

Incorporación de Inmunoglobulina Y (IgY) en hidrogeles pH-sensibles y su caracterización

Autores:

Natalia Yanina Picco¹, Julia Verona Canova², Romina Valeria Bellingeri³, Fabrisio Eduardo Alustiza⁴, Carlos Eugenio Motta⁵, María Carolina Grosso⁶, Adriana Beatriz Vivas⁷

1 Becaria Postgrado tipo II CONICET, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

2 Estudiante, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

3 Becaria Postgrado tipo II CONICET, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

4 Ayudante de Primera, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

5 Ayudante de Primera, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

6 Doctora, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

7 Doctora, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

E-mail: npicco@ayv.unrc.edu.ar

RESUMEN

La inmunoglobulina Y administrada por vía oral es efectiva, segura y posee una actividad protectora local contra determinados agentes patógenos. Sin embargo, para poder utilizarla como inmunoterapia pasiva, es necesario preservar su función biológica durante el pasaje gástrico. Los hidrogeles han mostrado muy buenas propiedades para la liberación controlada de diferentes moléculas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la incorporación de IgY en hidrogeles pH-sensibles. Se sintetizaron hidrogeles con ácido acrílico y acrilamida (monómeros) y bisacrilamida (entrecruzador) variando las concentraciones de los componentes. Los mismos se caracterizaron determinando su porcentaje de hinchamiento, peso, diámetro y altura. Se determinó el porcentaje de incorporación de la IgY dentro de los hidrogeles. Para completar la caracterización se realizó espectroscopia infrarroja transformada de Fourier. Luego de la incubación en las soluciones a diferentes pH, se observó un aumento del peso, diámetro y altura de los hidrogeles en los pH=5,5 y 7,4 para los 3 grupos analizados. A pH=5,5 y 7,4 los hidrogeles de los 3 grupos se comportaron de manera similar, mostrando porcentajes de hinchamiento cercanos al 100%. El porcentaje de incorporación de la IgY en los hidrogeles fue del 99,2%. El pH=7,4 resultó óptimo para la incorporación de la IgY. Los espectros FTIR evidenciaron que la IgY interactuó con el hidrogel pH-sensible mediante enlaces de hidrógeno prolongados. Los hidrogeles pH-sensibles lograron incorporar la IgY de una manera eficiente, sugiriendo que los mismos podrían ser utilizados para proteger a la IgY durante el pasaje gástrico, cuando es administrada en forma oral para inmunoterapia pasiva.

PALABRAS CLAVE: Hidrogeles pH-sensibles, IgY, inmunoterapia pasiva

INTRODUCCIÓN

Actualmente para la prevención de las enfermedades infecciosas en terneros deslechados, criados artificialmente en guacheras, se busca desplazar o cambiar el uso rutinario de los antibióticos por la administración de otras sustancias alternativas, tales como los anticuerpos aviares (IgY) específicos, obtenidos de la yema de huevo de gallinas inmunizadas contra el o los agentes patógenos causantes de la diarrea (Bilbao *et al.*, 2006; Terzolo *et al.*, 2003). El ejemplo más exitoso del uso profiláctico/terapéutico de productos industriales basados en IgY es la prevención y tratamiento de los terneros contra agentes víricos y bacterianos productores de diarrea (Mine and Kovacs-Nolan 2002 and Kovacs-Nolan and Mine

2004; Zhang *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2007). Debido a la distancia filogenética que existe entre aves y mamíferos, la IgY presenta múltiples ventajas sobre los anticuerpos de mamíferos (Narat, 2003; Carlander 2002; Karlsson *et al.* 2004). Se ha demostrado que la IgY específica administrada por vía oral es efectiva, segura y posee una actividad protectora local contra determinados agentes patógenos con actividades biológicas similares a la de los anticuerpos calostrales que la madre proporciona a los terneros (Días Da Silva y Tambourgui, 2010). Un punto importante para tener en cuenta en los productos basados en IgY son las características tecnológicas, tales como resistencia a la temperatura, presión y humedad, presencia de minerales y resistencia a la digestión gástrica (Margueritte *et al.*, 2005). La IgY es una proteína sensible a la desnaturalización, es bastante estable a las altas temperaturas y su actividad no se ve afectada por la pasteurización. Su punto isoeléctrico varía entre 5,7-7,6, es resistente a un rango de pH= 4-8 y es altamente estable frente a la digestión con tripsina y quimiotripsina (Carlander, 2002). Sin embargo, su actividad disminuye a un pH $\leq$ 3,5 y se pierde casi completamente con cambios irreversibles a un pH= 3 (Shimizu *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 2002). Debido a esto la administración oral de IgY está condicionada a la degradación ácida en el estómago y a la degradación de proteasas tales como la pepsina (Shimizu *et al.*, 1988). Para poder utilizarla como inmunoterapia pasiva, es necesario hallar un método efectivo para preservar el valor terapéutico y la función biológica de este anticuerpo durante el pasaje gástrico.

Desde el punto de vista de los nuevos materiales, la tendencia es obtener sistemas inteligentes, cargados con el principio activo de la molécula, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada (Peppas *et al.*, 2006). Es así como en las últimas décadas los hidrogeles han recibido mucha atención para su aplicación en esta área dado que pueden ser diseñados de acuerdo a los requerimientos deseados. Los hidrogeles son redes tridimensionales en las cuales las cadenas poliméricas están interconectadas por entrecruzadores químicos (Pourjavadi *et al.*, 2010). Estas redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros y son insolubles en todas las soluciones acuosas pero, dependiendo del solvente, pueden absorber y mantener un volumen considerable de líquidos. Algunos hidrogeles polielectrolíticos pueden absorber más de 100 partes de agua por cada parte de polímero seco, debido a la presión osmótica ejercida por los contra-iones. Los hidrogeles neutros, en cambio, poseen alta afinidad por el agua, aunque su grado de hinchamiento es mucho menor que el de los geles cargados (Bajpai y Giri, 2003; Branca *et al.*, 2006). Otra propiedad importante de los hidrogeles es su respuesta a diferentes estímulos externos del medio, como la temperatura, el pH, la presencia de solutos y los campos eléctricos y magnéticos (Peppas *et al.*, 2000; El-Naggar *et al.*, 2006). El mecanismo que causa el cambio estructural del hidrogel es completamente reversible y se requiere una alta cooperatividad entre la respuesta a las condiciones externas y el desarrollo interno de la microestructura del gel. Usualmente, estos hidrogeles son sintetizados por la copolimerización de monómeros ácidos o básicos y un entrecruzador como la N,N'-metilenbis-acrilamida (Omidian *et al.*, 2005). Son ampliamente utilizados como sustancias superabsorbentes, para reducir la humedad de medicamentos o productos higroscópicos envasados. Para esta aplicación la alta capacidad de retención del agua es la propiedad más importante (Katime *et al.*, 2004). También, debido a su consistencia suave y a su alto contenido en agua, se parecen al tejido vivo más que ninguna otra clase de biomaterial sintético, lo que contribuye a su biocompatibilidad. Esta propiedad permite utilizarlos en áreas como son la medicina y la farmacia: cápsulas artificiales (Lee y Mooney, 2001), membranas con permeabilidad regulada (Dole *et al.*, 2004), dispositivos sensores (Yew *et al.*, 2007) y transportadores para la liberación controlada de drogas (Peppas *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 2003), pudiéndose administrar por diferente vías: oral, rectal, ocular, transdérmica y subcutánea.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la incorporación de IgY en hidrogeles pH-sensibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES PH-SENSIBLES

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizaron dos monómeros: ácido acrílico (AAc) (Sigma-Aldrich®) y acrilamida (AAM) (Rotiphorese, Roth®). Como agente entrecruzador se empleó N',N'-metilen-bisacrilamida (BAAm) (Rotiphorese, Roth®). Como iniciador de la reacción se utilizó persulfato de amonio (Roth®) y como catalizador TEMED (Roth®). Se mezclaron el Rotiphorese (acrilamida 37,5: N',N'-metilen-bisacrilamida 1), el ácido acrílico y el agua destilada. Se llevó la solución a un pH alrededor 5 con hidróxido de sodio. Se burbujeó el sistema con nitrógeno gaseoso por 5 minutos. Luego se colocaron el sulfato de amonio y el TEMED. La solución de síntesis fue cargada en una jeringa de tuberculina y el extremo abierto de la jeringa fue sellado con parafilm. Los componentes de los hidrogeles y sus proporciones se encuentran detallados en la tabla 1. Se realizó también la síntesis de hidrogeles variando la concentración de los monómeros. Una vez gelificada la solución, se extrajo el polímero mediante la remoción del extremo anterior de la jeringa y presionando suavemente el émbolo hacia adelante. El polímero se fragmentó en pequeñas secciones, las cuales se lavaron durante 7 días con agua destilada para eliminar cualquier resto de monómero que pudiere resultar tóxico. Finalizado el proceso de lavado, los hidrogeles fueron colocados en placas de petri y secados en estufa a 37°C hasta lograr un peso constante.

CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

Para la caracterización de los hidrogeles, se determinó el porcentaje de hinchamiento y el contenido de agua de los mismos, incubándolos en soluciones a diferentes pH (pH=2,2; pH=5,5; pH=7,4; pH=10) y durante diferentes periodos de tiempo (0, 1, 2, 3, 8 y 24 horas). Para cada tiempo de incubación, se pesaron y se midieron (diámetro y altura) los hidrogeles.

INCORPORACIÓN DE LA IgY EN LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

Se colocaron 3 hidrogeles a hinchar individualmente, en un recipiente que contenía una solución de IgY a una concentración de 10 mg/mL. Este ensayo se realizó a temperatura ambiente y durante 24 horas. Al inicio y al finalizar el ensayo se pesaron los hidrogeles y se determinaron sus dimensiones (altura y diámetro). También se determinó la DO_{280nm} de la solución de IgY, la concentración de proteínas totales y se midió el volumen inicial y final de la misma. La eficiencia de encapsulación se expresó como el porcentaje de la IgY total disponible que se incorporó dentro de los hidrogeles.

CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES-IgY

Para completar la caracterización de la incorporación de la IgY en los hidrogeles se realizó espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) de los hidrogeles solos, la IgY sola y los hidrogeles-IgY. Se utilizaron pastillas de bromuro de potasio (Sigma-Aldrich®) debido a que las muestras eran sólidas. Para ello se tomaron alícuotas de los hidrogeles en polvo y se mezclaron con bromuro de potasio al 1% (p/p) en un mortero de ágata, hasta lograr una mezcla homogénea. Se formaron pastillas mediante un dispositivo de presurización con una presión de 15 ton·cm⁻² y vacío dinámico. Las pastillas se analizaron en un espectrómetro "FTIR Nicolet Impact 400", con una resolución de 4 cm⁻¹.

RESULTADOS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES pH-SENSIBLES

Se realizó la síntesis de los hidrogeles con diferentes concentraciones de los monómeros (Tabla 1). Los hidrogeles que fueron sintetizados con las relaciones

AAM:AAC de 1:0,5 (Grupo D) y 1:2 (Grupo E) fueron descartados. En el primer caso, los hidrogeles adoptaron una apariencia blanquecina, mucosa y se pegaron a las placas de petri al momento del secado en estufa. En el segundo caso, los hidrogeles no gelificaron correctamente y se desintegraron al momento del lavado. La caracterización de los hidrogeles se llevó a cabo con las relaciones AAM: AAC de 1:1 (Grupo A), 0,5:1 (Grupo B) y 2:1 (Grupo C). Luego de 24 horas de incubación en las soluciones a diferentes pH, se observó un aumento del peso, diámetro y altura de los hidrogeles en los pH=5,5 y 7,4 para los 3 grupos analizados. Con respecto al porcentaje de hinchamiento (Tabla 2), se observó que a pH=2,2 los hidrogeles del grupo C se hincharon rápidamente hasta un 96% y luego de las 3 horas de incubación dicho porcentaje disminuyó drásticamente. Por el contrario, los hidrogeles del grupo A y B tuvieron porcentajes de hinchamiento entre el 50-60% y se mantuvieron constantes a lo largo de las 24 horas de incubación. A pH=5,5 y 7,4 los hidrogeles de los 3 grupos se comportaron de manera similar, mostrando porcentajes de hinchamiento cercanos al 100%. A pH=10 se observó un porcentaje de hinchamiento cercano al 90% en los 3 grupos (Tabla 2). El contenido de agua mostró un comportamiento similar al porcentaje de hinchamiento en todos los pH y para todos los grupos.

INCORPORACIÓN DE IgY EN HIDROGELES pH-SENSIBLES

El ensayo se realizó a pH=7,4 con los hidrogeles del grupo A (1:1). Luego de la incubación de los hidrogeles en la solución de IgY se apreció un aumento significativo en el peso, diámetro y altura de los mismos ($p<0.05$). La concentración de proteínas totales y la DO_{280nm} de la solución disminuyeron significativamente al finalizar el ensayo de incorporación ($p<0.05$). El porcentaje de incorporación luego de las 24 horas de incubación fue del 99,2%.

CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES-IgY

La figura 1 muestra los espectros FTIR de los hidrogeles conteniendo IgY (hidrogel-IgY), los hidrogeles solos (hidrogel) y la IgY sola (IgY). En el espectro FTIR del hidrogel solo es posible observar una banda amplia a 3437 cm^{-1} correspondiente al estiramiento N-H de las amidas secundarias. Las bandas a 2974 y 2881 cm^{-1} se asignan al estiramiento simétrico y asimétrico de $-\text{CH}_3$. La banda a 1670 cm^{-1} es debido a la vibración del estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de la banda amida I, mientras que la banda a 1576 cm^{-1} se atribuye al movimiento de flexión N-H de la banda amida II. El espectro FTIR del hidrogel-IgY muestra un amplio pico en $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ en comparación con los picos respectivos del hidrogel solo y de la IgY sola.

DISCUSIÓN

Para que la IgY tenga una actividad biológica eficiente, debe estar protegida de la inactivación gástrica. Los hidrogeles pH-sensibles son considerados como sistemas inteligentes, ya que tienen una respuesta selectiva de hinchamiento dependiendo de las condiciones del medio (Qiu y Park, 2001). En este trabajo se observó que el porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles varió en los diferentes grupos dependiendo del pH del medio. A pH=5,5 y 7,4 se obtuvieron los mayores porcentajes de hinchamiento de los hidrogeles. Estudios previos (Elliott *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004) mostraron resultados similares en hidrogeles pH-sensibles sintetizados con ácido acrílico o metacrílico.

Katyme *et al.*, (2004) reportaron que el pH puede variar el volumen del hidrogel siempre que el hidrogel posea grupos funcionales ionizables. Si estos grupos son carboxílicos, al aumentar el pH aumenta el hinchamiento. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estos autores ya que los grupos carboxílicos del ácido acrílico permitieron un mayor porcentaje de hinchamiento al aumentar el pH.

AL EVALUAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN, SE OBSERVÓ QUE EL PH=7,4 RESULTA ÓPTIMO PARA LA INCORPORACIÓN DE LA IGY DENTRO DEL HIDROGEL. LOS HIDROGELES SINTETIZADOS CON UNA RELACIÓN AAM:AAC 2:1 (GRUPO C) NO FUERON INCLUIDOS EN EL ENSAYO DE INCORPORACIÓN YA QUE

PRESENTARON UN PORCENTAJE DE HINCHAMIENTO ALTO EN $\text{pH}=2,2$. POR LO TANTO NO SERÍAN ÚTILES PARA PROTEGER LA IGY DURANTE EL PASAJE GÁSTRICO PUES PODRÍAN LIBERARLA EN EL ESTÓMAGO. LOS ESPECTROS FTIR EVIDENCIARON QUE LA IGY INTERACTUÓ CON EL HIDROGEL PH-SENSIBLE MEDIANTE ENLACES DE HIDRÓGENO PROLONGADOS.

CONCLUSIONES

Las redes poliméricas sintetizadas mediante la polimerización acrilamida y ácido acrílico con N,N'-metilenbisacrilamida como entrecruzador, presentan una capacidad de hinchamiento dependiente del pH. Los hidrogeles pH-sensibles lograron incorporar la IgY de una manera eficiente, sugiriendo que los mismos podrían ser utilizados para proteger la IgY durante el pasaje gástrico, cuando es administrada en forma oral para inmunoterapia pasiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bilbao, G.; Chacana, P.; Mendiburu, A.; Rodríguez, E.; Blackhall, J.; Terzolo, H. (2006). Profilaxis de la diarrea neonatal de terneros de tambo mediante suplementación con inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina. *Revista de Medicina Veterinaria* 87, 4: 135-139.
2. Terzolo, HR., Chacana, PA., Vivas A., Greco C, Goya R., Schade, R. (2003) IgY technology in Argentina. *ALTEX* 20: 202.
3. Mine, Y. and Kovacs-Nolan, J. (2002) Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *Journal of Medicinal Food* 5: 159-169.
4. Kovacs-Nolan, J. and Mine, Y. (2004) Passive immunization through avian egg antibodies. *Food Biotechnology* 18: 39-62.
5. Schade, R.; Zhang, X.; Terzolo, H. (2007). Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: *Bioactive Egg Compounds*. Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M. & Schade, R. (Eds.). Springer, p. 213-219.
6. Zhang, X.; Zheng, L.; Schade, R.; Terzolo, H.; Chacana, P.; Porankiewicz-Asplund J. (2004). Technological aspects of egg yolk immunoglobulin. *Chinese Pharmacological Bulletin* 20: 1102-06.
7. Narat, M. (2003). Production of Antibodies in Chickens. *Food Technology and Biotechnology* 41 (3): 259-267.
8. Carlander, D. (2002). Avian IgY antibody. *In vitro* and *in vivo*. Acta Universitatis Upsaliensis. Dissertation from the Faculty of Medicine 1119, Uppsala, 53 pp., ISBN 91-554-5227-2.
9. Karlsson, M.; Kollberg, H.; Larsson, A. (2004) Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal* 60: 341-347.
10. Dias Da Silva, W. and Tambourgi, D. (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135: 173-180.
11. Margueritte, J.; Mattion, N.; Blackhall, J.; Fernández, F.; Parreño, V.; Vagnozzi, A.; Odeón, A.; Combessies, G. (2005). Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y control. En: <http://www.produccion-animal.com.ar>
12. Shimizu, M.; Nagashima H, Sano K, Hashimoto K. (1993.) Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comparative Physiology and Biochemistry* 106 (2): 255-261.
13. Lee K, Chang S, Lee Y, Lee J, Koo N. (2002). Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 488-493.
14. Shimizu, M., Fitzsimmons, S., Nacai, S. (1988). Anti- *E coli* Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science* 53: 1360-1366

15. Peppas, N.; Hilt, J.; Khademhosseini, A.; Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18: 1345-1360.
16. Pourjavadi, A.; Eftekhari Jahromi, P.; Seidi, F.; Salimi, H. (2010). Synthesis and swelling behavior of poly (acrylic acid) and poly (acrylamide) hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 79: 933-940.
17. Bajpai, A and Giri, A. (2003). Water sorption behavior of highly swelling (carboxyl methylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. *Carbohydrate Polymers* 53: 271-279.
18. Branca, C. ; Magazù, S. ; Maisano, G. ; Auditore, L. ; Barnà, R. ; De Pasquale, D. (2006). Synthesis of polyethylene oxide hydrogels by electron radiation. *Journal of Applied Polymer Science* 102: 820-824.
19. Peppas, N.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46.
20. El-Naggar, A.; Abd Alla, S.; Said, H. (2006). Temperature and pH responsive behaviors of CMC/AAC hydrogels prepared by electron beam irradiation. *Materials Chemistry and Physics* 95: 158-163.
21. Omidian, H.; Rocca, J.; Park, K. (2005). Advances in superporous hydrogels. *Journal of Controlled Release* 102: 3-12.
22. Katime, D.; Katime, O.; Katime, I. (2004). Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial de la Universidad del país Vasco. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.
23. Lee, K. and Mooney, D. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews* 101: 1869-1879.
24. Dole, P.; Joly, C.; Espuche, E.; Alric, I.; Gontard, N. (2004). Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers* 58: 335-343.
25. Yew, Y. ; Ng, T. ; Li, H. ; Lam, K. (2007). Analysis of pH and electrically controlled swelling of hydrogel-based micro-sensors/actuators. *Biomedical Microdevices* 9: 487-499.
26. Escobar, J.; Zaldivar, D.; Agüero, L.; Fernández, S.; Katime, I. (2003). Liberación de cefazolina sódica a partir de hidrogeles de poli (acrilamida-co-acido metacrílico). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 1-10.
27. Qiu, Y. and Park, K. (2001). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 53: 321-339
28. Elliott, J; Macdonald, M; Nie, J; Bowman, C. (2004). Structure and swelling of poly (acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure. *Polymer* 45: 1503-1510.
29. García, D; Escobar, J; Bada, N; Casquero, J; Hernáez, E; Katime, I. (2004). Synthesis and characterization of poly (methacrylic acid) hydrogels for metoclopramide delivery. *European Polymers Journal* 40: 1637-1643.

ANEXOS

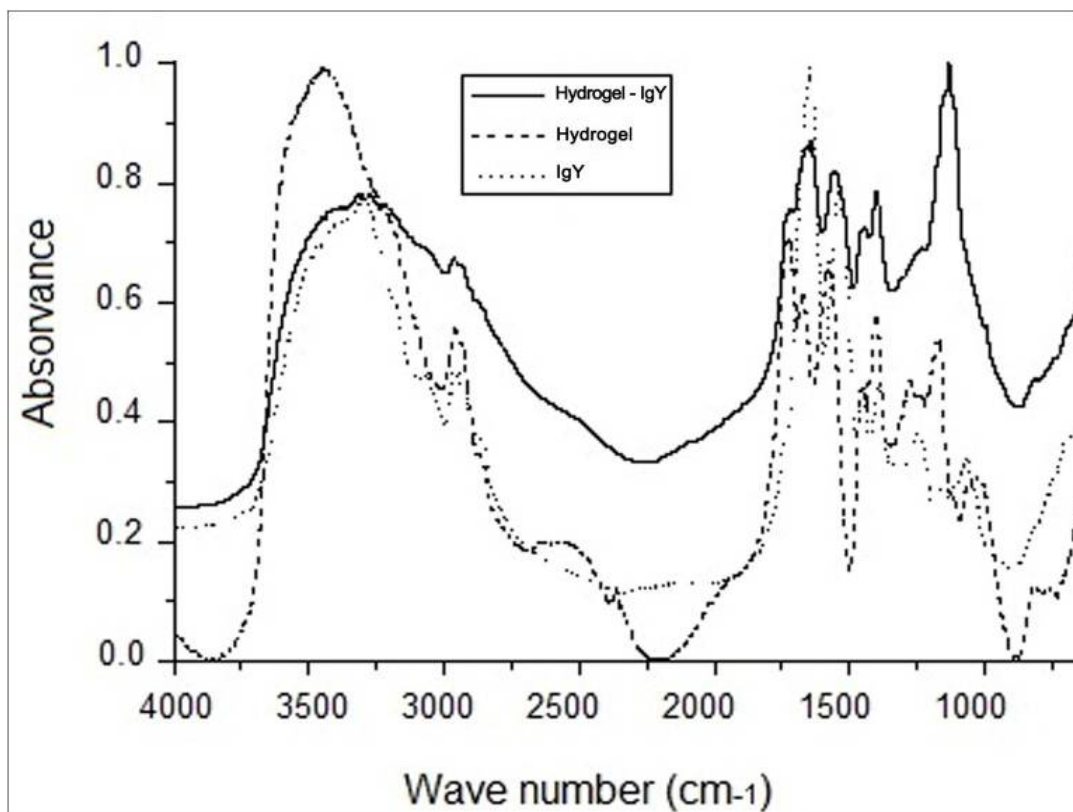


Figura 1: Espectros FTIR de los hidrogeles conteniendo IgY (hidrogel-IgY), los hidrogeles solos (hidrogel) y la IgY sola (IgY).

Tabla 1: Composición y proporciones para la síntesis de los hidrogeles pH-sensibles

	Grupo A 1:1*	Grupo B 0,5:1*	Grupo C 2:1*	Grupo D 1:0,5*	Grupo E 1:2*
AAM/BAAm	0,925 ml	0,462 ml	1,85 ml	0,925 ml	0,925 ml
AAc	1,775 ml	1,775 ml	1,775 ml	0,887 ml	3,55 ml
Temed	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Persulfato de Amonio	0,02 gr	0,02 gr	0,02 gr	0,02 gr	0,02 gr
Agua destilada	7,2 ml	7,663 ml	6,275 ml	8,088 ml	5,425 ml

AAM (Acrilamida); BAAm (N,N'-metilenbisacrilamida); AAc (ácido acrílico);
*Relación AAM: AAc.

Tabla 2: Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles pH-sensibles incubados 24 horas en buffers con diferentes pH

	pH 2,2	pH 5,5	pH 7,4	pH 10
Grupo A	53,69 ± 2,61	99,23 ± 0,04	99,29 ± 0,02	99,39 ± 0,05
Grupo B	68,90 ± 1,19	99,41 ± 0,05	99,42 ± 0,07	99,62 ± 0,06
Grupos C	3,89 ± 6,74	99,57 ± 0,01	99,42 ± 0,07	99,49 ± 0,11

Los datos son presentados como media ± desvío estándar.