



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

Tese de Doutorado

**Preparação, caracterização morfológica e aplicações de
hidrogéis de P(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico)**

Autora: Regiane da Silva Gonzalez

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Agosto de 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

G589p Gonzalez, Regiane da Silva.
Preparação, caracterização morfológica e aplicações de hidrogéis de P(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) / Regiane da Silva Gonzalez. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Hidrogel. 2. Morfologia. 3. S-nitrosotióis.
I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química.
III. Título.

Título em inglês: Preparation, morphological characterization of P(NIPAAM-CO-AAc) hydrogels

Palavras-chaves em inglês: Hydrogel, Morphology, S-nitrosothiols

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli (orientador), Prof. Dr. Edvani Curti Muniz (DQI-UEM), Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani (IQ-USP), Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (FEQ-UNICAMP), Prof. Dr. Renato Atílio Jorge (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 14/08/2008

À minha mãe Darci e à minha filha Laura
e especialmente ao meu marido Ricardo

Agradecimentos

Ao professor Marcelo, pela orientação do trabalho.

Ao professor Lourenço Sbragia e sua aluna Frances Lanhella da Faculdade de Medicina/UNICAMP, pelo trabalho em colaboração.

À professora Sônia Bueno e seu aluno Igor Bresolin da Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, pela colaboração com a análise de IEF.

Ao professor Marcelo Brochi e seu aluno Dorival do Instituto de Biologia/UNICAMP, pelo trabalho em colaboração.

À professora Maria Isabel Felisberti do Instituto de Química/UNICAMP e à técnica Fabiane M. Favareto pela colaboração com as análises de TMA.

Ao técnico Daniel Razzo, pela obtenção das micrografias eletrônicas

Ao pessoal do Laboratório B-135: Alexandre, Amedea, Aletéia, Alexandre, Anna, Ana Maria, Evandro, Fernanda S., Fernanda E., Gabriela, Heitor, Joseph, Juliana, Kelly, Jaqueline, Lílian, Maeling, Maíra, Maira, Marina Marcela, Marcelo A., Marcos, Marina, Rodrigo Angarten, Rodrigo Cardoso, Rodrigo Vieira, Rogério, Suelen, Vanessa e aos professores Edvaldo Sabadini e Watson Loh.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro parcial

À FAPESP, pelo suporte financeiro (Processos n. 03/12024-0 e 04/11202-4)

Curriculum Vitae

Nome: Regiane da Silva Gonzalez

Data de nascimento: 07 de janeiro de 1980, Nova Prata do Iguazu-PR

Bacharel em Química com atribuições tecnológicas: Período: 02/1999 a 05/ 2003.

Instituição: Departamento de Química/Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Mestre em Química: Período: 08/2003 a 01/2004 (passagem direta para o doutorado).

Departamento de Físico-Química-UNICAMP-Suporte Financeiro: CNPQ/FAPESP

Projeto: Preparação de biomateriais baseados em hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) para liberação localizada de óxido nítrico

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS ARBITRADOS

- Seabra, A. B., da Silva, R. de Souza, G.F.P and de Oliveira, M.G., “Antithrombogenic polynitrosated polyester/poly(methyl methacrylate) blend for coating of blood-contacting surfaces”. *Artificial Organs*, 32(4): 262-267(2008)
- da Silva, R. and de Oliveira, M.G., “Effect of the crosslinking degree on the morphology of PNIPAAm/AAc hydrogels”. *Polymer*, 48(14):4114-4122 (2007)
- Seabra, A. B., da Silva R. and de Oliveira M. G. “Polynitrosated Polyesters: Preparation, Characterization and Potential Use for Topical Nitric Oxide Release”. *Biomacromolecules*, 6: 2512-2520 (2005)
- Guilherme, M.R.; da Silva, R.; Rubira, A. F.; G. Geuskens and Muniz, E. C. "Thermo-sensitive hydrogels membranes from PAAm networks and entangled PNIPAAm: effect of temperature, cross-linking and PNIPAAm contents on the water uptake and permeability". *Reactive & Functional Polymers* 61 (2): 233-243 (2004).
- Guilherme, M.R.; da Silva, R.; Giroto, E. M.; Rubira, A. F. and Muniz, E. C. “Hydrogels based on PAAm network with PNIPAAm included: hydrophilic-hydrophobic transition measured by the partition of Orange II and Methylene Blue in water”. *Polymer*, 44 (15): 4213-4219 (2003).

RESUMOS DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO E INDEXADOS NO WEB OF SCIENCE (ISI)

- Seabra, A. B., da Silva, R. and de Oliveira, M. G. "Polynitrosated polyesters for transdermal nitric oxide release: potential application for promoting local vasodilation" *Nitric Oxide-Biology and chemistry*, 14(4): A40-A40 Jun, 2006
- da Silva, R., e de Oliveira, M.G., “Effect of the crosslinking degree on the morphology and swelling ratio of PNIPAAm/AAc hydrogels”, *Brazilian Journal of Morphological Sciences-Revista brasileira de ciências morfológicas*, Supplement - 278-279 (2005).

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE REUNIÕES CIENTÍFICAS INTERNACIONAIS

- Gonçalves, F.L.L., da Silva, R., Sbragia, L and de Oliveira, M.G., “Hydrogel protection: a new approach for reducing inflammation in gastroschisis”, and da Silva, R., Genari, M.

and de Oliveira, M.G., “S-nitrosothiol-containing N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid hydrogel increases dermal blood flow”. 8 World Biomaterial Congress-Crossing frontiers in biomaterials and regenerative medicine. Amsterdam, Holanda, 28 de maio-01 de junho de 2008.

- da Silva, R., Simões, M.M.S.G., and de Oliveira, M.G., “Diffusion of NO donors from P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels”. XI International Macromolecular Colloquium International Symposium on Natural Polymers and Composites. Gramado-RS, Brasil, 22-25 de Abril de 2007. (Apresentação oral)
- Seabra, A. B., da Silva, R., de Souza, G. F. P., Falconi, M. A. and de Oliveira, M. G., "Polynitrosated Polyester/PMMA blend for the coating of blood-contacting medical devices". Colaob- 4º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Caxambu-MG, Brasil, 8-11 de Agosto de 2006. (Apresentação oral)
- da Silva, R., Simões, M. M. S. G. and de Oliveira, M.G. "PNIPAAm/AAc hydrogels for the delivery of nitric oxide donors", and "Influence of the morphology on the absorption of GSNO by PNIPAAm-co-AAc hydrogels". World Polymer Congress-41 International Symposium on Macromolecules, Rio de Janeiro-RJ-Brasil, 16-21 Julho de 2006.
- da Silva, R., and de Oliveira, M.G., “Characterization of the interaction between PNIPAAm/AAc hydrogels and S-nitrosoglutathione by isothermal titration calorimetry”. 2nd International Symposium on calorimetry and chemical thermodynamics” Estância de São Pedro-SP, Brasil, 9-13 de Abril de 2006.
- da Silva, R., and de Oliveira, M.G., “Characterization of the swelling behavior of PNIPAAm-AAc hydrogels”. X International Macromolecular Colloquium. Gramado-RS, Brasil, 10-13 de Abril de 2005.
- da Silva, R., Simões, M.M.S.G., and de Oliveira, M.G., “PNIPAAm-AAc hydrogels for the local delivery of nitric oxide”. X International Macromolecular Colloquium. Gramado-RS, Brasil, 10-13 de Abril de 2005.
- da Silva, R., Simões, M. M.S.G., and de Oliveira, M.G., “A new cross-linked hydrogel for the controlled delivery of nitric oxide”. Nitric Oxide Cytokines and inflammation—An international Symposium”. Rio de Janeiro-JR, Brasil, 06-09 de Junho de 2004.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE REUNIÕES CIENTÍFICAS NACIONAIS

- Simões, M.M.S.G., da Silva, R. and de Oliveira, M.G., “Effect of freezing-thawing and chemical crosslinking on the structure of poly (vinyl alcohol) films”. 18º Reunião Anual dos Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Campinas-SP, 18-19 de fevereiro de 2008
- da Silva, R., e de Oliveira, M.G., “Effect of the cross-linking degree on the morphology and swelling ratio of PNIPAAm/AAc hydrogels”. XX Congresso da Soc. Brasileira de Microscopia e Microanálise. Águas de Lindóia-SP, Brasil, 28-31 de Agosto de 2005. (Apresentação oral)

Número de trabalhos Publicados em anais de Reuniões Científicas Internacionais: 11
Número de trabalhos Publicados em anais de Reuniões Científicas Nacionais: 10

RESUMO

Título: Preparação, caracterização morfológica e aplicações de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc).

Autora: Regiane da Silva Gonzalez.

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

Palavras-chave: Hidrogéis, morfologia, óxido nítrico, S-nitrotióis.

Hidrogéis compostos de redes poliméricas são de grande interesse como biomateriais. Neste trabalho, foram sintetizados hidrogéis de poli(N-isopropilacrilamida) copolimerizados com ácido acrílico (P(NIPAAm-co-AAc)) e reticulados com metileno-bisacrilamida (MBAAm) em diferentes graus de reticulação, interpenetrados (IPNs) e semi-IPNs com PVA. A presença de AAc permitiu elevar a temperatura crítica inferior de solução (LCST) para 37° C. Observou-se que as propriedades mecânicas dos hidrogéis melhoram significativamente com a presença de PVA na rede polimérica e com o aumento do grau de reticulação. Observou-se que o aumento de 3 para 5% no grau de reticulação leva a uma mudança da morfologia dos poros dos hidrogéis de esféricos a tubulares e que a difusão de azul de metileno a partir dos hidrogéis com poros tubulares é aumentada quando o eixo principal dos poros está orientado paralelamente ao fluxo de soluto. Demonstrou-se que tanto o aumento do grau de reticulação como a redução da temperatura de 37 para 25° C levam a uma redução das velocidades de difusão de S-nitrosoglutationa (GSNO) e S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) incorporadas nos hidrogéis. Verificou-se que tanto a absorção como a difusão destes solutos dependem das interações entre suas cargas elétricas resultantes e a carga da matriz polimérica em um determinado pH. Hidrogéis contendo GSNO e SNAC foram capazes de causar vasodilatação local na pele em aplicações tópicas, através de suas ações como doadores de óxido nítrico (NO). A ação vasodilatadora mais intensa e de mais curta duração da SNAC comparada à GSNO foi correlacionada com seu maior coeficiente de difusão na matriz de hidrogel. A aplicação do hidrogel aderido com adesivo de fibrina em um modelo animal de gastrosquises promoveu uma proteção efetiva das alças intestinais herniadas, com redução da inflamação.

ABSTRACT

Title: Preparation, morphological characterization and applications of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels.

Author: Regiane da Silva Gonzalez.

Advisor: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

Key words: Hidrogel, morfology, nitric oxide, S-nitrothiols.

Hydrogels composed of polymeric networks are of great interest as biomaterials. In this work hydrogels of poly(N-isopropilacrilamide) copolymerized with acrylic acid (P(NIPAAm-co-AAc)) and cross-linked with metilene-bisacrilamide (MBAAm) at different cross-linking degrees, interpenetrated (IPNs) and semi-IPNs with PVA. The presence of AAc allowed increasing the lower critical solution temperature (LCST) to 37° C. It was observed that the mechanical properties of the hydrogels are significantly improved with the presence of PVA in the polymeric network and with the increase in the cross-linking degree. It was observed that an increase from 3 to 5% in the cross-linking degree leads to a change in the pore morphology of the hydrogels from spherical to tubular and that the diffusion of methylene blue from the hydrogels with tubular pores is increased when the main axis of the pores are parallel oriented to the flow of the solute. The diffusion of S-nitrosothiols showed that the increase in the cross-linking degree from as well as the reduction in temperature from 37 to 25° C, leads to a reduction in the diffusion rates of S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) incorporated in the hydrogels and that both the absorption and diffusion of these solutes depend on the interactions between their net electrical charge and that of the polymeric matrix at a given pH. GSNO and SNAC-containing hydrogels were able to cause local vasodilation in the skin in topical applications through their actions as nitric oxide (NO) donors. The more intense and less lasting vasodilation action of SNAC, compared to GSNO was correlated to its higher diffusion coefficient in the hydrogel matrix. Application of the hydrogel bound through fibrin adhesive in an animal model of gastroschisis, provided an effective protection of herniated bowel, with reduction of inflammation.

Abreviações

A: adesivo cirúrgico de fibrina (Beriplast®)

AAc: ácido acrílico

AM: azul de metileno

TMA: análise termomecânica

BIS: N-N'-methylenebisacrylamide

C/D: congelamento/descongelamento

CisNO: S-nitrosocisteína

δ : deformação máxima

D: coeficiente de difusão

EDRF: fator de relaxamento derivado do endotélio

EDS: espectrometria de energia dispersiva

F127: copolímero PEO-PPO-PEO (pluronic)

G: gastroquise

G+A: gastroquise + adesivo de fibrina

G+A+H: gastroquise + adesivo de fibrina + hidrogel

GSH: glutationa

GSNO: S-nitrosoglutationa

H: hidrogel

$H_{/N}$: superfície de fratura horizontal paralela a placa de vidro

IPN: rede interpenetrada

K: coeficiente de partição

LA: líquido amniótico

LCST: Lower critical solution temperature

m: massa

MAc: ácido metacrílico

MB: methylene blue

MBAAm: N-N'-metileno-bisacrilamida

%MBAAm: porcentagem de MBAAm utilizado para reticulação do hidrogel

% mol BIS: porcentagem de MBAAm utilizado para reticulação do hidrogel

NAC: N-acetilcisteína

NIPAAm: N-isopropil acrilamida

NO: óxido nítrico

P: permeabilidade

PAAm; poli(acrilamida)

PBS: phosphate buffer saline

PEG: poli (etileno glicol)

PEO: poli (óxido de etileno)

PPO: polipropileno

pH: potencial hidrogeniônico

P(NIPAAm): poli(N-isopropil acrilamida)

P(NIPAAm-co-AAc): poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico)

P(NIPAAm-co-MAc): poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico)

PVA: poli (álcool vinílico)

Q: grau de intumescimento

RSHs: tióis

RSNOs: S-nitrostióis

RS-SR : dímero de tiol oxidado

RMN¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

semi-IPNs: rede semi-interpenetrada

SNAC: S-nitro-N-acetilcisteína

SEM: Microscopia eletrônica de varredura

$S_{\mathcal{N}}$: superfície em contato com a placa de vidro

σ : tensão a máxima deformação

T: Temperatura

TEMED: tetrametiletenodiamina

UV-VIS: ultravioleta-visível

$V_{\perp G}$: superfície de fratura vertical perpendicular a placa de vidro

$V_{\perp V}$: superfície de fratura vertical perpendicular a placa de vidro

VIPS: vapor induced phase separation

ÍNDICE

1.	Relevância do Trabalho	1
2.	Objetivos	5
3.	Caracterização Morfológica e Mecânica dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc)	6
3.1.	da Silva, R, and de Oliveira, MG. Effect of the cross-linking degree on the morphology of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels. <i>Polymer</i> , 48(14):4114-4122 (2007)	7
3.2.	Material suplementar 1 do artigo <i>Polymer</i> , 48(14):4114-4122 (2007)	17
3.3.	Material Suplementar 2: Determinação do coeficiente de partição (K) do Azul de metileno no hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) reticulado com 5% de MBAAm	20
3.4.	Material Suplementar 3: Análise da morfologia das membranas de P(NIPAAm-co-AAc) intumescidos em água e em solução de RSNOs	23
3.5.	Material Suplementar 4: Determinação da temperatura de transição de fase (LCST) de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc)	28
3.6.	Material Suplementar 5: Caracterização da síntese dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc), sintetizados sem reticulante, por RMN ¹ H	31
3.7.	Influence of temperature gradient on the cross-section morphology of P(NIPAAm-co-AAc) membranes	33
3.8.	Caracterização da resistência mecânica dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) interpenetrados e semi-interpenetrados com PVA.	46

3.9.	Material Suplementar 6: Influencia do PVA no grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc)	64
4.	Aplicações	65
4.1.	Influence of temperature and cross-linking degree of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels on the diffusion behavior of S-nitrosothiols	69
4.2.	Material Suplementar 7: Valores numéricos dos coeficientes de difusão dos RSNOs	93
4.3.	Material Suplementar 8: Velocidades iniciais de absorção de RSNOs	94
4.4.	Material Suplementar 9: Velocidades iniciais de liberação de RSNOs	96
4.5.	Material Suplementar 10: Aparência dos hidrogéis	97
4.6.	Proteção por hidrogel: uma nova estratégia para reduzir inflamação em gastrosquise	99
5.	Conclusões	119

1. Relevância do trabalho

Esta Tese descreve os resultados da preparação, caracterização e aplicações de hidrogéis obtidos a partir da reação radicalar de copolimerização de N-isopropilacrilamida com ácido acrílico (P[NIPAAm-co-AAc]). A reação de copolimerização foi realizada na presença de metileno-bisacrilamida, MBAAm, para a formação de uma rede polimérica, hidrofílica. Foram sintetizados ainda hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) semi-interpenetrados (semi-IPNs) e interpenetrados (IPN) com poli(alcool vinílico) (PVA).

Os resultados de caracterização da morfologia, do grau de intumescimento e da resistência mecânica foram agrupados em uma primeira parte da Tese, que relaciona a influência do grau de reticulação e a presença de PVA a estas propriedades. O grau de reticulação e o intumescimento determinam a porosidade dos hidrogéis e conseqüentemente a liberação de fármacos através de hidrogéis na forma de membranas. O principal objetivo desta parte do trabalho foi a caracterização da morfologia dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em função do grau de reticulação. Estes resultados estão apresentados no artigo científico publicado no periódico *Polymer* (48(14):4114-4122 (2007), juntamente com informações suplementares publicadas em congressos e outras ainda não publicadas. Neste trabalho verificou-se pela primeira vez que estes hidrogéis apresentam diferentes morfologias as quais dependem do grau de reticulação. Hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) com grau de reticulação de 3% ou menos, através do agente reticulante, metileno-bisacrilamida (MBAAm), possuem morfologia de celas relativamente esféricas. Entretanto quando o teor de reticulante é maior que 5%, sua morfologia passa a ser formada por poros tubulares, alinhados paralelamente ao campo gravitacional. Nesta parte do trabalho foram caracterizados ainda, o grau de intumescimento e a resistência

mecânica dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em função do grau de reticulação e da presença de PVA. Verificou-se que a presença de PVA leva a formação de redes interpenetradas com melhores propriedades mecânicas, conforme apresentado no item 3.5. Este trabalho está apresentado na forma de um manuscrito em preparação para submissão.

Na segunda parte da tese foram exploradas algumas aplicações dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc). A primeira delas é voltada para a absorção e liberação de S-nitrosotióis (RSNOs), que podem ser usados em aplicações tópicas como doadores de óxido nítrico (NO). Uma vez que a rede polimérica destes hidrogéis é composta de grupos hidrofílicos, eles são capazes de absorver grande quantidade de solução aquosa, apresentando grande interesse científico e comercial para utilização como biomateriais liberadores de fármacos. No exemplo em questão, membranas de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) contendo RSNOs foram utilizadas para a promoção da vasodilatação cutânea através da aplicação tópica na pele de voluntários sadios e, com isso, caracterizando pela primeira vez esta ação com o uso deste tipo de hidrogel. Nesta segunda parte do trabalho, foi avaliada também a aplicação terapêutica de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) no tratamento da Gastrosquises, através de um trabalho de colaboração com a participação da aluna de Mestrado Frances L.L. Gonçalves, sob orientação do Prof. Dr. Lourenço Sbragia, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP. Neste trabalho, toda a manipulação dos animais, bem como as análises morfométricas e histológicas do material biológico foram conduzidas pela mestrandia Frances L.L. Gonçalves, com acompanhamento da presente candidata, que foi responsável pela preparação dos hidrogéis utilizado para os recobrimentos das alças intestinais dos animais. A Gastrosquises (G) é um defeito congênito da parede abdominal de fetos resultando em um pequeno orifício, geralmente localizado à direita da cicatriz umbilical, que permite a

herniação e exposição permanente das alças intestinais ao líquido amniótico (LA) e seus componentes durante a gestação. Devido à exposição do intestino ao líquido amniótico, ocorre inflamação, sendo que em alguns casos é necessária a intervenção cirúrgica antes mesmo do nascimento ou a retirada do feto antes de se completar o período gestacional. A exposição permanente das alças ao LA e seus componentes causa alterações da morfologia e da histologia da parede intestinal que levam à hipomotilidade intestinal e deficiência na absorção dos nutrientes. Com o objetivo de reduzir a exposição das alças do intestino herniadas de fetos de rata (Sprague-Dawley) ao líquido amniótico utilizou-se hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) para recobrir as mesmas através de intervenções cirúrgicas durante o período gestacional. Apesar de o hidrogel ser uma rede polimérica altamente hidrofílica e capaz de intumescer no líquido amniótico, esta matriz possui grupos carboxílicos carregados negativamente no pH do LA (pH = 9,0) sendo, portanto capaz de agir como uma barreira protetora impedindo a permeação das proteínas causadoras de inflamação contidas no LA, que por sua vez também possuem cargas negativas. Os resultados obtidos nesta colaboração mostraram que o hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc), além de atuar como uma barreira protetora não causa danos ao feto devido a sua consistência macia, sendo de fácil remoção. Este trabalho está apresentado na forma de um manuscrito em preparação para submissão.

Desta forma, esta tese agrupa um conjunto de dados de caracterizações físico-químicas de membranas de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) e de análise da influência das condições de síntese sobre estas propriedades, com resultados de aplicações voltadas para a liberação de substâncias com atividade biológica e para o uso como material de proteção tecidual em um modelo animal. Os resultados obtidos demonstram o grande potencial de aplicação dos hidrogéis de

P(NIPAAm-co-AAc) e abrem perspectivas para a continuidade da pesquisa com estes materiais.

2. Objetivos

1. Caracterizar influência do grau de reticulação na morfologia de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc).
2. Caracterizar a influência da morfologia de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) na cinética de liberação de solutos hidrosolúveis.
3. Caracterizar influência do grau de reticulação e da interpenetração com poli(álcool vinílico), (PVA) sobre as propriedades mecânicas de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc).
4. Caracterizar as cinéticas de absorção e liberação de RSNOs por hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc).
5. Avaliar o efeito vasodilatador dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) carregados com RSNOs em aplicações tópicas na pele humana saudável.
6. Caracterizar o efeito protetor dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) na redução da inflamação em um modelo animal de gastrosquises.

3. Caracterização Morfológica e Mecânica dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc)

Nesta parte do trabalho caracterizou-se a morfologia dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em função do grau de reticulação, conforme detalhado no artigo publicado no periódico *Polymer* (48(14):4114-4122 (2007)). Foi avaliada ainda a morfologia dos hidrogéis intumescidos em solução de S-nitrosotióis (SNAC e GSNO) e a influência da morfologia na difusão de azul de metileno.

Além da análise da morfologia dos hidrogéis, esta parte do trabalho descreve a influência do grau de reticulação no intumescimento e na resistência mecânica dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc), em função do grau de reticulação e da presença de PVA.

3.1.

EFFECT OF THE CROSS-LINKING DEGREE ON THE MORPHOLOGY OF P(NIPAAm-co-AAc) HYDROGELS.

da Silva, R, and de Oliveira, MG.

Polymer, 48(14):4114-4122 (2007)

Copyright: ELSEVIER

Reproduced with permission



Effect of the cross-linking degree on the morphology of poly(NIPAAm-co-AAc) hydrogels

Regiane da Silva, Marcelo Ganzarolli de Oliveira*

Chemistry Institute, State University of Campinas, UNICAMP, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received 21 November 2006; received in revised form 27 April 2007; accepted 5 May 2007

Available online 13 May 2007

Abstract

Hydrogels of poly(*N*-isopropylacrylamide) co-polymerized with acrylic acid [P(NIPAAm-co-AAc)] were synthesized with cross-linking degrees of 2–7% using (*N,N'*-methylenebisacrylamide). SEM micrographs revealed that the morphology of dry hydrogels changes from interconnected spherical pores to channel-like pores, with the change in the cross-linking degrees from 3 to 5%. The change in morphology is associated with a significant change in the swelling ratio. It was found that the diffusion rates and permeabilities of methylene blue (MB) through the hydrogel with channel-like pores are significantly higher if the main axes of the pores are oriented parallel to the flow of MB molecules, than if it is oriented perpendicularly. These results show that different morphologies can be obtained by controlling the cross-linking degree of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels in a narrow range around 5% and by performing the polymerization reaction in moulds placed in horizontal and vertical positions, opening a new perspective for modulating their properties in applications as matrices for controlled release of drugs or as membranes for separation processes.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Poly(*N*-isopropylacrylamide); Hydrogels; Morphology

1. Introduction

Non-biodegradable hydrogels can have several applications as biomaterials, including scaffolds used as cellular culture supports, both *in vitro* and *in vivo* [1–3], coatings of cell plates used to promote controlled cell detachment [4,5] and matrices for the controlled release of drugs in target tissues [6]. In such applications, hydrogels must fulfill a number of requirements. They must be biocompatible and well tolerated by human tissue; their hydrophilic/hydrophobic balance must allow the adherence and growth of cells and they must provide an adequate chemical environment in order to keep the differentiated cell function, in the case of their use as scaffolds [7]. These abilities are largely determined by surface properties like surface charge and free energy and by the amount of water

they are capable to absorb [8] that in turn, determines the absorption and diffusion of solutes through the hydrogel and the adsorption of proteins in cultured medium [9]. The amount of water absorbed by hydrogels is limited by their ability of undergoing elastic network expansion, which can be controlled by controlling the cross-linking degree during the synthesis of chemically cross-linked hydrogels [10]. More recently, a special interest has been devoted to stimuli-responsive hydrogels, known as intelligent hydrogels. Among the various responses that can be obtained, those hydrogels which respond to temperature and pH have potential to be used as drug delivery systems, once they can be loaded with the drug solution through absorption and the rate of drug release can be controlled by changing the temperature or the pH of the medium where they are located [6,11–14]. Poly(*N*-isopropylacrylamide) [P(NIPAAm)] form well known thermosensitive hydrogels. When heated above 32 °C, P(NIPAAm) hydrogels exhibit a hydrophilic/hydrophobic transition in aqueous medium (Lower critical solution temperature – LCST) [8,15]

* Corresponding author. Tel.: +55 19 35213132; fax: +55 19 35213023.
E-mail address: mgo@iqm.unicamp.br (M. Ganzarolli de Oliveira).

characterized by the collapse of the three-dimensional gel structure with consequent expulsion of the solvent. This property can thus be useful for promoting the fast release of drugs in solution and has led to strategies for modulating the LCST for biomedical applications [16–18]. One of these strategies is copolymerizing NIPAAm with acrylic acid (AAc) [6,19]. In addition, their LCST, swollen behavior and the rate of drug release are affected by the amount of co-polymerized AAc [20]. These properties are ultimately correlated to the morphology of the polymeric network of the hydrogels. Although hydrated P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels are macroscopically isotropic to the naked eye, the dried hydrogels reveal an intricate microscopic porous structure composed of interconnected cells that can have different geometries. The morphology of these so-called “superporous hydrogels” can be a key factor in defining whether the absorption or release of solutes will be mainly driven by simple diffusion or by capillary forces [21]. In addition, morphology and surface topography of the gel structure can also affect culture cells by guiding cell spreading. In this respect, membranes or scaffolds with oriented channel-like pores are desirable to provide nutrient supply during cell culture.

Establishing a correlation between the morphology of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels and their swelling and diffusion behaviors, as well as understanding how the morphology is affected by their cross-linking degree, is fundamental for planning the use of such materials as mentioned above.

In this work, membranes of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels were synthesized in aqueous solutions using different amounts of *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) as a cross-linking agent. Hydrogels were characterized regarding their swelling behavior and LCST in hydrating conditions. The morphology of dry hydrogels changed from interconnected spherical pores to channel-like pores, with the change in the cross-linking degrees from 3 to 5%. The channel-like pore morphology led to significantly higher diffusion rates and permeabilities of methylene blue (MB) in membranes with the main axis of the pores oriented parallel to the flux of MB molecules, compared to the perpendicular orientation.

2. Experimental

2.1. Materials

N-Isopropylacrylamide (NIPAAm) monomer, stabilized 99% and acrylic acid (AAc) monomer, stabilized 99.5% (Acros organics) were previously purified twice by recrystallization in hexane and by vacuum distillation at 39 °C and 10 mmHg, respectively. *N,N'*-Methylenebisacrylamide (BIS) monomer, stabilized 99% (Acros organics) was used as a cross-linking agent, and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), 99% (Plusone-Pharmacia Biotech), was used as an accelerator, sodium persulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), P.A. (Synth), was used as initiator of polymerization, and phosphate buffer saline (PBS) with pH 7.4 (Sigma) was used as-received. Methylene blue (MB) was purchased from Synth, Brasil. Gaseous nitrogen (N_2) was purchased from Air Liquid and Parafilm was purchased

from Pechiney-Plastic Packaging, Menasha, WI. The experiments were carried out using analytical grade water from Millipore Milli-Q gradient filtration system.

2.2. Synthesis of P(NIPAAm) and P(NIPAAm-co-AAc)

P(NIPAAm) was synthesized in aqueous solutions containing 5% wt/wt of NIPAAm in the presence of sodium persulfate ($43 \mu\text{mol L}^{-1}$) and TEMED (2.5 mol L^{-1}). NIPAAm and persulfate were kept under constant stirring and nitrogen bubbling for 1 h at room temperature. After this period, TEMED, was added and the solution was kept under the same condition for 24 h. P(NIPAAm) obtained was purified by precipitation, by throwing the solution onto hot water ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) [22]. The precipitated polymer was removed from the water with tweezers and this procedure was repeated twice. The purified P(NIPAAm) was dried in a desiccator using silica-gel at room temperature for 48 h. P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels were synthesized in aqueous solutions containing 80 mol% NIPAAm/mol total monomer, 20 mol% AAc/mol total monomer, and 2, 3, 5 and 7 mol% BIS/mol (total monomer + cross-linker), in the presence of sodium persulfate ($43 \mu\text{mol L}^{-1}$) and TEMED (2.5 mmol L^{-1}) (Table 1). All the formulations were moulded as thin membranes. In each case, the appropriate amounts of NIPAAm, AAc, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and BIS were initially dissolved in water and the solutions were kept under constant stirring and nitrogen bubbling for 1 h at room temperature. After this period, TEMED was added. The final solutions were inserted in moulds composed of two glass plates ($10 \times 5 \text{ cm}$) kept apart by a rubber spacer 3 mm thick. The moulds were positioned in two different situations: (1) with the plane of the glass plates in the vertical position and (2) with the plane of the glass plates in the horizontal position. After filling with reactants the moulds were kept closed for 24 h at room temperature for the cross-linking reactions (Fig. 1(a)). The hydrogel membranes obtained were immersed in deionized water until reaching the swelling equilibrium. The membranes were further purified by several washings with deionized water [23,24], immersed in liquid nitrogen and freeze-dried for 48 h [25].

2.3. Infrared spectroscopy

Infrared spectra of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels and of NIPAAm and AAc monomers were recorded with an FT-IR (Bomem B-100 Hartmann & Braun, CA-USA) spectrophotometer at room temperature. The spectrum of AAc was

Table 1
Concentrations of reagents used in the synthesis of hydrogels with cross-linking degrees of 2, 3, 5 and 7%

Cross-linking degree (%)	NIPAAm (mmol L^{-1})	AAc (mmol L^{-1})	BIS (mmol L^{-1})
2	400	100	10
3	400	100	15
5	400	100	25
7	400	100	35

[TEMED] = $43 \mu\text{mol L}^{-1}$ and [$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$] = 2.5 mmol L^{-1} .

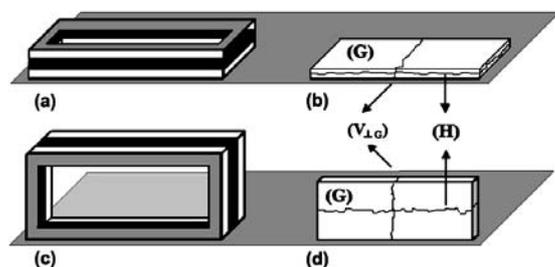


Fig. 1. Scheme of the mould of cross-linked P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membranes with the mould positioned horizontally (a and b) and vertically (c and d), relative to the bench surface. ($V_{\perp G}$) is the vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate; (G) is the surface in contact with the glass plate; (H) is the horizontal fracture surface.

obtained using a capillary film of AAC between two calcium fluoride (CaF_2) windows. The spectra of P(NIPAAm) monomer and of freeze-dried P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel were obtained in pressed KBr disks (1% wt/wt) [26]. All samples were analyzed in the range 4000–1000 cm^{-1} .

2.4. Morphological analysis

For the morphological characterization, hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% were kept in deionized water at 25 °C for 48 h to reach swelling equilibrium and at 37 °C for 4 h. The swollen hydrogels were cut in slices (2 cm \times 3 mm \times 1 mm) and frozen in liquid nitrogen in order to obtain the mechanical fracture surfaces according to Fig. 1(b) and (c). The fractured samples were freeze-dried for 24 h in order to preserve the open microporous structure of the hydrogels [25,27] and metalized with gold. Slices of the dried samples (2 cm \times 3 mm \times 1 mm) were also cut according to the surfaces of Fig. 1(b) and (c) using a scalpel, in order to obtain thin sheets with flat surfaces. Photomicrographs of cryoscopically fractured samples and of sliced samples of the dried hydrogels were examined using a Scanning Electron Microscopy (SEM-JSM 6360-LV, Tokyo, Japan) [17,19] with magnifications ranging from 18 to 1000 \times .

2.5. Swelling equilibrium behavior

The swelling ratio (Q) was calculated as the ratio of weight of swollen hydrogel (W_s), by the weight of dried hydrogel (W_d) [19,24] in PBS solution (pH 7.4), deionized water (pH 6.4) and HCl solution (pH 3.5). Hydrogel samples were immersed in these solutions at 25 °C for 2 days, until the swelling equilibrium was reached and subsequently weighted. Error bars represent the standard error of the mean of duplicates and triplicates.

2.6. Lower critical solution temperature (LCST) measurements

LCSTs were measured spectrophotometrically, based on the cloud point method [8]. Aqueous P(NIPAAm) solution

(5% wt/wt) or hydrogels (swollen in deionized water HCl solution or PBS solution, for 48 h) were transferred to a quartz cuvette (1 cm path length) and heated from 25 to 40 °C at a heating rate of 0.25 °C min^{-1} , using a Peltier-controlled diode array spectrophotometer (Hewlett-Packard, Model 8453, Palo Alto, CA, USA). Absorbance changes at $\lambda = 700$ nm, referenced against air, were recorded and LCSTs were measured as the first discontinuity in the absorbance vs. temperature, caused by light scattering due to phase separation.

2.7. Diffusion measurements

The diffusion of MB across membranes of hydrogel with cross-linking degree of 5%, was measured in a side-by-side diffusion apparatus consisting of two cylindrical glass-stirred diffusion cells (60 mL each) [24,28–30]. The swollen membranes were placed between the two cells and their ends were covered with Parafilm. The assembly was kept in a thermostated room at 25 \pm 1 °C during the experiments. The membranes were positioned in two different orientations: (a) with the main axis of the tubular pores parallel (\parallel) and (b) with the main axis of the tubular pores perpendicular (\perp), relative to the flow of MB molecules from one cell to the other. The temperature of 25 °C was selected in order to allow a comparison between the MB flow across membranes with pores opened, i.e. below LCST, in these two orientations. Membranes were 2.5 mm thick and the open area between the half-cells was $A = 3.46$ cm^2 . Before starting the measurements, the membranes were immersed in MB solution 2.7×10^{-4} mol L^{-1} at room temperature to reach absorption equilibrium and subsequently washed with deionized water to remove free MB molecules. The donor cell was filled with a 2.7×10^{-5} mol L^{-1} MB solution and the receptor cell was filled with deionized water. The increase in MB concentration in the receptor cell was monitored spectrophotometrically at 665 nm with a diode array UV-vis spectrophotometer (Hewlett-Packard, model 8453, Palo Alto, CA, USA) every 30 min for 4 h. The samples' absorbance was determined immediately upon removal of the aliquots from the receptor cell. After the absorbance measurements the aliquots were returned to the receptor cell.

3. Results and discussion

3.1. Infrared spectroscopy

Fig. 2 shows a comparison among the infrared spectra of the hydrogel with cross-linking degree of 2%, NIPAAm and AAC. The absorption band of the hydrogel at ca. 1710 cm^{-1} , can be assigned to the C=O vibration of AAC. The broad band with maximum at ca. 1650 cm^{-1} can be assigned to the overlapping of the NIPAAm and AAC absorptions in the range 1610–1670 cm^{-1} and the band at 1550 cm^{-1} can be assigned to the N–H vibration of NIPAAm. Thus, the presence of these bands in the spectrum of the purified P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel confirms the copolymerization reaction between NIPAAm and AAC monomers.

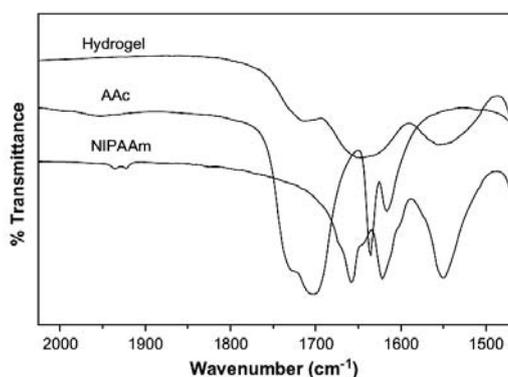


Fig. 2. FT-IR spectra of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel with cross-linking degree of 2%, NIPAAm and AAc monomers. The vertical axis was shifted to avoid the overlapping of the curves. The percentage of transmission scales varied in the range 80–50%.

3.2. Morphological analysis

Figs. 3–5 show the SEM micrographs of cryogenic fracture surfaces of hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% lyophilized from equilibrium swelling conditions at 25 and 37 °C and pH 6.4. The morphological analysis was focused on these two hydrogels because they show the greater change in swelling behavior at pH 6.4 (see below) allowing a better investigation of the correlation between morphology and swelling behavior. Fig. 3 shows the SEM micrographs of hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% below and

above LCST. Below LCST (i.e. 25 °C) the horizontal fracture surfaces (Fig. 3(a) and (c)) display highly porous structures with similar pore diameters: $33 \pm 5 \mu\text{m}$ for the hydrogel with cross-linking degree of 3% and $38 \pm 6 \mu\text{m}$ for hydrogel with cross-linking degree of 5% [15]. Above the LCST (i.e. 37 °C), the collapse of the P(NIPAAm) units induces a great hydrophobic environment responsible by the fast contraction of the hydrogel [31], which assumes a shrunken state [23]. This contraction can be clearly seen in the micrographs of Fig. 3(b) and (d), which were obtained after the achievement of swelling equilibrium above LCST. The collapsed hydrogels still display porous structures but with much smaller pore diameters [15]. There is, however, a very significant difference between the pore morphology of hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% below LCST. In the hydrogel with cross-linking degree of 3% (Fig. 3(a)) the pore structure has a sponge-like shape with spherical open and interconnected cells. On the other hand, in the hydrogel with cross-linking degree of 5% (Fig. 3(c)) the pore structure is composed of channel-like pores whose main axes are lined with the vertical axis of the mould, forming a regular and oriented tubular microstructure. The generation of these two different morphologies was confirmed in several different preparations and in hydrogels with cross-linking degrees of 2 (spherical cells) and 7% (tubular cells) (see Supplementary material). These features can be better observed in Figs. 4 and 5, which show the vertical fracture surfaces (Figs. 4(a) and 5(a)) and details of the horizontal fracture surfaces at magnifications of $1000\times$ (Figs. 4(b) and 5(b)) for the swollen hydrogels below LCST. It must be noted that the interconnectivity of the pores

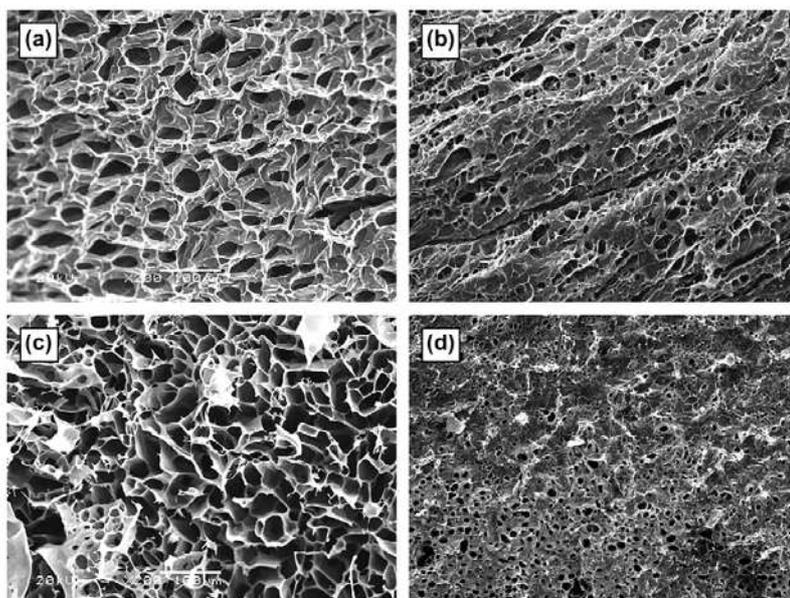


Fig. 3. SEM micrographs of hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C (a and c, respectively) and above LCST at 37 °C (b and d, respectively). Horizontal fracture surface (H), magnification: $200\times$.

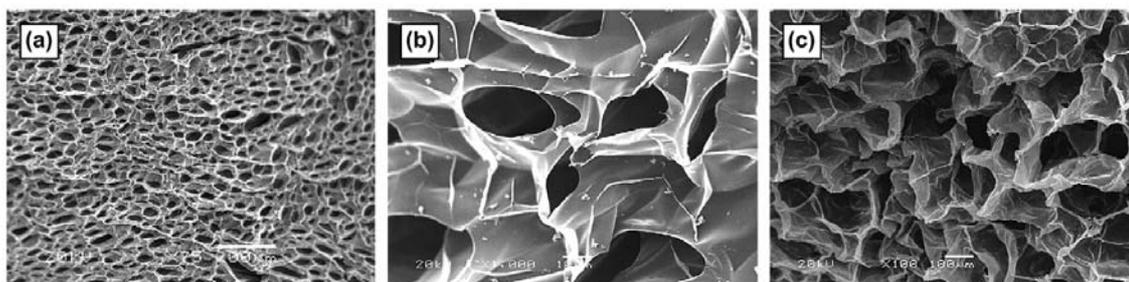


Fig. 4. SEM micrographs of hydrogel with cross-linking degree of 3% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. (a) Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp G}$), magnification: 75 \times ; (b) horizontal fracture surface (H), magnification: 1000 \times ; (c) surface in contact with the glass plaque (G), magnification: 100 \times .

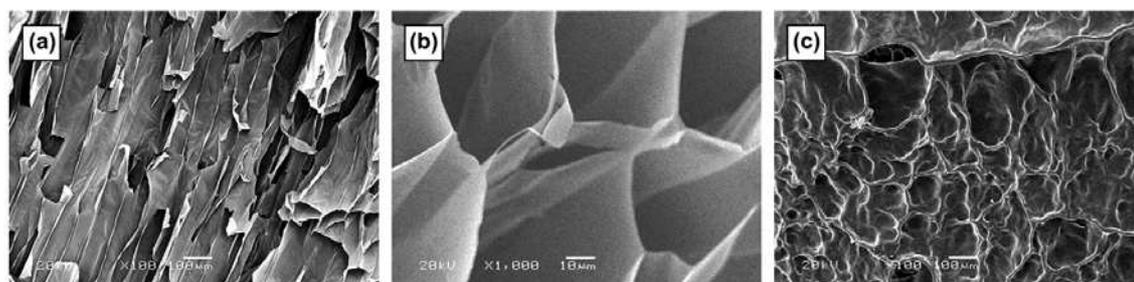


Fig. 5. SEM micrographs of hydrogel with cross-linking degree of 5% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. (a) Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp G}$), magnification: 100 \times ; (b) detail of the tubular pore structure in the horizontal fracture surface (H), magnification: 1000 \times ; (c) surface in contact with the glass plaque (G), magnification: 100 \times .

in the sponge-like structure is expected to be higher than that in the channel-like structure. Such characteristic must allow the diffusion of solutes in every direction with similar rates. On the other hand, the channel-like structure must allow higher diffusion rates along the pore axis. It must be emphasized that the cryogenic method used to exam the surface of the fractured hydrogels preserves their microstructure, as already pointed out by others [25]. Thus, the observed difference between the two morphologies is real and not an artifact caused by drying. The possibility of synthesizing hydrogels with sponge-like or channel-like structures could be used for modulating the rate of release of solutes in local or topical applications. Figs. 4(c) and 5(c) show another morphological feature of hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5%. It can be seen that the faces of the membranes formed in contact with the glass plates are mainly coated by a continuous film with relatively few apertures. This seems to be a result that does not depend on the cross-linking degree and is probably induced by the glass surface. Effects of the chemical nature of the mould surface on the morphology of superporous P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels were already reported and assigned to the establishment or not of specific interactions between the surface and the polymer [21].

Still, examination of the vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate in membranes prepared with the mould in the vertical and in the horizontal positions reveals a new feature of the tubular structure of the hydrogel with

cross-linking degree of 5%. First, in both mould positions, the main axes of the pores are aligned vertically relative to the plane of the bench surface. That is, there is a clear gravitational effect in the morphogenesis of the tubular pores. Second, in membranes prepared with the mould in the horizontal position, the pore growth during the polymerization reaction, apparently starts at both glass surfaces and proceeds toward the center of the membrane, where the two front lines of polymerization meet, defining a sharp surface, exactly at the medial plane of the membrane thickness. These meeting polymerization fronts lead to the formation of an apparently continuous wall parallel to the glass surface at this plane, as one can see in the SEM picture of Fig. 6(a) and (b). (See also another example in Fig. 4(a) and (b) in Supplementary material.) This feature suggests that the glass surface acts as a kind of “nucleating” surface for the initiation of the polymerization and phase separation processes. Another evidence that this effect is operative is the formation of a continuous membrane adjacent to both glass surfaces as one can see in the micrograph of hydrogel with cross-linking degree of 5% in Fig. 5(c).

In membranes prepared with the mould in the vertical position, the pores apparently cross the entire height of the mould (see Fig. 2 in Supplementary material). In this case, it is not possible to find any evidence that the pores also grow during polymerization reaction from both glass surfaces toward the center of the membrane, for if this happens, the vertical meeting fronts will be masked by the vertical pore walls. Thus, the

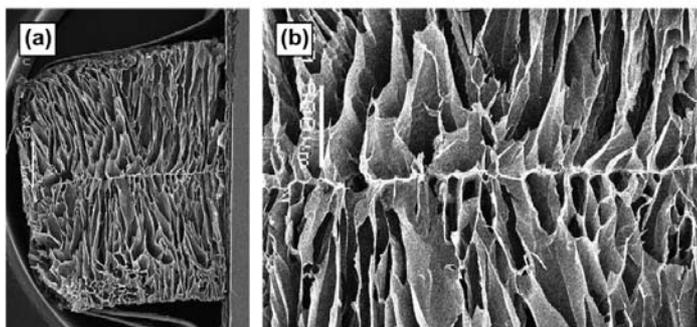


Fig. 6. SEM micrograph of a hydrogel membrane with cross-linking degree 5% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C, prepared with the mould in the horizontal position. (a) Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp\sigma}$), showing the formation of a horizontal divisor membrane at the medial plane of the membrane. Magnification: 18 \times ; (b) the same as (a). Magnification: 30 \times .

length of the pores is about half of the thickness of the membranes, for membranes prepared with the moulds in the horizontal position and is approximately the height of the mould for membranes prepared with the moulds in the vertical position. It must be noted, however, that these conclusions remain valid only for the membranes of 3 mm thickness used in this work and cannot be extrapolated to other thicknesses without previous investigation.

3.3. Lower critical solution temperature (LCST)

Incorporation of ionizable acrylic acid (AAc) groups in the structure of P(NIPAAm) hydrogels is known to increase their sensitivity to temperature, pH and ionic strength [32]. In the present case, the P(NIPAAm-co-AAc) copolymers obtained displayed an increased solubility, reflected in the shift of the LCST, from 32 °C for P(NIPAAm) solution to 37 °C for P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5%, at pH 6.4 (Fig. 7). It can also be observed in Fig. 7 that the LCST was not significantly affected by using 3 or 5 mol% BIS/mol as a cross-linking agent. The LCST is a parameter associated with the reversible volume phase transition (VPT) of P(NIPAAm), which is caused by the cleavage of hydrogen bonds between hydrophilic groups of the polymer and surrounding water molecules, with increasing temperature [33], a phenomenon driven by the increase in entropy due to the release of the hydrating water molecules [34].

3.4. Swelling equilibrium behavior

Fig. 8 shows the swelling ratios of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels prepared with 2, 3, 5 and 7 mol% BIS/mol in PBS solution (pH 7.4), deionized water (pH 6.4) and HCl solution (pH 3.5). The low swelling ratios observed at pH 3.5 can be assigned to the reduced expansion capability of the hydrated P(NIPAAm-co-AAc) chains, due to the protonation of the carboxyl groups of the AAc units, whose pK_a is 4.25 [34]. In solutions at pHs above 4.25, the swelling ratios increase expressively. This effect is more evident when comparing the swelling ratios at pHs 3.5 and 6.4. At pH 6.4 the carboxylic

groups of AAc units are deprotonated and negatively charged. The coulombic repulsions among these groups increase the Donnan potential inside the network as a whole contributing to the achievement of a greater expansion of the network and thus to higher swelling ratios [25]. Interestingly, in PBS solution with pH higher than 6.4, intermediate swelling ratios were obtained. This result can be interpreted by considering that in this saline medium the carboxylate groups ($-\text{COO}^-$) are partially neutralized by the shielding effect of the sodium ions, reducing the Donnan potential in the network and thus its expansion. In this condition, the elastic strength counteracts the network expansion [10], and leads to higher compression modules [19]. This result highlights the possibility of modulating the swelling/deswelling properties of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels by using media with different pHs or salinity, which may be important in applications aimed at releasing drugs locally on tissues, from swelled hydrogels.

Fig. 8 also shows the effect of the extent of cross-linking with BIS on the swelling ratio. It was observed that in all three

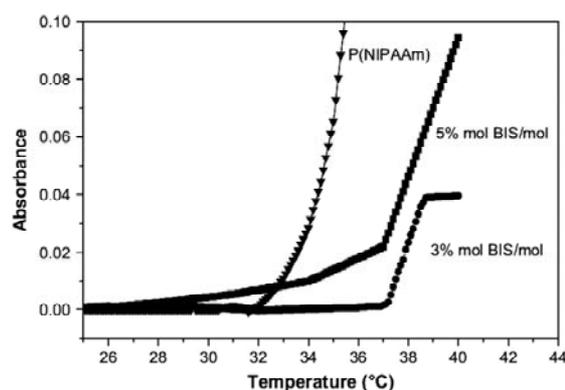


Fig. 7. Lower critical solution temperature (LCST) of swollen P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% and of P(NIPAAm) solution (5% wt/wt) without AAc, measured spectrophotometrically through the absorbance changes at 700 nm with increasing temperature. Heating rate = 0.25 °C min⁻¹.

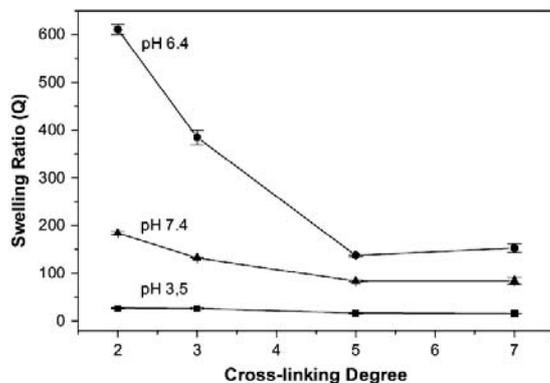


Fig. 8. Swelling ratio of hydrogels with cross-linking degrees of 2, 3, 5 and 7% in solutions with different pHs after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. Error bars are the SEM of triplicates.

pHs studied, the swelling ratio decreases with increasing cross-linking degrees from 2 to 5 mol% BIS/mol. This result is less evident at pH 3.5, where the swelling ratios are low, but this trend can also be identified in this condition. What calls attention in these results is that increasing the cross-linking degrees from 5 to 7 mol% BIS/mol did not further decrease the swelling ratio, suggesting that a transition in the swelling behavior is achieved at a cross-linking degree of 5%. An apparent correlation can be established between the morphology of hydrogels with cross-linking degrees of 3 and 5% and this transition in the swelling behavior. The higher swelling ratio of hydrogels with cross-linking degrees below 5% is possibly associated with the higher three-dimensional radial expansion capability of spherical cells, compared to the tubular-like cells of hydrogels with cross-linking above 5%. In the latter, the expansion is restricted in the vertical axis relative to the transversal plane of the pores, which can undergo bi-dimensional radial expansion.

3.5. Diffusion measurements

The diffusion of MB across the membranes of the 5% cross-linked hydrogel was used to characterize the tubular morphology obtained in this case and to compare the diffusion behavior in this morphology with that obtained in hydrogel with 3% cross-linked hydrogel with non-channel, interconnected pore structure. As MB is a cationic dye [22], it adsorbs strongly on the negatively charged P(NIPAAm-co-AAc) chains. For this reason, the membranes were previously soaked in MB solution for one day, in order to achieve absorption equilibrium. After this time, P(NIPAAm-co-AAc) membranes displayed the dark blue coloration of the original MB solution and the dye solution became only slightly blue. The nature of the interactions between the cationic MB molecules and acrylamide hydrogels has already been discussed in other works [22,35]. They involve not only the electrostatic interactions between the cationic group of MB and the carboxyl group of the hydrogel, but also hydrophobic interactions

between the conjugated aromatic system of MB and the methyl groups of the hydrogel. After absorption equilibrium has been achieved, the diffusion of free MB molecules is limited by their passage through the water-filled regions, or free volumes, inside the pore walls. Such diffusion behavior is well known to change strongly below and above the LCST. In the present case the measurements were done below LCST.

The diffusion rates and corresponding permeabilities of the 5% cross-linked hydrogel were measured in membranes mounted in the diffusion cell with the main axis of the pores oriented parallel and perpendicularly relative to the MB flow (Figs. 9 and 10). In these two different situations, it can be expected that MB displays different kinetics of diffusion, for in the perpendicular orientation, the number of pore walls that must be crossed by MB molecules is larger than in the parallel orientation, for the same membrane thickness. As discussed above, the tubular pores are not continuous and do not cross the entire membrane thickness (Fig. 5(a)). Thus, even in the parallel orientation, the diffusing MB molecules have to cross pore membranes. The influence of pore orientation of 5% cross-linked hydrogel in the diffusion rate of MB in aqueous solution is shown in Figs. 9(a) and 10(a). It can be seen that the diffusion rate of MB is ca. 10 times higher in the membrane with tubular pores oriented parallel than in the membranes with the pores oriented perpendicularly, relative to the flow of MB molecules. This difference is also reflected in the bar graph of Fig. 10(b) which shows the corresponding permeabilities, calculated through Eq. (1):

$$P = \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right) \frac{Vd}{C_0 A} \quad (1)$$

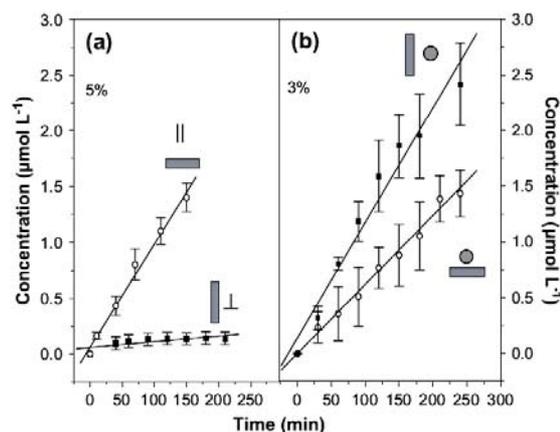


Fig. 9. Diffusion of methylene blue (MB) at 25 °C as a function of time across membranes of hydrogels with cross-linking degrees of 5% (a) and 3% (b) for membranes prepared with the mould positioned in the horizontal (||) and vertical (⊥) positions. In (a), || and ⊥ indicate that the flow of MB is parallel and perpendicular relative to the main axis of the tubular pores, respectively. In (b), (●) indicates that the membranes have interconnected spherical pores. The straight lines were obtained by linear regression of the experimental points. MB concentration in the donor cell was 2.7×10^{-5} mol L⁻¹ in all cases.

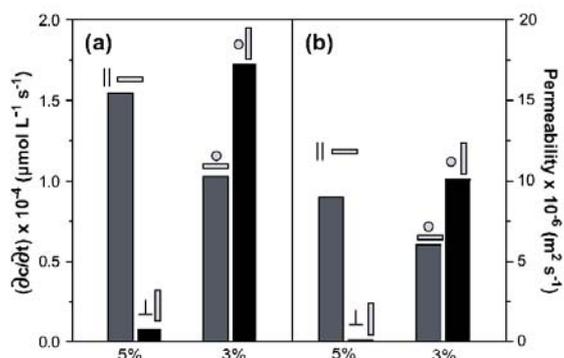


Fig. 10. Diffusion rate ($\partial c/\partial t$) (a) and permeability (b) of methylene blue (MB) at 25 °C across membranes of hydrogels with cross-linking degrees of 5% (a) and 3% (b) for membranes prepared with the mould positioned in the horizontal (□) and vertical (▧) positions. In (a), ⊥ and ⊥ indicate that the flow of MB is parallel or perpendicular relative to the main axis of the tubular pores, respectively. In (b), ⊙ indicates that the membranes have interconnected spherical pores. MB concentration in the donor cell was $2.7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ in all cases.

where, $(\partial c/\partial t)$ is the slope of the straight lines obtained in the linear regressions of Fig. 9, V and C_0 are the volume of the donor cell compartment and the concentration of MB donor solution, respectively, and A and d are the area and the thickness of the membrane, respectively [24,28]. It can be considered that, in the experimental conditions used, the MB concentration in the donor cell remains practically constant (it decreases by less than 6%) and the concentration in the receptor cell is always very low, leading to a practically constant concentration gradient between both sides of the membrane. In addition, in the concentration of the MB solution used ($2.7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), MB is in its monomeric form. This was confirmed by obtaining the UV–vis spectrum of the solution, which displayed only the absorption band due to the monomer at 665 nm [36] (data not shown). The permeability of MB in the 5% cross-linked hydrogel is ca. 45 times higher in the membrane with tubular pores oriented parallel than in the membranes with the pores oriented perpendicularly, relative to the flow of MB molecules. The significant change observed in the diffusion rates, and permeabilities to MB, depending on the membrane orientation in the diffusion cell, confirms the existence of long oriented tubular pores in the hydrogels synthesized with cross-linking degrees of 5% (or higher), according to what can be seen in the morphologies as shown in Figs. 4–6.

Figs. 9 and 10 also show the diffusion behavior of MB solution in the 3% cross-linked hydrogel with interconnected spherical pores. Although SEM micrographs of hydrogel 3% show an apparent isotropic distribution of non-channel interconnected pores that doesn't depend on the position of the mould during the preparation of the membranes, diffusion parameters changed depending on the position of the mould. In this case, diffusion rates ca. 1.8 times higher and corresponding permeabilities ca. 1.7 higher (Figs. 9(b) and 10(b), respectively) were obtained for membranes of hydrogel 3 prepared

with the mould in the vertical position. Although these differences are much smaller than those obtained for the tubular hydrogel, these results show that these membranes must also have some degree of pore orientation and that this orientation favors diffusion if the membranes are prepared with the mould in the vertical position, compared to the horizontal position.

In addition, regardless the position of the mould, the diffusion rates in the 3% cross-linked hydrogel were found to be much higher than the diffusion rates in hydrogel 5%, with the main axis of the pores oriented perpendicularly to solute flow. On the other hand, the magnitude of the diffusion rates obtained for the 3% cross-linked hydrogel approaches that of the 5% cross-linked hydrogel with the main axis of the pores oriented parallel to the solute flow. This result is also reflected in the permeability values of Fig. 10(b) and indicates that the diffusion rate depends on the number of pore walls that have to be crossed by MB molecules in their course across the membranes. The similar order of magnitude obtained for the diffusion rates in the 3% cross-linked hydrogel and in the 5% cross-linked hydrogel with pores oriented perpendicularly to solute flow, indicates that, in both cases, the solute must cross a similar number of pore walls in order to diffuse through the same membrane thickness. This is in accordance to the fact that the tubular pores do not cross the entire thickness of the membranes as discussed above.

These different morphologies, which can be obtained in P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels by changing the cross-linking degree around 5%, have not been reported before in other works in the literature. There are also no reports on the effect of the position of the mould on the morphology of these hydrogels, as well as on the influence of these particular morphologies on their swelling and diffusion behaviors. However, other techniques used to modulate the morphology of P(NIPAAm) hydrogels, have already been reported. Zhang and Chu [37] for example, used a new strategy for preparing PNIPAAm gel with improved properties, by cross-linking polymerization in DMSO at low temperatures. SEM analysis of the gels obtained, revealed a microstructure much more oriented and regular than the conventional PNIPAAm gels, but still different from the tubular structure reported here. Similarly, these authors also attributed the improved swelling and deswelling kinetics and dynamic response of this hydrogel to its unique interior morphology. Zhang et al. [17] reported SEM images of freeze-dried P(NIPAAm-co-AAc) gels with a morphology of isotropically interconnected cells, very similar to the non-tubular morphology of the hydrogel with cross-linking degree of 3% reported here. However, these authors have only used these images to analyze the influence of the incorporation of AAc and in the pH during the copolymerization reaction in the expansion of P(NIPAAm) network and did not correlate changes in morphology with diffusion properties. Gemeinhart and colleagues [21] have described the pore structure of cross-linked P(NIPAAm) superporous hydrogels, which may display spherical interconnected pores, as well as elongated pores. However, these authors used a gas blowing technique to obtain such morphologies. These works, although using different approaches, reinforce the interest in

understanding and controlling the morphology and swelling behavior of P(NIPAAm) hydrogels. The results herein reported, underscore the influence of two new factors, which could be used to modulate the properties of P(NIPAAm-co-AAc), namely the cross-linking degree and the position of the mould during the polymerization process. Together with other strategies, these results may increase the potential of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels in applications for the controlled release of drugs, or as membranes for separation processes.

4. Conclusions

Sponge-like porous hydrogels of P(NIPAAm-co-AAc) with spherically interconnected cells can be obtained with cross-linking degrees below 5%, while hydrogels with oriented channel-like pores can be obtained with cross-linking degree of 5 or 7%. The change in morphology is associated with a significant change in the swelling behavior of the hydrogels. Diffusion rates and permeabilities of MB through the hydrogel with channel-like pores are significantly higher if the main axes of the pores are oriented parallel to the flux of MB molecules, than if it is oriented perpendicularly. These results show that different morphologies can be obtained by controlling the cross-linking degree of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels in a narrow range around 5% and by performing the polymerization reaction in moulds placed in horizontal and vertical positions, allowing the modulation of their swelling and solute diffusion behaviors.

Acknowledgments

RS holds a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), project 04/11204-4. The authors wish to thank FAPESP for financial support.

Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.polymer.2007.05.010.

References

- [1] Wang K, Tsai DC, Nam EK, Aitken M, Sprague SM, Patel PK, et al. *J Biomed Mater Res* 1998;42:491–9.
- [2] Vernon B, Gutowska A, Kim SW, Bae YH. *Macromol Symp* 1996; 109:155–67.
- [3] Stile RA, Healy KE. *Biomacromolecules* 2001;2:185–94.
- [4] Schmaljohann D, Oswald J, Jørgensen B, Nitschke M, Beyerlein D, Werner C. *Biomacromolecules* 2003;4:1733–9.
- [5] Higuchi A, Yamamoto T, Sugiyama K, Hayashi A, Tak TM, Nakagawa T. *Biomacromolecules* 2005;6:691–6.
- [6] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27–46.
- [7] Diego RB, Olmedilla MP, Serrano Aroca Á, Gómez Ribelles M, Monleón Prads M, Gallego Ferrer G, et al. *Mater Sci Mater Med* 2005; 16:693–8.
- [8] Schild HG. *Prog Polym Sci* 1992;17:163–249.
- [9] Hoffman AS. *Artif Organs* 1995;19:458–67.
- [10] Matzelle TR, Geuskens G, Kruse N. *Macromolecules* 2003;36:2926–31.
- [11] Hoffman AS. *Adv Drug Delivery Rev* 2002;43:3–12.
- [12] Yamashita K, Hashimoto O, Nishimura T, Nango M. *React Funct Polym* 2002;51:61–8.
- [13] Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE, Raucher D. *Adv Drug Delivery Rev* 2002;54:613–30.
- [14] Shin BC, Kim SS, Ko JK, Jegal J, Lee BM. *Eur Polym J* 2003;39: 579–84.
- [15] Park TG, Hoffman AH. *Biotechnol Progr* 1994;10:82–6.
- [16] Gutowska A, Bae YH, Jacobs H, Feije J, Kim SW. *Macromolecules* 1994;27:4167–75.
- [17] Zhang X-Z, Yang Y-Y, Wang F-J, Chung T-S. *Langmuir* 2002;18: 2013–8.
- [18] Vernon B, Kim SW, Bae YH. *J Biomed Mater Res* 2000;51:69–79.
- [19] Zhang X-Z, Sun G-M, Wu D-Q, Chu C-C. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:865–75.
- [20] Zhang X-Z, Wu D-Q, Chu C-C. *Biomaterials* 2004;25:3793–805.
- [21] Gemeinhart RA, Park H, Park K. *Polym Adv Technol* 2000;11:617–25.
- [22] Guilherme MR, Silva R, Giroto EM, Rubira AF, Muniz EC. *Polymer* 2003;44:4213–9.
- [23] Ito K, Ujihira Y, Yamashita T, Horie K. *Radiat Phys Chem* 2000;58: 521–4.
- [24] Guilherme MR, da Silva R, Rubira AF, Geuskens G, Muniz EC. *React Funct Polym* 2004;61:233–43.
- [25] Sannino A, Netti PA, Mensitiri G, Nicolais L. *Compos Sci Technol* 2003;63:2411–6.
- [26] Sahiner N, Malci S, Celikbicak Ö, Kantoğlu Ö, Salih B. *Radiat Phys Chem* 2005;74:76–85.
- [27] McGrath JL, Hartwig JH, Kuo SC. *Biophys J* 2000;79:3258–66.
- [28] Muniz EC, Geuskens G. *J Membr Sci* 2000;172:287–93.
- [29] Hickey AS, Peppas NA. *J Membr Sci* 1995;107:229–37.
- [30] Hickey AS, Peppas NA. *Polymer* 1997;39:5931–6.
- [31] Kuckling D, Harmon ME, Frank CW. *Macromolecules* 2002;35: 6377–83.
- [32] Stile RA, Healy KE. *Biomacromolecules* 2002;3:591–600.
- [33] Liang L, Rieke PC, Liu J, Fruxell GE, Young JS, Engelhard MH, et al. *Langmuir* 2000;16:8016–23.
- [34] Serpe MJ, Jones CD, Lyon LA. *Langmuir* 2003;19:8759–64.
- [35] Dadhaniya PV, Patel MP, Patel RG. *Polym Bull* 2006;57:21–31.
- [36] Zanjanchi MA, Sohrabnejad S. *J Inclusion Phenom Macrocylic Chem* 2003;46:43–9.
- [37] Zhang X-Z, Chu C-C. *J Mater Sci* 2003;13:2457–64.

3.2. Material Suplementar 1 do Artigo *Polymer*, 48(14)4114-4122 (2007)

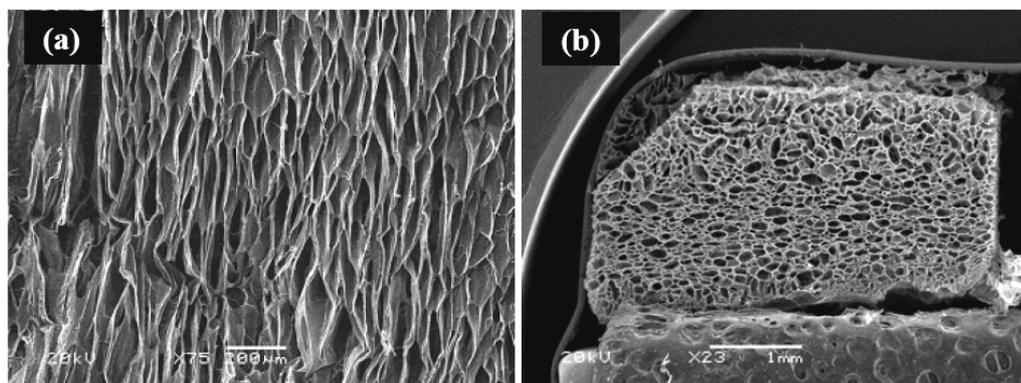


Fig. 1. SEM micrographs of hydrogel with cross-linking degree 5% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. The membrane was prepared with the mould in the **horizontal** position. (a) Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp G}$), magnification 75x; (b) Detail of the tubular pore structure in the horizontal fracture surface (H), magnification 23x.

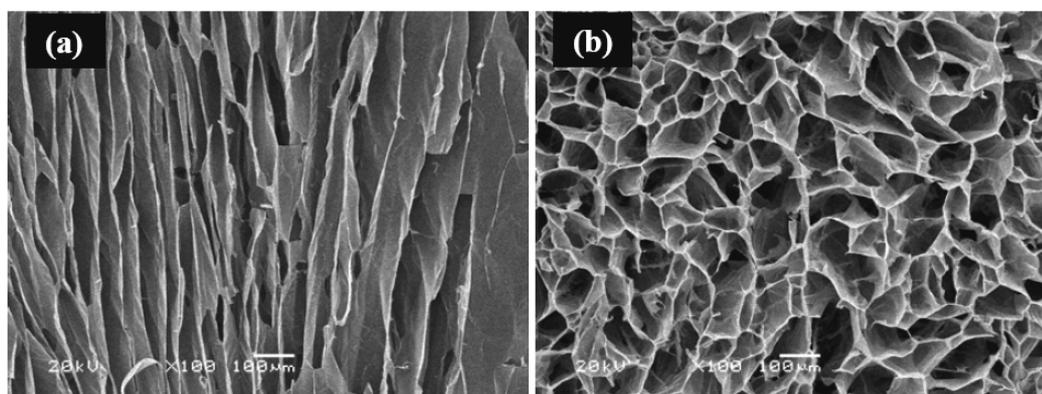


Fig. 2. SEM micrographs of hydrogel with cross-linking degree 7% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. The membrane was prepared with the mould in the **horizontal** position. (a) Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp G}$), magnification 100x; (b) Detail of the tubular pore structure in the horizontal fracture surface (H), magnification 100x.

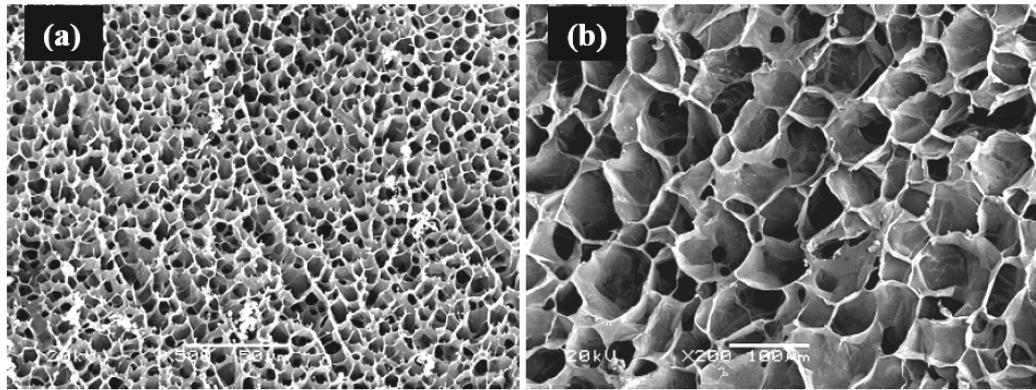


Fig. 3. SEM micrographs of hydrogel with cross-linking degree 2% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. The membrane was prepared with the mould in the horizontal position (a). Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp G}$), magnification: 50x; (b) The same as (a), magnification 200x.

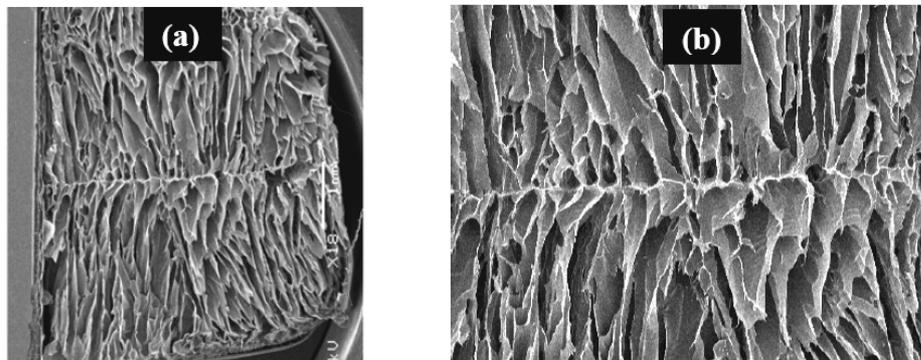


Fig. 4. SEM micrographs of hydrogel with cross-linking degree 5% after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. The membrane was prepared with the mould in the **horizontal** position. (a) Vertical fracture surface perpendicular to the plane of the glass plate ($V_{\perp G}$), showing the formation of a horizontal dividing membrane at the medial plane of the membrane. Magnification: 18x; (b) The same as (a). Magnification 100x.

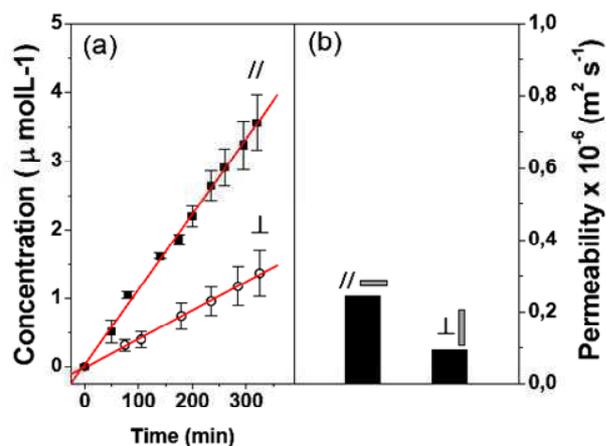


Fig. 5. Diffusion (A) and permeability (B) of methylene blue (MB) at 25°C as a function of time across membranes of hydrogels with cross-linking degrees 5% for membranes prepared with the mould positioned in the horizontal (—) and vertical (⊥) positions. // and \perp indicate that the flow of MB is parallel or perpendicular relative to the main axis of the tubular pores, respectively. MB concentration in the donor cell was $2.7 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ in all cases.

3.3. Material Suplementar 2: Determinação do coeficiente de partição (K) do Azul de metileno no hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) reticulado com 5% de MBAAm.

A solubilidade do azul de metileno, AM (Figura 6) nos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) foi avaliada através do cálculo do coeficiente de partição (K) do corante na fase gel em relação à água [Guilherme, 2003]. O procedimento foi realizado através da imersão de uma massa conhecida do hidrogel em solução de azul de metileno (pH = 6.4). Foram utilizadas para isto duas soluções de azul de metileno de concentrações $2,7 \times 10^{-4}$ e $2,7 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$.

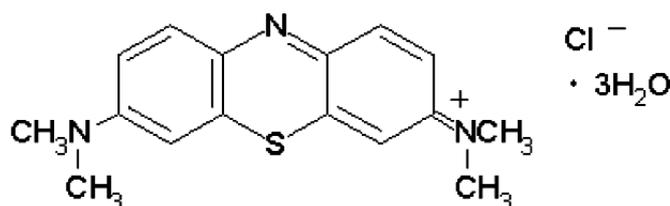


Figura 6. Estrutura molecular do azul de metileno

K foi definido como a razão da concentração do AM na fase gel (C_g), em relação à água (C_a), após o equilíbrio de absorção ter sido atingido, o que leva aproximadamente 2 dias (Eq. 1). As concentrações foram calculadas com base nos valores de absorbância em 665 nm da solução de azul de metileno antes de ser adicionado o hidrogel e após o equilíbrio, utilizando-se uma curva de calibração da concentração de azul de metileno em água.

$$K = C_g / C_a \quad \text{Eq. (1)}$$

Os valores de K obtidos para o AM foram 19,79 e 7,50 respectivamente para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em solução mais e menos concentrada, respectivamente. Estes resultados demonstram que o AM tem preferência pela fase gel em relação à água. A grande solubilidade do azul de metileno na fase gel em relação à água é atribuída a interações iônicas que podem ocorrer entre o AM e a matriz polimérica. Isto ocorre porque a solução de AM apresenta pH em torno de 6 (pH da água desionizada) e neste pH os grupamentos AAc, que possuem pKa igual a 4,25, presentes no copolímero estão desprotonados. Uma vez sendo o azul de metileno é uma molécula catiônica e a matriz polimérica apresentando carga resultante negativa ocorre forte adsorção da molécula de AM no hidrogel, por interações entre cargas opostas. Além disso, a molécula de azul de metileno também apresenta interações hidrofóbicas com a matriz polimérica [Zanjanchi, 2003], favorecendo ainda mais a sua adsorção. Somente após o equilíbrio de adsorção ser atingido a difusão das moléculas de AM que estão livres irá ocorrer através do volume livre dos hidrogéis, região esta situada entre as paredes dos poros e preenchida com solução.

Observou-se ainda através dos espectros de ultravioleta-visível, UV-VIS (Figura 7) das soluções de AM que na solução de menor concentração ($2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) as moléculas de azul de metileno estão preferencialmente na forma monomérica enquanto que na solução de maior concentração ($2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) as moléculas de azul de metileno estão na sua maioria dimerizadas. Através da Figura 7 podemos observar que a solução de menor concentração apresentou banda com máximo de absorção em 665 nm enquanto que a solução de maior concentração apresentou banda com máximos de absorção em 610 e 665 nm. Os valores dos comprimentos de onda de maior absorção são atribuídos, respectivamente, ao monômero e ao dímero de AM [Zanjanchi, 2003].

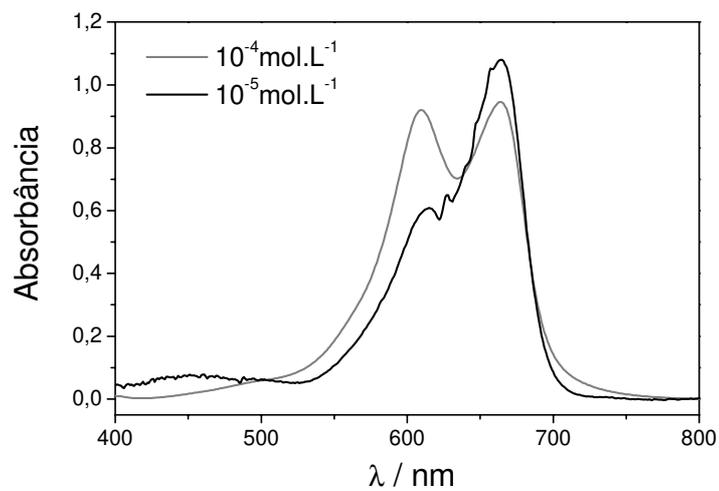


Figura 7. Espectro de absorção para soluções de azul de metileno $2,7 \times 10^{-4}$ e $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Referências

Guilherme MR, Silva R, Giroto EM, Rubira AF, Muniz EC. *Polymer* 2003;44(15):4213-4219.

Zanjanchi MA, Sohrabnejad S. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem.* 2003;46:43-49

3.4. Material Suplementar 3: Análise da morfologia das membranas de P(NIPAAm-co-AAc) intumescidas em água e em solução de RSNOs

A análise das morfologias das membranas dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM-JSM 6360-LV, Tokyo, Japan). Previamente à análise, os hidrogéis liofilizados foram metalizados com ouro por 2 min em alto vácuo (Balt-Tec MED 020, Liechtenstein). Para isto os hidrogéis foram intumescidos até o equilíbrio e em seguida congelados em N₂ e fraturados mecanicamente em duas orientações diferentes de acordo com a posição do hidrogel durante a síntese (vide *Polymer*, 48(14)4114-4122 (2007)) e então liofilizados por 24 h (Vir Tis-Benchtop K, Hampshire, UK). Observou-se, para todos os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) que a superfície do hidrogel que fica em contato com a placa de vidro (S_V), durante a síntese, é recoberta por um filme contínuo, o qual apresenta poucas aberturas (Figura 8). Uma vez que todos os hidrogéis reticulados com diferentes teores de MBAAm (2, 3, 5 e 7%) apresentaram esta membrana, podemos considerar que a formação da mesma não é influenciada pelo grau de reticulação dos hidrogéis, mas provavelmente pela superfície de vidro do molde usado na síntese.

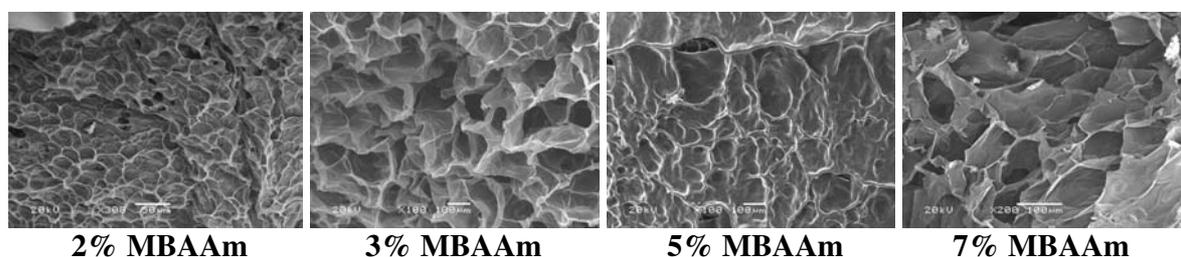


Figura 8. Influência da placa de vidro na superfície das membranas dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc).

Como já descrito anteriormente, através das micrografias das superfícies de fratura dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) (Figura 9) pode-se observar que os mesmos apresentam diferentes morfologias que dependem do grau de reticulação. Quando o copolímero é reticulado com 3% ou menos de agente reticulante sua estrutura é de celas esféricas (esponjosa) e quando reticulado com 5% ou mais de agente reticulante sua estrutura é formada por tubos paralelos cujos eixos estão alinhados paralelamente ao eixo gravitacional.

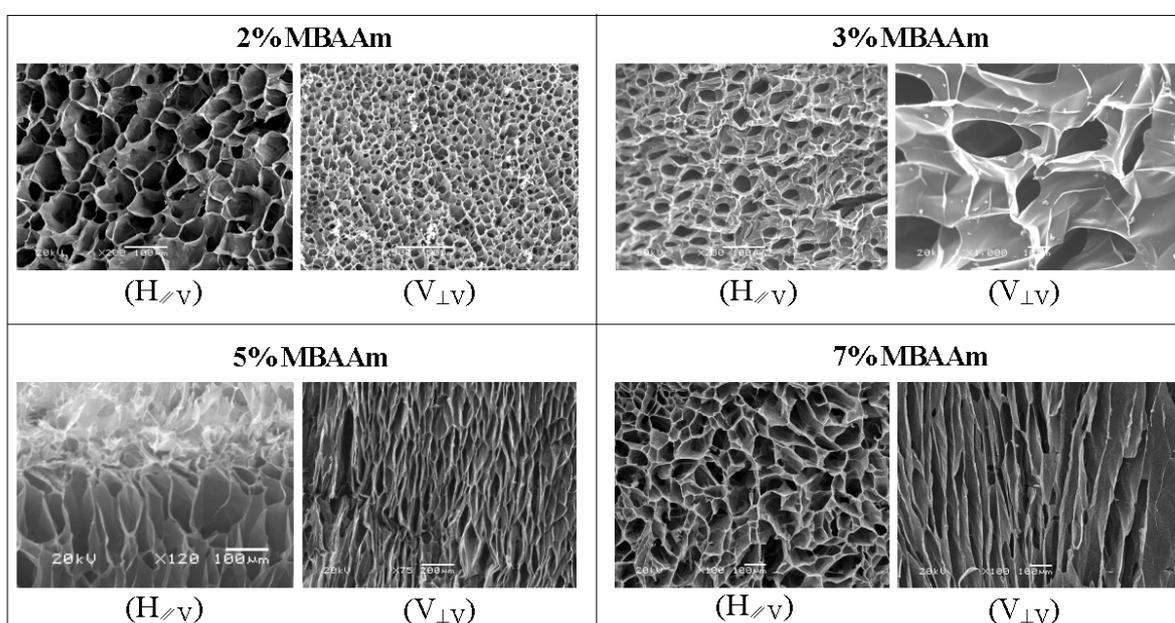


Figura 9. Influência do grau de reticulação na morfologia dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc). ($H_{\parallel V}$) é a superfície de fratura horizontal e ($V_{\perp V}$) é a superfície de fratura vertical.

Além da caracterização morfológica dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) intumescidos em água desionizada, realizou-se também a caracterização da morfologia dos mesmos hidrogéis, intumescidos em soluções de S-nitrosotióis, RSNOs, (43 mmol.L^{-1}) por 6 h (Figuras 10 e 11). Os RSNOs utilizados foram a S-nitrosoglutationa, GSNO, e a S-nitroso-acetilcisteína, SNAC. Após o

intumescimento, os hidrogéis foram liofilizados e fraturados mecanicamente em duas orientações diferentes de acordo com a posição do hidrogel durante a síntese, (para detalhes veja *Polymer*, 48(14)4114-4122 (2007)). Em seguida, os hidrogéis foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e espectrometria de energia dispersiva (EDS) para caracterizar sua composição.

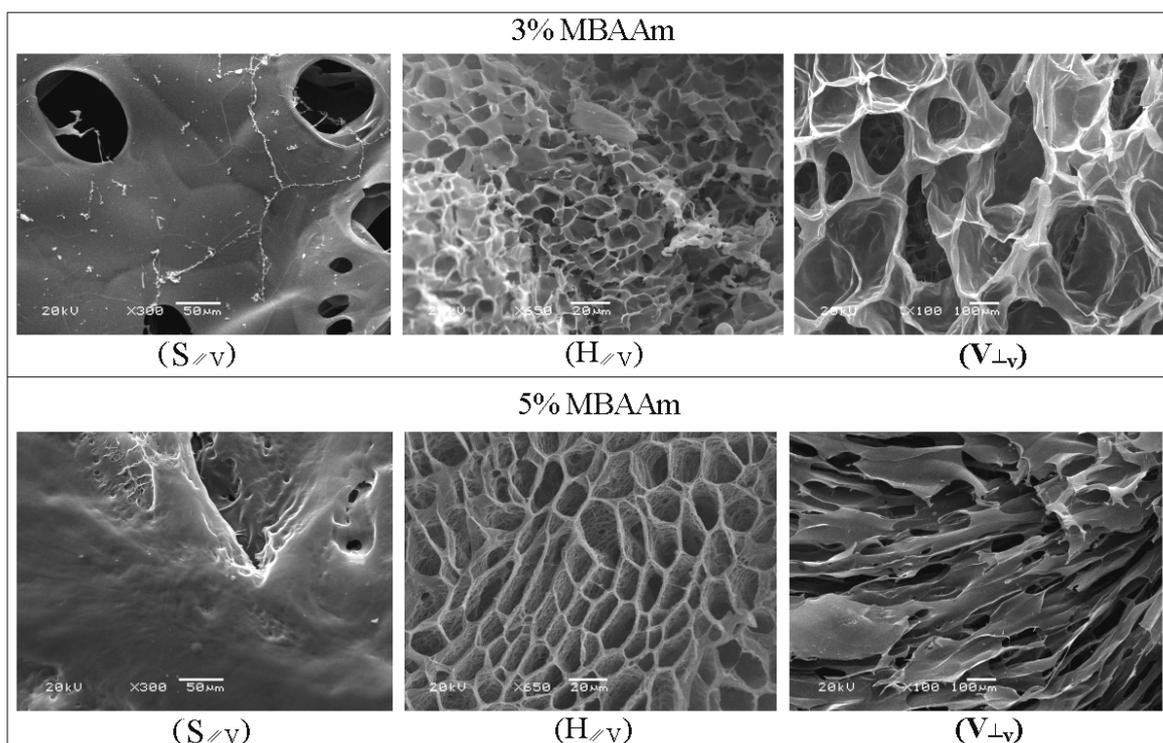


Figura 10. Micrografias eletrônicas de varredura dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) reticulados com 3 e 5% de MBAAm, intumescidos em solução de GSNO. ($S_{//V}$) é a superfície em contato com a placa de vidro; ($H_{//V}$) é a superfície da fratura horizontal e ($V_{\perp V}$) é a superfície da fratura vertical perpendicular ao plano da placa de vidro.

Foi observado que os hidrogéis intumescidos em solução de SNAC apresentam poros com diâmetros maiores do que os intumescidos em solução de GSNO (Figuras 10 e 11). Esta diferença foi atribuída ao fato dos hidrogéis não

terem atingido o equilíbrio de intumescimento após 6 h, além de possuírem carga efetiva negativa. O hidrogel sendo negativamente carregado apresenta menor velocidade de intumescimento quando imerso em solução de GSNO, negativamente carregada, do que quando imerso em solução de SNAC, positivamente carregada. O favorecimento da absorção de solução de SNAC leva a uma maior expansão da rede polimérica resultando em poros com diâmetros maiores.

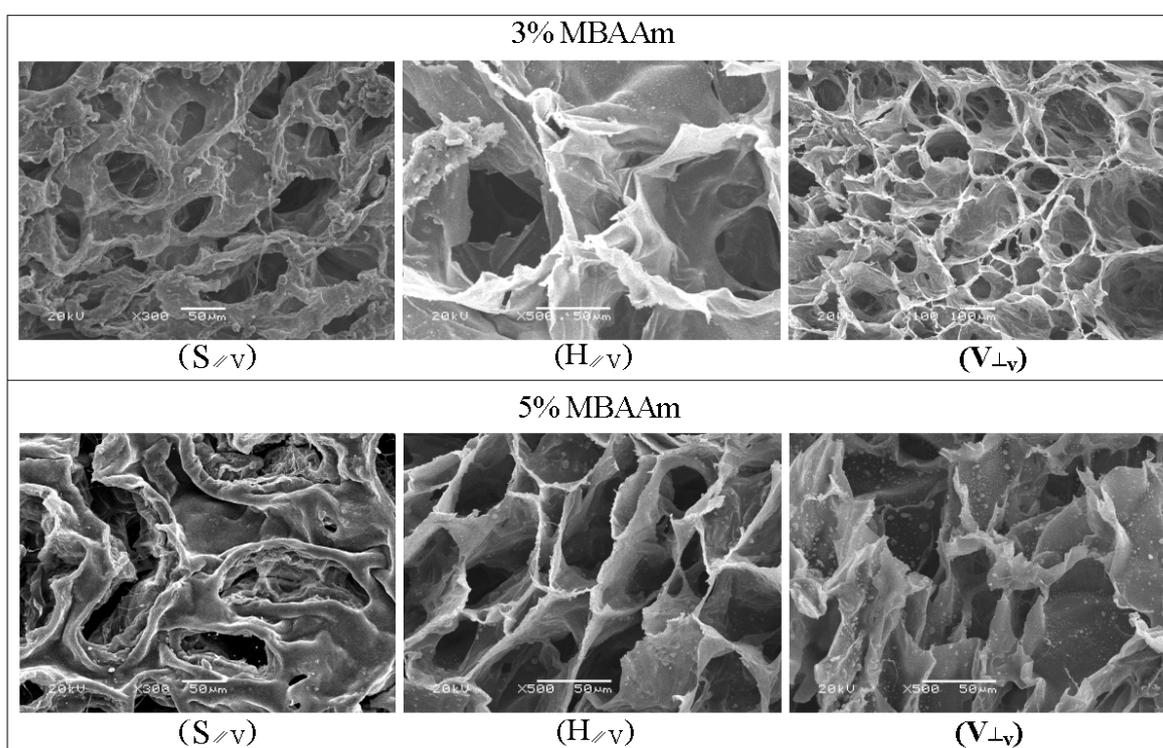


Figura 11. Micrografias eletrônicas de varredura dos hidrogéis P(NIPAAm-co-AAc) reticulados com 3 e 5% de MBAAm, intumescidos em solução de SNAC. $(S_{//v})$ é a superfície em contato com a placa de vidro; $(H_{//v})$ é a superfície da fratura horizontal e $(V_{\perp v})$ é a superfície da fratura vertical perpendicular ao plano da placa de vidro.

Além disso, foi observado que nos hidrogéis intumescidos em solução de SNAC (Figuras 11) ocorre a formação de cristais de cloreto de sódio oriundos da

associação entre o íon cloreto, contra íon da NAC e o íon sódio proveniente do nitrito de sódio utilizado para nitrosar a NAC. Os cristais formados podem ser vistos mais detalhadamente na figura 12.

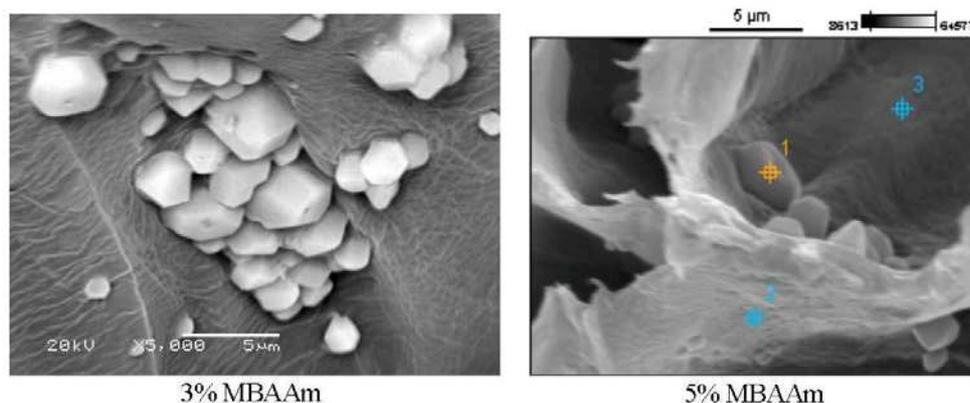


Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc).

Para confirmar que os cristais formados são de NaCl foi realizada uma análise de EDS (Figura 13) onde podemos observar que átomos de sódio e de cloro são detectados em qualquer das regiões analisadas uma vez que a análise de EDS para os pontos 2 e 3 também mostrou sinais significativos destes átomos. Entretanto quando a análise é feita exatamente no cristal formado (pt1) vemos a predominância dos sinais de sódio e cloro.

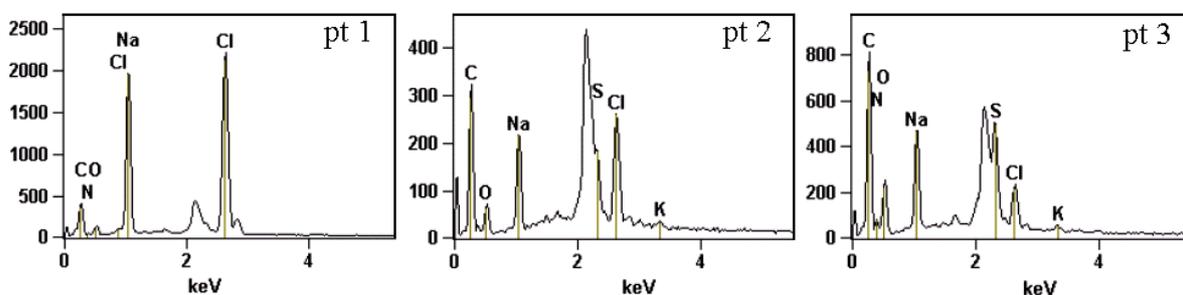


Figura 13. EDS dos pontos (pt 1 a 3) referente à micrografia dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) reticulados com 5% de MBAAm da figura 12.

3.5. Material Suplementar 4: Determinação da temperatura de transição de fase (LCST) de hidrogeis de P(NIPAAm-co-AAc)

A síntese dos copolímeros de P(NIPAAm-co-AAc) foi realizada conforme descrito no artigo *Polymer* (48(14)4114-4122 (2007)) através da reação de copolimerização do NIPAAm ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$) com AAc ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), em meio aquoso, na presença de persulfato de sódio ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ para o copolímero linear e $43 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para os reticulados) e TEMED (25 mmol L^{-1} para o copolímero linear e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para os reticulados). Os hidrogeis reticulados foram moldados como membranas finas de ($10 \times 5 \times 0,4 \text{ cm}$) enquanto que o copolímero linear não foi moldado.

A copolimerização do NIPAAm com o AAc, monômero mais hidrofílico que o NIPAAm, aumentou a solubilidade em água dos copolímeros de P(NIPAAm-co-AAc) que passaram a apresentar a “Lower Critical Solution Temperature”, LCST ou Temperatura consoluta Inferior em $32 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Shin *et al.*, 2003). Os copolímeros P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados sem reticulante e com MBAAm apresentaram separação de fases a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ quando imersos em água desionizada ou solução aquosa ácida em pH 3,5 (Figura 14 A e B). O valor de LCST obtido para o P(NIPAAm) puro (5,0%) foi $33 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Figs. 14 B). O hidrogel P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados sem reticulante ou seja reticulado por entrelaçamento de cadeias, quando em temperatura acima de $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ encolhe, expulsando a água contida em seu interior através do colapso das cadeias poliméricas, resultante da separação de fases das unidades de P(NIPAAm) (Zhang e Peppas, 2002). Por outro lado, observou-se que o hidrogel P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados com MBAAm apresenta separação de fases, porém não colapsa totalmente num período de 12 horas de imersão em água aquecida a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$. No caso do

copolímero P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados sem reticulante observamos apenas um aumento significativo da viscosidade da solução polimérica com a temperatura, que pode levar a uma consistência de gel, dependendo da concentração do copolímero.

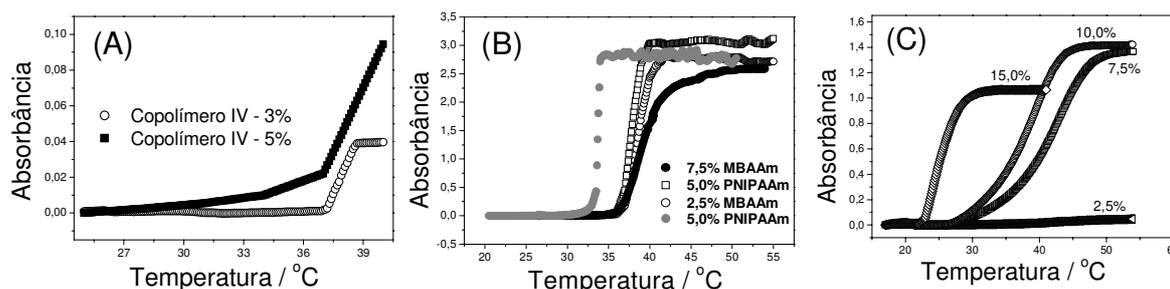


Figura 14. Determinação da LCST: (A) para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) reticulados com 3 e 5% de MBAAm, intumescidos em água desionizada, (B) para soluções aquosas do copolímero linear de P(NIPAAm-co-AAc), contendo 2,5, 5,0 e 7,5% em massa de copolímero e para solução aquosa contendo 5,0% em massa de P(NIPAAm) e (C) para soluções aquosas do copolímero de P(NIPAAm-co-MAc), contendo 2,5, 7,5, 10,0 e 15,0% em massa de. A LCST foi determinada através de uma rampa de aquecimento de 10 °C h⁻¹ acompanhada em 700 nm.

Na Figura 14 (C), observa-se que a adição de 20% de monômeros ácido metacrílico, MAc, menos hidrofílicos que o NIPAAm, confere ao copolímero P(NIPAAm-co-MAc) uma menor temperatura de transição de fases em relação ao P(NIPAAm) puro. A síntese do copolímero de P(NIPAAm-co-MAc) foi realizada através da reação de copolimerização do NIPAAm (0,8 mmol L⁻¹) com MAc (0,2 mmol L⁻¹), em meio aquoso, na presença de persulfato de sódio (43 μmol L⁻¹) e TEMED (2,5 mmol L⁻¹). Os valores obtidos para a LSCT para as soluções poliméricas 2,5, 7,5, 10,0 e 15,0 % foram respectivamente 28, 27, 27 e 22°C. Estes resultados demonstraram que a LCST pode ser modulada através da

natureza química do ácido acrílico usado na copolimerização e de sua porcentagem em relação às unidades de P(NIPAAm).

Referências

Shin BC, Kim SS, Ko JK, Jegal J, Lee B. M. Eur Polym J. 2003;39:579-584.

Zhang J, Peppas NA. Journal of Biomaterial Science-Polymer Edition. 2002;13(5):511-525.

3.6. Material Suplementar 5: Caracterização da síntese dos hidrogeis de P(NIPAAm-co-AAc), sintetizados sem reticulante, por RMN ^1H

Para confirmar a reação de copolimerização entre o NIPAAm e o AAc, sem a presença de agente reticulante, foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, RMN ^1H , da mistura de NIPAAm com AAc antes da reação de síntese e após a reação e a purificação do produto. A figura 15 mostra os sinais dos deslocamentos dos ^1H dos monômeros (A) e do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizado sem agente reticulante (B).

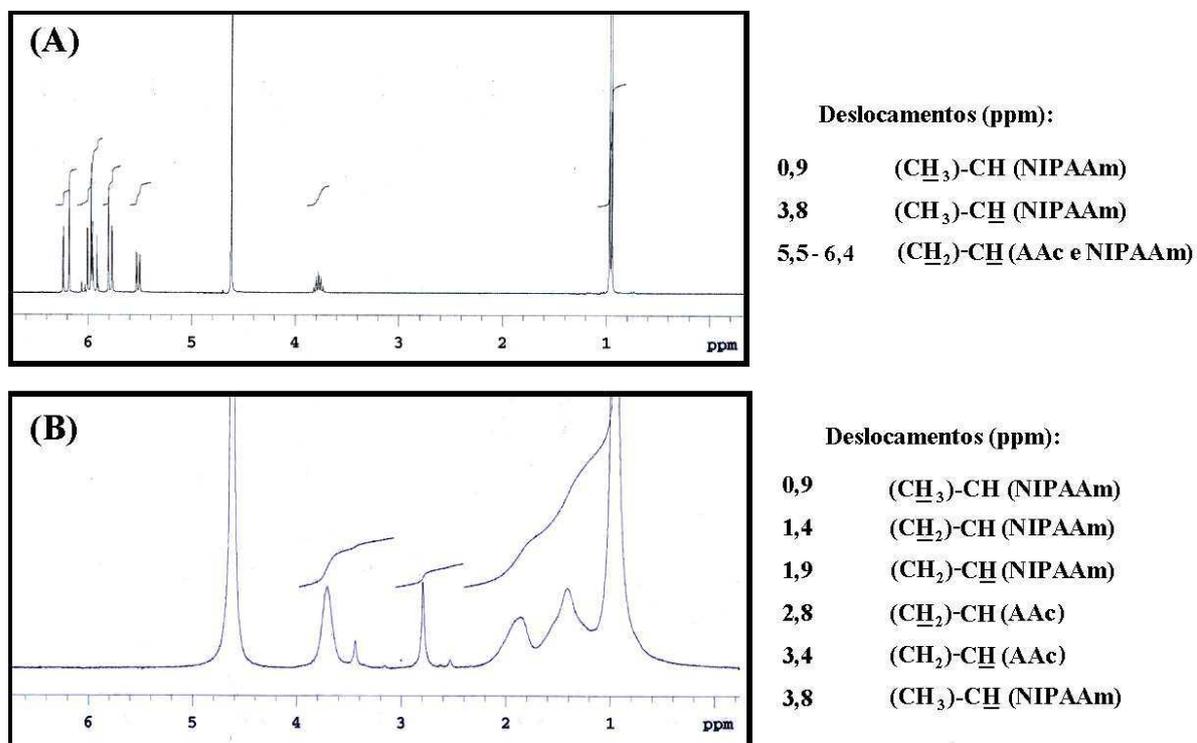


Figura 15. Espectros de RMN ^1H da mistura de NIPAAm com AAc antes da reação (A) e do copolímero de P(NIPAAm-co-AAc) (B).

Como pode ser claramente observado, os sinais de deslocamento para os ^1H correspondentes a duplas (5,5-6,4 ppm) ligações desaparecem no copolímero.

Podemos observar ainda que os sinais obtidos para o copolímero são alargados o que é típico de polímeros.

Este resultado obtido por RMN ^1H , em conjunto com o resultado obtido por espectroscopia de infravermelho (IV) já relatado no artigo publicado na Polymer (48(14):4114-4122 (2007)), confirma a polimerização por adição de acordo com o esquema da Fig. 16.

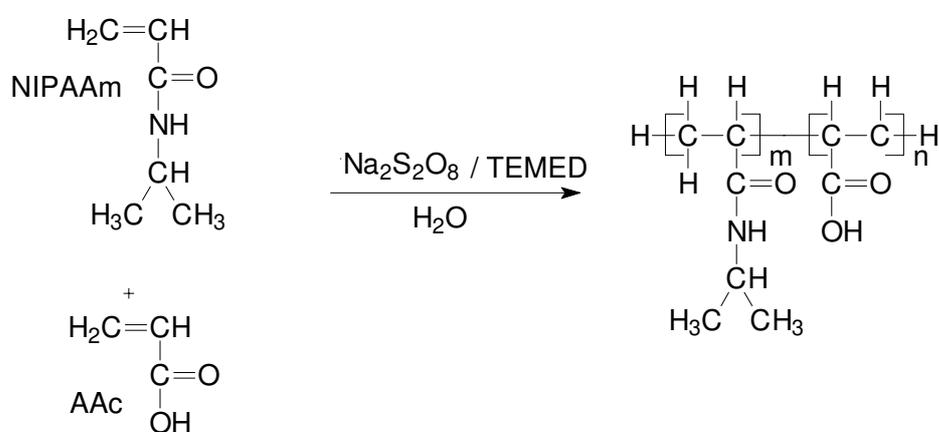


Figura 16. Esquema da síntese do copolímero de P(NIPAAm-co-AAc).

Uma vez que não há sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, RMN ^1H que mostrem ligação cruzada, ou seja, reticulação, entre as cadeias poliméricas podemos atribuir o fato deste copolímero apresentar característica de hidrogel a formação de ligação de hidrogênio entre os grupos carboxilatos e amida. A formação destas ligações, quando intermolecular, pode atuar como pontos de reticulação justificando assim a não solubilidade do copolímero em água, ou seja, a formação de uma rede polimérica.

3.7.

INFLUENCE OF TEMPERATURE GRADIENT ON THE CROSS-SECTION MORPHOLOGY OF P(NIPAAm-co-AAc) MEMBRANES

*Regiane da Silva, Marcelo Ganzarolli de Oliveira**

Chemistry Institute, State University of Campinas, UNICAMP, CP 6154, CEP
13083-970, Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55-19-37883132; Fax: +55-19-37883023.

E-mail address: mgo@iqm.unicamp.br

Abstract

Hydrogels of poly(N-isopropylacrylamide) copolymerized with acrylic acid [P(NIPAAm-co-AAc)] were synthesized with of 5% of (N,N'-methylenebisacrylamide). The influence of the temperature gradient on the hydrogel morphology was studied by SEM by controlling the temperature of the opposite glass plates of the mould during the synthesis. SEM micrographs revealed that the tubular morphology of dry hydrogels does not change with the polymerization temperature. However, in hydrogel membranes synthesized with the mould oriented parallel to the plane of the bench, the formation of a continuous dividing film near to the medial cross-section plane of the membrane is observed and may have consequences for their diffusion properties. The position of this film was observed to shift from the medial plane of the membrane, if one of the glass plates is kept at a different temperature, relative to the other, that is, if a temperature gradient is imposed on the mould during the polymerization process. The formation of this film was assigned to the advancement of two polymerization fronts, which start at the opposite glass plate surfaces. The plane where the polymerization fronts meet was observed to be governed by their relative rates of advancement which, in turn, are proportional to the temperature of the glass plates.

Keywords: Hydrogels, poly(N-isopropylacrylamide), polymerization, morphology.

Introduction

Several special properties of hydrogels allow their use in a large variety of applications such as biomaterials for the controlled release of drugs [Peppas, 2000], scaffolds for cell cultures [Wang, 1998; Vernon, 1996; Stile, 2001] promotion of controlled cell detachment [Schmaljohann, 2003; Higuchi, 2005] and separation processes [Denizli, 2005]. The chemical structure of hydrogels governs their swelling ratio which increases with the increase in the hydrophilicity and the reduction of their cross-linking degree [Hoffman, 2005; Matzelle, 2003; da Silva, 2007]. Changes in the chemical nature of the polymeric chains can lead to stimuli-responsive hydrogels, which are able to respond to temperature, pH, ionic strength, solvent, electric and magnetic fields, light, and biochemical changes, by increasing or decreasing their volume [Peppas, 2000; Hoffman, 2002; Yamashita, 2002; Chilkoti, 2002; Shin, 2003; Schild, 1992]. In order to obtain porous scaffolds with controlled porosity and pore size distributions for tissue engineering applications, some hydrogels have been prepared under special conditions, which include: gas foaming [Behraves, 2002 (A)], freeze-drying [Hickey, 1995 and 1997; Simões, 2006] phase separation [Behraves, 2002 (B)], use of biodegradable polymers [Zhang, 2004], changes in the pH solution and monomer amount during the synthesis [Zhang, 2002], control of the cross-linking degree [Krajewska, 2001; da Silva, 2007], changes in the concentration of ionizable comonomer [Erbil, 1999] and use of surfactants [Rill, 1998]. In the last case, the authors developed a cross-linked polyacrylamide hydrogel that can have its structure altered through the polymerization in the presence of high concentrations of unreactive, micellar surfactant co-solutes, which act as “templates”. After the removal of the surfactant from the polymerized network, the hydrogel contained pores of

approximately the same shape and dimensions as the surfactant micelles. Guilherme et al. [Guilherme, 2006] developed a sandwich-like IPN hydrogel membrane, based on P(NIPAAm) and P(AAm) that can suffer drastic changes in the internal morphology with changes in temperature. In these membranes the increase in temperature, led to internal layer contraction (ca. 85%) and to external layer expansion (ca. 45%). Albrecht et al., [Albrecht, 2005] synthesized poly(ether imide) (PEI) membranes by a dry–wet spinning technique. The results showed that an outer layer of one extruded dense structure recovered the membrane. This structure was formed by precipitation of polymer solution from vapor induced phase separation (VIPS). Moreover, with a modified air gap-spinning process, using a triple spinneret, an outer annulus was used for the transport of fluids containing a high amount of solvent. Their results showed that highly asymmetric hollow fiber morphologies without any external skin can be reproducibly prepared by this technique. Another recent work demonstrated the preparation of materials with highly sophisticated structures (hydrogels with tubular pores like a honeycomb structure) using the ice-segregation-induced self-assembly process [Gutiérrez, 2008]. This process which consists in freezing the hydrogel, storing it in the frozen state during certain time and then defrosting it, creates a macroporous structures, characterized by “walls” of matter enclosing empty areas where ice crystals originally resided. These examples underscore an increasing interest in producing special morphologies in hydrogels, for specific applications. We have shown recently that P(NIPPAm-co-AAc) hydrogels can be prepared with different pore morphologies (interconnected spherical or channel-like pores) by controlling their cross-linking degree and the orientation of the moulds used in the preparation of membranes, and that these morphologies affect their swelling and diffusion behaviors [da Silva, 2007]. In the case of channel-like pore membranes, a peculiar morphological feature was observed;

the formation of a continuous dividing film near to medial cross-section plane of the membrane. As this film may have consequences for the diffusion and mechanical properties of the membrane, it becomes important to understand its mechanism of formation and the factors which affect its position. In this work we show that the position of this film shifts from the medial plane of the membrane, if one of the glass plates is kept at a different temperature, relative to the other during the polymerization process. The formation of this film was assigned to the advancement of two polymerization fronts, which start at the opposite glass plate surfaces and its position was observed to be governed by their relative rates of advancement which are proportional to the temperature of the glass plates.

Experimental

Materials

N-Isopropylacrylamide (NIPAAm) monomer, stabilized 99% and acrylic acid (AAc) monomer, stabilized 99.5% (Acros organics) were previously purified twice by recrystallization in hexane and by vacuum distillation at 39 °C and 10 mmHg, respectively as previously described [da Silva, 2007]. *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) monomer, stabilized 99% (Across organics) used as a cross-linking agent, and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), 99% (Plusone–Pharmacia Biotech), used as an accelerator, sodium persulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), P.A. (Synth), used as initiator of polymerization, and phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (Sigma) were used as received. Gaseous nitrogen

(N₂) was purchased from Air Liquid. The experiments were carried out using analytical grade water from Millipore Milli-Q gradient filtration system.

Synthesis of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel

Briefly, P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels membranes were synthesized in aqueous solutions containing 80% mol NIPAAm/mol total monomer, 20% mol AAc/mol total monomer, and 5 % mol BIS/mol (total monomer + cross-linker), in the presence of sodium persulfate ($43 \mu\text{mol L}^{-1}$) and TEMED (2.5 mmol L^{-1}) as previously described [da Silva, 2007]. Initially, the amounts of NIPAAm, AAc, TEMED and BIS were dissolved in water and kept under constant stirring and nitrogen bubbling for 1 h at 0°C in an ice bath. Bubling with N₂ is necessary in order to avoid the inactivation of TEMED molecules by oxygen dissolved in the aqueous solution. After this period, Na₂S₂O₈ was added. The final solution was inserted in moulds composed of two glass plates (10x5 cm) kept apart by a rubber spacer 3 mm thick (Figure 17 (A)).

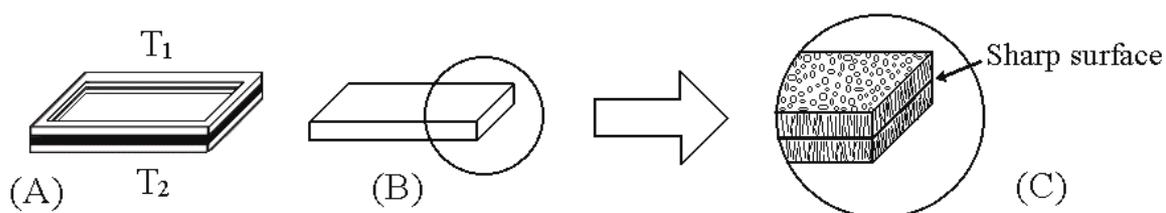


Figure 17. (A) Scheme of the preparation of cross-linked P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membranes with the moulds positioned with their main axis in the horizontal position and kept closed for 24 h for the cross-linking reactions. The syntheses were made in three different temperature conditions: first one, T₁=T₂=25°C; second, T₁=10°C and T₂=25°C and thrirth, T₁=35°C and T₂=-10°C. (B) membrane after synthesis and (C) scheme of the cross-section surface of lyophilized membrane showing a sharp surface.

The moulds were positioned with their main axis in the horizontal position and were kept closed for 24 h for the cross-linking reactions. The mould was kept in three different temperature conditions, as follows:

- i) both plates were kept at room temperature ($T_1 = T_2 = 25^\circ \text{C}$);
- ii) one of the plates was kept at 10°C and the other at 25°C ($T_2 - T_1 = 15^\circ \text{C}$);
- iii) one of the plates was kept at 35°C and the other at -10°C ($T_2 - T_1 = 45^\circ \text{C}$).

The second temperature condition: $T_1 = 25$ and $T_2 = 10^\circ \text{C}$, was obtained by putting one of the external faces of the glass plate in contact with the surface of the water from a thermostated bath at 10°C , while the other glass plate was left in contact with the air in a thermostated room at 25°C . In the third case, where $T_1 = -10^\circ \text{C}$ and $T_2 = 35^\circ \text{C}$, one of the faces was put in contact with a thermostated bath, 35°C , and the other face was put in contact with an aluminum block which was previously thermostated at -10°C . All the temperatures of the glass plates were measured with a thermopar, by putting the temperature sensor into contact with the external faces of the glass plates. The moulds were kept at these temperature gradients during 4 h. After this period the moulds were stored for 20 h at room temperature for ensuring complete polymerization. After this period hydrogel membranes obtained were removed from the moulds and immersed in deionized water until reaching the swelling equilibrium. The membranes were further purified by several washings with deionized water.

Morphological analysis

For the morphological characterization of temperature gradient on the continuous dividing film near to the medial cross-section plane of the membrane

the swollen hydrogel membranes were cut in slices and frozen in liquid nitrogen, in order to obtain the mechanical fracture surfaces [Erbil, 1999]. The fractured samples were freeze-dried for 24 h in order to preserve the open microporous structure of the hydrogels [Sannino, 2003] and metalized with gold. The hydrogel surface analyzed was the vertical surface perpendicular to the glass plates. To characterize the morphology of the hydrogels, micrographs of the fractured surface of dried samples were recorded with a Scanning Electron Microscopy (SEM-JSM 6360-LV, Tokyo, Japan) under magnifications of 40x. The thickness of each half of the membrane was measured from the inner surface of the glass plate to the dividing film in nanometers using the measuring tool of the electron microscopy software and their corresponding normalized thickness, for a scale of 0 to 1, where 1 is the total thickness of the membrane were calculated.

Results and discussion

The formation of a continuous dividing film near to the medial cross-section plane of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membranes cross-linked with 5% of (N,N'-methylenebisacrylamide), with the mould oriented parallel to the plane of the bench, has already been reported elsewhere [da Silva, 2007]. This characteristic was assigned to the fact that polymerization reaction is expected to start on the surface of the glass plates which act as a kind of nucleating surface for the beginning of the polymerization reaction and phase separation processes. In this case, the continuous film formation at the medial plane of the membrane thickness was interpreted as the result of the advance, at the same rate, of two polymerization fronts in opposite sides until they get in contact with each other

in the middle of the gap. In this junction the polymerization process apparently tends to spread horizontally leading to the formation of the dividing film. The advancement of the polymerization fronts at the same rate can be assigned to the fact that the two glass surfaces are at the same temperature, once the rate of polymerization and thus of advancement of the front is expected to increase with the increase in temperature (Fig. 18 A). In the present work this hypothesis was tested by polymerizing the membranes under a temperature gradient along the axis perpendicular to the plane of the glass plates, that is, along the vertical axis. Two temperature gradients were used, and compared to the membrane prepared under the uniform temperature of 25 °C ($\Delta T = 0^\circ \text{C}$) (Fig. 18):

- one plate kept at 25° C and the other at 10 °C ($\Delta T = 15^\circ \text{C}$)
- one kept at 35° C and the other at -10 °C ($\Delta T = 45^\circ \text{C}$)

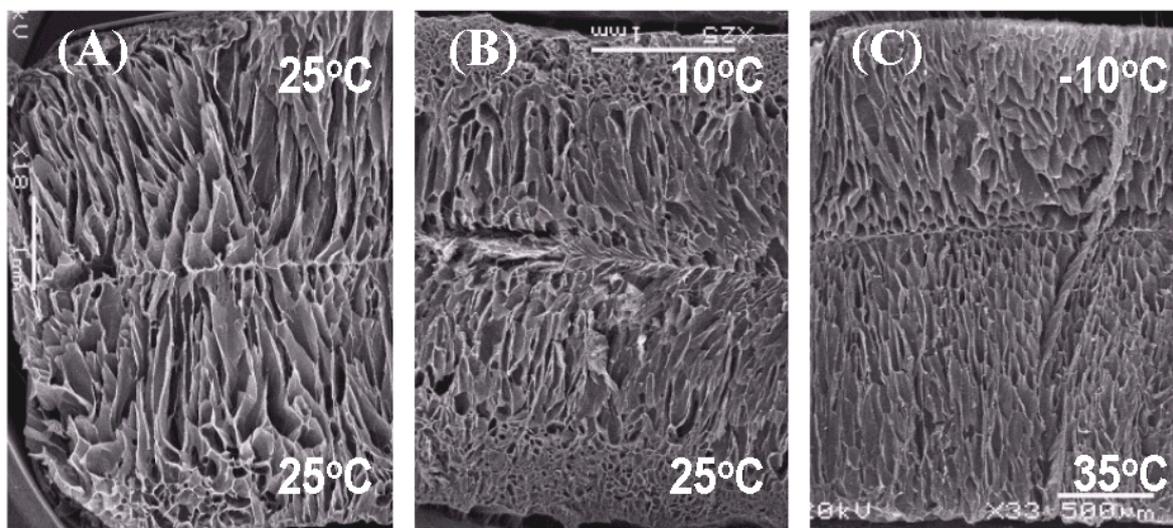


Figure 18. SEM micrographs of cross-sections of hydrogel with 5% cross-linking degree after reaching the swelling equilibrium below LCST at 25 °C. The lower hydrogel surface kept at room temperature (25° C) and the upper surfaces kept at (A) room temperature, (B) 10° C. (C) lower hydrogel surface kept at 35° C and the upper surfaces kept at -10° C.

It was observed that in all cases the hydrogel membranes synthesized with cross-linking degree of 5% presented a continuous dividing film which can be clearly identified in the SEM micrographies of the membrane cross-sections (Fig. 18). Figure 18 also shows that the continuous dividing film undergoes a significant shift from the medial plane of the membrane towards the glass plate kept at the lower temperatures. In addition it can also be seen that this shift increases with the increase in the temperature gradient from $\Delta T = 15^\circ \text{C}$ (Fig. 17(B)) to $\Delta T = 45^\circ \text{C}$ (Fig. 2(C)), while at $\Delta T = 0^\circ \text{C}$ the film is located at the medial plane of the membrane, as reported before (Fig. 17 (A)).

Table 1. Thickness of each half of cross-linked P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membranes, measured from the inner surface of the glass plate to the dividing horizontal film, for membranes synthesized under different temperature conditions: the two glass plates of the mould kept at 25°C ; one plate kept at 25°C and the other at 10°C and one kept at 35°C and the other at -10°C

	Temperature			
	of the lower/upper glass plates	$10/25^\circ \text{C}$	$25/25^\circ \text{C}$	$-10/35^\circ \text{C}$
Thickness of the upper half of the membrane (μm)		785 ± 52	1317 ± 28	1001 ± 45
Thickness of the lower half of the membrane (μm)		901 ± 37	1334 ± 32	1448 ± 38

The thickness of each half of the membranes are presented in Table 1 and their corresponding normalized thicknesses are presented in Fig. 18. It can be seen that a significant difference between the thicknesses of the two halves of the membranes is observed in the two temperature gradients, confirming the visual

analysis of Fig. 18. Also Figure 19 shows that the increase in the difference between the thicknesses of the two halves increases significantly with the increase in the temperature gradient. Thus, the morphology of such membranes is influenced not only by the polymerization degree but also by the uniformity of temperature in the mould used to prepare membranes. This result may have consequences in the diffusion properties of these membranes and in other applications where the morphology is an important characteristic.

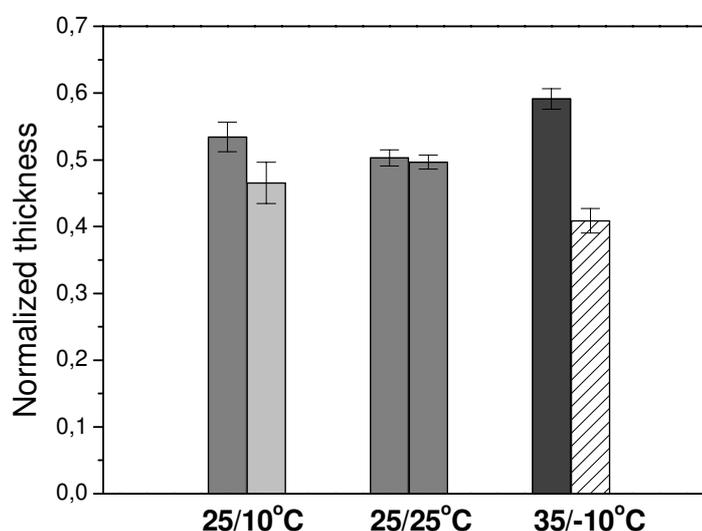


Figure 19. Normalized thickness of each half of cross-linked P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membranes, measured from the inner surface of the glass plate to the dividing horizontal film, for membranes synthesized under different temperature conditions: the two glass plates of the mould kept at 25° C; one plate kept at 25° C and the other at 10° C and one kept at 35° C and the other at -10° C. Error bars are the SEM of triplicates

Conclusions

The morphological analysis of the cross-sections of P(NIPAAm-co-AAc) membranes cross-linked with of 5% of (N,N'-methylenebisacrylamide) confirm that the formation of a dividing film in this condition, is a general feature of this

membrane. The dividing film can be assigned to the advancement of two polymerization fronts, starting from the glass plates of the moulds. The location of the film in the membrane thickness is governed by the temperature gradient maintained in the glass plates of the mould.

Acknowledgments

RS holds a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), project 04/11204-4. The authors wish to thank FAPESP for financial support.

References

- Albrecht W, Kneifel K, Weigel, Th, Hilke R, Just R, Schossing M, Ebert K, Lendlein A. *Journal of Membrane Science* 2005;262:69–80.
- Behravesh E, Jo S, Zygourakis K, Mikos AG. *Biomacromolecules* 2002;3:374-381 (A)
- Behravesh E, Timmer MD, Lemoine JJ, Libschner MAK, Mikos AG. *Biomacromolecules* 2002, 3, 1263-1270 (B)
- Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE, Raucher D. *Adv Drug Delivery Rev* 2002;54:613-630.
- da Silva, R. and de Oliveira, M.G., *Polymer* 2007; 48(14):4114-4122
- Denizli A, Garipcan, B, Karabakan, A, Senöz, H. *Materials Science and Engineering C*. 2005;25:448-454.
- Erbil C, Aras S, Uyanik N. *Journal of Polymer Science part A-Polymer Chemistry*. 1999;37(12):1847-1855.
- Guilherme MR, Campese GM, Radovanovic E, Rubira AF, Tambougi EB, Muniz EC. *Journal of Membrane Science* 2006;275(1-2):187-194.
- Gutiérrez MC, Ferrer ML, del Monte F, *Chem. Mater.* 2008;20:634–648

- Higuchi A, Yamamoto T, Sugiyama K, Hayashi A, Tak TM, Nakagawa T. *Biomacromolecules* 2005;6:691-696.
- Hickey AS, Peppas NA. *Journal of Membrane Science* 1995;107:229-237.
- Hickey AS, Peppas NA. *Polymer* 1997;38(24):5931-5936.
- Hoffman AS. *Artif Organs* 1995;19:458-467.
- Hoffman AS. *Adv. Drug Delivery Rev* 2002;43:3-12.
- Krajewska A, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (J chem Technol Biotechnol)* 2001;76:636-642.
- Yamashita K, Hashimoto O, Nishimura T, Nango M. *React Funct Polym* 2002;51:61-68.
- Matzelle TR, Geuskens G, Kruse N. *Macromolecules* 2003;36:2926-2931.
- Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27-46.
- Rill RL, Van Winkle DH, Locke BR. *Analytical Chemistry* 1998;70(13):2433-2438.
- Sannino A, Netti PA, Mensitiri G, Nicolais L. *Comp Sci Technol* 2003;63:2411-2416.
- Schmaljohann D, Oswald J, Jørgensen B, Nitschke M Beyerlein D, Werner C. *Biomacromolecules* 2003;4:1733-1739.
- Schild HG. *Prog Polym Sci* 1992;17:163-249.
- Shin BC, Kim SS, Ko JK, Jegal J, Lee B. M. *Eur Polym J* 2003;39:579-584.
- Simões MMSG, *Dissertação de mestrado, Instituto de Química-UNICAMP, 2006*
- Stile RA, Healy KE. *Biomacromolecules* 2001;2:185-194.
- Vernon B, Gutowska A, Kim SW, Bae YH. *Macromol Symp* 1996;109:155-167.
- Wang K, Tsai DC, Nam EK, Aitken M, Sprague SM, Patel PK, Healy KEJ. *Biomed Mater Re.* 1998;42:491-499.
- Zhang X-Z, Sun G-M, Wu D-Q, Chu C-C. *J Mater Sci: Mater Med* 2004;15:865-875.
- Zhang X-Z, Yang Y-Y, Wang F-J, Chung T-S. *Langmuir* 2002;18:2013-2018.

3.8.

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS HIDROGÉIS DE P(NIPAAm-co-AAc) INTERPENETRADOS E SEMI-INTERPENETRADOS COM PVA

*Regiane da Silva, Marcelo Ganzarolli de Oliveira**

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, CP 6154,
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

*Autor correspondente. Tel.: +55-19-37883132; Fax: +55-19-37883023.
e-mail: mgo@iqm.unicamp.br

Resumo

Os hidrogéis são redes poliméricas altamente hidrofílicas capazes de absorver grande quantidade de água. A presença e o teor de água no hidrogel determinam não somente a permeação de materiais para dentro e fora do gel, mas também sua resistência mecânica. Hidrogéis sensíveis ao pH e à temperatura como os de poli(*N*-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico), P(NIPAAm-co-AAc), são de grande interesse para sistemas de liberação de fármacos uma vez que a permeação de solutos através do hidrogel é também influenciada pelas suas propriedades de mudança de fase. Entretanto a simples conjugação do NIPAAm com AAc leva à obtenção de membranas de hidrogéis com resistência mecânica muito baixa, após a hidratação. Com o objetivo de se obter membranas deste tipo com melhores propriedades mecânicas, que permitam aplicações como biomaterias, sintetizou-se hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) interpenetrados e semi-interpenetrados com poli(álcool vinílico) (PVA), onde a interpenetração foi obtida através da reticulação das cadeias de PVA através de ciclos de congelamento-descongelamento. Observou-se que tanto a semi-interpenetração como a interpenetração da rede de P(NIPAAm-co-AAc) com as cadeias de PVA aumenta a flexibilidade e a resistência do hidrogel à compressão. Entretanto os hidrogéis que apresentaram maior resistência mecânica foram os hidrogéis preparados a partir de soluções mais concentradas dos precursores de polimerização.

Palavras-chave: poli(*N*-isopropilacrilamida), poli(álcool vinílico), resistência mecânica, hidrogel.

Introdução

Há um interesse crescente no uso de hidrogéis como biomateriais. A adequação das propriedades físicas dos hidrogéis, para a viabilização destas aplicações, depende fortemente da flexibilidade do material hidratado e de outras propriedades mecânicas a ela associadas, como a resistência à compressão. Estas propriedades, por sua vez, estão associadas ao grau de intumescimento do hidrogel e dependem diretamente do grau de reticulação da rede polimérica [Hoffman, 2002, Berger, 2004, Schoröder, 1988, Peppas, 2000], cujo controle pode ser complexo. A redução no grau de reticulação leva à formação de redes poliméricas cada vez menos densas, ou frouxamente reticuladas, que absorvem maiores quantidades de água, tornando-se mais macias e flexíveis. Entretanto, hidrogéis com grau de reticulação muito reduzido são muito frágeis e de difícil manipulação. Por outro lado, o incremento no grau de reticulação leva à formação de redes mais densas, menos flexíveis, mais resistentes à compressão e capazes de absorver menores teores de água. Entretanto, hidrogéis que possuem grau de reticulação muito elevado são quebradiços e de baixa resistência mecânica [Perepechko, 1981].

Além do grau de reticulação, outro fator que determina o grau de intumescimento dos hidrogéis é a sua composição química e, neste caso, a presença de grupamentos como os de ácidos carboxílicos, amidas, hidroxilas, entre outros, leva à formação de redes poliméricas cujos graus de intumescimento são dependentes da hidrofiliabilidade dos grupos que constituem a rede polimérica. Além disso, alguns grupamentos podem conferir maior ou menor flexibilidade à rede polimérica, ou ainda promover à matriz polimérica sensibilidade a variações de estímulos externos como: temperatura, pH, corrente elétrica, ou presença de íons, entre outros [Yamashita, 2002; Chilkoti, 2002 e

Shin, 2003, Jones, 2003, Zhang, 2002]. Hidrogéis deste tipo atraem maior interesse que polímeros lineares para sistemas de liberação de fármacos uma vez que a permeação de solutos através do hidrogel é também influenciada pelas suas propriedades de mudança de fase [Hoffman, 2002].

Um polímero termo-sensível bastante estudado é o poli(N-isopropilacrilamida) (P(NIPAAm)). Em solução aquosa, este polímero apresenta separação de fases quando a solução é aquecida acima de 32°C (temperatura consoluta inferior, LCST) [Schild, 1992]. Abaixo da LCST hidrogéis de P(NIPAAm) apresentam caráter hidrofílico, possuindo alto grau de intumescimento. Porém, acima da LCST ocorre o colapso da rede que desidrata. A adição de grupos ácidos como, por exemplo, o ácido acrílico, aumenta a temperatura de transição de fase com o aumento do pH da solução. Por outro lado, à adição de monômeros básicos aumenta a temperatura de transição com redução do pH da solução.

A termo-sensibilidade do P(NIPAAm) é de grande interesse no desenvolvimento de novos biomateriais. Porém, hidrogéis de P(NIPAAm) possuem baixa resistência mecânica. Para melhorar esta propriedade tem-se sintetizado matrizes poliméricas de P(NIPAAm) com outros polímeros, como o poli(ácido acrílico), (PAAc), o poli(óxido de etileno) (PEO) e a poliacrilamida (PAAm) entre outros [Yamashita, 2002]. Entretanto, a simples conjugação do P(NIPAAm) com outros monômeros não produz melhorias significativas nas propriedades mecânicas de hidrogéis de P(NIPAAm). Há algumas estratégias reportadas na literatura para se melhorar as propriedades mecânicas de hidrogéis. Tanaka e colaboradores [Tanaka, 2005] desenvolveram três tipos de hidrogéis com excelentes propriedades mecânicas. Dois tipos destes hidrogéis foram sintetizados utilizando um reticulante especial que permite distribuir uniformemente a tensão ao longo das cadeias poliméricas, resultando assim em géis altamente resistentes ao estiramento (cerca de 10 à 20 vezes o comprimento

original sem se romper). O terceiro tipo sintetizado foi composto de uma dupla estrutura reticulada o que resultou em um gel com excelente resistência a compressão o qual apresentou ruptura da rede quando submetido à pressão superior a 20kPa. Para obter este novo hidrogel Tanaka baseou-se no fato de redes altamente reticuladas resistirem à compressão. Entretanto como estas redes são quebradiças foi introduzida durante a síntese outra rede frouxamente reticulada formando assim um hidrogel interpenetrado capaz de resistir à alta pressão de compressão sem se romper. Isto ocorre porque a rede frouxamente reticulada atua como um suporte da rede densa sendo capaz de absorver a energia elástica do processo de compressão evitando assim a propagação da fratura ou rompimento da rede densamente reticulada. Baseado neste estudo, desenvolvemos redes de P(NIPPAm-co-AAc) densamente reticuladas as quais foram interpenetradas e semi-interpenetradas com uma rede frouxamente reticulada de PVA. Foi observado que a presença do PVA leva a formação de redes capazes de resistirem a maiores pressões de compressão quando comparado a rede de P(NIPPAm-co-AAc) pura. Foi observado ainda para estes géis que a presença de PVA também reduz o grau de intumescimento dos mesmos.

Parte experimental

Materiais

N-isopropilacrilamida, (NIPAAm), ácido acrílico (AAc) e *N,N'*metileno-bisacrilamida (MBAAm) (Acros organics), persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), (Synth), *N,N,N',N'*tetrametiletlenodiamina (TEMED), (Plusone–Pharmacia

Biotech), água desionizada, poli(álcool vinílico), PVA, solução tampão fosfato (PBS) pH= 7,4 e ácido clorídrico (Sigma/Aldrich) e N₂ gasoso (Air Liquide),.

Síntese dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) Interpenetrado e semi-Interpenetrado com PVA

A síntese do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) foi realizada através da reação radicalar de copolimerização do NIPAAm com o AAc em solução aquosa na presença de PVA (0, 1,5 e 3% m/v) de acordo com a tabela 2 [da Silva R, 2007]. Em todos os casos a proporção molar de NIPAAm (80%) em relação a AAc (20%) foi mantida constante, variando-se o teor de reticulante em 2, 3, 5 e 7%. As membranas sintetizadas foram rotuladas utilizando a seguinte nomenclatura: X% MBAAm/Z, onde X é o teor de reticulante e Z é a percentagem em massa de PVA. As membranas foram sintetizadas num molde composto por duas placas de vidro separadas por um espaçador de borracha. Após este período as membranas sintetizadas foram retiradas do molde. As membranas sintetizadas com PVA foram submetidas a 0, 1 e 3 ciclos de congelamento descongelamento (C/D) respectivamente de 22 e 2h [Simões, 2006] formando neste caso redes de P(NIPAAm-co-AAc) semi-IPN (0 C/D) e IPN (1 e 3 C/D) com o PVA.

Todas as membranas foram purificadas por imersão em banho de água desionizada, por 48h fazendo-se trocas constantes. Em seguida uma parte de cada membrana foi mantida em água a 25° C e outra parte foi liofilizada. As membranas liofilizadas foram utilizadas para determinação do grau de intumescimento (Q) e as hidratadas foram utilizadas para os testes de resistência mecânica por análise termomecânica, TMA.

Determinação do grau de intumescimento (Q)

Após a síntese e purificação, pedaços de membranas de massa conhecida e liofilizada foram deixados intumescer imersos em água desionizada (pH 6,4), PBS (pH 7,4) ou solução de HCl (pH 3,5) por 48h até o equilíbrio de intumescimento. Q foi definido como a relação entre a massa do gel intumescido no equilíbrio à 25° C pela massa do gel seco.

$$Q = m(\text{gel intumescido})/m(\text{gel seco}) \quad \text{Eq. (02)}$$

Tabela 2. Teor dos reagentes utilizados durante a síntese dos hidrogéis utilizando 10 mL de água.

	Na ₂ S ₂ O ₈ (g)	TEMED (µL)	MBAAm (mmol)	AAc (mmol)	NIPAAm (mmol)	PVA (g)	%(m/v)
2% MBAAm/0	0,0050	50	0,10	1,0	4,0	-	5,12/94,88
2% MBAAm/1,5	0,0050	50	0,10	1,0	4,0	0,15	6,45/93,55
3% MBAAm/0	0,0050	50	0,15	1,0	4,0	-	5,19/94,81
3% MBAAm/1,5	0,0050	50	0,15	1,0	4,0	0,15	6,52/93,48
3% MBAAm/0(B)	0,0100	100	0,30	2,0	8,0	-	9,74/90,26
3% MBAAm/3,0	0,0100	100	0,30	2,0	8,0	0,30	12,12/87,88
5% MBAAm/0	0,0050	50	0,25	1,0	4,0	-	5,33/94,67
5% MBAAm/1,5	0,0050	50	0,25	1,0	4,0	0,15	6,65/93,35
7% MBAAm/0	0,0050	50	0,35	1,0	4,0	-	5,46/94,54
7% MBAAm/1,5	0,0050	50	0,35	1,0	4,0	0,15	6,79/93,21

Medidas de TensãoXDeformação dos hidrogéis utilizando Análise termomecânica

Para caracterizar a morfologia dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) utilizou-se análise termomecânica, TMA (TMA- 2940 TA Instrument). Os hidrogéis intumescidos em água desionizada (pH 6,4) foram cortados cuidadosamente com uma gilete em duas orientações diferentes de acordo com a posição do hidrogel durante a síntese. Assim foram obtidas membranas finas de aproximadamente 2.0mm de espessura. As amostras foram então novamente cortadas com um anel fino com um diâmetro de 8.0 mm obtendo-se assim discos de aproximadamente 2x8 mm. Em seguida os discos dos hidrogéis foram levados ao equipamento (TMA) para os ensaios de compressão/descompressão, a temperatura constante de 25° C (Figura 20A). Primeiramente realizou-se uma compressão por 3min utilizando-se 0,001N de força. Em seguida o disco do hidrogel foi submetido a uma rampa de força na razão de 0,05N/min até 0,5N, durante 10 min, imediatamente seguida de uma descompressão até 0,001N também na razão de 0,05N/min (Figuras 20B e 20C), durante 10 min. A força de compressão sobre o disco do hidrogel foi efetuada com o auxílio de um disco de 3,04mm de raio.

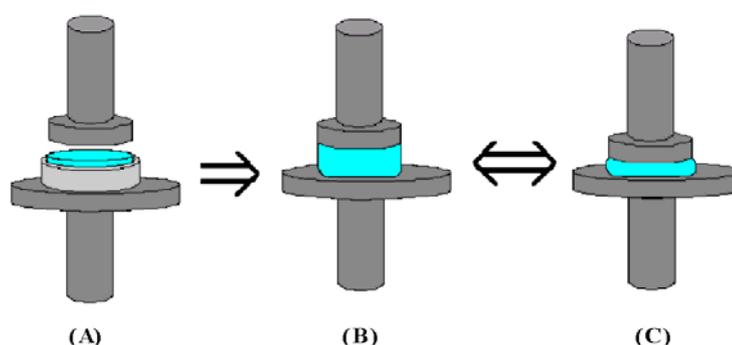


Figura 20. Esquema do ensaio de compressão/descompressão. (A) Hidrogel antes de ser submetido a compressão/descompressão dentro de um anel de plástico. (B) hidrogel antes e após ter sido submetido à compressão e (C) hidrogel sobre processo de compressão.

Resultados e Discussão

Intumescimento dos Copolímeros de P(NIPAAm-co-AAc) Interpenetrados e semi-Interpenetrados com PVA

Membranas dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) foram sintetizadas interpenetradas e semi-interpenetradas com PVA com o objetivo de aumentar a propriedade mecânica destes copolímeros. Conforme pode ser visto através da Tabela 3 e da Figura 21, estes novos hidrogéis, interpenetrados e semi-interpenetrados com PVA apresentaram menor grau de intumescimento, quando comparado aos hidrogéis dos copolímeros de P(NIPAAm-co-AAc) puros.

Tabela 3. Grau de intumescimento para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizado com 3% de MBAAm, sem PVA e com PVA (0 C/D), em função do teor de reagente utilizado durante a síntese (%m/v).

	%(m/v)	Sem PVA	PVA, 0 C/D
3% MBAAm/0	5,19/90,26	384,4 ±15,0	-
3% MBAAm/1,5	6,52/90,26	-	165,4±10,2
3% MBAAm/0 (B)	9,74/90,26	57,1±6,2	-
3% MBAAm/3	12,12/87,88	-	27,9±0,6

A redução no grau de intumescimento está diretamente relacionada com o aumento de massa de reagentes em relação à massa total de água utilizada durante a síntese, contribuindo para formação de redes mais densas que possuem com isso menor capacidade de expansão. Esta relação pode ser claramente

observada quando comparamos os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados com 3% de agente reticulante nas mesmas condições porém com diferentes percentagem (m/v) em que o incremento do teor de reagentes utilizados na síntese em relação ao volume de solvente (água) leva a redução do intumescimento (Tabela 3). A redução do volume de água utilizado aumenta a eficiência da polimerização e reticulação reduzindo com isso a capacidade de expansão da rede polimérica e, portanto seu intumescimento.

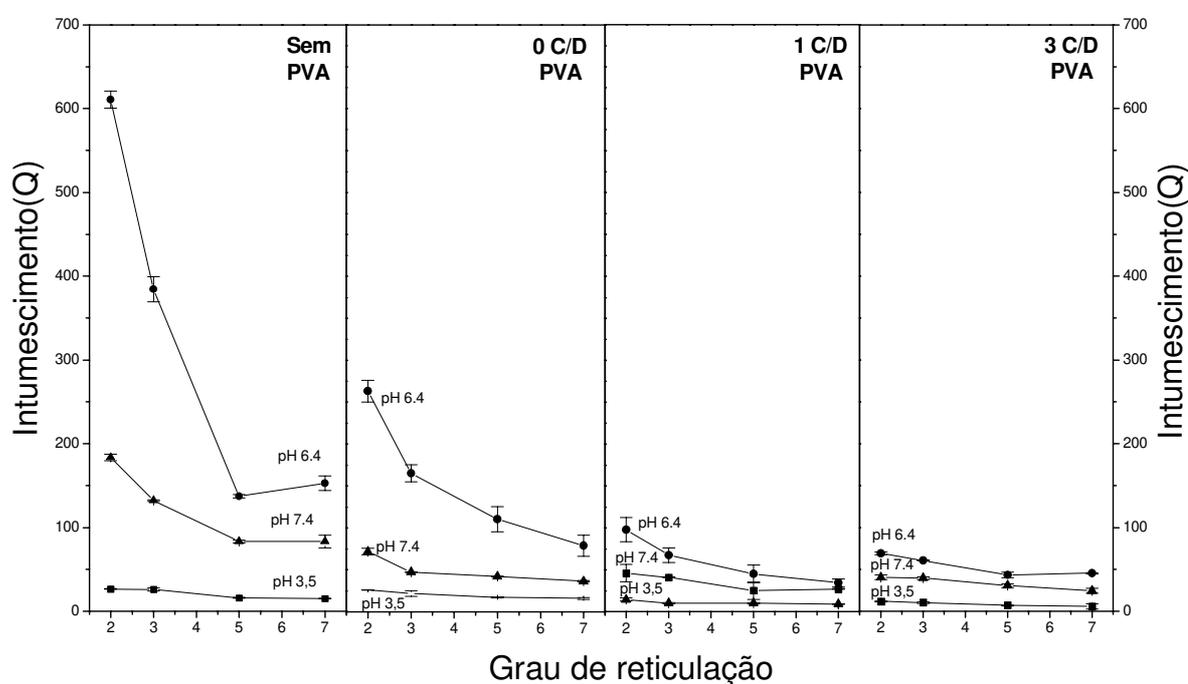


Figura 21. Grau de intumescimento para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc), sem PVA e com PVA (0, 1 e 3 C/D), em função do grau de reticulação.

A influencia do incremento da massa de reagentes em relação à massa total de água utilizada durante a síntese no grau de intumescimento também pode ser observado se relacionarmos o grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) puros (sem PVA) com os semi-Interpenetrados com PVA (0 Ciclo), uma vez que neste caso o PVA não está reticulado. Neste caso, a

redução do grau de intumescimento, com a formação do semi-IPN, ocorre apenas pelo incremento de massa polimérica em relação à massa de água durante a síntese. Por outro lado para os hidrogéis submetidos a 1 e 3 ciclos de congelamento/ descongelamento (C/D) ocorre a formação de uma rede de PVA que interpenetra a rede de de P(NIPAAm-co-AAc) formada anteriormente. A formação desta segunda rede reduz grandemente o intumescimento do hidrogel uma vez que ocorre a formação de cristalitos de PVA que atuam como retículos da matriz de PVA, o que não se observa na rede semi-Interpenetrada. Neste caso, na rede interpenetrada (submetida aos ciclos de congelamento/descongelamento) o grau de intumescimento é reduzido não somente pelo aumento de massa polimérica em relação à massa de água durante a síntese, mas também pela formação de novos retículos.

Observou-se ainda as maiores reduções do grau de intumescimento ocorreram quando houve a formação de uma rede semi-interpenetrada e interpenetrada. Neste caso podemos dizer que o grau de intumescimento sofre menor redução com o aumento dos ciclos quando comparado a redução do intumescimento que ocorre apenas com a presença de PVA na matriz polimérica (semi-IPN). Esta observação torna-se mais clara se compararmos o grau de intumescimento dos hidrogéis submetidos a 1 ciclo com 3 ciclos de congelamento/ descongelamento, em que o aumento no número de ciclos não foi capaz de reduzir significativamente o grau de intumescimento. Este fenômeno foi atribuído ao favorecimento do crescimento dos cristalitos formados ainda no primeiro ciclo e não a formação de novos pontos de reticulação (novos cristalitos). Esta hipótese pode ser confirmada se compararmos a redução no grau de intumescimento que ocorre com o incremento do teor de reticulante (MBAAm) na síntese de todos os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) puros (Figura 21). Neste caso, quando ocorre

aumento da concentração de MBAAm ocorre a formação de retículos efetivos que restringem grandemente a expansão e flexibilidade da rede polimérica.

A forma como as cadeias de PVA estão distribuídas na matriz polimérica também pode ter afetado diretamente o grau de intumescimento dos hidrogéis formados. Durante a preparação dos hidrogéis semi-IPNs e IPNs o PVA estava dissolvido no meio reacional e, portanto uniformemente distribuído, entretanto com a formação dos retículos de MBAAm para a formação da rede de P(NIPAAm-co-AAc) pode ter ocorrido segregação do PVA para o espaço entre os retículos. Neste caso o incremento dos ciclos de C/D de 1 para 3 além de favorecer o crescimento dos cristalitos já formados no primeiro ciclo, frente a formação de novos cristais, não irá afetar grandemente o grau de intumescimento do IPN uma vez que a formação destes pontos de rede do PVA irão ocorrer preferencialmente no espaço intra retículo da rede de P(NIPAAm-co-AAc).

Medidas de Tensão x Deformação dos hidrogéis utilizando Análise Termo-Mecânica (TMA)

A síntese dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) interpenetrados (1 ciclo ou 3 ciclos de congelamento descongelamento) e semi-interpenetrados com PVA (0 ciclo) foi realizada com o objetivo de se obter hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) com melhores propriedades mecânicas. Estes novos hidrogéis (contendo PVA) mostraram-se mais flexíveis e pouco quebradiços se comparados aos copolímeros de P(NIPAAm-co-AAc) puros e, conseqüentemente, apresentando melhor potencial para comercialização como um biomaterial. Testes mecânicos de compressão destes materiais foram realizados para comparar em módulo a resistência destes materiais frente à deformação (resistência à compressão).

Através de uma análise geral da tabela 4 e da Figura 22 podemos observar que os hidrogéis 2%MBAAm e 3%MBAAm foram os hidrogéis menos resistentes a compressão. Estes hidrogéis tiveram o rompimento de suas estruturas em tensões menores que 15kPa. Por outro lado o incremento do grau de reticulação para 5 e 7% foi capaz de produzir redes poliméricas resistentes a compressão em pressões superiores a 15kPa, sem se romperem. A redução do teor de reticulação leva a formação de redes poliméricas mais elásticas, entretanto de baixa resistência a compressão. Por outro lado o incremento no teor de reticulação leva a formação de redes mais densas menos elásticas e mais resistentes à compressão, no entanto, um elevado teor de reticulante pode formar redes quebradiças. A presença de PVA na matriz polimérica, formando uma rede semi-IPN, fornece a matriz maior resistência a compressão. Entretanto, ao submeter as matrizes poliméricas a ciclos de ciclos de Congelamento/Descongelação, resultando em uma rede interpenetrada, ocorre a formação de hidrogéis mais frágeis, principalmente com o incremento de 1 para 3 ciclos de C/D. Ao realizarmos os ciclos de C/D a água no interior do gel sofre congelamento e conseqüentemente expansão ocasionando com isto o rompimento de parte da estrutura da rede de P(NIPAAm-co-AAc) a qual torna-se mais frágil a cada ciclo.

A relação entre o teor de reticulante e o número de ciclos de C/D pode ser observada claramente através da Tabela 4 em que o incremento no teor de MBAAm (de 3 para 5 e 7%), utilizado durante a síntese, levou a formação de redes mais resistentes a fratura por compressão porém, mais sensíveis ao processo de congelamento/descongelamento. Analisando as curvas na figura 22, podemos observar ainda para os hidrogéis reticulados com 3, 5 e 7% de MBAAm, que não sofreram rompimento, apresentaram histerese, ou seja, a estrutura da rede não foi capaz de retornar ao estado expandido inicial. A histerese se relaciona à perda de energia provocada pelo deslizamento

irreversível das cadeias poliméricas, em ciclos de compressão-descompressão, e, quanto maior seu valor, maior a suscetibilidade do material sofrer deformações irreversíveis [Calister, 2000].

Tabela 4. Tensão a máxima deformação (σ) e deformação máxima (δ) dos hidrogéis submetidos a ensaios de compressão.

		Sem PVA	PVA 0-C/D	PVA 1-C/D	PVA 3-C/D
2% MBAAm	δ	51,4	63,2	84,1	-
	σ	12,6	8,9	8,5	-
3% MBAAm	δ	75,3	-	62,1	-
	σ	14,7	-	7,9	-
5% MBAAm	δ	-	-	67,5	-
	σ	-	-	7,7	-
7% MBAAm	δ	-	-	-	81,5
	σ	-	-	-	7,6

Em uma análise mais detalhada das curvas de tensão x deformação da Figura 22 para o hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) reticulado com 3% de MBAAm podemos observar claramente que o hidrogel semi-interpenetrado com PVA, ou seja, não submetido aos ciclos de congelamento/descongelamento foi o hidrogel que apresentou melhor resistência a compressão. Este hidrogel devido à presença de PVA tornou-se mais flexível e, portanto menos quebradiço, resistindo assim a maiores pressões de compressão sem se romper. Se compararmos, entretanto os hidrogéis reticulados com 2 e 3% de MBAAm podemos ver claramente que o hidrogel menos reticulado, mesmo semi-interpenetrado com PVA, não foi capaz de resistir as mesmas pressões de compressão sem se romper. Neste caso, como a

rede de P(NIPAAm-co-AAc) é frouxamente reticulada esta apresenta menor resistência a compressão.

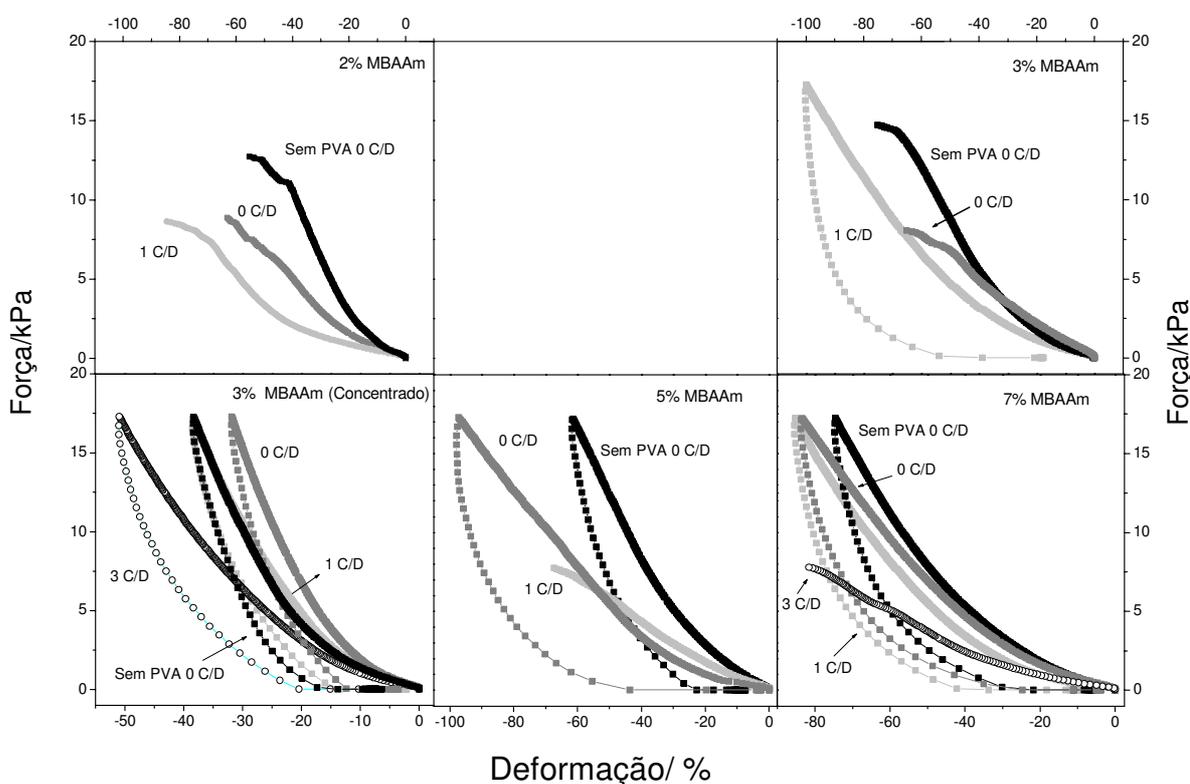


Figura 22. Tensão x Deformação para os hidrogéis do copolímero IV submetidos a ensaios de compressão.

Através da Figura 22 podemos relacionar a influência do teor de reticulação e da percentagem (m/v) de reagente utilizada durante a síntese dos hidrogéis na resistência mecânica como uma função do teor de água dos hidrogéis. Podemos observar que os hidrogéis 5 e 7% MBAAm suportaram maiores tensões sem sofrer fratura quando comparados aos hidrogéis 2 e 3% MBAAm. Além do incremento do número de pontos de reticulação, os quais fornecem à malha polimérica mais pontos de resistência à deformação, ocorre redução do grau de

intumescimento, ou seja, do teor de água absorvida, o que aumenta a resistência à quebra uma vez que hidrogéis que possuem grau de intumescimento muito elevado possuem também uma rede quebradiça [Peppas, 2000]. Foi observado que todos os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados com maior percentagem (m/v) de reagente apresentaram menor deformação a maiores tensões sem sofrerem rompimento durante o experimento de compressão (Figura 22), em relação aos demais hidrogéis. Podemos ver ainda que estes hidrogéis apresentaram menor histerese uma vez que as curvas de compressão e descompressão estão mais próximas umas das outras. Com a redução de água durante a síntese ocorre a formação de uma rede mais densa e, portanto com uma estrutura mais esticada e rígida que é capaz de suportar maiores tensões apresentando assim uma menor deformação. Além disso, durante a síntese um elevado teor de água pode reduzir a eficiência da polimerização e reticulação, ou seja, há um maior volume livre para os monômeros formarem pontas de cadeias sem retículo. Neste caso ocorre a formação de muitas pontas de cadeias que não se ligam e com isso a rede formada é frágil possuindo diversos pontos de quebra onde não há a formação de um retículo efetivo. Neste caso tanto a redução de água quanto à presença de PVA aumentam a resistência à fratura. Entretanto, como observado, somente a presença de PVA no hidrogel não foi suficiente para se obter uma matriz mais flexível e menos quebradiça.

Conclusões

Foi observado que o incremento do grau de reticulação bem como a presença de PVA leva a formação de redes mais densas e mais resistentes à deformação.

Entretanto a técnica de formar uma rede interpenetrada de PVA por congelamento/descongelamento não é adequada para hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) uma vez que sofrem rompimento de sua rede durante o processo de síntese. Além disso, foi observado que a redução do teor de água utilizado durante a síntese é fator determinante para a obtenção de redes com melhores propriedades mecânicas.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto 04/11204-4, pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57:19-34.
- Calister WD. Jr. *Materials Science and Engineering: an introduction*. John Wiley & Sons, 589 p., 2000.
- Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE, Raucher D. *Adv Drug Delivery Rev* 2002;54:613-630.
- da Silva, R. and de Oliveira, M.G., *Polymer* 2007;48(14):4114-4122
- Hoffman AS. *Adv. Drug Delivery Rev* 2002;43:3-12.
- Jones CJ, Jyon LA. *Macromolecules* 2003;36:1988-1993.
- Maíra MSGS, *Dissertação de mestrado, Instituto de química-UNICAMP, 2006*
- Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27.
- Perepechko I I. *An Introduction to Polymer Physics*, Mouscow, 1981.
- Maíra MSGS, *Dissertação de mestrado, Instituto de química-UNICAMP, 2006*

- Shin BC, Kim SS, Ko JK, Jegal J, Lee B. M. Eur Polym J. 2003;39:579-584.
- Schild HG. Prog Polym Sci 1992;17:163-249.
- Schoröder E, Müller G, Arndt K.-F. Polymer Characterization, New York, 1988.
- Tanaka Y, Gong JP, Osada, Y. Prog. Polym. Sci. 2005;30:1–9
- Yamashita K, Hashimoto O, Nishimura T, Nango M. React Funct Polym 2002;51:61-68.
- Zhang J, Peppas NA. Journal of Biomaterial Science-Polymer Edition. 2002;13(5):511-525.

3.9. Material Suplementar 6: Influencia do PVA no grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc)

A influência da presença de PVA e dos ciclos de congelamento/descongelamento no grau de intumescimento pode ser observada também através da Figura 23 para os diferentes graus de reticulação. Neste caso podemos ver claramente a redução do intumescimento em função da presença de PVA e do incremento dos ciclos de congelamento/descongelamento. Os dados desta figura são referentes aos dados da Figura 21 do manuscrito em questão onde se pode observar a influência do grau de reticulação no grau de intumescimento para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sem PVA e com PVA submetidos a 0, 1 e 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

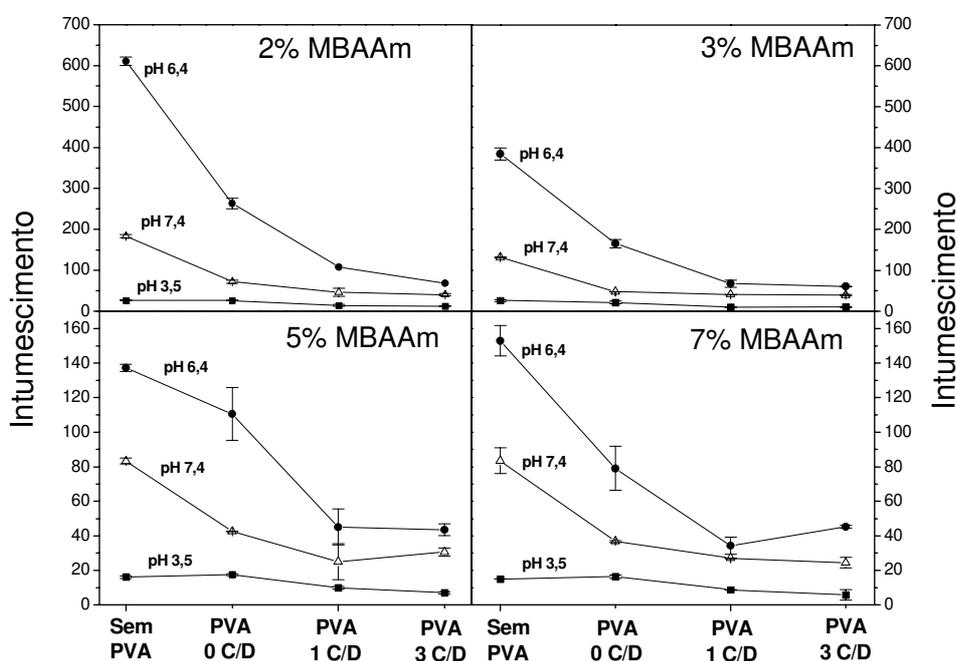


Figura 23. Grau de intumescimento para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc), contendo 2, 3, 5 e 7% de MBAAm, em função da presença de PVA e do número de ciclos de congelamento e descongelamento.

4. Aplicações

O óxido nítrico, NO, é uma molécula que atua como um mensageiro químico endógeno em mamíferos [Hogg, 2000] capaz de promover vasodilatação, atuando como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) [Ignarro, 1987], além de regular processos importantes como a citotoxicidade mediada pelos macrófagos, a modulação da neurotransmissão, a adesão de plaquetas e a agregação de neutrófilos [Williams, 1996, Stamler, 1992, Lipton, 1993, Lancaster, 1996, Hughes, 1999] e cicatrização.

Como NO livre pode ser inativado rapidamente por espécies reativas contidas no plasma e no meio celular como os radicais superóxido, considera-se que o NO endógeno é estabilizado por moléculas transportadoras que prolongam a sua meia vida, preservando suas funções biológicas. Um conjunto grande de evidências indica que os tióis (RSHs) de baixo peso molecular, encontrados no plasma humano, são os principais transportadores endógenos de NO [Gastón, 1993]. Neste processo os tióis são reversivelmente nitrosados formando S-nitrosotióis (RSNOs). Os S-nitrosotióis apresentam muitas das propriedades biológicas atribuídas ao NO, como a vasodilatação de veias e artérias e a inibição da agregação plaquetária. Devido a estas características, há um grande potencial para o uso destes compostos como fontes exógenas de NO para aplicações biomédicas [Shishido, 2000, de oliveira, 2001A, B].

A reação de S-nitrosação de sulfidrilas (SH) pode ocorrer *in vitro* através da reação com nitrito de sódio (NaNO₂) em meio ácido [Bohl, 2000, de Oliveira 2001 A]. A liberação espontânea de NO a partir dos RSNOs, ocorre por via térmica com formação do dímero RS-SR (Eq. 3).



Métodos e sistemas de síntese de RSNOs já foram desenvolvidos em nosso laboratório e usados para sintetizar a S-nitrosocisteína (CisNO), a S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e a S-nitrosoglutationa (GSNO) (Fig. 24). Estes RSNOs são doadores de NO encontrados endogenamente. Apresentam ação vasodilatadora e um grande potencial de uso como fontes exógenas de NO para aplicações farmacêuticas [Shishido, 2003, Santos, 2001A, B].

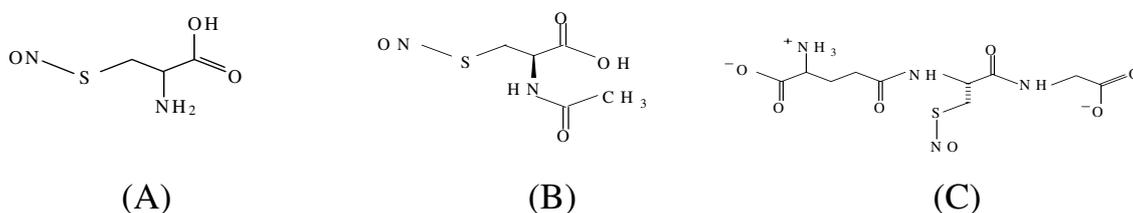


Figura 24. Estruturas da (A) S-nitrosocisteína, (B) S-nitroso-N-acetilcisteína e (C) S-nitrosoglutationa.

A caracterização das reações de liberação de NO a partir destes doadores em trabalhos anteriores, nos demonstrou que além das diferenças de estabilidade intrínseca [de Oliveira, 2002], as cinéticas de liberação de NO a partir de RSNOs podem também ser moduladas através da incorporação dos mesmos em matrizes poliméricas líquidas, sólidas ou na forma de hidrogéis [Shishido, 2000; Seabra, 2001] e filmes poliméricos [Seabra, 2004]. Alguns trabalhos já demonstraram que a agregação plaquetária e a proliferação de células musculares lisas em superfícies revestidas com colágeno foram inibidas após a exposição do sangue a hidrogéis de poli (etileno glicol) (PEG) doadores de NO [Bohl e West, 2000]. Desta forma, a incorporação de doadores de NO em matrizes deste tipo, possui um grande potencial de uso para a liberação controlada e localizada de NO em aplicações biomédicas que incluem o tratamento de lesões cutâneas [Smith, 1996], em especial as resultantes de infecções por *Leishmania donovani*

(leishmaniose cutânea) [Adhuna *et al.*, 2000] ou resultantes de queimaduras, bem como para o recobrimento de dispositivos de implante [Mowery, 1999, 2000, Desai, 1998].

Nesta parte do trabalho encontram-se descritos os resultados obtidos para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) como matrizes para aplicação tópica de RSNOs para promoção da vasodilatação. Em uma primeira parte encontram-se descritos a influência da temperatura e do grau de reticulação dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) no comportamento de absorção e difusão de RSNOs. Além disso, também foi avaliado o efeito vasodilatador destas matrizes contendo RSNOs associando a resposta de vasodilatação com a capacidade dos hidrogéis em liberar estes doadores de NO.

Em uma segunda parte encontra-se descrito a aplicação do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) em gastrosquises, onde foi estudado o efeito protetor do hidrogel na redução da inflamação em gastrosquises em modelo animal.

Referências:

- Adhuna A, Saltora P, Bhatnagar R. *Immunol. Letters*. 2000;71(3):171-176.
- Bohl KS, West JL. *Biomaterials*, 2000;21:2273-2278.
- de Oliveira MG, Rohweder JJR, Shishido SM, Seabra AB. Protocolo no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Nº 100.557-4 - 09/02 (2001) (A).
- de Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB. Submetida ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial através do EDISTEC/UNICAMP - Julho (2001) (B).
- de Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH. *J. Phys. Chem. A*. 2002;106(38):8963-8970.
- Desai SD, Blanchard J. *J. Pharm. Sci.* 1998;87:226-230.

- Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, Loscalzo J, Stamler JS. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993;90:10957-10961.
- Hogg N. Free Radical Biol Med. 2000;28:1478-1486
- Hughes MN. Biochem. Biophys. Acta 1999;1411:263-272.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987;84:9265-9269.
- Lancaster Jr.J, Ed. In Nitric Oxide - Principles and Action; Academic Press: New York, 1996.
- Lipton SA, Choi YB, Pan AH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. Nature 1993;364:626-632.
- Mowery KA, Meyerhoff ME. Polymer 1999;40:6203-6207.
- Santos KFR, Shishido SM, Laurindo FRM, de Oliveira MG, Krieger MH. Free Rad. Biol. Med. 2001A;31:216.
- Santos KFR, Shishido SM, Laurindo FR, de Oliveira MG, Krieger MH. Hypertension 2001B;37:1039-1039.
- Seabra, AB., Dissertação de Mestrado - IQ/UNICAMP - Fevereiro de 2001.
- Seabra AB, de Oliveira MG. Biomaterials 2004;25:3773-3783.
- Shishido SM, de Oliveira MG. Photochem. Photobiol. 2000;71(3):273-280.
- Shishido SM, de Oliveira MG, Seabra AB, Loh, W. Biomaterials 2003;24:3543-3553.
- Smith DJ, Chakravarthy D, Pulfer S, Simmons ML, Hrabie JA, Citro ML, Saavedra JE, Davies KM, Hutsell TC, Mooradian DL, Hanson SR, Keefer LK. J. Med. Chem. 1996;39:1148-1156.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Science 1992;258:1898-1902.
- Williams RJP. Chem Soc Rev. 1996;2:77-83.

4.1.

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND CROSS-
LINKING DEGREE OF P(NIPAAm-co-AAc)
HYDROGELS ON THE DIFFUSION BEHAVIOR OF
S-NITROSOTHIOLS

*Regiane da Silva, Marcela Gennari, Marcelo Ganzarolli de Oliveira**

Chemistry Institute, State University of Campinas, UNICAMP, CP 6154, CEP 13083-970,
Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55-19-37883132; Fax: +55-19-37883023.

E-mail address: mgo@iqm.unicamp.br

Abstract

Hydrogels of poly(N-isopropylacrylamide) copolymerized with acrylic acid [P(NIPAAm-co-AAc)] and cross-linked with N,N'-methylenebisacrylamide were used to absorb and release the S-nitrosothiols (RSNOs), S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) and S-nitrosoglutathione (GSNO). SNAC was observed to be preferentially partitioned in P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels after the achievement of swelling equilibrium in aqueous solutions while GSNO is partially segregated from the swelled hydrogel. Electrostatic interactions between positively charged SNAC molecules and negatively charged groups on the P(NIPAAm-co-AAc) chains in physiological pH conditions was assigned to be responsible to the higher rate of absorption of SNAC relative to GSNO. Diffusion measurements to a PBS receptor solution using a Franz-like diffusion cell showed that RSNOs diffuse with lower rates from hydrogels compared to their diffusion from aqueous solution. The rate of release of both RSNOs loaded in the hydrogels was shown to be sensitive to the change in temperature and is significantly increased with the increase from 25 to 37°C. Laser Doppler flowmetry allowed demonstrating that SNAC is able to produce a more intense and faster vasodilation effect than GSNO. However this effect does not last as much as the effect produced by GSNO. These results indicate that the RSNOs-containing P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels can be used to control the diffusion of RSNO in topical or transdermal applications promoting a local skin vasodilation by choosing the appropriate RSNO and by controlling temperature and the cross-linking degree of these hydrogels. Cross-linked P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel have potential to be used as a biomaterial for the treatment on ischemic tissues.

Keywords: P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels, porous membranes, swelling ratio, diffusion Nitric oxide drug delivery system

Introduction

Some intrinsic properties of synthetic cross-linked hydrogels like, ability to absorb high amounts of water [Hoffman, 2002], softness similar to biological tissues, a better feeling for the skin if compared to conventional ointments and good biocompatibility patches [Peppas 2000; Bernik, 2006], have made them promising biomaterials for several medical and pharmaceutical applications. This range of applications have been widened by hydrogels that, in addition to these properties, are capable of changing their swelling behavior, permeability and mechanical properties in response to changes in pH, ionic strength and temperature. These so-called “intelligent hydrogels” can find special applications in solute extraction and separation (Hoi, 2000), drug delivery [Young, 2001; Chilcoti, 1994; Hoffman, 1995; Bell, 1995; Schild, 1992; Ichikawa, 2000], artificial organs [Verrion, 2000] and enzyme immobilization [Liu, 1993].

Hydrogels of poly(N-isopropylacrylamide) copolymerized with acrylic acid [P(NIPAAm-co-AAc)] and cross-linked with N,N'-methylenebisacrylamide (BIS) are thermosensitive and undergo a well-known volume-phase transition with the increase in temperature, which leads to the shrinking of the swelled hydrogel and to the release of large amounts of water, or solution” previously absorbed. [Clinton, 2003; Zhang, 2002; Hoffman, 1991]. This transition temperature is called lower critical solution temperature (LCST) and can be modulated by changing the rate of P(NIPAAm) to AAC in the copolymer, as well as its cross-linking degree[Shin, 2003; Schild, 1992]. This special property of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels make them candidates for topical or transdermal delivery of drugs [Blanco, 2003].

Endothelial dysfunction plays an important role in the pathogenesis of peripheral vascular diseases such as diabetic microcirculatory disorders,

Raynaud's syndrome or chronic leg ulcers [Vevves, 1998; Dinh, 2005; Greenman, 2005; Herrick, 2005]. Impaired autoregulation of blood flow is associated to reduced levels of endothelial nitric oxide (NO) production, therefore, the delivery of exogenous NO may represent a promising therapeutic tool in the treatment of microangiopathy-associated diseases [Durante, 1988; Sigauco-Roussel, 2004]. Systemic administrations of sodium nitroprusside and organic nitrates have been shown to prevent thrombosis development via the inhibition of platelet activation [Sogo, 2000; Vilahur, 2000]. However, the prolonged administration of these compounds can lead to cyanide poisoning and nitrate tolerance, limiting their usefulness in a clinical setting [Johanning, 1995]. S-nitrosothiols (RSNOs) such as S-nitrosoglutathione (GSNO) have already been identified as endogenous NO carriers and donors in mammals [Hogg, 2000; Zhang, 2005]. RSNOs have been at the centre of several pharmacological studies investigating the importance of NO in living systems and it has already been demonstrated that they are vasodilators and inhibitors of platelet aggregation [Ignarro, 1980; Mellion, 1983; Ricardo, 2002]. In such species, NO is covalently bound to a sulphur atom in a C-S-NO moiety and can be released through heterolytic or homolytic S-N bond cleavage, allowing NO to be transferred to specific receptors such as (i) iron-containing enzymes to which it can coordinate as a ligand (nitrosylation reactions) or (ii) thiol-containing proteins to which it can be bound as a nitrosonium ion (NO⁺) in transnitrosation reactions [Zhang, 2005; Ortega, 2000]. GSNO can also decompose spontaneously through homolytic bond cleavage, with free NO release and the formation of oxidized glutathione [de Oliveira, 2002]. Incorporation of GSNO in nontoxic polymers allows local delivery of NO to target areas such as the skin microcirculation, where NO has a vasodilator effect [Seabra, 2004]. The incorporation of GSNO into a hydrogel composed of Pluronic F127 has already been reported and its

topical application on the skin of healthy volunteers resulted in NO-dependent vasodilation [Seabra, 2004; Shishido, 2000].

The aim of the present study was to investigate the ability of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels to absorb and release S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) (Figure 25) solutions using a sink and a non-sink diffusion method. It was observed that these RSNOs-containing hydrogel are able to reduce the RSNO rate release compared to the RSNO rate release from PBS solution. Furthermore it was observed that, in the non-sink diffusion method, the increase in the cross-linking degree leads to the reducing in the RSNO rate diffusion. Moreover was evaluated the perspectives of using these hydrogels for the controlled delivery of RSNOs in topical applications to promote local skin vasodilation. The results showed the potential of RSNOs-containing hydrogels to be used as a biomaterial for the treatment on ischemic tissues.

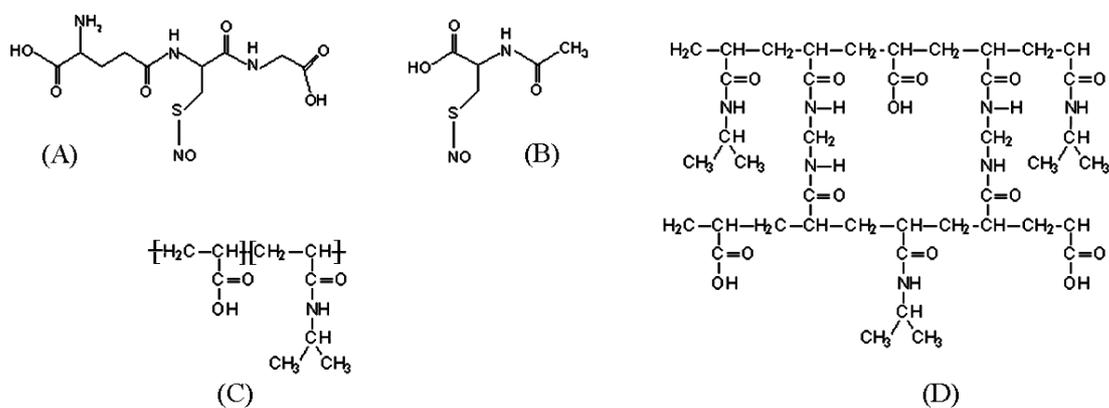


Figure 25. Molecular structures of (A) GSNO, S-nitrosoglutathione, (B) SNAC, S-nitroso-N-acetylcysteine, (C) 80-20-0 hydrogel and (D) 80-20-3 and 80-20-5 hydrogels.

Materials and methods

Materials

N-Isopropylacrylamide (NIPAAm) monomer, stabilized 99% and acrylic acid (AAc) monomer, stabilized 99.5% (Acros organics) were purified as previously described [da Silva R, 2007]. *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) monomer, stabilized 99% (Acros organics) was used as a cross-linking agent, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), 99% (Plusone–Pharmacia Biotech), was used as an accelerator and sodium persulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), P.A. (Synth), was used as initiator of polymerization. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4, glutathione (γ -Glu-Cys-Glu, GSH), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), sodium nitrite, hydrochloric acid and S&S Nylon 66-membrane filter with pore size $0.45\mu\text{m}$ and diameter 25 mm were purchased from Sigma, ST. Louis MO, USA and used as received. Gaseous nitrogen, N_2 was obtained from Air Liquide (Campinas, SP, Brasil). The experiments were carried out using analytical grade water from Millipore Milli-Q gradient filtration system.

Synthesis of P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels

In brief, P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels were synthesized in aqueous solutions as previously described [da Silva R, 2007], containing 80% mol NIPAAm/mol total monomer, 20% mol AAc/mol total monomer, and 0, 3 and 5% mol BIS/mol (total monomer + cross-linker), named as 80-20-0, 80-20-3 and 80-20-5 respectively. The synthesis was carried out under nitrogen bubbling. Hydrogels 80-20-3 and 80-20-5 were synthesized in the presence of $43\ \mu\text{mol L}^{-1}$ sodium

persulfate solution and 2.5 mmol L⁻¹ TEMED solution, while hydrogels 80-20-0 were synthesized in the presence of 0.8 mmol L⁻¹ sodium persulfate solution and 25 mmol L⁻¹ TEMED solution. Hydrogels 80-20-3 and 80-20-5 were synthesized in a squared mould 10x5x0.3 cm, as previously described [da Silva R, 2007], while hydrogel 80-20-0 was synthesized in a reaction balloon. The hydrogels were further purified by several washings with deionized water and freeze-dried for 48 h.

Synthesis of GSNO and SNAC

S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine (SNAC) were synthesized by reacting equimolar GSH and NAC with sodium nitrite in acidic aqueous solutions (HCl 0.5M, pH 1). The final solutions were stirred at room temperature for 15 min for SNAC and 40 min for GSNO, protected from light with aluminium foil. GSNO was precipitated with acetone, filtered under vacuum, freeze-dried for 24 h and stored as a solid at -20 °C for further use. SNAC solutions were prepared by dilution to 43 mmol L⁻¹ (pH 3.5) from the concentrate solution obtained in the synthesis and used immediately.

Preparation of GSNO and SNAC-containing P(NIPAAm-co-AAc) membranes

The dry membranes (ca. 1.0 mm thick) were cut into disks with an outer diameter of 1 cm. As such membranes are opaque to the laser beams, a central inner hole, with a diameter of 3 mm was opened in each dry membrane, using a perforating tool manufactured for this purpose, for allowing the laser beams to

probe the skin in the middle of the application area (Fig. 26). The dry perforated membrane disks (weighing ca. 10 mg each) were loaded with RSNOs by immersion in 3.0 mL of RSNO solution (43 mmol L⁻¹) at 25° C during 1 h for laser Doppler experiment and for 6 h absorption behavior characterization. The amount of RSNOs absorbed was monitored at 545 nm and calculated as a reduction in the RSNOs initial concentration. The amount of RSNOs thermally decomposed during the absorption period was evaluated in separate experiments and used to correct the values of the absorbed amounts of RSNOs. After the loading period (1 h), the swollen membrane disks were removed from the solution, excess solution was removed by touching the membranes with a tissue paper and the membranes were immediately applied on the skin for the Laser Doppler measurements.

Diffusion measurement

Sink Diffusion

A piece of hydrogel (ca. 0.3g) containing RSNOs (about 50 mmol L⁻¹) previously absorbed according to the procedure described above was immersed in 3.0 mL of PBS solution, pH 7.4 in a 1 cm path length quartz cuvette placed in the thermostated sampling compartment of a diode array spectrophotometer. RSNOs diffusion to the PBS solution were monitored at 336 nm for 12 h at 25 and 37 °C.

Non-Sink Diffusion

Dry P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membranes (ca. 30 mg) previously charged with RSNOs according to the above described procedure were used for the diffusion measurements. A modified Franz diffusion cell was used for measuring diffusion coefficients of SNAC and GSNO. A membrane filter with pore size 0.45 μm and diameter 25 mm (S&S Nylon 66- Membrane Filter, Aldrich) was mounted on the diffusion cell and clamped carefully between the receptor and donor compartment. The specially designed Franz diffusion cell has an effective permeation area and receptor cell volume of 1 cm^2 and 4.2 mL. The receptor compartment (PMMA cuvette with 1 cm path length) was filled with PBS solution at pH 7.4. The receptor compartment of the cell was inserted in the spectrophotometer sampling compartment and thermostated at 25 and 37° C. The receptor fluid was stirred continuously at 600 rpm with a magnetic stirring flea bar. The donor compartment was loaded with P(NIPAAm-co-AAc) (ca. 0.3g) or PBS solution (ca. 0.3 mL) containing RSNOs. RSNOs diffusion to the receptor compartment was spectrophotometrically monitored at 336 nm for 12 h at 25 °C.

Blood flow measurements by laser Doppler Flowmetry

Subjects: Two men (22 \pm 1 years) and four women (22 \pm 1 years) were recruited for this study. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas (736/2007). Prior to participation each subject gave written informed consent as set by the Declaration of Helsinki. All subjects were healthy, nonsmokers, did not have any story of diabetes or cardiovascular disease, and did not have atopic skin disease.

Volunteers were not permitted to consume caffeine for at least 12 hours before the measurements.

All measurements were performed in a thermoneutral laboratory thermostated at 25°C with the subjects in the supine position and the experimental arm at heart level. A laser Doppler perfusion monitor (Transonic Systems Inc.) with one satellite unit connected to the server was used to record blood flow readings from two laser probes simultaneously. A round perforated P(NIPAAm-co-AAc) membrane with outer diameter of 1 cm, containing either GSNO, or SNAC and their respective controls (P(NIPAAm-co-AAc) membrane alone), were applied on the ventral surface of the forearm of the subjects and laser Doppler probes were secured to the overlying skin with adhesives. To obtain an index of skin blood flow, red blood cell (RBC) flux was monitored directly over the applied hydrogels. The perfusion monitor was connected to a PC and recordings displayed continuously by Transonic Systems Inc. software. Subjects blood pressure was measured at the beginning and at the end of the experiment with an automated oscillometric upper arm blood pressure monitor (Omron M7 HEM-780-E, USA). Initial rates of blood flow increase were calculated through the linear regression of kinetic curves for the first 20 to 40 min, depending on the curve. A significant increase in skin blood flow above baseline was defined as an increase of 10–15 flux units (mV) for at least 10 s after the application of the hydrogels that continued to progressively increase. Thus, any increase in flux assignable to body movement would have returned to baseline within 10 s and would not have progressively increased. All values are presented as mean \pm s.e.m of at least triplicates.

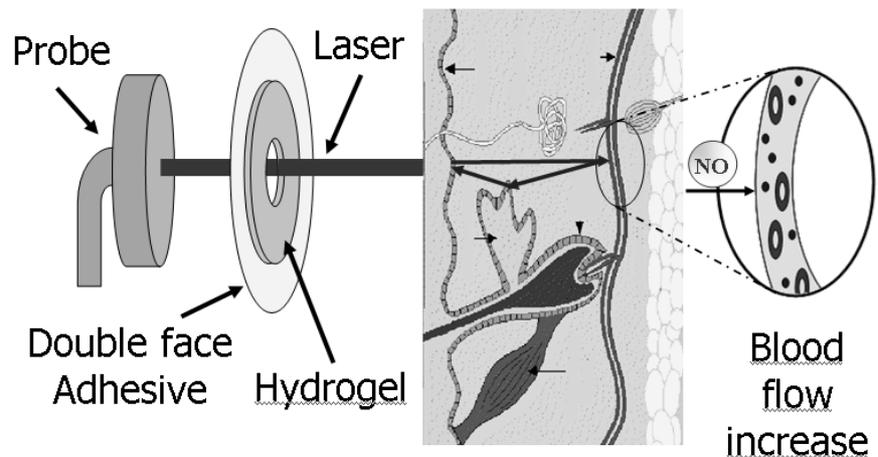


Figure 26. Scheme of Laser Doppler application on the skin.

Results and discussion

Absorption measurements

Figure 27 shows the curves corresponding to the absorption of GSNO and SNAC from solution by P(NIPAAm-co-AAc) membranes, compared to the curves due to the thermal decomposition of the RSNOs at the same concentration. It can be seen that SNAC is more strongly concentrated than GSNO in the first 2 h of adsorption as can be seen from the bimodal shape of the curves obtained with SNAC in both hydrogels than GSNO. The discontinuity at ca. 2h in such curves indicates that after this time an apparent saturation of the main sites of adsorption is achieved with SNAC.

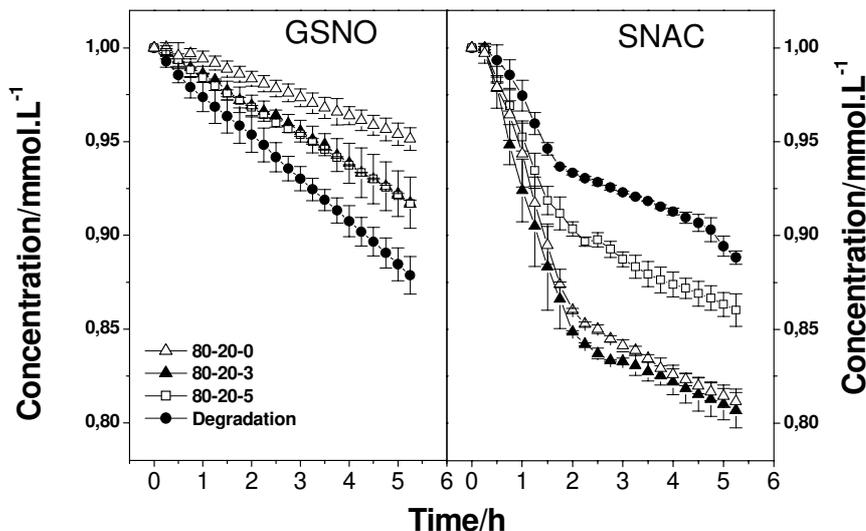


Figure 27. Kinetic curves of GSNO and SNAC degradation and absorption by 80-20-0, 80-20-3 and 80-20-5 hydrogels.

The slope of the second section of the SNAC curves is similar to the slope of the GSNO curve along the five hours period. Thus, the second phase of slow absorption rate of SNAC after 2h can be assigned mainly to the swelling of the hydrogel. It must be noted that the thermal decomposition of the RSNOs during this same period of time has already been taken into account in the curves of Fig. 27. Moreover, SNAC also displays a different dependence of absorption on the swelling behavior that relative to GSNO. It can be seen that the extent of SNAC absorption in hydrogel 80-20-0 and in hydrogel 80-20-3 are greater than in hydrogel 80-20-5. This fact indicates that the SNAC absorption in hydrogel 80-20-5 is associated with the lower swelling ratio of the hydrogel, which is a consequence of its higher cross-linking degree. Moreover the swelling ratio of hydrogel 80-20-0, cross-linked by entanglement is practically equal to the swelling ratio of hydrogel 80-20-3 during the absorption process. It can also be seen that the reduction in SNAC concentration due to decomposition is smaller than the reduction in concentration due to decomposition in the presence of the

swelling hydrogels while in the case of GSNO, the opposite is observed. The decrease in SNAC concentrations during the swelling of the dry hydrogels indicates that hydrogels 80-20-3 and 80-20-5 removed SNAC from the solution phase more strongly than GSNO. The calculated partition coefficients, K at 25°C for SNAC and GSNO were 3.97 and 0.95 respectively in hydrogel 80-20-0, respectively, 2.71 and 0.74 in hydrogel 80-20-3 and 1.52 and 0.52, respectively in hydrogel 80-20-5. These values are significantly higher for SNAC in all cases indicating that SNAC solubility is higher in both hydrogel phases relative to the aqueous phase while this phenomenon is not observed for GSNO. Moreover the partition coefficients show that GSNO absorption is similar in both cross-linked hydrogels. However, SNAC absorption is higher in hydrogel 80-20-3, which absorbs a higher amount of water. In order to understand the difference in K values between SNAC and GSNO, an analysis of the intermolecular electrostatic interactions between the ionized groups of the RSNOs and P(NIPAAm-co-AAc) chains, was performed taking into account their resultant charges in the pH of the solutions used in the absorption experiments. As acidic electrolytes the average pH of SNAC and GSNO solutions is 3.5. At this pH the calculated resultant charges of SNAC, GSNO and P(NIPAAm-co-AAc) based on the corresponding pKa values of the carboxylic (-COOH), amino (-NH₂) and amide (-NHC=O) groups and on their relative contribution according to the relative number of moles of each group in each molecule are reported in Table 5. These values show that SNAC is at its isoelectric point while GSNO and P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel are negatively charged. Such resulting charges show that the absorption of negative GSNO molecules is unfavoured due to the repulsion against the negatively charged groups of the hydrogel chains. Thus, GSNO is expected to be segregated from the hydrogel phase increasing its concentration in the aqueous phase, as observed in Fig. 27, although part of the GSNO molecules

must penetrate the hydrogel during its swelling with the solution. It must be considered here that these hydrogels have a macropore morphology as already shown (da Silva, 2007) and that GSNO segregation is expected to occur only at a short distance from the surface of the pore walls. Thus, the partition coefficients for GSNO, are still positive although much smaller than for SNAC. On the other hand, the absorption of neutral SNAC molecules is expected to be favoured by electrostatic interactions with the positively charges of the P(NIPAAm-co-AAc) chains, leading to a more extensive partitioning of SNAC into the hydrogel phase, as observed in Fig. 27.

Table 5. Net resulting charge from the molar contributions of -COO^- , NH_3^+ and CONH_2^+ groups in SNAC, GSNO and P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels.

	-COO^-	NH_3^+	CONH_2^+	EFFECTIVE
	(mol)	(mol)	(mol)	CHARGE
SNAC	1.5×10^{-1}	1.5×10^{-1}	-	Neutral
GSNO	3.0×10^{-1}	1.5×10^{-1}	-	(-)
P(NIPAAm-co-AAc)	1.5×10^{-2}	-	9.4×10^{-6}	(-)

These results may have important consequences for biomedical applications of RSNOs-containing P(NIPAAm-co-Aac) hydrogels, once not only the charging of the hydrogels with RSNOs solutions through absorption will be affected by the resulting charges involved but the charges will also affect the diffusion and rates of release of the RSNOs from the hydrogels, as shown below.

Diffusion measurements

The incorporation of RSNOs in Pluronic-F127 hydrogel has already been reported (Shishido, 2003). RSNOs-containing F127 hydrogel were used in topical applications on the skin of human healthy volunteers resulting in NO-dependent vasodilation [Seabra, 2004 and 2007].

Figure 28 show the kinetic curves for the diffusion of SNAC and GSNO from the RSNOs-containing P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels to PBS solution, using a non-Sink (N) condition (hydrogels 80-20-5 and 80-20-3) with a Franz-like diffusion cell and in a sink (S) condition (hydrogels 80-20-5, 80-20-3 and 80-20-0) over 12 h at 25 and 37°C, compared to the diffusion of SNAC and GSNO from PBS solution to the same reception medium.

By comparing the concentration plateaus achieved after ca. 2h in all curves in the sink and non-sink conditions, it can be seen that the diffusion rates of GSNO and SNAC from the hydrogels are significantly lower than from PBS solution. This result shows that in the non-sink condition, where the RSNOs molecules have to cross longer distances inside the hydrogel to reach the receptor solution in the Franz-like cell, diffusional limitations are higher as expected. In the sink condition, where a piece of the hydrogel is immersed in the receptor solution the surface area for diffusion is much greater and thus the rates of diffusion are comparable to those observed from PBS solution to PBS solution. In these cases (PBS curves) the decrease in concentration of RSNO after ca. 2h can be assigned to the thermal decomposition of the RSNOs, which are significantly higher at 37 °C. In the non-sink condition the initial rates of diffusion of RSNOs from the hydrogels at 37 °C are 3 to 6-fold lower than the rates measured in PBS solution. In addition, it can be seen that the reduction in the initial rates of diffusion are greater for the cross-linked hydrogels and increase with the increase in the cross-linking degree.

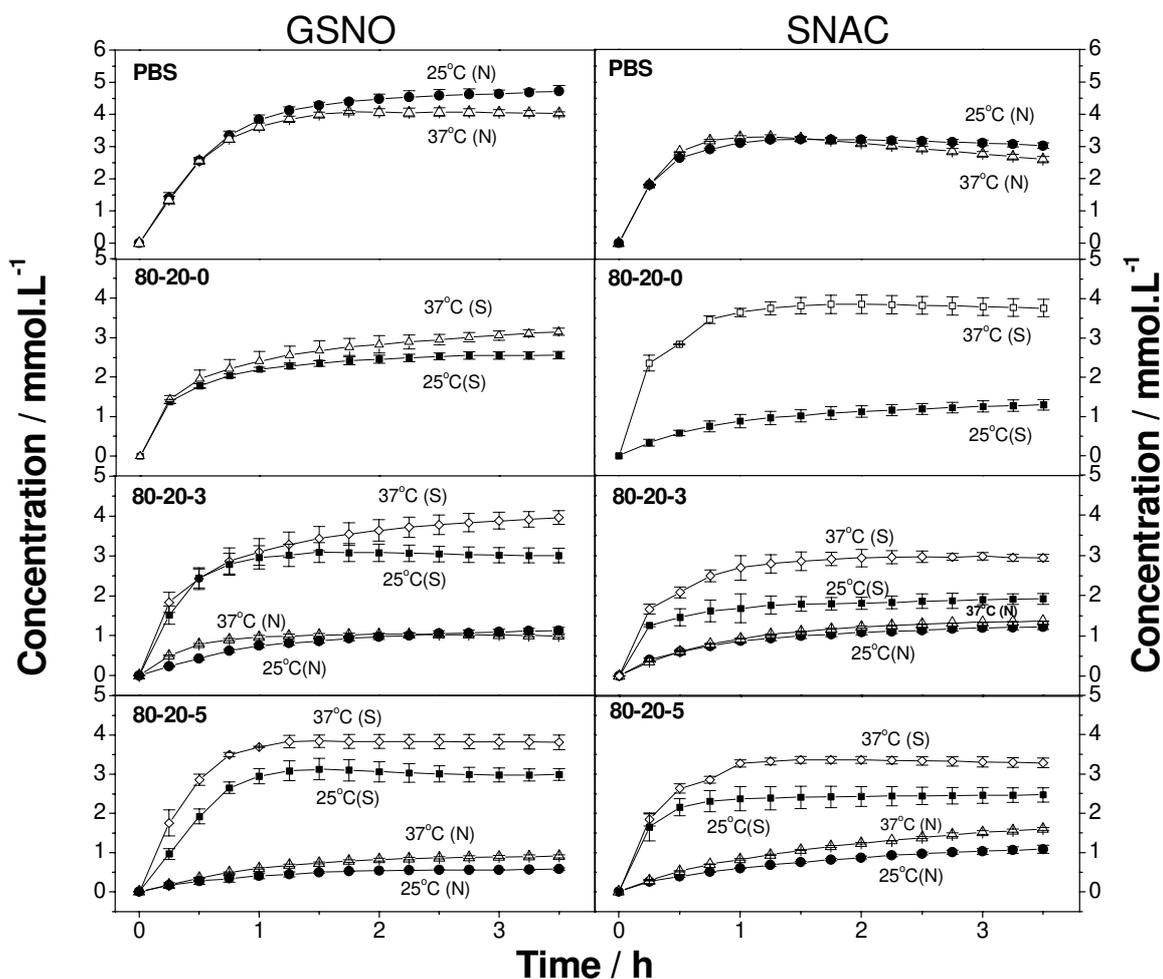


Figure 28. Kinetic curves of GSNO and SNAC release from PBS solution to PBS solution (PBS) and from swollen hydrogels 80-20-0, 80-20-3 and 80-20-5 to PBS solution, using a non-Sink (N) and a sink (S) release method.

It can also be seen in Figure 28 that in all cases the rates of release are higher at 37° C than at 25° C. This result can be assigned to the fact that at 25° C the P(NIPAAm) hydrogel chains are below LCST and are highly hydrophilic. Consequently, the hydrogels are able to store large amounts of RSNOs solutions and display lower release ratios than at 37°C where the hydrogels are above the LCST having underwent hydrophilic-hydrophobic transitions which lead to a fast release of the RSNOs solutions. This fact becomes more evident in the sink

condition where the immersion in PBS solution favors the hydrophilic-hydrophobic transitions and the consequent increase in the rates of RSNOs release at 37°C.

Finally, it is possible to conclude that the non-sink condition using a Franz-like diffusion cell offers a better condition to evaluate the effect of the cross-linking degree on the initial rates of RSNOs diffusion. In this condition it becomes clear that a higher cross-linking degree imposes higher diffusional limitations. This effect is more evident in hydrogel 80-20-5.

The diffusion coefficients were calculated by plotting the accumulated amounts of RSNOs in the receptor compartment divided by unit area versus the square root of the time according to the Higuchi model (Higuchi 1962) (Eq. 4)

$$Q=2C_0(Dt/\pi)^{1/2} \quad (4)$$

where Q is the total amount of RSNOs accumulated in the receptor compartment divided by unit area, Co is the initial concentration, D is the diffusion coefficient and t is time of measurement and are shown in the bar graph of Figure 29.

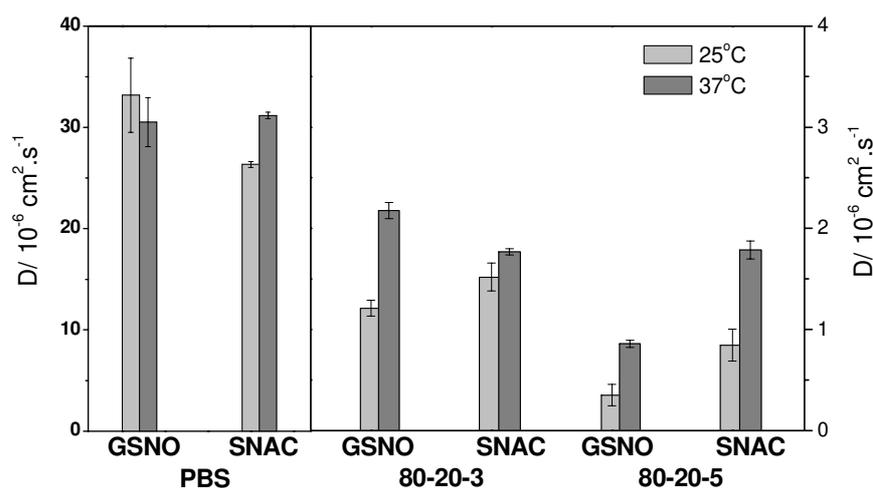


Figure 29. Diffusion coefficient of RSNOs released from hydrogels 80-20-3 and 80-20-5 to PBS solution using a no-sink method at 25 and 37°C.

Blood Flow measurements

The diffusion results presented in Fig. 28 allowed selecting hydrogel 80-20-5 and 80-20-3 as better options for topical application on the skin once this formulation is expected to lead to lower initial rates of RSNOs release and thus to more prolonged vasodilator effects. Figure 30 shows the profile of blood flow increase obtained in the topical application of GSNO and SNAC-containing P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels, compared to the control hydrogel. It can be seen that the blood flow increased more than five times, 30 min after the application of the GSNO-containing hydrogel. This flow was sustained up to 1 h and started to decrease back to the base level in the next 1 h. The maximal blood flow was sustained between 30 and 60 min post application. On the other hand SNAC-containing P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel lead to a much higher blood flow increase in the first 20 min and started to decrease soon after going to values lower than those obtained for GSNO from 30 to 120 min. These results indicate that the differences between GSNO and SNAC actions must be related to the intrinsic diffusion properties of these RSNOs. It is worth noting that in all cases local erythema formation was observed after removal of the RSNO-containing hydrogels, and vanished a few minutes after application. No adverse side effects were observed in the tested skin area, indicating the absence of any inflammatory or allergic reactions. No significant changes in blood pressure were detected in any of the subjects, indicating the absence of systemic effects.

The influence of diffusion parameters on the facility of these RSNOs in penetrating the stratum corneum and the epidermis was estimated on the bases of their diffusion coefficients calculated through a model membrane in a Franz-like diffusion cell and presented in Figure 29. The membrane filter with pore size 0.45 μm , used in these measurements, offers no physical barrier to the diffusion

of the RSNOs, once the pore diameter is ca. 10 times larger than the molecular areas or volumes of the RSNOs molecules. Thus, the membrane represents only a barrier to polymeric matrices and the diffusion coefficients measured reflect the free diffusion of these hydrophilic molecules through a continuous aqueous medium.

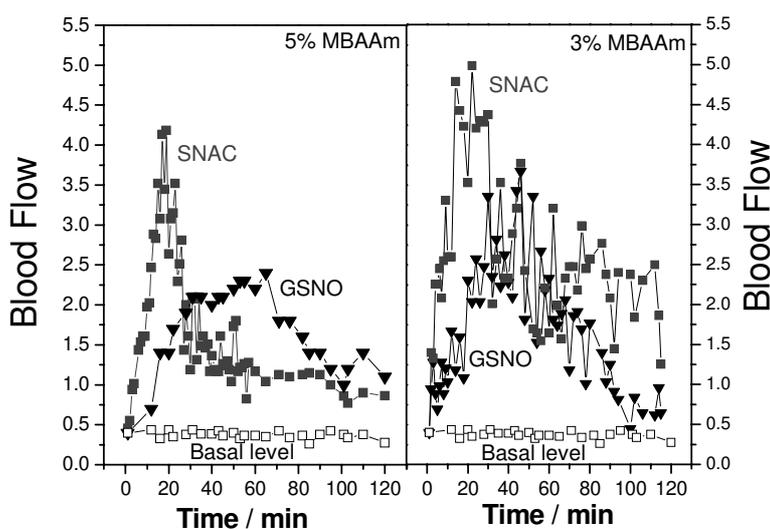


Figure 30. Dermal blood flow after application of RSNO-containing hydrogel and control hydrogel (without RSNO) on the skin of human volunteers.

The use of this skin model minimized the variability in permeation of RSNOs that would be obtained in human skin. Although it is not possible to determine the mean path of these molecules through the skin to reach the microvasculature, the faster vasodilation obtained with SNAC, as well as its faster return to baselevel suggests a direct correlation with the diffusion coefficients. Moreover, there is a direct correlation between the higher blood flow rate of SNAC with the smaller time necessary to reach the plateau of maximal blood flow. These correlations can be observed in the bar graphs of Fig. 31.

As hydrophilic species, SNAC and GSNO can be assumed to diffuse through the plasma and extracellular matrix to deliver NO to the smooth muscle cells of the microvasculature, triggering vasodilation through the cGMP-dependent pathway. The correlations observed indicate that the desired vasodilation effect can be modulated by changing both the RSNO (SNAC or GSNO) or their concentration in the donor hydrogels, and that it does not depend on the nature of these two hydrogel matrices used. Such results open new perspectives for treating skin microcirculation disorders with exogenous RSNOs, with ample possibilities of topical application ranging from the use of membranes to flowing hydrogels.

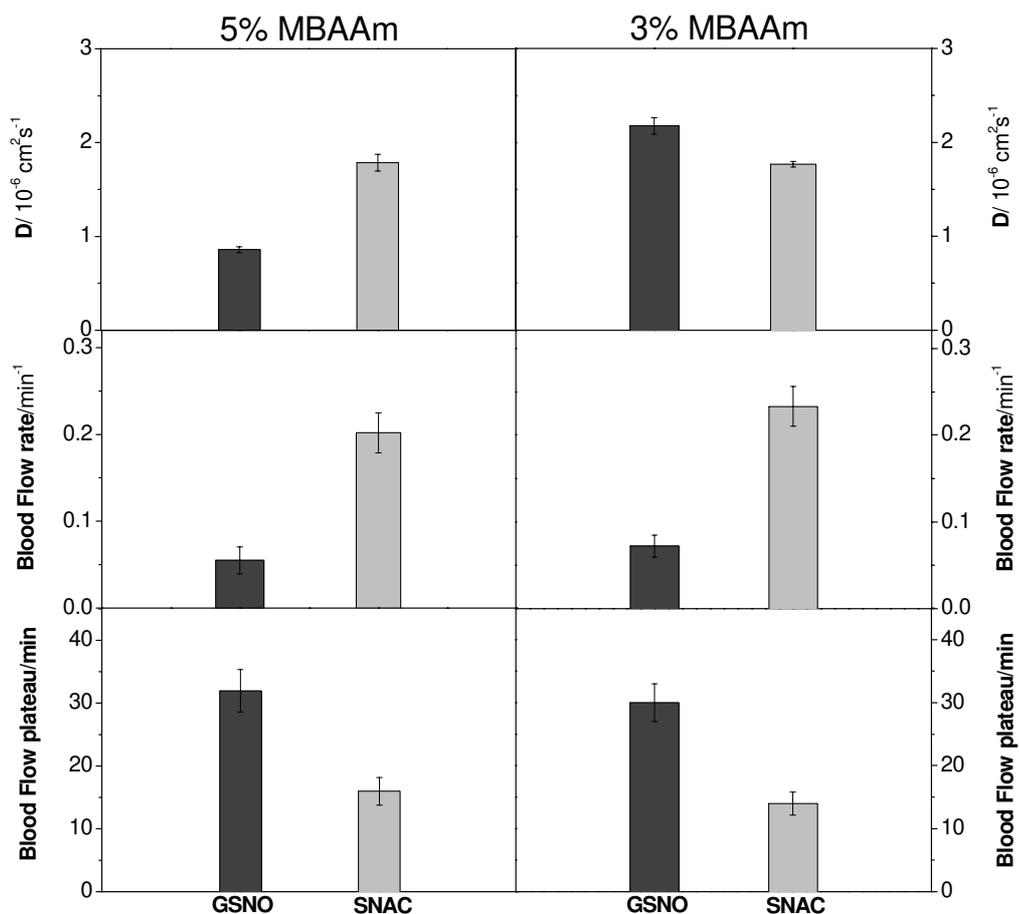


Figure 31. Coefficient of diffusion, blood flow rate and time to achieve blood flow plateau after application of RSNO-containing hydrogel.

Conclusions

SNAC was observed to be preferentially partitioned in P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels after the achievement of swelling equilibrium in aqueous solutions while GSNO is partially segregated from the swelled hydrogel. These results can be assigned to the resulting electrical charges in of the RSNOs molecules and P(NIPAAm-co-AAc) chains where neutral SNAC molecules are strongly absorbed by the negatively charged hydrogel matrix, compared to the negatively charged GSNO molecules in the acidic condition used. Diffusion measurements to a PBS receptor solution using a Franz-like diffusion cell showed that RSNOs diffuse with a lower rate from hydrogels than from aqueous solution. The rate of release of both RSNOs loaded in the hydrogels was shown to be sensitive to the change in temperature and is significantly increased with the increase from 25 to 37°C. These results indicate that the RSNOs-containing P(NIPAAm-co-AAc) hydrogels can be used to control the diffusion of RSNO in topical or transdermal applications by choosing the appropriate RSNO and by controlling temperature and the cross-linking degree of these hydrogels. Laser Doppler flowmetry allowed demonstrating that SNAC and GSNO have different vasodilation profiles, with SNAC having a more intense, faster and shorter vasodilation effect. This result is directly correlated with the measured diffusion coefficients. P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel membrane, used for the first time for this application was shown to be an effective matrix for the topical delivery of RSNOs on the skin.

Acknowledgments

RS and MG hold a fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), project 04/11204-4 and 07/55594-1. The authors wish to thank FAPESP for financial support.

References

- Bell CL, Peppas NA. *Adv Polym Sci.* 1995;74:122-125
- Bernik DL, Zubiri D, Monge ME, Martín Negri R. *Colloids and Surfaces* 2006; 273:165-173.
- Blanco MD, Bernardo MV, Teijón C, Sastre RL, Teijón JM. *International Journal of Pharmaceutics* 2003;255:99-107.
- Chilkoti A, Chen G, Stayton PS, Hoffman AS. *Bioconj. Chem.* 1994;504-507.
- de Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB et al. *J Phys Chem* 2002;106:88963–70.
- Dinh T, Veves A. *Curr Pharm Des* 2005;11:2301–9.
- Durante W, Sen AK, Sunahara FA. *Br J Pharmacol* 1988; 94:463–468.
- Frank J, Rabinowitch E. *Trans. Faraday Soc.* 1934;30:120.
- Greenman RL, Panasyuk S, Wang X et al. *Lancet* 2005; 366:1711–17.
- Guilherme MR, Silva R, Giroto EM, Rubira AF, Muniz EC. *Polymer* 2003;44: 4213-4219.
- Guilherme MR, da Silva R, Rubira AF, Geuskens G, Muniz EC. *React Funct Polym* 2004;61:233-243.
- Herrick AL. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:587–96.
- Higuchi Wi, *Journal of pharmaceutical sciences*, 1962;51 (8):802.
- Hoffman AS. *Artif. Organs* 1995;19:458-467.
- Hoffman AS. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2002;43:3-12.
- Hogg N. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1478–86.
- Hoi YJ, Yamaguchi T, Nakao S. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000;39:2491-2495

Ichikawa H, Fukumori Y. *Controlled Release* 2000;63:107-119.

Ignarro LJ, Gruetter CA. *Biochim Biophys Acta* 1980;631:221–31.

Ito K, Ujihira Y, Yamashita T, Horie K. *Radiat Phys Chem.* 2000;58:521-524.

Johanning RJ, Zaske DE, Tschida SJ et al. *Pharmacotherapy* 1995;15:773–7.

Liu F, Tao GL, Zhuo RX. *Polym. J.* 1993;25:561-567

Mellion BT, Ignarro LJ, Myers CB et al. *Mol Pharmacol* 1983; 23:653–64.

McGrath JL, Hartwig JH, Kuo SC. *Biophys J* 2000;79:3258-3266.

Noyes RM. *J. Am. Chem. Soc.* 1955;77:2042.

Ortega Mateo A, Amaya A de A. *Pharmacol Res* 2000;42(2):421–427.

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27-46.

Ricardo KF, Shishido SM, de Oliveira MG et al. *Nitric Oxide* 2002; 7:57–66.

Sannino A, Netti PA, Mensitiri G, Nicolais L. *Comp Sci Technol* 2003;63:2411-2416.

Schild H. G. *Prog. Polymer Science.* 1992;17:163-249

Seabra AB, Fitzpatrick A, Paul J et al. *Br J Dermatol* 2004; 151:977–83.

Seabra, A.B. et al., *British Journal of Dermatology*, 156 (5), 814, 2007.

Serpe MJ, Jones CD, Lyon LA. *Langmuir* 2003;19:8759-8764.

Sigaudou-Roussel D, Demiot C, Fromy B et al. *Diabetes* 2004; 53:1564–9.

Shin BC, Kim SS, Ko JK, Jegal J, Lee BM. *European Polymer Journal* 2003;39:579-584.

Shishido SM, Oliveira MG. *Photochem. Photobiol.* 2000;71(3):273-280.

Shishido SM, Seabra AB, Loh W, de Oliveira MG. *Biomaterials* 2003;24:3543-3553.

Shishido SM, de Oliveira MG, Seabra AB, Loh, W. *Biomaterials* 2003;24:3543-3553.

Sogo N, Magid KS, Shaw CA et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:412–19.

Todd PA, Goa KL, Langtry HD. *Drugs* 1990; 40:880–902.

Verrion B, Kim SW, Bae YH. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000;51:69-79

Veves A, Akbari CM, Primavera J et al. *Diabetes* 1998; 47:457–63.

Vilahur G, Sogo N, Magid KS, Shaw CA et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:412–19.

Young TH, Chuang WY, Wei CW, Tang CY. *Journal of Membrane Science*, 2001;191:199-205.

Zhang XZ, Yang YY, Wang FJ, Chung TS. *Langmuir*. 2002;18:2013-2018.

Zhang X-Z, Sun G-M, Wu D-Q, Chu C-C. *J Mater Sci: Mater Med*. 2004;15:865-875.

Zhang Y, Hogg N. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:831–8.

4.2. Material Suplementar 7: Valores numéricos dos coeficientes de difusão dos RSNOs medidos em cela de Franz

Na tabela 6 estão apresentados os valores de coeficiente de difusão para os RSNOs utilizando cela de Franz, sendo os valores nela apresentados os mesmos que constam no manuscrito anterior (Figura 29). Podemos verificar que a difusão tanto da GSNO quanto da SNAC é de aproximadamente $30 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a partir da solução de PBS para PBS. Entretanto podemos observar que a difusão dos RSNOs é grandemente reduzida quando a partir dos hidrogéis para a solução de PBS, independente do grau de reticulação do gel. Além disso, se compararmos os graus de reticulação podemos ver que a difusão dos RSNOs é menor através do hidrogel mais reticulado comparado ao hidrogel menos reticulado.

Tabela 6. Coeficiente de difusão ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) dos RSNOs a partir da solução de PBS e dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) para solução de PBS à 25 and 37°C usando cela de difusão de Franz.

		PBS	3 % MBAAm	5% MBAAm
GSNO	25°C	33,17±3,66	1,21±0,78	0,35±0,10
	37°C	30,50±2,42	2,17±0,08	0,85±0,03
SNAC	25°C	26,33±0,30	1,52±0,14	0,84±0,16
	37°C	31,17±0,32	1,77±0,03	1,79±0,09

4.3. Material Suplementar 8: Velocidades iniciais de absorção de RSNOs

A figura 32 mostra os gráficos de barras das velocidades iniciais de absorção de soluções de GSNO e SNAC por hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) correspondentes às curvas cinética de absorção da Figura 27.

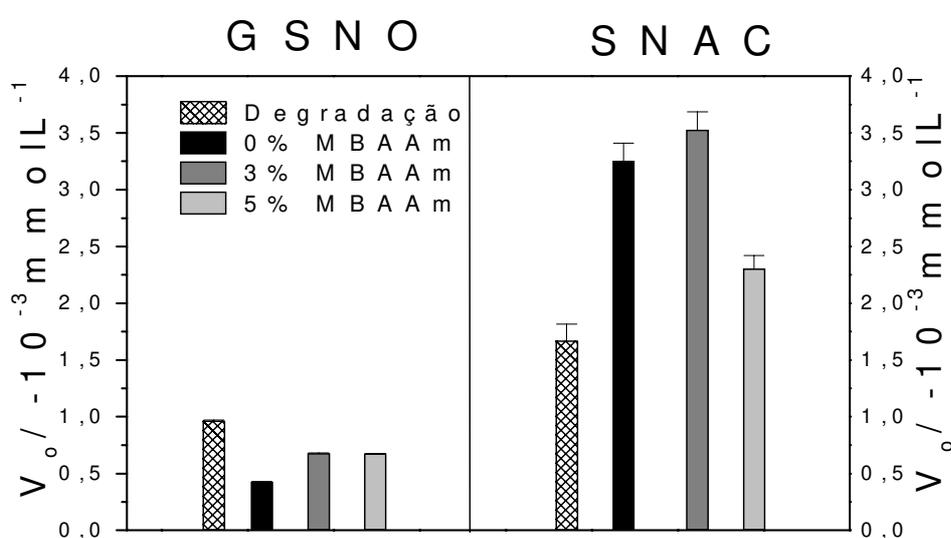


Figura 32. Velocidade inicial de Absorção de GSNO e SNAC pelos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizado sem reticulante e com reticulante (3 e 5% MBAAm), inicialmente secos por liofilização, a 25°C (acompanhamento em 545 nm).

Através da Figura 32 foi possível observar que as velocidades de absorção da SNAC são maiores que a velocidade de decomposição. Por outro lado a GSNO apresenta uma maior velocidade de degradação em relação às velocidades de absorção. Estes resultados reforçam a conclusão de que a velocidade de absorção da GSNO é menor que a da SNAC, pelo fato da GSNO possuir carga resultante negativa nas condições do experimento, enquanto nestas mesmas condições a carga resultante da SNAC é positiva, sendo mais rapidamente absorvida pela

matriz negativamente carregada do hidrogel. Observa-se também que a velocidade de decomposição da GSNO é menor que a da SNAC, o que está de acordo com resultados já publicados (de Oliveira, et al., 2002)

Referência:

de Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH. J. Phys. Chem. A 2002;106(38):8963-8970

4.4. Material Suplementar 9: Velocidades iniciais de liberação de RSNOs

Através das Figuras 33 (A e B) podemos observar que o incremento do grau de reticulação de 3 para 5% no copolímero IV favorece uma maior velocidade de liberação de GSNO e SNAC a 37°C em relação a 25°C. Também é possível observar que as velocidades iniciais de difusão da GSNO e da SNAC a partir dos hidrogéis nas duas temperaturas utilizando a cela de Franz são menores quando comparadas à difusão a partir da solução de PBS ou se comparadas com o método de imersão. A maior velocidade de liberação de SNAC a 37 °C a partir do copolímero sintetizado sem agente reticulante foi atribuída ao fato deste hidrogel sofrer maior colapso liberando praticamente toda a solução do seu interior, enquanto que os demais não colapsaram totalmente.

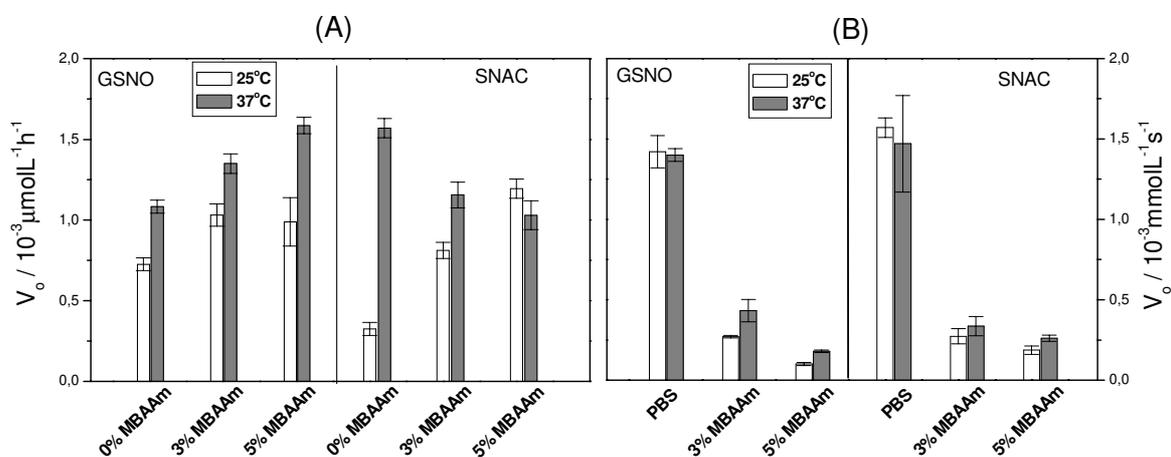


Figura 33. Velocidade inicial de liberação de RSNOs: (A) por imersão e (B) utilizando cela de Franz.

4.5. Material Suplementar 10: Aparência dos hidrogéis

A figura 34 mostra a aparência dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) reticulados com MBAAm (2%) secos e intumescidos em água (pH 6,4) e em solução de HCl (pH 3,5) e em PBS (pH 7,4). Observa-se claramente o efeito do pH no grau de intumescimento. O aumento do pH de 3,5 para 7,4 leva a um grande aumento no grau de intumescimento associado com a desprotonação dos grupos carboxilato. O menor grau de intumescimento observado em pH 7,4 (em relação ao pH 6,4) pode ser atribuído ao efeito de blindagem das cargas negativas dos grupos carboxilato do AAc, pelos eletrólitos da solução tampão de PBS.

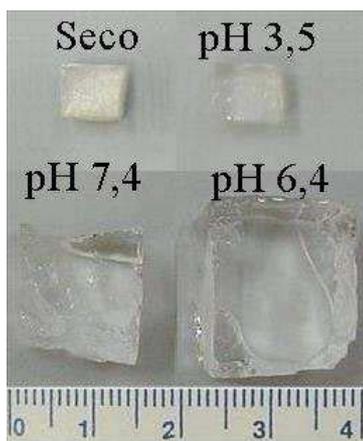


Figura 34. Aparência física dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados com 2% de MBAAm, seco, após o equilíbrio de intumescimento em solução de HCl, pH 3,5, solução tampão de PBS, pH 7,4 e em água desionizada, pH 6,4.

A figura 35 mostra a aparência dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) não reticulado (Figura 35 A) e reticulado com MBAAm (5%) (Figura 35 B), intumescidos em água e em solução de GSNO. Observa-se que os hidrogéis intumescidos em solução de GSNO adquirem coloração alaranjada/avermelhada

uniforme proveniente da GSNO e neste caso podemos dizer que a GSNO está uniformemente distribuída na matriz polimérica.

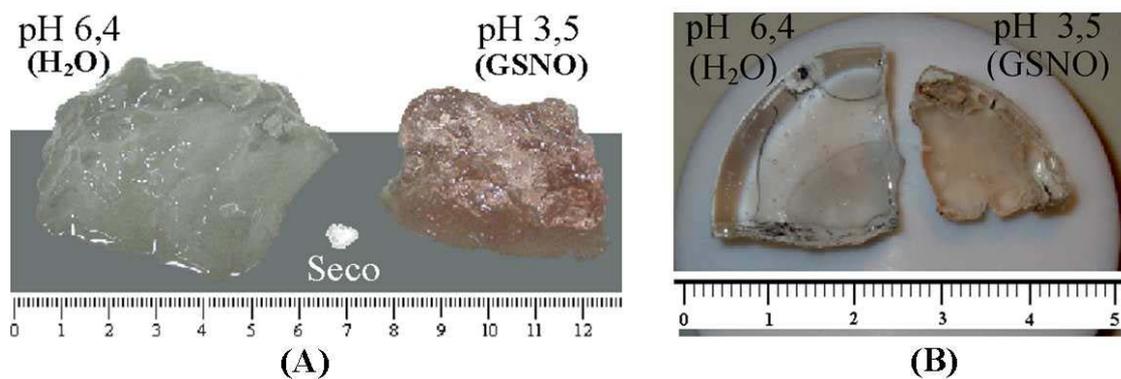


Figura 35. Aparência dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizado (A) sem agente reticulante e (B) com 5% de MBAAm intumescidos em solução de GSNO e PBS.

4.6

PROTEÇÃO POR HIDROGEL: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA REDUZIR INFLAMAÇÃO EM GASTROQUISE

*Frances Lilian Lanhellas Gonçalves¹, Regiane da Silva²,
Marcelo Ganzarolli de Oliveira², Lourenço Sbragia^{1*}*

¹Divisão de Cirurgia pediátrica, Departamento de Cirurgia-Faculdade de Ciências Médicas - ²Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, SP/Brasil

*Autor correspondente. Tel.: +55-19-3521-9588; Fax: +55-19-3521-9588.
E-mail address: sbragia@fcm.unicamp.br

Abstract

Gastrosquise (G) é um defeito congênito da parede abdominal de fetos que permite a herniação e exposição permanente das alças intestinais ao líquido amniótico (LA) e seus componentes durante a gestação. A exposição ao LA resulta em uma série de disfunções intestinais graves. Com o objetivo de reduzir o tempo de exposição ao LA em modelo animal usamos hidrogéis de poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico), P(NIPAAm-co-AAc), que possuem rápido intumescimento em LA para recobrir as alças intestinais expostas ao LA até o final da gestação. Para isto G foi induzida em fetos de ratas (Sprague-Dawley) através da evisceração parcial do intestino dos fetos por um pequeno orifício feito a direita da cicatriz umbilical no dia 18,5 de gestação. Os fetos foram separados em três grupos: gastrosquise (G), gastrosquise com as alças de intestino expostas recobertas com adesivo de fibrina -Beriplast[®] (G + A), gastrosquise com as alças de intestino expostas recobertas com adesivo de fibrina seguido de um pequeno pedaço de hidrogel seco (G +A +H), Fetos controle foram mantidos sem perturbação. No dia 21,5 de gestação os animais foram retirados por cesárea e então retirado com delicadeza o hidrogel. Foram realizadas análises morfométricas dos fetos e dos intestinos cujos resultados mostraram que o hidrogel é capaz de promover proteção do intestino exposto ao LA em gastrosquise enquanto que só a cobertura do intestino com o adesivo de fibrina não foi suficiente para reduzir o quadro inflamatório. O hidrogel demonstrou ser uma matriz capaz de reduzir o contato das proteínas contidas no LA ao intestino exposto reduzindo a inflamação em gastrosquise.

Palavras-chaves: Gastrosquise, Hidrogel

Introdução

Gastrosquise (G) é um defeito congênito da parede abdominal de fetos caracterizado pelo não fechamento completo da parede abdominal, resultando assim em um pequeno orifício, geralmente localizado à direita da cicatriz umbilical, que permite a herniação e exposição permanente das alças intestinais ao líquido amniótico (LA) e seus componentes, até o fim da gestação [Ambrose, 1972; Aoki, 1980]. O mecanismo que leva à G é ainda desconhecido, entretanto sabe-se que por volta da 10^a semana, período no qual deveria ocorrer o fechamento da parede do abdômen, as alças do intestino permanecem expostas ao LA por meio de uma fraqueza na parede abdominal, localizada à direita do umbigo, devido à falha da migração das células musculares provenientes de miótomos dorsais nesta região o que define embriologicamente a G [Gray, 1972].

Apesar da G não ser popularmente conhecida, não se pode dizer que as ocorrências são raras, uma vez que ela ocorre em 1:5.000 a 1:10.000 nascidos vivos [Kunz, 2005; Morrison, 1998; How, 2000]. Além disso, sabe-se que a G acomete mais meninos que meninas numa proporção aproximada de 2:1 [Saxena, 2002] e incide mais em fetos de mães com idade abaixo dos 20 anos, de baixa condição sócio-econômica, baixa escolaridade, com história obstétrica de abortos anteriores e com curto intervalo de tempo entre a menarca e primeira gravidez [Tibboel, 1986; Wilson, 2004]. Entretanto o mecanismo de formação do defeito congênito abdominal para-umbilical que resulta na G ainda ser de etiologia desconhecida [Saxena, 2002; Singh, 2003; Davis, 2005], alguns autores sugerem que a G possa ocorrer por alterações genéticas (grupos familiares com padrão de herança autossômica, de expressão variável), teratogênicas (radiação na fase de implantação), e fármacos como o ácido acetilsalicílico, a pseudoefedrina, o

acetaminofen e o tabagismo, estariam também envolvidas na sua etiologia [Wilson, 2004; Kunz, 2005]. Por outro lado o uso de fármacos ilícitas como matanfetamina, cocaína e maconha (*Cannabis sativa*), parece não ter risco significativo comprovado na fisiopatologia da G [Forrester, 2006].

A G pode ser diagnosticada ainda no período pré-natal por meio da ultrasonografia [Fitzsimmons, 1988; Langer, 1990], sendo que é possível visualizar as alças intestinais na cavidade amniótica por volta da 18^a semana [Vergunta, 2005]. Este diagnóstico ainda no período gestacional é de grande importância para se reduzir a taxa de mortalidade dos bebês após o nascimento. Isto porque se pode tentar prolongar o período gestacional que acaba sendo mais curto quando o feto apresenta G. As taxas de mortalidade variam de 4% a 22% [Stringer, 1991; DI Lorenzo, 1987; Fitzsimmons, 1988] e nos casos mais complexos a mortalidade chega a 28%, quando a G está associada à atresia intestinal e perfuração, e a quase 100% quando ocorre volvo [Wilson, 2004]. No Brasil a mortalidade da G pode chegar até a 52% pelas baixas condições de atendimento perinatal [Vilela, 2001], mas em geral, com o aprimoramento das unidades de terapia intensiva pediátrica e neonatal, a mortalidade vem diminuindo no mundo para taxas de 5% a 10% [Singh, 2003; Schlatter, 2003].

A exposição permanente das alças ao LA e seus componentes causa alterações da morfologia e da histologia da parede intestinal que levam a hipomotilidade intestinal e à deficiência na absorção dos nutrientes [Srinathan, 1995; Dilsiz, 1999; Santos, 2003]. A hipomotilidade e a deficiência absorptiva intestinal, por sua vez, obrigam a utilização de nutrição parenteral prolongada e eleva a possibilidade de ocorrer complicações pós-operatórias, o que aumenta a morbidade e o custo do tratamento médico-hospitalar [Morrison, 1998; Sydorak, 2002].

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova estratégia para reduzir a inflamação da G intra-útero. Com o intuito de reduzir a exposição das alças do intestino ao líquido amniótico, neste trabalho aplicou-se um material polimérico para recobrir as alças do intestino. Uma vez que o material a ser utilizado para recobrir as alças expostas do intestino deve não somente promover um contato suave sobre o intestino evitando assim formação de lesões, mas acima de tudo evitar o contato das proteínas contidas no LA com as alças intestinais o que conseqüentemente reduz a inflamação, neste trabalho utilizou-se hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) que quando intumescido constitui um material macio e devido a grande quantidade de água absorvida apresenta também biocompatibilidade.

Materiais e métodos

Materiais

P(NIPAAm-co-AAc) sintetizado a partir de: *N*-isopropilacrilamida, (NIPAAm) e Ácido acrílico, (AAc) (Acros organics) e N,N'-metileno-bisacrilamida (MBAAm) e persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), (Synth), N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED), (Plusone-Pharmacia Biotech), água desionizada e N_2 gasoso (Air Liquide).

Foram utilizados ainda, solução tampão fosfato (PBS) pH= 7,4, ácido acético, etanol e Glutaraldeído, Hematoxilina e Eosina (Sigma/Aldrich), poliacrilamida PhastGel IEF 3-9 (Amersham Biosciences[®]), TCA 20%, e Nitrato de prata, tetroxido de ósmio, cloreto de cálcio (Synth), Cetamina (Ketamina[®] - Pfizer do Brasil Ltda.) e Xylazina (Rompum[®] - Bayer do Brasil Ltda.) e adesivo cirúrgico de fibrina (Beriplast[®]).

Preparação de hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) para o recobrimento das alças intestinais

Hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) foram preparados de acordo com o procedimento relatado no artigo Polymer (48(14):4114-4122 (2007)). Foram utilizados discos de hidrogéis de ca. 1 x 1 cm de área, e ca. 5 mg de massa, recortados a partir de membranas de 10 x 15 cm e ca, 0,4 cm de espessura previamente purificadas e liofilizadas.

Determinação do grau de intumescimento (Q)

O grau de intumescimento do hidrogel em LA foi determinado através da imersão de uma massa conhecida do hidrogel seco (liofilizado) em LA até total imersão. Foram utilizados líquidos amnióticos dos dias 17,5, 18,5, 19,5, 20,5, e 21,5 de gestação. Q foi definido como a relação entre a massa do gel intumescido no equilíbrio à 25°C pela massa do gel seco [da Silva, 2007].

$$Q = m(\text{gel intumescido})/m(\text{gel seco}) \quad \text{Eq. (04)}$$

Determinação da carga líquida do LA através de Isoeletrofocalização (IEF)

Para a corrida foram utilizados o sistema PhastSystem e o gel homogêneo de poliacrilamida PhastGel IEF 3-9 que possui um gradiente de pH 3-9 formado por anfólitos estáveis carregados isoeletricamente. A IEF consiste de 3 passos: pré-focalização (formação do gradiente de pH), aplicação das amostras e focalização. As amostras foram aplicadas no meio do gel, uma vez que se desconheciam as

proteínas existentes na amostra e, portanto elas poderiam correr para o pólo negativo ou positivo do aparelho de eletroforese.

Foi aplicado no primeiro e último poços o kit de calibração de pI (pI de 2,80 a 10,25) e nos outros seguintes foram aplicados 20 µL de LA, sendo as amostras nas idades de gestação: 17,5 dias, 18,5 dias, 19,5 dias, 20,5 dias e 21,5 dias, respectivamente.

A corrida foi realizada a 15 °C, 2,5 mA e por aproximadamente 30 minutos. As proteínas migram condições previamente programadas e sem a necessidade de tampão até o pH correspondente ao seu pI e precipitam. O gel foi revelado por nitrato de prata, seguindo os passos na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Etapas seguidas para revelação do gel de IEF por nitrato de prata

Etapa	Solução	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	TCA 20%	0,5	20
2	Etanol 50% + Ácido acético 10%	2	50
3	Etanol 10% + Ácido acético 5%	2	50
4	Etanol 10% + Ácido acético 5%	4	50
5	Glutaraldeído 8,3%	6	50
6	Etanol 10% + Ácido acético 5%	3	50
7	Etanol 10% + Ácido acético 5%	0,5	50
8	Água Milli-Q	2	50
9	Água Milli-Q	2	50
10	Nitrato de prata 0,5%	10	40
11	Água Milli-Q	0,5	30
12	Água Milli-Q	0,5	30
13	Revelador	0,5	30
14	Revelador	4	30
15	Ácido acético 5%	5	50

Efeito do recobrimento das alças herniadas do intestino pelo hidrogel

O procedimento in vivo teve seu projeto de pesquisa aprovado no comitê de ética experimental em animal da UNICAMP (projeto nº 1452-1). Foram utilizadas ratas (*Sprague-Dowley*) pesando entre 250g-300g as quais foram postas para acasalar e atribuído como dia zero de gestação o dia na qual a fêmea é inseminada. O período total de gestação é de 22 dias, durante os quais as ratas recebem comida e água abundante e são mantidas em ambientes com ciclos de 12 h escuro (noite)/claro (dia).

Procedimento cirúrgico

O modelo de gastrosquises utilizado foi baseado em Correia-Pinto *et al.*, 2001. Primeiramente as ratas foram anestesiadas no dia 18,5 de gestação utilizado Cetamina 50mg/ml (175 mg/kg) associada com Xylazina 10mg/ml (2.5 mg/kg). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado utilizando um microscópio ótico com aumento de 2,5 vezes.

Foram utilizadas para todo o experimento dez fêmeas de rato (*Sprague-Dowley*) sendo com isto um total de 63 fetos utilizados neste estudo. Destes fetos morreram um total de 15, restando então 48 fetos vivos. Os fetos vivos foram divididos em quatro grupos de 12 fetos cada, conforme segue:

- fetos controle (Grupo C)
- fetos submetidos a Gastrosquise (Grupo G)
- fetos submetidos a Gastrosquise possuindo a alça do intestino recoberta com adesivo cirúrgico de fibrina (Beriplast®) (Grupo G +A)
- fetos submetidos a Gastrosquise possuindo a alça do intestino recoberta com adesivo cirúrgico de fibrina (Beriplast®) mais hidrogel (Grupo G +A+H)

O grupo controle é composto de fetos não submetidos a procedimento cirúrgico antes do nascimento.

Durante a cirurgia os fetos das extremidades foram excluídos devido à diferença de tamanho e a mesma foi realizada nos dois cornos uterinos da rata prenha. Os fetos utilizados foram parcialmente expostos (pernas e abdômen, conforme Figura 36(A)) e então realizado uma pequena incisão no lado direito do abdômen dos fetos para simular a G (Fig.. 36 (B)), ou seja, expor parte das alças do intestino (Fig. 36 (C)) ao LA. Em seguida os fetos foram retornados para dentro do útero da mãe para dar seqüência a gestação até o dia 21,5 de gestação.

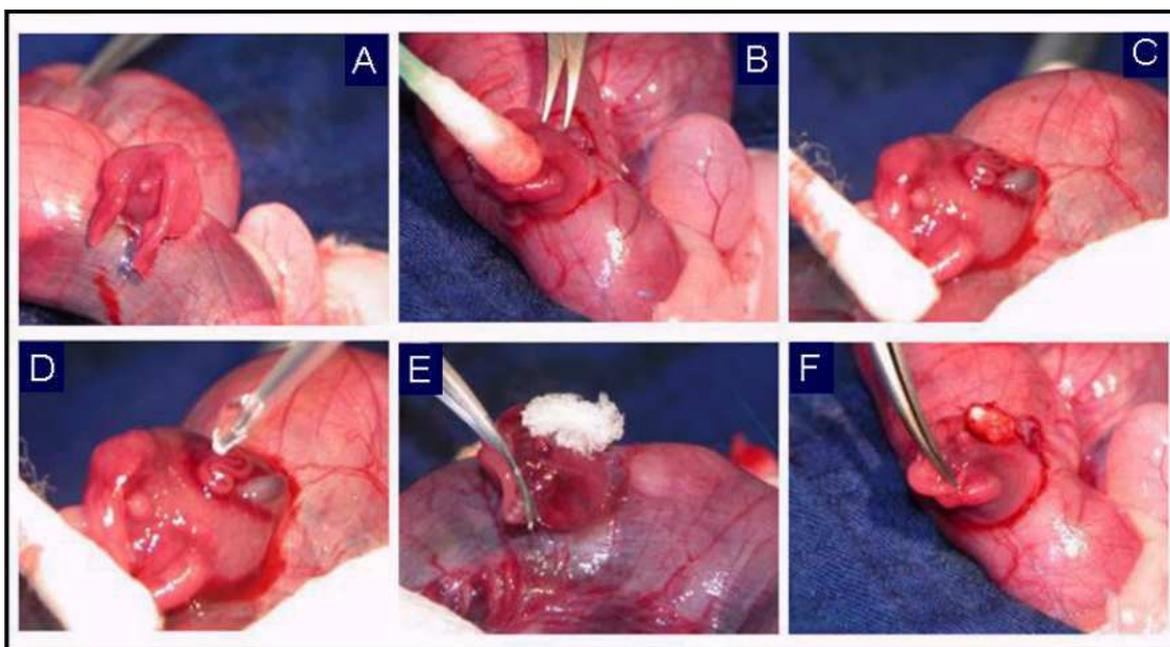


Figura 36. Procedimento cirúrgico. (A) Exposição do feto, (B) incisão a direita do umbigo, (C) exposição de parte do intestino, (D) aplicação do adesivo de fibrina, (E) aplicação do hidrogel e (F) adesão e intumescimento do hidrogel.

Os discos de hidrogéis foram aderidos às alças do intestino através do uso de um adesivo cirúrgico baseado na polimerização do fibrinogênio em fibrina.

Inicialmente, aplicou-se 15 μ L de solução de CaCl₂ e trombina sobre a alça intestinal a ser recoberta (Fig. 1D). Simultaneamente aplicou-se 15 μ L de solução de fibrinogênio e aprotinina sobre o disco de hidrogel a ser aderido à alça. O disco de hidrogel foi imediatamente aplicado sobre a alça que recebeu a solução de CaCl₂ (Fig. 1E) e mantido na área de aplicação por aproximadamente 1 min para permitir a reação de polimerização da fibrina e o intumescimento parcial do hidrogel (Fig. 1F). Em seguida o feto com a alça exposta e recoberta foi novamente inserido no útero e suturou-se a parede do útero e a parede abdominal da rata.

Aos 21,5 dias de gestação foi realizada a cesárea para retirada dos fetos. No caso dos fetos tratados com hidrogel, o mesmo foi retirado com o auxílio de um bastonete de algodão embebido em soro fisiológico à temperatura ambiente.

Análise morfométrica

Para a análise morfométrica foram pesados os fetos e os intestinos separadamente assim como também a massa do hidrogel. Os intestinos foram fixados para posteriormente serem analisados através de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para a fixação primeiramente os intestinos e hidrogéis coletados foram tratados com PBS (0,1, pH7,4) por 24h, realizando trocas de solução a cada 30min nas primeiras 12h. Em seguida foram imersos em tetroxido de ósmio por 1h a temperatura ambiente e então novamente lavados com PBS por 30min. Em seqüência do procedimento os materiais foram desidratados, ou seja, secos utilizando secagem a ponto crítico de etanol. Após terem sido secas as amostras foram metalizadas com ouro para a análise por MEV no microscópio JEOL JSM 5800 LV.

Outra parte dos intestinos dos quatro grupos foi fixada em formaldeído (10%) e incluídas em parafina para serem analisadas por microscopia óptica. Os blocos histológicos foram cortados em secções transversais do intestino de 5 μ m de espessura. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina/Eosina para fornecer contraste óptico as amostras as quais foram fotografadas utilizando-se um fotomicroscópio (Nikon Eclipse E800, Tóquio, Japão) com aumentos de aproximadamente 100 e 200 vezes para o diâmetro e camadas do intestino, respectivamente. Após as imagens terem sido digitalizadas elas foram analisadas através do programa Image Pro Plus (Epix, Buffalo Grove, IL, USA) para a obtenção das medidas das secções transversais dos intestinos.

Todos os dados obtidos foram analisados através dos métodos ANOVA e Tukey-Kramer, sendo adotado o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) para o teste estatístico.

Resultados e discussão

Devido a presença de grupamentos ácidos os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) apresentam alto grau de intumescimento. Uma vez que os grupos AAc possuem pKa igual a 4,25 os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) apresentam maior grau de intumescimento quando intumescidos em pHs maiores que o pKa do AAc [da Silva R, 2007] devido a repulsão de carga entre os grupos carboxilatos. Neste trabalho foi verificado o grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em LA (pH= 9,0) para os diferentes dias de gestação dos fetos de ratos. Verificou-se que o grau de intumescimento do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) é praticamente constante, em torno de 34 vezes a massa seca, durante todo o período gestacional estudado (Fig. 37).

O valor do grau de intumescimento do hidrogel no LA é de fundamental importância para determinar o espaço ocupado pelo hidrogel junto com o feto dentro do útero da mãe, isto porque se o gel intumescer muito pode se desprender da alça do intestino ou ainda impedir os movimentos do feto. Através do valor de Q obtido pôde-se calcular a massa que o hidrogel adquiriu dentro do útero como sendo igual à aproximadamente 170 mg uma vez que a massa do hidrogel seco utilizado foi de aproximadamente 5mg. Podemos ressaltar através do resultado obtido que o grau de intumescimento obtido foi suficiente para conferir um recobrimento suave (macio) às alças do intestino sem se desprender ou impedir os movimentos do feto que no final da gestação pesa aproximadamente 4,5g, ou seja, aproximadamente 23 vezes mais que o hidrogel intumescido.

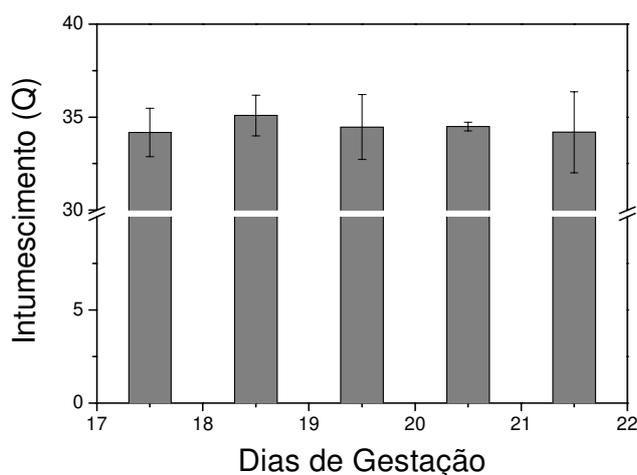


Figura 37. Grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em LA de diferentes dias gestacionais.

Verificou-se ainda, através de IEF que o LA é composto basicamente de proteínas com carga líquida negativa. Este tipo de eletroforese de alta resolução foi realizada com o intuito de descobrir a carga da maioria das proteínas existentes no LA, que constituem mais da metade dos constituintes orgânicos

(variando de 0,90 a 1,55 mg/mL no LA das ratas prenhas) presentes no LA, sendo os outros constituintes carboidratos, gorduras, enzimas, hormônios, mecônio e urina. Na IEF as proteínas são separadas por um gradiente de pH até alcançarem a posição estacionária onde a carga final é zero, ou seja, no seu ponto isoelétrico (pI).

Através da Figura 38 podemos ver que após a corrida as amostras, inicialmente aplicadas no centro do gel de IEF, correram quase na sua totalidade para o pólo positivo, sendo, portanto de carga negativa. Podemos observar ainda que apenas uma pequena quantidade das proteínas são de carga positiva. A faixa de pI predominante das proteínas presentes no LA é de 3,50 a 7,35, demonstrando que no pH 8,5 do LA a maioria das proteínas presentes possuem carga negativa, sendo repelidas pelo hidrogel cuja carga é a mesma. O hidrogel pode absorver outros compostos e água, porém as proteínas ficam retidas fora do gel, não entrando em contato com o intestino fetal e neste caso o hidrogel constitui uma excelente matriz para recobrir as alças do intestino, pois além de conferir um recobrimento macio que não cause lesão ao órgão ele atua como uma barreira física que impede o contato direto das proteínas inflamatórias e do mecônio contidos no LA e o intestino.

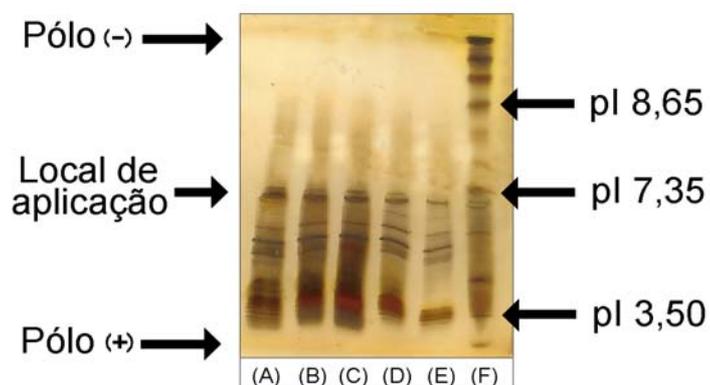


Figura 38. Corrida de IEF. Líquido amniótico dos dias (A) 17,5, (B) 18,5, (C) 19,5, (D) 20,5 e (D) 21,5 e (F) padrão de ponto isoelétrico, PI.

Ao realizar a cesárea observamos que os fetos controles estavam bem, ao contrário dos fetos com G que apresentaram intestino herniado, inflamado e edemaciado. Ao verificar os animais com aplicação do adesivo apenas, notamos que o órgão exposto continuou inflamado ao passo que aqueles com hidrogel apresentaram inflamação e edema menos intenso comprovando que a proteção do biomaterial foi eficaz.

É importante ressaltar que o hidrogel não adere por si só as alças do intestino sendo necessário o uso de um adesivo cirúrgico. O adesivo de fibrina utilizado da marca Beriplast® P é um composto obtido de plasma humano, a base de fibrina, usado em procedimentos cirúrgicos que constitui um sistema de formação de selante de fibrina que simula a fase final do processo de coagulação sanguínea, possibilitando adesão de tecidos, suporte para sutura, hemostasia local e selagem de cavidades corporais e espaços subaracnóideos. Resultados clínicos mostraram que o selante de fibrina tem tido bom desempenho em procedimentos como cirurgia gastrointestinal, hepática, pancreática e biliar. Em nosso experimento, ele teve como única função colar o hidrogel a parede intestinal mantendo um contato íntimo com o órgão, porém não serviu como proteção contra o LA, sendo absorvido pelo organismo. Além disso, o adesivo permitiu a fácil remoção do hidrogel da parede do intestino sem causar dano a mesma conforme podemos observar através da Figura 39.

Podemos observar através das micrografias (Fig. 39) da junção entre os biomateriais (adesivo e hidrogel) e intestino que não houve danos à parede do intestino e à vilosidade mesmo após a retirada do hidrogel, o qual também teve a sua morfologia inalterada. Podemos observar através da figura 39 que o hidrogel aderiu ao intestino através do adesivo de fibrina (Fig. 39 (B)) e completamente recobriu as alças expostas (Fig. 39(A)) sem sofrer rompimento (Fig. 39 (C)) de sua estrutura. Podemos ver ainda que após a retirada do hidrogel a morfologia da

parede do intestino (Fig. 39 (F)) e a vilosidade são preservadas (Fig. 39 (D)). Além disso, podemos verificar o hidrogel também tem sua morfologia preservada (Figura 4E) onde podemos ver a superfície do mesmo que ficou em contato com o intestino.

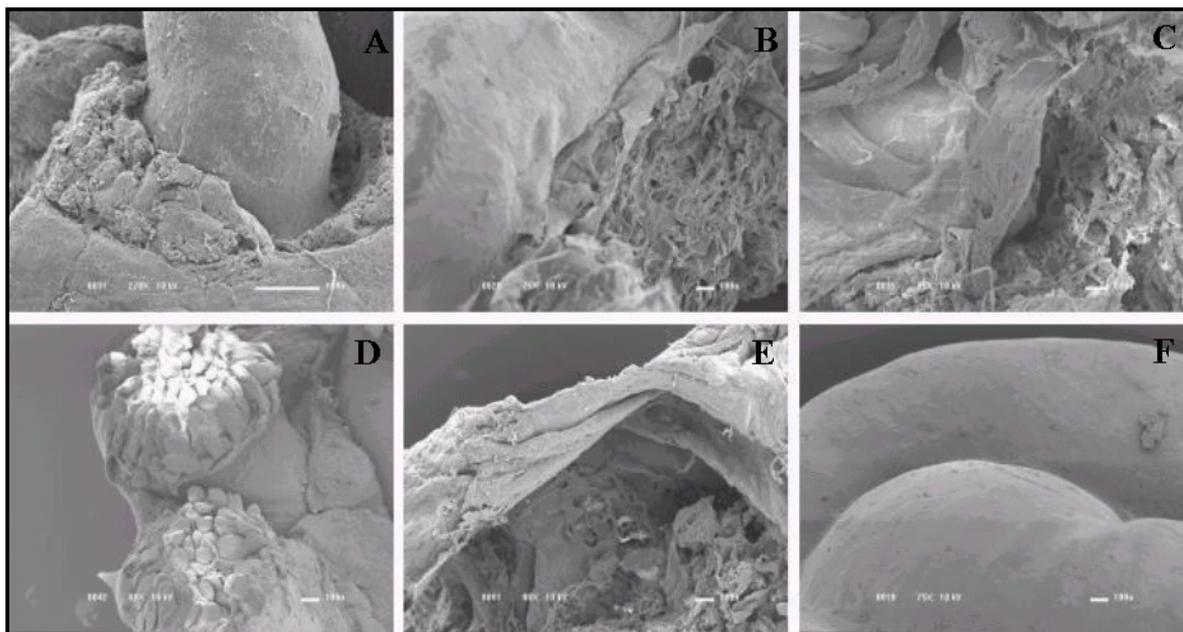
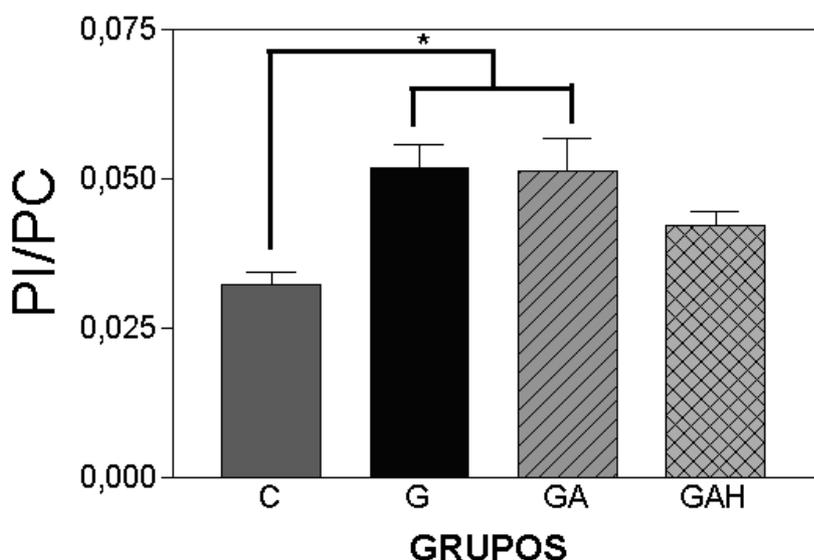


Figura 39. Microscopia eletrônica de varredura das alças do intestino (A e F), vilosidade (D) e do hidrogel com o adesivo de fibrina (B, C e D).

A Comparação do peso do intestino versus peso do corpo dos fetos de rato mostrou claramente que houve redução da inflamação em G (Fig. 40). Podemos ver através da Figura 5 que não existe diferença significativa entre os grupos C e G+A+H ($p>0,05$), ao passo que os grupos G e G+A apresentam diferença significativa com relação aos primeiros ($p<0,05$), demonstrando a proteção do biomaterial na alça intestinal. Foi observado que a relação peso intestinal x peso corporal, no qual o órgão inflamado na G é mais curto e mais pesado do que o controle, pois a constrição do intestino pela parede abdominal causa ao órgão

dilatação e espessamento da mucosa, enquanto que o líquido amniótico causa a formação de uma camada fibrosa na superfície, edema da camada serosa e espessamento. Ambos os efeitos são independentes.



* $p < 0.05$ - diferença significativa

Figura 40. Comparação da razão peso do intestino/peso corporal (PI/PC) entre os grupos C (controle), G (gastrosquises), GA (gastrosquises mais adesivo) e GAH (gastrosquises mais adesivo mais hidrogel).

Os resultados obtidos através da medida dos diâmetros intestinais também comprovaram a proteção que o hidrogel é capaz de promover quando há G, conforme podemos observar através da Figura 41. Podemos verificar claramente que o diâmetro intestinal quando comparado entre os grupos mostrou diferença entre C e G, ao passo que o grupo tratado com o hidrogel não apresentou diferença em relação ao C (Fig. 41).

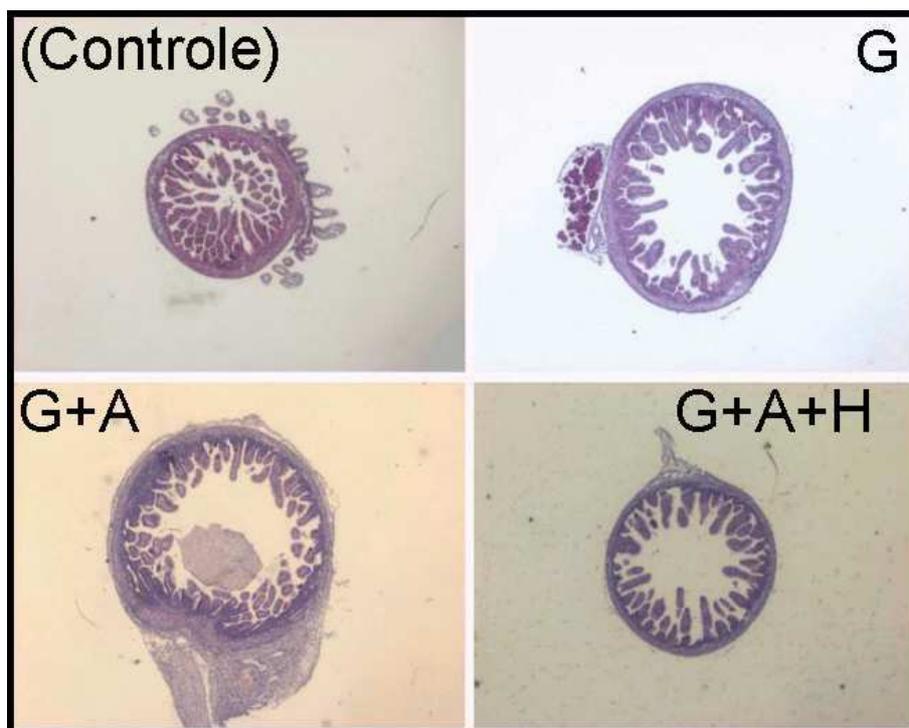


Figura 41. Microscopia óptica da secção transversal do intestino dos fetos para os grupos controle, G (gastrosquises), G+A (gastrosquises mais adesivo) e G+A+H (gastrosquises mais adesivo mais hidrogel).

A comparação entre a espessura da parede intestinal também pôde demonstrar que o tratamento da G com hidrogel leva a redução da inflamação, ou seja, a espessura da parede intestinal é praticamente a mesma tanto para o feto controle quanto para o submetido ao tratamento com hidrogel (Fig. 41). Podemos verificar que não existe diferença significativa entre os grupos submetidos a G e G+A. Por outro lado estes grupos mostraram diferença significativa com o controle ($p < 0,01$), e neste caso podemos dizer que só o recobrimento do intestino com o adesivo não é suficiente para redução da inflamação. Entretanto foi possível verificar que o grupo tratado com hidrogel apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos G e G+A, mas não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo C ($p > 0,05$).

Conclusões

O hidrogel P(NIPAAm-co-AAc) mostrou ainda que pode ser utilizado como matriz para a redução de inflamação em G uma vez que retirado de cima do órgão após a cirurgia apresenta aspecto gelatinoso, sendo de fácil remoção a temperatura ambiente. Com relação à sua proteção ele é um biomaterial que protege a alça intestinal do contato com o LA e com o mecônio, não sendo possível à inflamação e o encurtamento do órgão, seu aumento de peso, de diâmetro e da espessura da parede intestinal.

Agradecimentos

RS agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto 04/11204-4, pelo suporte financeiro. FG agradece à Capes pelo suporte financeiro. RS e FG agradecem ao mestre Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin e a professora Sônia Maria Alves Bueno da Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP pela colaboração na análise de IEF.

Referencias

- Aoki Y, Ohshio T, Komi N. J Pediatr Surg. 1980;15:252-256.
- Bealer JF, Graf J, Brush SW, Adzick NS, Harrison MR. J Pediatr Surg. 1996;31(8): 1043-1048.
- Bittencourt DG, Barreto MW, França WM, Gonçalves A, Pereira LA, Sbragia L. J Pediatr Surg. 2006; 41(3):547-553
- Correia-Pinto J, Tavares ML, Baptista MJ, Estevao-Costa J, Flake AW, Leite-Moreira AF. J Pediatr Surg. 2001;36(1):213-216.
- da Silva, R, de Oliveira MG. Polymer 2007;48:4114-4122

- Davis MW, Avis MW, Kimble RM, Cartwright DW. *J Pediatr Surg.* 2005;40: 523-527.
- Dilsiz A, Gündogan AH, Aktan M, Duman S, Aktung, T. *J Pediatr Surg.* 1999;34(8): 1248-1252.
- Dilorenzo, C, Hyman, PE. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996;25(1): 203-224.
- Fasching G, Haeusler M, Mayr J, Schimpl G, Haas J, Puerstner P. *J Pediatr Surg.* 2005;40(12):1887-1891.
- Fitzsimmons J, Nyberg DA, Cyr DR, Hastch E. *Obstet Gynecol.* 1988;71(6 pt 1): 910-913.
- Forrester MB, Merz RD. *J Toxicol Environ Health.* 2006;69(13): 1253-1259.
- How HY, Harris BJ, Pietrantonio M, Evans JC, Dutton S, Koury J, Siddiqi, TA. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(6): 1527-1534.
- Kanmaz T, Yagmurlu A, Aktug T, Gökçora, H. *J Pediatr Surg.* 2001;36(9): 1341-1345.
- Kunz LH, Gilbert WM, Towner DR. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193: 1248-1252.
- Langer JC, Longaker MT, Crombleholme TM. *J Pediatr Surg.* 1989;24:992-997.
- Nichol PF, Hayman A, Pryde PG, Go LL, Lund DP. *Pediatr Surg Int.* 2004;20(3):211-214.
- Morrison JJ, Klein N, Chitty LS, Kocjan G, Walshe D, Goulding M, Geary MP. *Br J Obstet Gynecol.* 1998;105: 1200-1204.
- Santos MM, Tannuri U, Maksoud JG. *J Pediatr Surg.* 2003;38(10): 1506-1511.
- Saxena AK, Hülskamp G, Schleef J, Schaaschmidt K, Harms E, Willital GH. *Pediatric Surg Int.* 2002;18: 420-424.
- Schalatter M, Norris K, Uitvlugt N, Decou J, Connors R. *J Pediatr Surg.* 2003;38(3): 459-64.
- Singh SJ, Fraser A, Leditschke JF, Spence K, Kimble R, Dalby-Payne J. *Pediatric Surg Int.* 2003;19: 260-265.
- Srinathan SK, Langer JC, Blennerhassett MG, Harrison MR, Pelletier GJ, Lagunoff D. *J Pediatr Surg.* 1995;30:379-383.

- Stringer MD, Brerenton RJ, Wright VM. Arch Dis Child. 1991;66(1): 34-36.
- Sydorak RM, Sbragia L, Nijagal A, Phibbs RH, Harrison MR, Albanese CT. J Pediatr Surg. 2002;37(12):1669-1672.
- Tibboel D, Vermey-Keers C, Kluck P, Gaillard JL, Koppenberg J, Molenaar JC. Teratology 1986;33:267-272.
- Vergunta RK, Wallace LJ, Leonardi MR, Gross TL, Renfroe Y. J Pediatr Surg. 2005;40: 528-534.
- Vilela PC, Ramos DE, Amorim MM, Falbo GH, Santos LC. J Pediatr Surg. 2001;36:559-564.
- Wilson D, Johnson MP. Fetal Diag Ther. 2004;19(5): 385-398.

5. Conclusões Gerais

Hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) são altamente hidrofílicos possuindo alto grau de intumescimento o qual é diretamente dependente do teor de reticulação. Estes podem ser obtidos em diferentes morfologias dependendo do teor de reticulação, sendo que quando reticulados com 3% de agente reticulante eles apresentam uma morfologia esponjosa e quando reticulados com mais de 5% sua estrutura passa a ser formada por poros tubulares. Além disso, foi verificado que a difusão de soluto através do hidrogel com morfologia tubular é dependente da orientação dos tubos em relação ao fluxo da solução, sendo que quando os poros estão orientados paralelamente ao fluxo a difusão de soluto é aumentada em relação aos poros estão orientados perpendicularmente ao fluxo.

Hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) sintetizados com 5% de agente reticulante com o molde posicionado na posição horizontal apresenta uma membrana interna perpendicular ao eixo dos tubos. Foi observado que o vidro atua como um catalisador da reação que se processa mais rapidamente a partir da superfície do vidro mantida em maior temperatura e neste caso a membrana interna pode mudar de posição se aproximando da placa mantida a temperatura mais baixa.

Foi observado que o incremento do grau de reticulação bem como a presença de PVA leva a formação de redes mais densas e mais resistentes à deformação. Entretanto a técnica de formar uma rede interpenetrada de PVA por congelamento/descongelamento não é adequada para hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) uma vez que estes sofrem rompimento de sua rede durante o processo de síntese. Além disso, foi observado que a redução do teor de água utilizado durante a síntese é fator determinante para a obtenção de redes com melhores propriedades mecânicas.

Foi observado ainda que a SNAC e a GSNO são preferencialmente particionadas para os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) após o equilíbrio de intumescimento em soluções de RSNOs. A maior absorção da SNAC em relação a GSNO foi atribuída a interações eletrostáticas atrativas entre a SNAC (positivamente carregada) e a matriz polimérica (negativamente carregada). A difusão dos RSNOs utilizando cela de Franz foi menor a partir dos hidrogéis em relação a difusão a partir de solução aquosa (PBS). A razão de liberação de ambos os RSNOs a partir dos hidrogéis foi dependente da temperatura apresentando aumento significativo com o incremento da temperatura de 25 para 37°C especialmente para os hidrogéis mais reticulados. Os resultados mostraram ainda que os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) contendo RSNOs podem controlar a difusão dos mesmos em aplicações tópicas ou transdérmicas através da escolha do RSNO apropriado e do controle da temperatura e do grau de reticulação. Além disso, os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) contendo RSNOs podem ser utilizados para promover vasodilatação na pele tendo potencial como um material para tratamento de lesões isquêmicas.

O hidrogel P(NIPAAm-co-AAc) mostrou ainda que pode ser utilizado como matriz para a redução de inflamação em gastrosquises uma vez que retirado de cima do órgão após a cirurgia apresenta aspecto gelatinoso, sendo de fácil remoção a temperatura ambiente. Com relação à sua proteção ele é um biomaterial que protege a alça intestinal do contato com o LA e com o mecônio, não sendo possível à inflamação e o encurtamento do órgão, seu aumento de peso, de diâmetro e da espessura da parede intestinal.