formulations. **Int. J. Pharm.**, v.142, p.9-23, 1996.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Biodegradable microparticles for sustained delivery of tetracycline to the periodontal pocket: formulatory and drug release studies. **J. Microencapsulation**, v.14, p. 175-187, 1997.

FALTA de higiene bucal traz outros problemas para o organismo. São Paulo: Aventis, 2003. Disponível em : <http://www.aventispharma.com.br/aventispb/imprensa/releases/jan/030113b.asp> >. Acesso em 20/01/2004.

FIAT, A. M.; JOLLÉS, P. casein of various origins and biologically active peptides and oligosaccharides: Strutural e pHysiological aspects. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 87, p. 5-30, 1989.

FIGUEIREDO, K. C. **Géis de quitosana para a liberação prolongada intrabolsa periodontal de metronidazol para o tratamento da periodontite**. 2005. 177p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

FLORES, R. J.; WALL, M. D.; CARNAHAN, D. W.; OROFINO, T. A. An investigation of internal phase losses during the microencapsulation of fragrances. **J. Microencapsulation**, v. 9 (3), p. 287-307, 1992.

FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. New York: Cornell University Press, 1953.

FRIEDMAN, M.; GOLOMB, G. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. **J. Periodont. Res.**, v. 17, p.323, 1982.

GABARRA, F.R. **Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudos de liberação de fármaco**. 2002. 199p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

GATES, K. A.; GRAD, H.; BIREK, P.; LEE, P. I. A new bioerodible polymer insert for the controlled release of metronidazole. **Pharm. Res.**, v. 11, p.1605-1609, 1994.

GIRARD, M.; SANCHEZ, C.; LANEUVILLE, S.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S.F. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. **Colloids Surf. B: Biointerface**, v 35 (1), p. 15-22, 2004.

GOODSON, J. M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **J. Dent. Res.**, v. 68, p.1625-1632, 1989.

- GOODSON, J. M.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY, S. S. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. **J. Clin. Periodontol.**, v.6, p.83-92, 1979.
- GOODSON, J. M.; HOLBOROW, D.; DUNN, R. L.; HOGAN, P.; DUNHAM, S. Monolithic tetracycline containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. **J. Periodontol.**, v.54, p. 575-79, 1983.
- GRANT, G. T; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C, THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Lett.**, v. 32, p. 195-198, 1973.
- GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 11 (22), p. 145-158, 1997.
- HATTING, J.; HO, E. The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. **J. Periodont. Res.**, v.15, p.90-95, 1980.
- HERZBERG, M.; MEYER, M. Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. **J. Periodontol.**, v. 67, p.1138-42, 1996.
- HIGASHI, K.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; KIMURA, S.; EBISU, S.; OKADA, H. Local ofloxacin delivery using a controlled-release insert (PT-01) in the human periodontal pocket. **J. Periodontal Res.**, v.25, p.1-5, 1990.
- HOOG, E. H. A.; TROMP, R. H. On the phase separation kinetics of an aqueous biopolymer mixture in the presence of gelation: the effect of the quench depth and the effect of the molar mass. **Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 213 (2-3), p. 221- 234, 2003.
- HOOGENDAM, C. W.; KEIZER, A.; STUART, M. A. C.; BIJSTERBOSCH, B. H.; SMIT, J. A. M.; DIJK, J. A. P. P.; HORST, P. M.; BATELAAN, J. G. Persistence length of carboxymethyl cellulose as evaluated from size exclusion chromatography and potentiometric titrations. **Macromolecules**, v. 31, p. 6297-6309, 1998.
- JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharm. Res.**, v. 10 (8), p. 1115-1122, 1993.
- JONES, A. A.; KORNMAN, K. S.; NEWBOLD, D. A.; MANWELL, M. A. Clinical and microbiological effects of controlled release locally delivered minocycline in periodontitis. **J. Periodontol.**, v.65, p. 1058-1066, 1994.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; O'NEILL, M. J. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: in vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. **J. Control. Release**, v.49, p.71-79, 1997.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J.; COUTLER, A. Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. **Pharm. Res.**, v.13, p.1734-1738, 1996.

JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S.; SUOMALA, P.; SUMMANEN, P. Activity of metronidazole and its hydroxyl metabolite against clinical isolates of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.3, p.32-34, 1988.

KALACHANDRA, S.; DONGMING, L.; OFFENBACHER, S. Controlled drug release for oral condition by a novel device based on ethylen vinyl acetate (EVA) copolymer. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 13, p.53-58, 2002.

KAR, F.; ARSLAN, N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. **Carbohydr. Polym.**, v. 40 (4), p. 277-284, 1999.

KELLY, H. M.; DEASY, P. B.; ZIAKA, E.; CLAFFEY, N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. **Int. J. Pharm.**, v.274, p.167-183, 2004.

KITA, R.; KAKU, T.; KUBOTA, K.; DOBASHI, T. Pinning of phase separation of aqueous solution of hydroxypropylmethylcellulose by gelation. **Phys. Lett. A**, v. 259 (3-4), 302-307, 1999.

KLINGE, B.; ATTSTRÖM, R.; KARRING, T.; KISCH, J.; LEWIN, B.; SOLTZE, K. 3 regiments of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults. **J. Clin. Periodontol.**, v.19 p.708-714, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 49, p. 1-9, 2000a.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for $\dot{U} - 3$ unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **J. Microencapsulation**, v. 18 (3), p. 347-357, 2001.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Visualisation and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CSLM). **Int. J. Pharm.**, v. 196, p. 223-226, 2000b.

LANEUVILLE, S. I.; SANCHEZ, C.; TURGEON, J.; HARDY, J.; PAQUIN, P. Small angle static light scattering study of mixtures under shear. In: DICKSON, E. **Food Colloids: Interactions, Microstructure and Processing**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005, p. 443-465.

- LARSEN, T. In vitro release of doxycycline from bioabsorbable materials and acrylic strips. **J. Periodontol.**, v.61, p.30-34, 1990.
- LATHA, M. S.; JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde cross-linked bovine casein microspheres as a matrix for the controlled release of theophylline: in-vitro studies. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.46, p. 8-13, 1994.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. A estrutura tridimensional das proteínas. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1995b. Cap. 7, p. 118-146.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1995a. Cap. 11, p. 222-241.
- LIU, D. Z.; CHEN, W. P.; LEE, C. P.; WU, S. L.; WANG, Y. C.; CHUNG, T. W. Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. **J. Microencap.**, v.21, p.643-652, 2004.
- LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Petin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, p. 3333-3343, 2003.
- LOESCHE, W. J.; GIORDANO, J.; SOEHREN, S.; HUTCHINSON, R.; RAU, C. F.; WALSH, L.; SCHORK, M. A.; ARBOR, A. Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 81, p. 533-543, 1996.
- LOESCHE, W. J.; SYED, S. A.; SHMIDT, E.; MORRISON, E. C. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 56, p.447-456, 1985.
- LOPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTIERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **J. Periodontol.**, v.73, p. 911-924, 2002.
- LORÉN, N.; HERMANSSON, A-M. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 27 (4), p. 249-262, 2000.
- MAHESHWARI, M.; MIGLANI, G.; MALI, A.; PARADKAR, A.; YAMAMURA, S.; KADAM, S. Development of tetracycline-serratiopeptidase-containing periodontal gel: formulation and preliminary clinical study. **AAPS PharmSciTech**, v. 7 (3), article 76, 2006.
- MAROZIENE, A.; De KRUIF, C. G. Interaction of pectina and casein micelles. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.391-394, 2000.
- MATHEW, M.; DAS GUPTA, V.; BETHEA, C. Stability of metronidazole benzoate in suspensions. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 19, p. 31-34, 1994.

- MATIA-MERINO, L.; LAU, K.; DICKINSON, E. Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 18 (2), p. 271-281, 2004.
- MEDLICOTT, N. J.; RATHBONE, M. J.; TUCKER, I. G.; HOLBOROW, D. W. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.13, p.181-203,1994.
- MEKHLOUFI, G.; SANCHEZ, C.; RENARD, D.; GUILLEMIN, S.; HARDY, J. pH-Induced structural transitions during complexation and coacervation of β -lactoglobulin and acacia gum. **Langmuir**, v. 21 (1), p. 386-394, 2005.
- MINABE, M.; UEMATSU, A.; NISHIJIMA, K.; TOMOMATSU, E.; TAMURA, T.; HORI, T.; UMEMOTO, T.; HINO, T. Application of a local drug delivery system to periodontal therapy. I. Development of collagen preparations with immobilized tetracycline. **J. Periodontol.**, v.60, p.113-117, 1989.
- MORRIS, G. A. The self-assembly and structure of caseins in solution. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, vol 19, p. 357-376, 2002.
- MULLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, v. 93, p. 165-171, 1983.
- MUNDARGI, R. C.; SRIRANGARAJAN, S.; AGNIHOTRI, S. A.; PATIL, S. A.; RAVINDRA S.; SETTY, S. B.; AMINABHAVI, T. M. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies. **J. Control. Release**, v. 119 (1), p.59-68, 2007.
- NAIRN, J. G. Coacervation-phase separation technology. In: GAUDERTON, B.; JONES, T.; MCGINITY, J. **Advances in Pharmaceutical Science**, Elsevier Science & Technology: London, 1995, p. 93-219.
- NAKAGAWA, T.; YAMADA, S.; OOSUKA, Y.; SAITO, A.; HOSAKA, Y.; ISHIKAWA, K.; OKUDA, K. Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocline[®]) following scaling and root planning in recurrent periodontal pockets. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v. 32, p. 63-70, 1991.
- NAKAJIMA, A.; SATO, H. Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyninyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. **Biopolymers**, v. 10, p. 1345-1355, 1972.
- NELSON, B. K.; BARBANO, D. M. A microfiltration process to maximize removal of serum proteins from skim milk before cheese making. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 1891-1900, 2005.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram

sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9 (6) p. 255-262, 1988.

NEWMAN, H. N. Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 17, p.533-41, 1990.

NOGUCHI, T.; IZUMIZAWA, K.; FUKUDA, M.; KITAMURA, S.; SUZUKI, Y.; IKURA, H. New method for local drug delivery using resorbable base material in periodontal therapy. **Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.**, v. 31, p.145-153, 1984.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRÖM, S; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.19, p.687-692, 1992.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. **J. Food Sci.**, v. 49, p. 1093-1098, 1984.

OFFENBACHER, S.; KATZ, V.; FERTIK, G., et al. Periodontal infection as a possible risk factor for pre-term low birth weight. **J. Periodontol.**, v.67, p.1103-13, 1996.

OFFENBACHER, S.; MADIANOS, P. N.; CHAMPAGNE, C. M. E. et al. Periodontitis atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. **J. Periodontol. Res.**, v.34, p.346-352, 1999.

ONUKE, A. Effects of shear flow and viscosity difference on phase separation. **Int. J. Thermophys.**, v. 16 (2), p. 381-390, 1995.

OULD ELEYA, M. M.; TURGEON, S. L. The effects of pH on the rheology of β -lactoglobulin / κ -carrageenan mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 245-251, 2000.

OVERBEEK, J. T. G.; VOORN, M. J. Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. **J. Cell. Comp. Physiol.**, v. 49 (1), p. 7-26, 1957.

PALMIERI, G. F.; LAURI, D.; MARTELLI, S.; WEHRLE, P. Methoxybutropate microencapsulation by gelatin – acacia complex coacervation. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 25 (4), p. 399-407, 1999.

PALMIERI, G. F.; MARTELL, S.; LAURI, D.; WEHRLE, P. Gelatin – Acacia complex coacervation as a method for ketoprofen microencapsulation. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 22 (9-10), p. 951-957, 1997.

PANOUILLE, M.; DURAND, D.; NICOLAI, T.; LARQUET, E.; BOISSET, N. Aggregation and gelation of micellar casein particles. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 287, p. 85-93, 2005.

PARK, J. M.; MUHOBERAC, B. B.; DUBIN, P. L.; XIA, J. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. **Macromolecules**, v. 25, p. 290-295, 1992.

- PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M.; KARRING, T. Comparative clinical and microbiological effects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.19, p.715-722, 1992.
- PEREYRA, R.; SCHMIDT, K. A.; WICKER, L. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45 (9), p. 3448-3451, 1997.
- PERRY, D. A.; BEENSTERBOER, P. L. Tissues of the periodontium. In: PERRY, D.A.; BEENSTERBOER, P.L.; TAGGART, E.J. **Periodontology for the dental hygienist**. 1. ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1996. Cap. 2, p. 19-29.
- PIÑÓN-SEGUNDO, E.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALONSO-PÉREZ, V.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. **Int. J. Pharm.**, v. 294, p.217-232, 2005.
- PITCHER, G. R.; NEWMAN, H. N.; STRAHAN, J. D. Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation. **J. Clin. Periodontol.**, v.7, p.300-308, 1980.
- REDIGUIERI, C. F.; FREITAS, O.; LETTINGA, M. P.; TUINIER, R. Thermodynamic incompatibility and complex formation in pectin/caseinate mixtures. **Biomacromolecules**, v. 8 (11), p. 3345-3354, 2007.
- SALVI, G. E.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. PGE2, IL-16, and TNF responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. **Ann. Periodontol.**, v.3(1), p. 40-50, 1998.
- SANCHEZ, C.; MEKHLOUFI, G.; SCHMITT, C.; RENARD, D.; ROBERT, P.; LEHR, C.M.; LAMPRECHT, A. HARDY, J. Self-assembly of β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous solvent: structure and phase-ordering kinetics. **Langmuir**, v. 18 (26), p. 10323-10333, 2002.
- SANTINHO, A. J. P.; PEREIRA, N. L.; FREITAS, O.; COLLETT, J. H. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 186, p.191-198, 1999.
- SAUVETRE, E.; GLUPEZYNSKY, Y.; LABBE, M.; YOURASSOWSKY, E.; POURTOIS, M. The effect of clindamycin gel insert in periodontal pockets, as observed on smears and cultures. **Infection**, v.21, p.245-7, 1993.
- SCHMIDGALL, J.; HENSEL, A. Bioadhesive properties of polygalacturonides against colonic epithelial membranes. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 30, p. 217- 225, 2002.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; LAMPRECHT, A.; RENARD, D.; LEHR, C.M.; DE KRUIF, K.G.; HARDY, J. Study of β -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. **Colloids Surf. B: Biointerface**, v. 20 (3), p. 267-280, 2001.

- SCHMITT, C.; SANHEZ, D.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.38 (8), p.689-753, 1998.
- SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; MONTI, A.; BARR, J.; HELLER, J.; GURNY, R. Optimization of a novel bioerodible device based on auto-catalyzed poly(ortho esters) for controlled delivery of tetracycline to periodontal pocket. **Biomaterials**, v. 22, p. 1659-1666, 2001.
- SEYMOUR, R. A.; HEASMAN, P. A. Dental plaque and calculus. In: SEYMOUR, R. A.; HEASMAN, P. A. **Drugs, diseases, and the periodontium**. New York: Oxford University Press, 1992. Cap.2, p.11-18.
- SHEN, H.; FREY, D. D. Effect of charge regulation on steric mass-action equilibrium for the ion-exchange adsorption of proteins. **J. Chromatogr. A**, v. 1079, p. 92-104, 2005.
- SILVA, C. Q. **Desenvolvimento de filmes adesivos para aplicação em bolsas periodontais: avaliação do perfil de liberação do metronidazol**. 2005, 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- SILVA, F. L. B.; LUND, M.; JÖNSSON, B.; AKESSON, T. On the complexation of proteins and polyelectrolytes. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 4459-4464, 2006.
- SINGH, O. N.; BURGESS, D. J. Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 41, p. 670-673, 1989.
- SINHÁ, V. R.; KUMRIA, R. Microbially triggered drug delivery to the colon. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 18, p. 3–18, 2003.
- SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 6, p.351-382, 1979.
- SMART, J. D.; KELLAWAY, I. W.; WORTHINGTON, H. E. C. An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 36, p. 295–299, 1984.
- SOSKOLNE, W. A.; CHAJEK, T.; FLASHNER, M.; LANDAU, I.; STABHOLTZ, A.; KOLATCH, B.; LERNER, E.I. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.1017-1021, 1998.
- SOSKOLNE, W. A.; FREIDMAN, M. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: RATHBONE, M.J. **Oral mucosal drug delivery**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. Cap. 14, p. 359-379.
- SOUTHARD, G. L.; GODOWSKI, K. C. Subgingival controlled release of antimicrobial agents in the treatment of periodontal disease. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 9, p. 239–253, 1998.

- STABHOLZ, A.; KETTERING, J.; APRECIO, R.; ZIMMERMAN, G.; BAKER, P. J.; WIKESJO, U. M. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, p.557-562, 1993.
- STANLEY, A.; WILSON, M.; NEWMAN, H. N. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. **J. Clin. Periodontol.**, v.16, p.259-264, 1989.
- STEIN, S. H.; HART, T. E.; HOFFMAN, W. H.; HENDRIX, C. L.; GUSTKE, C. J.; WATSON, S. C. Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in type 1 diabetic peripheral B lymphocytes. **J. Periodontol. Res.**, v. 32(1), p.189-95, 1997.
- STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M. Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental diseases. In: TYLE, P. (ed.). **Drug Delivery Devices**. New York: Marcel Decker, 1988. p. 491-515.
- STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLNE, A.; SELA, M. N. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease. In vitro release study. **J. Periodontol.**, v.61, p.393-398, 1990.
- STOLTZE, K. Concentration of metronidazole in periodontal pockets after application of a metronidazole 25% dental gel. **J. Clin. Periodontol.**, v.19, p.698-701, 1992.
- SUTTER, V. L.; JONES, M. J.; GHONEIM, A. T. M. Antimicrobial susceptibilities of bacteria associated with periodontal disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.23, p. 483-486, 1983.
- TAINAKA, K. Effect of counterions on complex coacervation. **Biopolymers**, v. 19, p. 1289-1298, 1980.
- TAINAKA, K. Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. salt free systems. **J. Phys. Soc. Jpn.**, v. 46 (6), p. 1899-1906, 1979.
- TAKEDA, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Microencapsulation and bioavailability in beagle dogs of indomethacin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 29 (1), p. 264-267, 1981.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Y. Electrophoretic properties of sulfamethoxazole microcapsules and gelatin – acacia coacervates. **J. Pharm. Sci.**, v. 70, p. 302-305, 1981.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Y. Micromeritic properties of sulfamethoxazole microcapsules prepared by gelatin – acacia coacervation. **J. Pharm. Sci.**, v. 69 (5), p. 513-516, 1980.
- THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - a review. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v.37, p. 47-73, 1997.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Food as dispersed systems: thermodynamic aspects of composition-property relationships in formulated food. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 61, p. 397-409, 2000.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of food protein and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, v.4, p. 429-468, 1991.

- TOLSTOGUZOV, V. B. Protein-polysaccharide interactions. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Decker, 1997, p. 171-198.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing into foodstuffs. **Food Hydrocolloids**, v. 2, p. 339-370, 1988.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Texturising by phase separation. **Biotechnol. Adv.**, v. 26, p. 626-628, 2006.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, food and beverages. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 22 (2), p.89-174, 2002.
- TOMOTAKE, H.; OKUYAMA, R.; KATAGIRI, M.; FUZITA, M.; YAMATO, M.; OTA, F. Comparison between Holstein cow's milk and Japanese-Saanen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility and protein profile. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70 (11), p. 2771-2774, 2006.
- TROMP, R. H.; DE KRUIF, C. G.; VAN EIJK, M.; ROLIN, C. On the mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin. **Food Hydrocolloids**, v.18 (4), p. 565-572, 2004.
- TROMP, R. H.; DE KRUIF, C. G.; VAN EIJK, M.; ROLIN, C. On The mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.565-572, 2002.
- TROMP, R. H.; VAN DE VELDE, F.; RIEL, J.; PAQUES, M. Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. **Food Res. Int.**, v. 34 (10), p. 931-938, 2001.
- TUINIER, R.; ROLIN, C.; DE KRUIF, C. G. Eletroabsorption of pectin in to casein micelles. **Biomacromolecules.**, v. 3, p. 632-638, 2002.
- TUINIER, R.; DHONT, J. K. G.; DE KRUIF, C. G. Depletion-induced phase separation of aggregated whey protein colloids by an exocellular polysaccharide. **Langmuir**, v. 16 (4), p. 1497-1507, 2000.
- TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 8(4-5), p. 401-414, 2003.
- TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 12, p. 166-178, 2007.
- VAN DER SCHOOT, P. Protein-Induced Collapse of Polymer Chains. **Macromolecules**, v. 31, p. 4635-4638, 1998.
- VEIS, A.; ARANYI, C. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatine. **J. Phys. Chem.**, v. 64, p. 1203-1210, 1960.

- VERHAEGH, N. A. M.; VAN BLAADEREN, A. Dispersions of rhodamine-labeled silica spheres: synthesis, characterization, and fluorescence confocal scanning laser microscopy. **Langmuir**, v. 10, p. 1427-1438, 1994.
- VRIES, R. Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point. **J. Chem. Phys.**, v. 120, p. 3475-3481, 2004.
- VRIES, R.; STUART, M. C. Theory and simulations of macroion complexation. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 11, p. 295- 301, 2006.
- VRIJ, A. Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions. **Pure Appl. Chem.**, v. 48 (4), p. 471- 483, 1976.
- WAKERLY, Z.; FELL, J. T.; ATTWOOD, D.; PAKKINS, D. Studies on amidated pectins as potential carries in colonic drug delivery. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, p. 622-625, 1997.
- WALKER, C.; KARPINIA, K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 1188-1196, 2002.
- WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Dairy Foods**, v. 73 (8), p.1965-1979, 1990.
- WANG, L. C.; CHE, X. G.; ZHONG, D.; XU, Q. C. Study on poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan blend film as local drug delivery system. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 18 (6), p. 1125-1133, 2007.
- WANG, S.; VAN DIJK, J. A. P. P.; ODIJK, T.; SMIT, J. A. M. Depletion-induced demixing in aqueous protein-polysaccharide solutions. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1080-1088, 2001.
- WEINBRECK, F. **Whey protein/polysaccharide coacervates: structure and dynamics**. 2004. 198 f. Tese de Doutorado – University of Utrecht, Utrecht, 2004.
- WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey protein and gum arabic. **Biomacromolecules**, v. 4 (2), p. 293-303, 2003.
- WOLFF, J. DAHLEN, G. AEPPLI, D. Bacteria as risk markers for periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 498-510, 1994.
- YEWEY, G. L.; DUYSEN, E. G.; COX, S. M.; DUNN, R. L. Delivery of proteins from a controlled release injectable implant. In: SANDERS, L. M.; HENDREN, R. W. **Protein delivery**. New York: Plenum Press, 1997. Cap.3, p.93-117.
- YU, Z.; RAMAMURTHY, N. S.; LEUNG, M.; CHANG, K. M.; NAMARA, T. F.; GOLUB, L.M. Chemically-modified tetracycline normalizes collagen metabolism in diabetic rats: a dose-response study. **J. Periodontal Res.**, v. 28, p. 420-428, 1993.
- YUE, I. C.; POFF, J.; CORTÉS, M. E.; SINISTERRA, R. D.; FARIS, C. B.; HILDGEN, P.; LANGER, R.; SHASTRI, V. P. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. **Biomaterials**, v. 25, p. 2743-2750, 2004.

ANEXO

Thermodynamic Incompatibility and Complex Formation in Pectin/Caseinate Mixtures

Camila F. Redigueri,[†] Osvaldo de Freitas,[†] M. Paul Lettinga,[‡] and Remco Tuinier^{*‡}

Department of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (FCFRP-USP), Av. Do café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil, and Institut für Festkörperforschung, Forschungszentrum Jülich, Weiche Materie, 52425 Jülich, Germany

Received April 24, 2007; Revised Manuscript Received August 27, 2007

The instability of polysaccharide/protein mixtures occurs because of either thermodynamic incompatibility or complexation. We studied which instability mechanism dominated given the external conditions. Therefore the effect of temperature, pH, and biopolymer concentration on the phase separation of pectin/caseinate mixtures was investigated. At pH > 6, thermodynamic incompatibility with spinodal decomposition was observed in pectin/caseinate mixtures resulting in the formation of water-in-water emulsions in intermediate stages of the phase separation process. The demixing rate of these emulsions and appearance of two macroscopic phases (lower phase enriched with caseinate and upper phase with pectin) was retarded when the pectin concentration increased or when the storage temperature decreased due to a higher viscosity of the mixtures at those conditions. As the pH of the mixture was lowered below 6, pectin accumulated in the caseinate-rich phase. Complexation of pectin and caseinate led to the formation of microparticles ($\sim 3 \mu\text{m}$), whose shape depends on the biopolymer concentration ratio and rate of acidification. These pectin/caseinate particles do not coalesce and are insensitive to salt addition.

1. Introduction

Aqueous mixtures of polysaccharides and proteins are usually unstable above a certain biopolymer concentration and phase-separate either because of repulsive (segregative) or attractive (associative) interactions.^{1–4} In the first case, also called thermodynamic incompatibility, the two biopolymers do not carry opposite net charges, and after stirring is stopped, the dispersion separates into two phases, each enriched by one of the polymers. In the case of complexation, the two biopolymers attract each other because they carry opposite charges, and after demixing, the system consists of a phase containing biopolymer complexes and another phase consisting mainly of solvent. We demonstrate that both types of phase instabilities can be found in aqueous mixtures of pectins and caseinates.

Because of the wide applicability of polysaccharide/protein mixtures, the interest in identifying interactions between them has been growing to provide optimum food quality, in terms of texture and stability, and also innovative products in cosmetic and pharmaceutical industries.

Pectin is an anionic linear polysaccharide extracted from citrus peel or apple pomace. Its chemical structure is mainly characterized by D-galacturonic acid units linked together by α -(1–4) glycosidic linkages, occasionally interrupted by α -(1–2) L-rhamnopyranosyl residues. Caseinates are milk proteins whose monomers are complex amphiphilic copolymers with a strong tendency for micellar self-assembly. In milk, caseins are associated with calcium phosphate forming casein micelles (diameter $\approx 200 \text{ nm}$).⁵ After removing calcium phosphate, casein micelles dissociate into casein monomers and/or casein submicelles.⁶

Mixtures of pectin and casein(ate) in aqueous solution are known to be incompatible at pH 6.5 above a certain biopolymer

Figure 1. Image of the SDS-PAGE gel with separated sodium caseinate fractions.

concentration.⁷ At lower pH values, pectin has been used to stabilize acidified dairy beverages due to pectin adsorption onto casein micelles, preventing the aggregation of casein micelles during the acidification process. Much has been published about the interaction of pectin with casein micelles in acidified milk drinks,^{8–11} but very few studies were done on pectin/caseinate mixtures at low pH's in calcium-free aqueous solutions.^{12,13} None of them, however, used pectin concentrations above 1 wt %, because their interest was focused on milk drink stabilization and that requires just small amounts of pectin.

In this work we study the phase behavior of aqueous pectin plus caseinate mixtures in a wide pH and biopolymer concentra-

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: r.tuinier@fz.juelich.de.

[†] University of São Paulo.

[‡] Forschungszentrum Jülich.

Figure 2. Phase diagram of pectin/casein mixtures at pH 7 in 0.01 M phosphate buffer: diamonds, binodal points; circles, initial concentrations; square, critical point; thick full curve, binodal; thin full line, tie-lines. Images show mixtures with different volumes of polymer phases for the same tie-line: upper, 75% pectin/25% caseinate; middle, 50% pectin/50% caseinate; lower, 25% pectin/75% caseinate. Bright areas correspond to the pectin-rich phase.

tion range. This enables optimizing the use of pectin/caseinate mixtures in applications (see below). Therefore, a phase diagram was obtained at high pH's, where thermodynamic incompatibility takes place, to determine the concentrations where stable and unstable mixtures can be found. Inside the unstable region, water-in-water emulsions were formed, and the stability of these emulsions was investigated as a function of biopolymer concentration and storage temperature. At low pH's, we investigated the complex formation between pectin and caseinate and the conditions to obtain large spherical particles of the complex. The process to obtain such particles, which is simple and performed in mild conditions, could be used as a microencapsulation technique for pharmaceutical compound encapsulation or for encapsulation of flavors and odors in food products. The advantage of working with pectin and caseinate is that they are biodegradable polymers with recognized alimentary use and no toxic effects in their utilization are expected.

2. Materials and Methods

2.1. Materials. High methoxy citrus pectin GENU type USP-B with a 68% degree of esterification was kindly donated by CP Kelco Limeira, Brazil. CP Kelco indicates that the molar mass is between 110 and 130 kg/mol. Commercial bovine milk sodium caseinate was a gift from Kauffmann & Co., Germany. The caseinate powder contains 92–94% protein and has a maximum humidity of 12%. Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) and rhodamine B were purchased from Sigma-Aldrich, and dibutyltin dilaurate and pyridine from Fluka. All of the other reagents used in this study were of analytical grade.

2.2. Methods. **2.2.1. Casein Characterization.** A semiquantitative characterization of casein was performed using the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique, according to the method of Laemmli¹⁴ in a discontinuous gel system composed of 5% and 12.5% acrylamide stacking and running gels, respectively. Sodium caseinate solution at pH 7 was diluted in 0.025 M Tris-HCl buffer pH 6.8 containing 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue, and 0.2 M

dithiothreitol (DTT) and boiled for 5 min at 100 °C. Samples with 40, 20, and 10 mg of protein were loaded into a vertical electrophoresis cell (Hoefer SE 600, Amersham Biosciences) at 12 mA and ran until the dye front reached the bottom of the gel. The electrode buffer was 0.025 M Tris-HCl pH 6.8, 0.192 M glycine, and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The gel was stained with Coomassie brilliant blue G-250. First it was incubated for 1 h in a 40% (v/v) ethanol and 10% (v/v) acetic acid solution and then immersed for 12 h in 0.1% w/v Coomassie G-250, 2% w/v phosphoric acid, 10% w/v ammonium sulfate, and 20% v/v methanol. For destaining, 25% v/v methanol was used, and the images were acquired with ImageScanner II (Amersham Biosciences).

2.2.2. Labeling. To visualize pectin and caseinate with confocal scanning light microscopy (CLSM), they were labeled with fluorescent dyes. Pectin was labeled covalently with FITC according to the procedure described by Tromp et al.¹⁵ Pectin (1 g), FITC (0.14 g), pyridine (400 μ L), and dibutyltin dilaurate (80 μ L) were dissolved in 100 mL of dimethylsulfoxide (DMSO). The reaction mixture was heated for 4 h at 100 °C, poured into isopropyl alcohol (400 mL), and centrifuged for 55 min at 9500g at 20 °C. Subsequently, the polysaccharide sample was redissolved in 200 mL of hot water and dialyzed against 0.1 M NaCl solution (4 $\times$ 4 L) and distilled water (2 $\times$ 4 L). In this manner an excess of unbound dye and salt was removed. After that, the sample was freeze-dried.

To calculate the number of FITC molecules per galacturonic acid molecule, first a calibration curve for FITC was constructed. An amount of 10 mg of FITC was dissolved in 100 mL of DMSO. Dilutions of this solution in 0.01 M phosphate buffer were used to construct the calibration curve, measured at a wavelength of 490 nm, from which the molar extinction coefficient (ϵ) was calculated, giving $\epsilon = 73\,789\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. To determine the number of dyes per pectin monomer, we dissolved a known amount of pectin–FITC in buffer and detected the absorption of the solution at 490 nm. The dye concentration then follows from absorption plus the obtained extinction coefficient. We found that each milligram of labeled pectin contained 20.45 μ g of FITC. Considering that pectin mainly consists of galacturonic acid monomers with a molar mass close to 200 g/mol, the number of FITC molecules/galacturonic acid molecules was estimated to be about 0.01. The fact

Figure 3. Effect of temperature on the phase diagram of the pectin/caseinate mixtures at pH 7. Samples were incubated at 45 °C (triangles, two series of experiments), 20 °C (x), and 5 °C (+).

that we have only one dye molecule per hundred sugar monomers and that the phase behavior does not change with the small amount of labeled pectin used implies that we cannot expect large effects of labeled pectin on the physical properties.

Caseinate was labeled noncovalently with rhodamine B by adding one drop of a 0.02% solution to 10 mL of biopolymer mixture.

2.2.3. Phase Diagram Determination. Pectin and sodium caseinate were dispersed separately in 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 containing 0.03 wt % sodium azide (NaN_3) to prevent bacterial contamination. Stock solutions of 1.76 wt % pectin and 10 wt % caseinate were used to prepare mixtures as to establish the phase diagram. Equal volumes of the diluted solutions were mixed, and the pH was adjusted to 7.0 with 4 M NaOH. One gram of the mixtures was weighed in glass tubes and left overnight to phase-separate at 45 °C. The concentrations of the biopolymers in both phases were determined spectrophotometrically. Two series of samples were prepared, one containing labeled pectin (50 mg of pectin-FITC/g of unlabeled pectin) and another with only unlabeled pectin for caseinate quantification. No difference of the phase volumes was observed between the labeled and the unlabeled samples. To measure pectin and caseinate concentrations, calibration curves for the two polymers were constructed at pH 7.0. The absorbance values were taken at a wavelength of 490 nm for pectin-FITC ($\epsilon = 0.21 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). To quantify the amount of caseinate, the Bradford reagent was used,¹⁶ and the absorbance values were taken at 595 nm, where $\epsilon = 0.63 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

The most upper tie-line in the phase diagram was obtained from solutions of 6 wt % pectin and 6 wt % caseinate. In this case, the phase separation took a long time, and therefore, 1 g of the mixtures were weighed in small vials and centrifuged in a Microfuge18 centrifuge (Beckman Coulter) at 2296g for 1 h. Also, as the lower phase in this sample was very viscous and difficult to pipet, the concentration in that phase was obtained by subtracting the amount of the biopolymers (pectin and caseinate) in the upper phase from the total amount. The volumes were determined by marking the interface position on the outside of the tubes and, after emptying, by weighing the amount of water corresponding to the marked volumes.

2.2.4. Effect of pH on Pectin/Caseinate Mixtures. Equal volumes of 6 wt % pectin and 6 wt % caseinate solutions were mixed, and the pH was adjusted to 8.0 with 4 M NaOH. Under magnetic stirring, the mixture was acidified with 1 M citric acid to various pH values between 8 and 3. At each pH, 5 g of the mixtures were collected and centrifuged in a TJ-25 Centrifuge (Beckman Coulter) at 5000g for 3 h. Again, two series of samples were prepared for quantification of pectin and caseinate in the upper phases (according to subsection 2.2.3). Calibration curves were established at every pH. The concentrations in the lower

Figure 4. Comparison of experimental pectin/caseinate phase diagram (A) at pH 7 with theoretical phase diagram (B) for mixtures of hard spheres plus polymer chains with excluded volume interaction.²⁴ Symbols identify experimental (squares) and a few representative theoretical (circles) binodals connected through tie-lines. The theoretical prediction is also represented in panel A by the thin curve. Asterisks identify the critical points.

Figure 5. Specific viscosity η_{sp} over pectin concentration c as a function of pectin concentration measured at pH 7. The intercept yields the intrinsic viscosity $[\eta]$: measurements, data points; straight line, linear fit at low concentrations.

phase were obtained by subtracting the amount of the biopolymers in the upper phase from the total amount present in the mixture. The volumes were measured as described also in section 2.2.3.

Figure 6. Spinodal decomposition for the 50% pectin/50% caseinate sample. (a) Intensity of the Fourier transform of the fluorescence microscopy images. The open squares represent the data set of intensities taken 0.3 s after mixing, and the stars were data taken 1.7 s after mixing. The insets show the real space (field of view is 400 μm) and Fourier transforms at the indicated times. (b) Structure size ($1/Q_{\text{max}}$) as a function of time.

2.2.5. Stability. The stability of pectin/caseinate mixtures at pH 7.0 with different polymer ratios was studied at 5, 15, 30, and 45 $^{\circ}\text{C}$. One gram of each mixture was weighed in glass tubes and closed to avoid solvent evaporation. The tubes were kept in the thermostatic bath or fridge for 1 week. The samples were checked every 24 h. When the meniscus between the two phases appeared, the sample was considered demixed.

2.2.6. Rheology. Rheological experiments of concentrated samples were performed using a rheometer Rheometric Scientific (Ares) in the controlled strain mode with Couette geometry (bob 32 mm and cup 34 mm). The measurements were made at 5, 15, 30, and 45 $^{\circ}\text{C}$. A solvent trap was used to avoid evaporation.

The intrinsic viscosity of pectin was determined at 25 $^{\circ}\text{C}$ by using an ordinary Ostwald viscosimeter. An amount of 15 mL of each pectin solution, prepared in a phosphate buffer with pH 7, was poured into the viscosimeter. The flow time of the samples was measured at different concentrations (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, and 2 wt %). The dynamic viscosity η follows from the flow time multiplied by the density. The density (ρ) was measured using a pycnometer.

2.2.7. Microscopic Observations. Transmission microscopy and CSLM observations were carried out on a Zeiss Axioplan 2 with a 40 $\times$ oil immersion objective lens. The scanning head was a multipoint confocal scanner VTIinfinity from VisiTech. The excitation lengths for rhodamine and FITC were 568 and 488 nm, respectively. Emission maxima were detected at wavelengths of 625 and 518 nm.

The microscopic observations of the phase separation were done on a Zeiss Axioplan 2 with a 10 $\times$ objective lens. Samples containing

rhodamine were mixed in a vortex, and 50 μL was immediately pipetted on a glass slide. With a spatula, the samples were sheared continuously until the sample was well-mixed, and immediately after cessation of mixing, images were taken sequentially.

Image treatment was done with home-written IDL programs, using the standard IDL Fast-Fourier Transform routine.

3. Results and Discussion

3.1. Casein Characterization. The PAGE traces for caseinate solution, shown in Figure 1, are very similar to already reported bovine casein PAGE profiles.^{17–19} Two major bands appeared after protein separation, which correspond to α_s -casein (approximately 32 kDa) and β -casein (approximately 29 kDa). The amounts of these two fractions were similar. The third fraction, κ -casein, appears as a thin and smooth trace (approximately 27 kDa), indicating a smaller amount. This result agrees with the ratio 4:1:4:1.3 of the fractions $\alpha_s1/\alpha_s2/\beta/\kappa$ generally found for bovine caseins.⁶

3.2. Phase Diagram. When pectin and caseinate are brought together in aqueous solution the mixture may phase-separate into two phases: a lower phase containing mainly protein and an upper phase enriched in polysaccharide. To determine the phase coexistence concentrations at which pectin/caseinate mixtures undergo phase separation we constructed a phase diagram, as shown in Figure 2, at pH 7. The solid curve corresponds to the binodal, which distinguishes the compatible (one-phase) region from the incompatible (two-phase) region in the phase diagram. Below the binodal, pectin/caseinate mixtures are stable. As the concentration of the biopolymers is raised above the binodal, the system starts to phase-separate. The compatible region is, therefore, small compared to the incompatible one, as expected for polysaccharide/protein mixtures²⁰ and according to previous work of Antonov et al.⁷

In the phase diagram the concentrations of the coexisting phases after phase separation are linked by tie-lines. As the mixture is diluted, while taking care that the volumes of the two coexisting phases remain approximately equal, the tie-lines become shorter until the coexisting phase compositions merge at the critical point. At relatively high pectin concentrations along a tie-line, the system is microscopically characterized by droplets of caseinate (dark domains) in a continuous pectin phase (light domains) in Figure 2. If we take the opposite direction toward higher caseinate concentrations, then there is a phase inversion, and pectin droplets become surrounded by a continuous phase enriched in caseinate. At intermediate positions along a tie-line, where the volume fractions of both phases are similar, a bicontinuous system is observed.

A mixture of caseinate and pectin may be considered as a colloid/polymer mixture in a common solvent. At the temperature studied, caseinates (mainly β - and α -caseins) form spherical micelles with a diameter of 30 nm.²¹ Pectin molecules in aqueous solution can be regarded as polymer chains. In case polymers (pectin) do not adsorb onto spherical particles (micellar caseinates), the non-adsorbing polymers are depleted from the regions surrounding the spheres. Such regions are called depletion zones.^{22,23} When the protein particles approach each other sufficiently close, the depletion zones overlap. Thus, the distance between the two spheres is smaller than the diameter of the polymer particles, and therefore no polymers can enter the gap between them. Such a lack of polymers leads to an osmotic pressure imbalance that causes an effective attraction between the spheres. If this attraction is sufficiently strong, then the system will phase-separate; the spheres and non-adsorbing

Figure 7. Time of phase separation at pH 7 at different temperatures: crosses, 24 h; asterisks, 48 h; triangles, 72 h; diamonds, 96 h; squares, 120 h; open circles, 144 h; filled circles, stable until 1 week.

polymers are thermodynamically incompatible. Thermodynamically, the driving force is purely entropic, and therefore, no temperature dependence of the phase coexistence curve is expected in this case. As demonstrated in Figure 3, mixtures incubated at three different temperatures (45, 20, and 5 °C) had similar results for the coexisting phase concentrations after phase separation.

In Figure 4, we compared the experimental coexistence curve for pectin/caseinate mixtures at pH 7 (panel A) to a theoretical prediction²⁴ for mixtures of hard spheres plus polymer chains with excluded volume interaction between the segments (panel B). The theoretical phase diagram is only a function of $q = R_g/a$ with hard sphere radius a and the radius of gyration of the polymer chains R_g . Caseinates are mainly present as spherical micelles with a radius $a \approx 15$ nm.²¹ For the pectin polymers, we have no information of the size of the chains. Therefore, we match the critical point of the theoretical prediction to the experimental critical point. The critical caseinate concentration is close to 40 g/L (Figure 2). The volume fraction ϕ of the spherical micelles can be converted to the caseinate concentration by using the voluminosity of caseinate micelles, being close to 4 mL/g.²¹ We therefore set $q = R_g/a = 1.5$ in the calculations because this corresponds to a critical volume fraction at $\phi = 0.17$. The polymer concentration at the critical point is found in terms of c/c^* , where c^* is the overlap concentration. Theoretically, we find $c/c^* \approx 2$ at the critical point for $q = 1.5$. We thus ensure $c/c^* = 2$ corresponds to the pectin concentration at the critical point determined experimentally, which is 5.6 g/L. This means c^* would be close to 2.7 g/L. Because $c^* \approx 1/[\eta]$, where $[\eta]$ is the intrinsic viscosity, the intrinsic viscosity would be on the order of 0.4 L/g.

We measured the viscosity of the pectins in the solution that we used in the dilute regime. In Figure 5 we plot the specific viscosity over the pectin concentration as a function of pectin

concentration. The intrinsic viscosity $[\eta]$ follows from the intercept and is 0.27 L/g, close to the result of Kar and Arslan.²⁵

We plot the theoretical phase coexistence curve in Figure 3 (panel B), including a few representative tie-lines. The resulting theoretical phase diagram is very similar to the experimental phase diagram, which supports the idea that the phase behavior is only driven by entropic forces. It is noted that a prediction for hard spheres plus ideal (non-interacting) chains looks differently; the binodal then looks more like a $1/x$ decaying function. The main difference between panels A and B is that the experimental tie-lines depend more strongly on caseinate concentrations.

3.3. Kinetics of Phase Separation. The phase separation process can usually be described in terms of two mechanisms: (a) nucleation and growth, for mixtures with concentrations in the metastable region of the phase diagram, between the binodal and spinodal and (b) spinodal decomposition, for mixtures in the unstable region above the spinodal curve. Close to the critical point, where the binodal and spinodal meet, an increase in polymer concentrations directly leads to a transition from the stable region to the spinodal region, without crossing the metastable region. To visualize spinodal decomposition in pectin/caseinate mixtures, samples close to the critical point were investigated with equal volumes of the two phases but also with 75% pectin phase/25% caseinate phase and 25% pectin phase/75% caseinate phase along the same tie-line.

As can be seen in Figure 6, after mixing was stopped structure formation was observed for the 50%/50% sample, which is characteristic of spinodal decomposition. From the interconnected structure seen in the microscopic images (left side of the insets in Figure 6A), we see the formation of the typical interconnected structure, and the Fourier transform of the images shows the appearance of a ring structure, which is typical for spinodally decomposing samples.^{26,27} The peak intensity is found

Figure 8. Viscosity of a pectin/caseinate mixture (30/30 g/L) pH 7 (panel A) and incubation time required for macroscopic phase separation (panel B) as a function of temperature.

at the typical wavelength, which we denoted as $Q_{\max}$. In Figure 6B, the characteristic length scale $1/Q_{\max}$ is plotted as a function of time after cessation of mixing. Shortly after mixing $1/Q_{\max}$ is apparently nearly constant, which is sometimes observed in relatively viscous demixing polysaccharide/protein mixtures.²⁷ Above $t \approx 1$ s, $1/Q_{\max}$ starts to increase significantly with time. In the regime around $t \approx 2$ s, $Q_{\max}$ scales as $1/Q_{\max} \sim t^{0.52}$. For $t \approx 10$ s, $Q_{\max}$ scales as $1/Q_{\max} \sim t^{0.76}$. These scaling exponentials are at variance with theoretical estimates for spinodal decomposition of $1/Q_{\max} \sim t^{1/3}$ and $1/Q_{\max} \sim t^1$ for concentrated mixtures where hydrodynamics dominates, which are both found experimentally.^{28,29}

For the 75%/25% and 25%/75% samples, even after high shear rates, the droplets did not disappear. According to Onuki,³⁰ domains that are more viscous than the continuous phase tend to be closed-shaped because the continuous phase is more easily deformed into extended shapes. Therefore, for those samples, the spinodal decomposition in the very early stages could not be visualized.

3.4. Stability. Pectin and caseinate concentrations strongly affect the phase separation rate of the biopolymer mixture, because the concentration of biopolymers influences both the thermodynamic forces in the mixture and the viscosity of the system. High polymer concentrations increase the thermodynamic incompatibility that induces the phase separation, but, on the other hand, increasing the viscosity decelerates the demixing process. Thus, the combination of both factors

determines the demixing rate. If the biopolymer concentration increases and the phase separation rate slows down, then this is due to the fact that viscous forces dominate, while thermodynamic forces dominate if the phase separation rate goes up.

Figure 7 indicates the time required for macroscopic phase separation of some pectin/caseinate mixtures at four temperatures: 5, 15, 30, and 45 °C. The samples were checked every 24 h for 1 week. It is clear that phase separation is retarded when the polymer concentration in the mixture increases (compare mixtures 20/20, 30/30, and 40/40 g/L). Indeed, when the caseinate concentration is kept constant and the pectin concentration increases, the demixing process is also retarded (see caseinate 10 and 40 g/L). In these cases the increasing viscosity of the mixtures is the dominating factor determining the demixing rate. However, when the pectin concentration is kept constant and the caseinate concentration is increased, the demixing process either slows down (see pectin 20 g/L at 15 °C) or accelerates (pectin 30 g/L at 30 and 45 °C). In the last case the thermodynamic forces dominate with respect to the rheological properties of the system.

In the late stage of spinodal decomposition, phase separation is governed by diffusion of droplets. Because of the high viscosity of concentrated polymer solutions, diffusivity of the droplets in the system decreases with increasing concentration. The low diffusivity consequently reduces the collisions between the droplets. Hence, coalescence slows down, and the demixing process may even become arrested. The effect of gelation on coarsening prevention has been reported in systems containing gelatin^{31–34} and hydroxypropyl methylcellulose.³⁵

Besides biopolymer concentration, another factor that influences the viscosity, and consequently the demixing rate, is temperature. At higher temperatures the demixing process for pectin/caseinate mixtures occurs faster. At 45 and 30 °C the macroscopic phase separation took place within 6 days. At 15 and 5 °C most of the samples were still stable after 1 week.

Figure 8A shows the viscosity of a pectin/caseinate mixture as a function of temperature. A mixture with a composition of 30/30 g/L was chosen for this experiment. The viscosities plotted were viscosities measured at a shear rate of 0.1 s^{-1} . As expected, the viscosity of the mixture increases with decreasing temperature. This change in viscosity is strongly correlated with the demixing duration (Figure 8B). Although viscosity is not the only factor that dictates the phase separation rate, it is clear that it does play an important role. Another factor that in general affects the phase separation rate is the interfacial tension,²⁸ which probably hardly changes with temperature. Depending on the storage temperature, these water-in-water mixtures can be stable for approximately a month.

3.5. Effect of pH on Pectin/Caseinate Mixtures. An interesting finding was made when the pH of the mixture was lowered to 5. Although the viscosity of the mixture was lower at that pH than at pH 7 (Figure 8A), the macroscopic phase separation took much longer (more than a week) at 45 °C. This suggests that the driving force for a segregative phase separation becomes weaker at lower pH values and thermodynamic incompatibility is suppressed. If complexation occurs, then two phases would be seen only after sedimentation of the complexes, and this could take a long time depending on the density and sizes of the complex particles.

To investigate what happens at lower pH's, the concentration of the biopolymers in both phases was measured for a 30/30 g/L mixture at different pH values. First, a mixture was prepared with pH 8, and then, by adding citric acid, the pH was brought down until the desired pH was reached. Figure 9A shows the

Figure 9. (A) Pectin concentration in the lower and upper phases relative to initial pectin concentration in the mixture as a function of pH. (B and C) Lower phase content at different pH values. Panel B refers to the mass ratio of pectin/caseinate, and panel C refers to the total biopolymer (pectin + caseinate) concentration in the lower phase.

Figure 10. Transmission (row A) and CSLM images (rows B and C) of pectin/ caseinate mixtures (30/30 g/L) at different pH values. Rows A and B refer to images of the mixtures just after stirring. Row C refers to images of the lower phases after centrifugation. The scale bar for all images corresponds to 10 μm . Bright areas correspond to pectin-rich phases.

relative concentration of pectin in both the upper and the lower phases compared to the initial concentration as a function of pH.

At high pH values the concentration of pectin in the upper phase is higher than the concentration in the original mixture. In the lower phase, only small amounts of the polysaccharide are found. This reflects a phase separation driven by segregative interactions. As the pH is lowered, the concentration of pectin in the upper phase decreases while the concentration increases in the lower phase. Because the lower phase volume is much smaller than the upper phase volume (it can be 10 times smaller

depending on the pH), the concentration in the lower phase increases strongly with decreasing pH. The crossover point at pH 5.5 indicates that at this pH the concentration of pectin is equal in both phases and that below this point pectin becomes more concentrated in the lower phase. In contrary to pectin, caseinate remained more concentrated in the lower phase independent of the pH. These results suggest that pectin and caseinate concentrate in a single phase below pH 5.5, which is characteristic for complexation.

The reason why at pH > 6 pectin/caseinate mixtures phase-separate is that the polymers repel each other. Under those

Figure 11. CLSM images of pectin/caseinate mixtures at three different points in the phase diagram, before and after acidification. The scale bars correspond to 10 μm . Bright areas correspond to pectin-rich phases.

conditions both pectin, with pK_a 's of carboxylic groups close to 3, and caseinate, with $\text{pI} \approx 4.6$, carry negative charges, which makes repulsive electrostatic and excluded volume interactions dominant. In that case, incompatibility takes place driven by depletion forces. However, as the pH of the mixture is lowered, caseinate becomes less negative. Even though the protein carries a net negative charge above the pI , the presence of regions on the caseinate molecules that are positively charged even at high pH's can attract the negatively charged pectins. This attraction becomes stronger with decreasing pH below the isoelectric point, when the amphoteric caseinate becomes positively charged.

Figure 10 shows images of the 30/30 g/L mixture in transmission and confocal microscopy. At pH's 7 and 6 the mixtures (rows A and B) consisted of caseinate-rich droplets in a pectin-rich continuous phase. At pH 5.5 confocal contrast is negligible, which means that the concentration of pectin in the droplets and in the continuous phase becomes similar. This agrees with the results of Figure 9A where the upper phase concentration curve meets the lower phase close to pH 5.5. Further lowering of the pH (pH 5) pushes more pectin into the droplets, and they become brighter than the outside medium. The "migration" of pectin from the continuous phase to the particles explains the lower viscosity of the mixture at pH 5 compared with pH 7 (Figure 8A).

Images of the lower phases after phase separation (Figure 10C) were also investigated. At pH 7, the lower phase was mainly caseinate-enriched with some small pectin-rich droplets. At pH 6, the lower phase was not a continuous phase but rather caseinate-rich particles interconnected by pectin-rich areas, indicating that coalescence was prevented. At pH 5.5 contrast nearly vanishes, while particles become distinguishable again at pH 5. Figures 9B and 9C show the lower phase content at different pH values. In panel B, we see that the mass ratio of pectin/caseinate increases with decreasing pH. At pH 6, although pectin is not concentrated in the particles, the amount in the lower phase increases because it stays entrapped between the particles (Figure 10C). This causes an increase in the volume of the lower phase, which explains the reduction of total biopolymer concentration in the lower phase at that pH (Figure 9C). Visual observations of the mixtures also indicate that complexation occurs at pH values smaller than 6. Between pH 8 and 6.5, the mixture was transparent and so were the two phases after demixing. Starting from pH 6, the mixture became

more turbid, and at pH 5 it was opalescent white, indicating the presence of insoluble matter (complexes). At this point, the bottom phase after centrifugation was solid and not liquid as for high pH mixtures.

The slow acidification of polysaccharide/protein mixtures from a pH where no associative interaction occurs has been performed before by using glucono- δ -lactone (GDL) to study electrostatic adsorption of pectins onto casein micelles in milk¹⁰ and electrostatic complexation between β -lactoglobulin and xanthan,³⁶ β -lactoglobulin and pectins,³⁷ and β -lactoglobulin and Acacia gum.³⁸ However, the use of xanthan or pectins as polyanionic biopolymers did not induce the formation of coacervates but resulted in rather small¹⁰ or fractal aggregates with fractal dimensions in the range of 1.7–2.5.³⁷ Liquid droplets or vesicles were observed only with acacia gum.^{39,40}

In our case, spherical particles $\sim 3 \mu\text{m}$ in diameter were obtained after lowering the pH slowly (~ 1 drop of citric acid/min) from 7 to 5 for mixtures with high pectin concentrations (Figure 11, situation A). When the pH was lowered fast (a single drop of citric acid/s), the particles lost sphericity. It seems that pectin needs time to diffuse into the droplets and adsorb onto micellar caseinates and stabilize them. When the acidification is performed rapidly, not all micelles become stabilized by pectin molecules, and some of them aggregate, resulting in nonspherical particles. This also happens when the concentration of pectin in the mixture is reduced (Figure 11, situations B and C). In such cases, the amount of pectin is insufficient to stabilize all caseinate micelles, and even with slow acidification, the particles become nonspherical. For samples with volume fractions of 50% (situation C in Figure 11) and 25% pectin/75% caseinate (not shown), the concentration of pectin was, compared to caseinate concentration, low to such a degree that, at pH 5, pectin was still concentrated in the continuous phase (the particles were dark). Because the amount of pectin available to complex with caseinate was so small, caseinates needed to have more positively charged groups (pH below the isoelectric point) to attract more pectin, so that the particles would become more concentrated in pectin than the continuous phase was. It is important to mention that this complexation in pectin/caseinate mixtures is reversible. As the pH is increased again, the pectin molecules migrate from the particles to the bulk phase, and the droplets become flexible and start coalescing as happens at high pH values.

Despite the pH sensitivity, pectin/caseinate complexes are found to be insensitive to salt addition. This contrasts with the behavior of other studies on polysaccharide/protein complexes.^{41,42} Even at high ionic strengths (100 mM NaCl) the particles did not change into soluble complexes or to a segregation of pectin and caseinate. It is a well-known phenomenon that the microions present in the solution screen the charges of the polymers and thus reduce the range of their associative interactions.² In pectin/caseinate complexes, maybe because of the high biopolymer concentration used (total 60 g/L), the amount of microions was below that required for complexation suppression.

Conclusions

In this paper we have shown that pH and biopolymer concentration play an important role in the phase stability of pectin/caseinate mixtures. A phase diagram constructed at pH 7, where both polymers are negatively charged, reveals that the mixture is stable only at small biopolymer concentrations. Higher concentrations lead to phase separation, due to thermodynamic incompatibility, and formation of a water-in-water emulsion. We could confirm that thermodynamic incompatibility occurs at pH > 6, because the phase line in that regime is insensitive to temperature and the observed phase diagram could be rationalized by comparing with theory for a dispersion of hard spheres (mimicking micellar caseinates) plus polymer chains (mimicking pectin polymers) in solution with excluded volume interactions between the segments. Spinodal decomposition was observed in the early stages of the phase separation. The phase separation rate slows down as the concentration of pectin in the system is increased, due to the higher viscosity of those mixtures. Because viscosity changes with temperature, the stability of the emulsions is also dependent on the storage temperature.

When the pH of the incompatible mixture is lowered below 6, complexation takes place, because caseinate then becomes significantly positively charged and attracts the negatively charged pectin molecules, resulting in the formation of large pectin/caseinate particles that are resistant to high ionic strengths. These particles are more spherical at high pectin concentrations and when the acidification is performed slowly, because of better stabilization of micellar caseinates by pectin at these conditions. The complexation process is reversible so that the particles turn into soluble droplets (emulsion) again with increasing pH. This versatility of pectin/caseinate mixtures could be relevant especially for pharmaceutical applications in the field of microencapsulation of active compounds and drug delivery systems. In the particular case of oral administration, where the pH changes from acidic in the stomach to neutral at the intestine, pectin/caseinate particles would be excellent candidates.

Acknowledgment. We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for the financial support of this work and CP Kelco and Kauffmann & Co for samples and supplies. We thank C. G. de Kruif and R. H. Tromp for useful discussions. We thank M. G. McPhie for a critical reading of the manuscript.

References and Notes

- (1) Tolstoguzov, V. B. Functional properties of food protein and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids* **1991**, *4* (6), 429–468.
- (2) Schmitt, C.; Sanchez, C.; Desobry-Banon, S.; Hardy, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, *38* (8), 689–753.
- (3) Doublier, J. L.; Garnier, C.; Renard, D.; Sanchez, C. Protein-polysaccharide interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5* (3), 202–214.
- (4) Turgeon, S. L.; Beaulieu, M.; Schmitt, C.; Sanchez, C. Protein-polysaccharide interactions: Phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8* (4–5), 401–414.
- (5) Kruif, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81* (11), 3019–3028.
- (6) Walstra, P. On the stability of casein micelles. *Dairy Foods* **1990**, *73* (8), 1965–1979.
- (7) Antonov, Yu. A.; Grinberg, V. Ya.; Tolstoguzov, V. B. Incompatibility of proteins and polysaccharides in aqueous media. *Vysokomolek. Soed., Ser. B* **1976**, *18B* (8), 566–569 (in Russian).
- (8) Amice-Quemeneur, N.; Haluk, J. P.; Hardy, J.; Kravtchenko, T. P. Influence of the acidification process on the colloidal stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk. *J. Dairy Sci.* **1995**, *78* (12), 2683–2690.
- (9) Marozienne, A.; de Kruif, C. G. Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids* **2000**, *14* (4), 391–394.
- (10) Tuinier, R.; Rolin, C.; de Kruif, C. G. Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (3), 632–638.
- (11) Tromp, R. H.; de Kruif, C. G.; van Eijk, M.; Rolin, C. On the mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids* **2004**, *18* (4), 565–572.
- (12) Pereyra, R.; Schmidt, K. A.; Wicker, L. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (9), 3448–3451.
- (13) Matia-Merino, L.; Lau, K.; Dickinson, E. Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids* **2004**, *18* (2), 271–281.
- (14) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.
- (15) Tromp, R. H.; Van De Velde, F.; Riel, J.; Paques, M. Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Res. Int.* **2001**, *34* (10), 931–938.
- (16) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (7), 248–254.
- (17) Panouillé, M.; Durand, D.; Nicolai, T.; Larquet, E.; Boisset, N. Aggregation and gelation of micellar casein particles. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287* (1), 85–93.
- (18) Nelson, B. K.; Barbano, D. M. A microfiltration process to maximize removal of serum proteins from skim milk before cheese making. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88* (5), 1891–1900.
- (19) Tomotake, H.; Okuyama, R.; Katagiri, M.; Fuzita, M.; Yamato, M.; Ota, F. Comparison between Holstein cow's milk and Japanese-Saen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility, and protein profile. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2006**, *70* (11), 2771–2774.
- (20) Grinberg, V.; Ya Tolstoguzov, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids* **1997**, *11* (22), 145–158.
- (21) Kruif, C. G. J.; Tuinier, R.; Holt, C.; Timmins, P. A.; Rollema, H. S. Physicochemical study of κ - and β -casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase. *Langmuir* **2002**, *18* (12), 4885–4891.
- (22) Asakura, S.; Oosawa, F. On the interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22* (7), 1255–1256.
- (23) Vrij, A. Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions. *Pure Appl. Chem.* **1976**, *48* (4), 471.
- (24) Aarts, D. G. A. L.; Tuinier, R.; Lekkerkerker, H. N. W. Phase behaviour of mixtures of colloidal spheres and excluded-volume polymer chains. *J. Phys.: Condens. Matter* **2002**, *14*, 7551–7561.
- (25) Kar, F.; Arslan, N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity-molecular weight relationship. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *40* (4), 277–284.
- (26) Dhont, J. K. G. Phase separation kinetics. In *An Introduction to Dynamics of Colloids*; Elsevier: Amsterdam, 1996; Chapter 9.
- (27) Bhat, S.; Tuinier, R.; and Schurtenberger, P. Spinodal decomposition in a food colloid-biopolymer mixture: Evidence for a linear regime. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18* (26), L339.
- (28) Aarts, D. G. A. L.; Dullens, R. P. A.; Lekkerkerker, H. N. W. Interfacial dynamics in demixing systems with ultralow interfacial tension. *New J. Phys.* **2005**, *7*, 40.

- (29) Tuinier, R.; Dhont, J. K. G.; de Kruif, C. G. Depelting-induced phase separation of aggregated whey protein colloids by an exocellular polysaccharide. *Langmuir* **2000**, *16* (4), 1497–1507.
- (30) Onuki, A. Effects of shear flow and viscosity difference on phase separation. *Int. J. Thermophys.* **1995**, *16* (2), 381–390.
- (31) Lorén, N.; Hermansson, A.-M. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27* (4), 249–262.
- (32) Anderson, V. J.; Jones, R. A. L. The influence of gelation on the mechanism of phase separation of a biopolymer mixture. *Polymer* **2001**, *42* (23), 9601–9610.
- (33) Butler, M. F. Mechanism and kinetics of phase separation in a gelatin/maltodextrin mixture studied by small-angle light scattering. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (4), 676–683.
- (34) Hoog, E. H. A.; Tromp, R. H. On the phase separation kinetics of an aqueous biopolymer mixture in the presence of gelation: The effect of the quench depth and the effect of the molar mass. *Colloids Surf., A* **2003**, *213* (2–3), 221–234.
- (35) Kita, R.; Kaku, T.; Kubota, K.; Dobashi, T. Pinning of phase separation of aqueous solution of hydroxypropylmethylcellulose by gelation. *Phys. Lett. A* **1999**, *259* (3–4), 302–307.
- (36) Laneuville, S. I.; Sanchez, C.; Turgeon, J.; Hardy, J.; Paquin, P. In *Food Colloids: Interactions, Microstructure, and Processing*; Dickinson, E., Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U. K., 2005.
- (37) Girard, M.; Sanchez, C.; Laneuville, S.; Turgeon, S. L.; Gauthier, S. F. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: A kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids Surf., B* **2004**, *35* (1), 15–22.
- (38) Mekhloufi, G.; Sanchez, C.; Renard, D.; Guillemin, S.; Hardy, J. pH-Induced structural transitions during complexation and coacervation of β -lactoglobulin and Acacia gum. *Langmuir* **2005**, *21* (1), 386–394.
- (39) Schmitt, C.; Sanchez, C.; Lamprecht, A.; Renard, D.; Lehr, C.-M.; de Kruif, C. G.; Hardy, J. Study of β -lactoglobulin/Acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids Surf., B* **2001**, *20* (3), 267–280.
- (40) Sanchez, C.; Mekhloufi, G.; Schmitt, C.; Renard, D.; Robert, P.; Lehr, C. M.; Lamprecht, A.; Hardy, J. Self-assembly of β -lactoglobulin and Acacia gum in aqueous solvent: Structure and phase-ordering kinetics. *Langmuir* **2002**, *18* (26), 10323–10333.
- (41) Burgess, D. J. Practical analysis of complex coacervate systems. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *140* (11), 227–238.
- (42) Weinbreck, F.; de Vries, R.; Schrooyen, P.; de Kruif, C. G. Complex coacervation of whey protein and gum arabic. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (2), 293–303.

BM7004438