

ENTRECruzAMIENTO DE UN ALMIDÓN COMERCIAL UTILIZANDO EPICLORHIDRINA Y TRIMETAFOSFATO DE SODIO

Juan Sabatier C.*

Facultad de Química e Ingeniería Química. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Se estudió el entrecruzamiento de un almidón comercial con epiclorhidrina y trimetafosfato de sodio, siguiendo las reacciones por mediciones de la viscosidad. Los productos fueron caracterizados por métodos espectroscópicos, microscopía electrónica y determinaciones del hinchamiento en distintos fluidos. La dosis de epiclorhidrina ejerce una influencia significativa sobre los resultados del entrecruzamiento, mientras que el NaOH cataliza la reacción con el trimetafosfato de sodio y este produce hidrogeles de mayor hinchamiento.

Palabras claves: Almidón, entrecruzamiento, epiclorhidrina, trimetafosfato de sodio, liberación controlada.

ABSTRACT

Crosslinking of a commercial starch with epichlorohydrin and sodium trimetaphosphate was studied. These reactions were monitored by viscosity measurements, while products were characterized by spectroscopic methods, electron microscopy and determining the swelling on several fluids. Epichlorohydrin dose has a significant influence on the results of crosslinking, meanwhile sodium hydroxide catalyzes the reaction with sodium trimetaphosphate and this crosslinking reagent produces higher-swelling hydrogels.

Keywords: Starch, crosslinking, epichlorohydrin, sodium trimetaphosphate, controlled release.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los sistemas de liberación controlada ha ido aparejado con las aplicaciones médicas y farmacéuticas de los polímeros^[1-2]. Un sistema polimérico muy utilizado han sido los llamados «hidrogeles», retículos poliméricos, que absorben y retienen grandes cantidades de agua al hidratarse sus grupos funcionales hidrofílicos^[3] por lo que se requiere un cierto nivel de entrecruzamien-

to para evitar la disolución de las cadenas poliméricas hidrofílicas.

Los polímeros biodegradables son preferidos para estos sistemas^[1,4] ya que disminuyen los riesgos de acumulación del polímero en el entorno biológico. Los polímeros naturales se destacan como una alternativa atractiva no solo por ser usualmente biodegradables sino también por su disponibilidad, bajos costos y posibilidad de ser modificados^[1,4].

* E-mail: jsabac@yahoo.com

Los polisacáridos son opciones ventajosas por ser usualmente no tóxicos e inertes desde el punto de vista farmacológico^[1]. El almidón es uno de los polisacáridos más utilizados para estos fines^[5-6], debido a su elevado volumen de producción industrial con alta pureza y bajo costo, lo que motiva que tenga diversas aplicaciones en las industrias de los alimentos, cosméticos, papel, farmacéutica y otras^[7].

Distintos reactivos han sido utilizados para el entrecruzamiento del almidón, tales como el trimetafosfato de sodio o STMP^[8-10], la epíclorhidrina o ECH^[11-13] y otros^[7]. Incrementos del grado de entrecruzamiento por encima de cierto valor provocan una disminución del hinchamiento y afectan la liberación controlada^[13], por lo que el entrecruzamiento debe ser regulado para lograr resistencia a la disolución y adecuadas propiedades mecánicas del gel sin afectar sus propiedades.

Este trabajo compila los resultados obtenidos por el autor en el entrecruzamiento de un almidón comercial con ECH^[14] y STMP. El entrecruzamiento con ECH fue estudiado durante una estancia como Investigador Visitante en el Instituto de Macromoléculas (IMA) de la Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), mientras que la utilización del STMP fue investigada en trabajos posteriores desarrollados en el Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana.

En el IMA/UFRJ anteriormente se habían realizado estudios sobre el entrecruzamiento del almidón con ECH para la obtención de materiales termoplásticos^[15-16] mientras que el trabajo aquí discutido ha sido realizado con vistas a la obtención de una matriz polimérica, adecuada para la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos, mediante el entrecruzamiento de un almidón comercial con ECH o STMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado con almidón de maíz producido por la fábrica ubicada en la provincia de Cienfuegos, Cuba. Este almidón natural presentó 13% de humedad, 0.15% de cenizas, 0.55% de proteínas y 0.50% de ceras. El mismo fue también caracterizado

por microscopía electrónica de barrido (SEM), así como Espectroscopía IR y RMN ¹³C. Los entrecruzamientos con ECH y STMP fueron estudiados por separado y, en este trabajo, se compilan y comparan los resultados obtenidos.

El tiempo de gelatinización, por la acción del medio alcalino, se determinó a 25-27 °C bajo agitación constante en una solución 1M de hidróxido de sodio (NaOH), para una relación NaOH/almidón de 1:1 p/p. Se determinó la viscosidad dinámica del sistema reaccionante a (25,0 ± 0,1) °C cada 15 minutos, para monitorear el curso de la gelatinización (igual que para el entrecruzamiento) utilizando un viscosímetro Brookfield Synchro-lectric Modelo LVT a diferentes velocidades de cizallamiento.

El tiempo de gelatinización fue determinado por el máximo de la curva de viscosidad versus tiempo, mientras que se consideró finalizado el entrecruzamiento cuando se obtuvieron valores constantes de viscosidad durante 4-5 lecturas.

Las variables independientes consideradas para el entrecruzamiento con ECH y sus niveles de estudio se muestran en la tabla N.º 1.

Tabla N.º 1. Variables independientes y sus niveles para el estudio del entrecruzamiento con ECH.

| Variable | Nivel | | |
|--------------------------------------|-------|-------|------|
| | Bajo | Medio | Alto |
| Dosis de ECH, % sobre almidón p/p | 10 | 15 | 20 |
| Relación molar NH ₃ / ECH | 0 | 0,5 | 1 |
| Tiempo para adición de ECH, min. | 30 | 60 | 90 |

La dosis de ECH fue variada de acuerdo a trabajos previos de la literatura^[17-18]. Por otro lado, se investigó el posible efecto –sobre el entrecruzamiento– de iones amonio cuaternario^[12, 15-16], adicionando dosis variables de NH₃, aunque fue contemplada también su no utilización. El tiempo para la adición de la ECH se varió con vistas a entrecruzar almidones total y parcialmente gelatinizados.

Las variables independientes consideradas para el entrecruzamiento con STMP y sus niveles de estudio se muestran en la tabla N.º 2.

Tabla N.º 2. Variables independientes y sus niveles para el estudio del entrecruzamiento con STMP.

| Variable | Nivel | | |
|---|-------|-------|------|
| | Bajo | Medio | Alto |
| Dosis NaOH, g/g almidón | 0,5 | 0,75 | 1,0 |
| Dosis STMP* | 1,0 | 2,5 | 4,0 |
| Dosis Na ₂ SO ₄ * | 0 | 2 | 4 |

* % respecto al almidón en base seca (b.s.).

Las dosis de NaOH y Na₂SO₄ fueron variadas según los resultados del entrecruzamiento con ECH y lo reportado por Kulicke y col.^[19], donde indican la acción catalítica de los iones sodio y su efecto sobre las propiedades del hidrogel. La dosis de STMP se varió según trabajos de diversos autores^[8-10, 19].

El entrecruzamiento con ECH se realizó adicionando este reactivo al almidón gelatinizado, al tiempo previsto en el diseño experimental. El amoníaco (NH₃) se adicionó, en los casos en que esto se hizo, justo antes de la adición de la ECH. Al finalizar el entrecruzamiento, se neutralizó a pH 7 y se precipitó el almidón entrecruzado sobre etanol. Un pH metro digital (Modelo Q400A, Quimis Aparelho, Brasil), previamente estandarizado, fue usado para las mediciones de pH. El producto fue filtrado y lavado con mezcla etanol-agua 1:1 y posteriormente con etanol. Finalmente, fue secado a 50°C por 16 horas.

El entrecruzamiento con STMP fue realizado de idéntica forma a la anterior, excepto que se efectuó para un tiempo de gelatinización fijo de 90 min y la adición de Na₂SO₄ sustituyó al NH₃. Los reactivos, empleados en el trabajo, fueron todos de calidad analítica suministrados por diversos fabricantes.

Atendiendo a las dificultades para estimar el grado de entrecruzamiento, según plantean diferentes autores^[7-10, 18], se intentó evaluar el mismo –en el caso de la ECH– por la intensi-

dad relativa de la señal IR de 2925-2932 cm⁻¹ (grupos CH₂) referida a la banda de vibración 2a de las α-D-glucopiranosas (850-865 cm⁻¹), siguiendo una metodología similar a la planteada para evaluar el grado de entrecruzamiento de muestras de celulosa con ECH⁽²⁰⁻²²⁾. También se intentó evaluar los grupos CH₂ mediante espectroscopia RMN ¹³C.

Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrómetro FTIR Perkin Elmer 1720X con resolución de 2 cm⁻¹, aplicando 20 acumulaciones a tabletas de KBr con una concentración de 10% p/p de muestra. Los espectros RMN ¹³C se determinaron a disoluciones al 10% p/p de muestra en DMSO-d₆, utilizando un espectrómetro Varian Modelo Mercury 300, a 75.4 MHz. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente en modo de Transformada de Fourier, con 12 000 acumulaciones a un pulso de 90°, tiempo de relajación de 0,5 s y tiempo de adquisición de 1,591 s. Se garantizó desacoplamiento de banda ancha con el hidrógeno y se utilizó como referencia el pico central del DMSO-d₆ (δ=39,5 ppm). También se determinaron los espectros APT (Attached Proton Test), con vistas a lograr una mejor asignación de las señales.

Las muestras se caracterizaron también por microscopía electrónica de barrido (SEM) y determinando el hinchamiento en diversos fluidos. Las microfotografías se obtuvieron en un microscopio Jeol JSM-5610 LV, a 2-10 kV. Las muestras fueron previamente sometidas a deposición de Au/Pd en un equipo Denton II. El hinchamiento en el tiempo se determinó a 37,0 °C mediante un equipo descrito para evaluar la absorción de superabsorbentes^[23], utilizando fluido intestinal simulado o FIS (3,4 g de KH₂PO₄ y 91,0 mL de NaOH 0,2N, enrasado a 500 mL, pH » 7,4) y fluido gástrico simulado o FGS (1,0 g de NaCl y 3,5 mL de HCl conc., enrasado a 500 mL, pH » 1,2)^[24].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El almidón inicial presentó características típicas de cualquier almidón obtenido a partir del maíz^[7]. La microscopía electrónica de barrido permitió observar que el mismo estaba formado por gránulos de diámetro aproximado de 10 μm, como muestra la figura N.º 1.

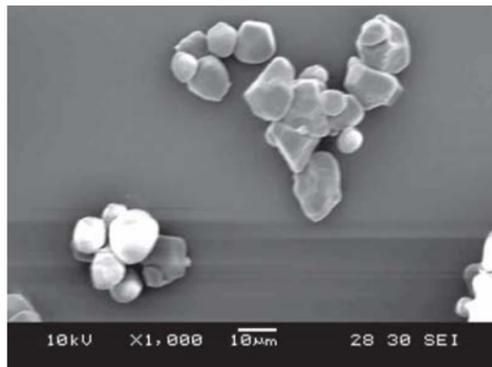


Fig. N.º 1. Microfotografía SEM (Magnificación x1000) de los granulos del almidón comercial de partida.

Por otro lado, en el espectro IR se pueden apreciar las señales características de este polímero natural⁽⁷⁾, según se muestra en la Figura 2. En la misma se indican las bandas a 2932 cm⁻¹ y 862 cm⁻¹, correspondientes al estrechamiento de los grupos CH₂ y a la vibración 2a de las α-D-glucopiranosas, respectivamente. La intensidad relativa de la señal de 2932 cm⁻¹ respecto a la de 862 cm⁻¹ fue evaluada como posible indicador del grado de entrecruzamiento del almidón con ECH.

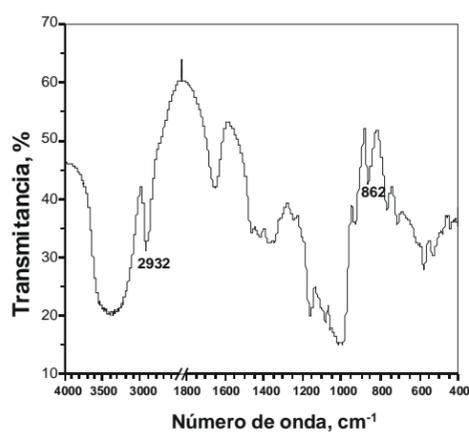


Fig. N.º 2. Espectro FTIR del almidón comercial.

Igualmente, los espectros RMN ¹³C (cualitativo y APT) se corresponden con los resultados esperables para este polímero, según ilustra la figura N.º 3 y las asignaciones de las bandas en la tabla N.º 3.

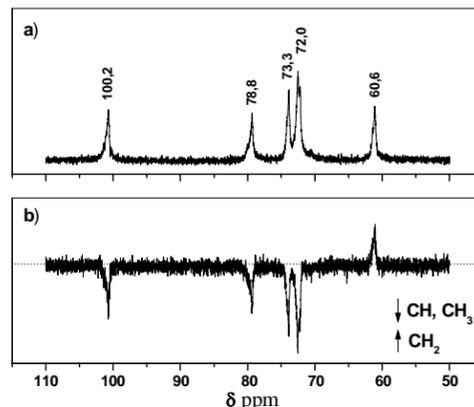


Fig. N.º 3. Espectros RMN ¹³C cualitativo (a) y APT (b) del almidón de partida.

Tabla N.º 3. Asignaciones de las señales del espectro RMN ¹³C para el almidón natural.

| Corrimiento químico (δ), ppm | Grupo | Átomo de carbono |
|------------------------------|--------------------|------------------|
| 100,2 | CH | C1, anomérico |
| 78,8 | CH | C4, enlace α 1-4 |
| 72,0-73,3 | CH | C 2, 3 y 5 |
| 60,6 | CH ₂ OH | C6 |

Las señales en el rango de 72,0 a 73,3 ppm corresponden a los carbonos 2, 3 y 5 que no pueden ser resueltos fácilmente.

El estudio de la gelatinización del almidón dio como resultado que, bajo las condiciones empleadas, esto ocurre a los 90 minutos según evidencia la figura N.º 4.

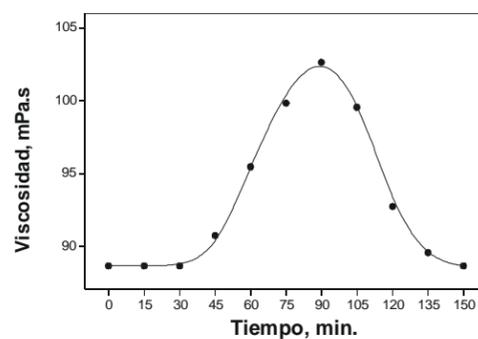


Fig. 4. Variación de la viscosidad durante la gelatinización del almidón.

Por lo tanto, la adición de ECH a 90 minutos de comenzada la gelatinización corresponde al entrecruzamiento de un almidón totalmente gelatinizado; mientras que a menores tiempos, implica entrecruzar almidón sólo parcialmente gelatinizado.

Ya durante el entrecruzamiento con ECH, la viscosidad aumenta hasta un valor constante, tal como muestra la figura N.º 5. En la misma se evidencia cómo la viscosidad máxima, al igual que el tiempo del entrecruzamiento, dependen fundamentalmente de la dosis de ECH.

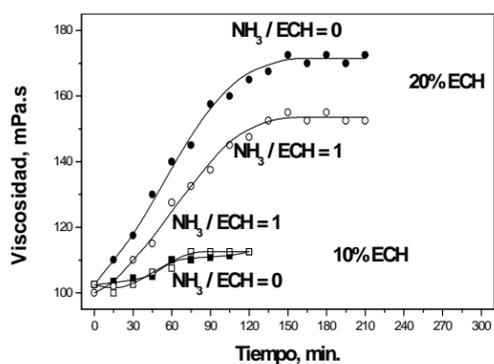


Fig. N.º 5. Influencia de la dosis de ECH y NH₃ sobre la viscosidad y el tiempo de entrecruzamiento para una adición a 90 minutos de gelatinización.

Un análisis estadístico, con un nivel de significación de 0,99 o superior, demostró que ambas respuestas (viscosidad máxima y tiempo de entrecruzamiento) dependen de forma significativa sólo de la dosis de ECH. Para 10% de ECH la reacción concluye a los 60-90 minutos bajo las condiciones empleadas, mientras que para 20% de ECH se prolonga hasta 150 minutos.

La microscopía SEM evidenció que, independientemente del momento al cual se adicionó la ECH, todos los almidones entrecruzados se pudieron apreciar como materiales relativamente homogéneos donde desaparecieron los gránulos del almidón inicial, indicando que la gelatinización continuó aún después de haber adicionado la ECH. Una posible interpretación de este hecho sería que la dosis adicionada de NaOH era susceptible de ser disminuida. Ese fue uno de los motivos por el cual se decidió estudiar menores adiciones de NaOH para el entrecruzamiento con STMP.

El cálculo de intensidades relativas $2932\text{ cm}^{-1} / 862\text{ cm}^{-1}$ en los espectros IR de los almidones entrecruzados con ECH no permitió establecer una relación definida con el grado de entrecruzamiento. No obstante, se encontró que al aumentar la viscosidad máxima obtenida en el entrecruzamiento existía una tendencia al incremento de la intensidad de la banda IR de 2932 cm^{-1} , como se indica en la figura N.º 6.

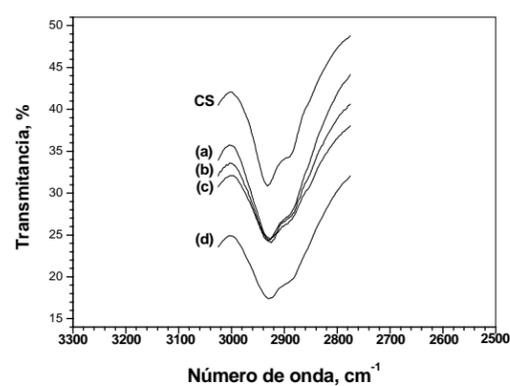


Fig. N.º 6. Bandas IR a 2932 cm^{-1} para los diferentes experimentos a 20% ECH. CS: Almidón de partida; a) 30 min, NH₃ / ECH = 1, Visc. 142 mPa.s; b) 90 min, NH₃ / ECH = 1, Visc. 153 mPa.s; c) 30 min, no NH₃, Visc. 166 mPa.s; d) 90 min, no NH₃, Visc. 170 mPa.s.

Esta tendencia se corrobora por la existencia de una correlación estadísticamente significativa ($r=0,9871$; $r_c=0,872$ para $a=0,999$) entre la viscosidad máxima y la absorbancia IR en 2932 cm^{-1} , como ilustra la figura N.º 7.

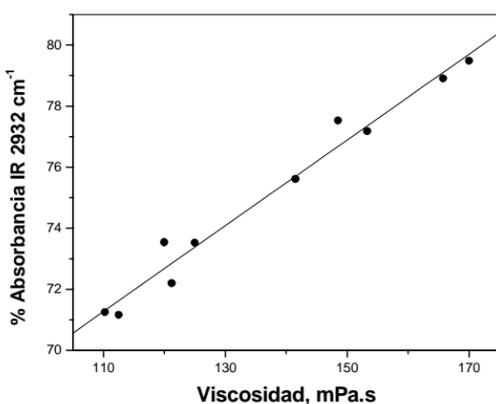


Fig. N.º 7. Relación entre la viscosidad máxima y la absorbancia IR a 2932 cm^{-1} .

Esto indica una posible relación entre esta señal IR y el grado de entrecruzamiento, lo

que señala la necesidad de trabajos futuros en esta dirección.

Los espectros RMN ¹³C para las muestras de almidón entrecruzado con ECH fueron prácticamente idénticos al obtenido para el almidón de partida, con la diferencia de que aparecen dos señales de muy baja intensidad, pero totalmente corroboradas, en 63,2 y 70,0 ppm.

La asignación de estas señales de baja intensidad corresponde a grupos CH₂ y CH, respectivamente, planteando la posibilidad de que fueran señales producidas por el entrecruzamiento. Su baja intensidad estaría en correspondencia con los niveles de entrecruzamiento esperados en este trabajo.

No obstante, no se obtuvo evidencia sólida que permita esta afirmación. De hecho, toda la evidencia obtenida –tanto por espectroscopia IR como RMN– aunque ha brindado indicios no ha posibilitado establecer un método confiable para evaluar el grado de entrecruzamiento, ratificando las dificultades planteadas en este sentido en la literatura^[7-10, 18].

La evaluación del hinchamiento en FGS para diferentes muestras de almidón entrecruzado con ECH se muestra en la figura N.º 8.

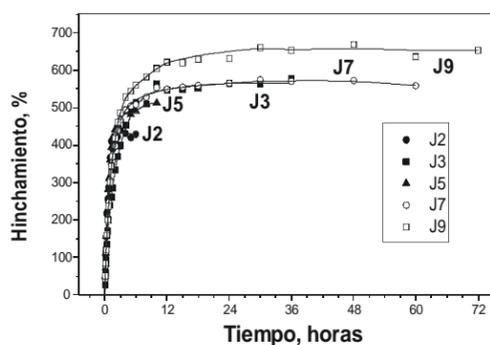


Fig. N.º 8. Hinchamiento de diferentes muestras de almidón entrecruzado en FGS (pH ≈ 1,2).

Los mejores resultados (mayores valores de hinchamiento máximo) se obtuvieron para los experimentos J3 y J7, ya que el experimento J9 presentó menor valor del hinchamiento máximo en FIS (pH ≈ 7,4), como se puede observar en la Tabla N.º 4.

Tabla N.º 4. Hinchamiento máximo (HM) en FIS/FGS y tiempo en alcanzarlo para diferentes muestras de almidón entrecruzado con ECH.

| Exp. | % ECH | % HM | t min |
|------|-------|---------|---------|
| J2 | 20 | 300/440 | 90/300 |
| J3 | 10 | 520/600 | 90/360 |
| J5 | 10 | 500/510 | 90/120 |
| J7 | 10 | 560/570 | 180/480 |
| J9 | 15 | 420/660 | 120/480 |

Como resulta de interés obtener hidrogeles que se hinchen preferentemente en el intestino, es evidente que dosis de ECH superiores al 10% limitaron el hinchamiento deseado de las muestras. Sólo los experimentos donde se aplicó 10% ECH permitieron obtener matrices con un hinchamiento máximo en FIS de 500-600%. Es presumible que dosis superiores al 10% de ECH hayan limitado el hinchamiento en FIS por producir un mayor grado de entrecruzamiento.

Además, las condiciones aplicadas garantizaron que los hinchamientos se lograran en tiempos relativamente cortos para el FIS y generalmente mucho mayores para el FGS, lo cual favorece aún más la liberación preferencial en el intestino.

Las curvas de viscosidad versus tiempo para el entrecruzamiento con STMP mostraron un comportamiento completamente similar a las obtenidas para el caso de la ECH.

El efecto catalítico del NaOH, y en general de los iones sodio, sobre el entrecruzamiento con STMP se puede apreciar en la figura N.º 9.

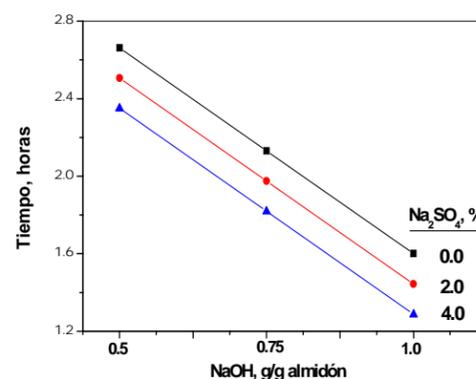


Fig. N.º 9. Influencia del NaOH y el Na₂SO₄ sobre el tiempo de entrecruzamiento con STMP (2,5%).

En esta figura se muestra cómo el tiempo de entrecruzamiento disminuye en la medida que aumenta la dosis de NaOH, y de iones sodio en general.

Por otro lado, el entrecruzamiento con STMP permitió obtener matrices poliméricas con un hinchamiento en FIS de prácticamente el doble respecto a la ECH, alcanzable en tiempos muy semejantes y estable por períodos más prolongados, según se puede apreciar en la figura N.º 10.

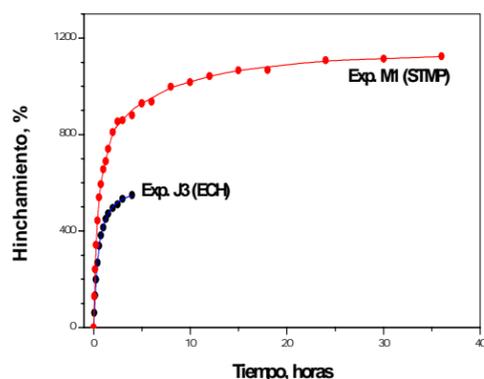


Fig. N.º 10. Comparación del hinchamiento en FIS obtenido para el entrecruzamiento con ECH y STMP.

Este hecho es muy alentador, ya que demuestra los resultados positivos esperables del entrecruzamiento con STMP, lo cual a su vez tiene la ventaja de no utilizar un agente entrecruzante con la toxicidad de la ECH.

CONCLUSIONES

El tiempo de gelatinización del almidón comercial utilizado en este trabajo, bajo las condiciones empleadas en el mismo, es de 90 min.

La dosis del agente entrecruzante fue la única variable con peso significativo sobre la viscosidad máxima y el tiempo del entrecruzamiento con ECH. Mayores dosis de ECH conducen a mayores viscosidad y tiempo de entrecruzamiento.

Se obtienen materiales entrecruzados relativamente homogéneos aún al adicionar la ECH antes de finalizada la gelatinización, lo que hace pensar que la gelatinización continúa –aún después de adicionar la ECH– debido a la acción del medio alcalino.

No se logró cuantificar el grado de entrecruzamiento con ECH por IR y RMN ¹³C. No obstante, existen indicios de que la intensidad de la banda IR correspondiente a los grupos CH₂, ubicada en 2925-2932 cm⁻¹, varía debido al entrecruzamiento.

La evaluación del hinchamiento indicó que los mejores resultados del entrecruzamiento con ECH se lograron en los experimentos donde se aplicó la menor dosis de este agente entrecruzante (10% ECH), evidenciados por altos valores del hinchamiento máximo a tiempos relativamente cortos en FIS y tiempos mucho mayores en FGS.

Se corroboró el efecto catalítico del NaOH, y en general de los iones sodio, sobre la reacción de entrecruzamiento con STMP.

El entrecruzamiento con STMP permitió obtener matrices poliméricas con un hinchamiento en FIS de prácticamente el doble respecto a la ECH, alcanzable en tiempos muy semejantes y estable por períodos más prolongados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dumitriu S. (Ed.). *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker, New York, 1994.
- [2] Peppas N.A. *et al. Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 27 (2000).
- [3] Hennink W.E. y Van Nostrum C.F. *Adv. Drug Deliv. Reviews*, 54, 13 (2002).
- [4] Bogdanský S. «Natural polymers as drug delivery systems» (en *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, M. Chasin and R. Langer, Eds.), Marcel Dekker, New York, 231-259, 1990.
- [5] Chebli C. *et al. Pharm. Res.*, 16, 1436 (1999).
- [6] Dumoulin Y., Cartilier L. y Mateescu M. *J. Control. Release*, 60, 161 (1999).
- [7] Wurzburg, O.B. (Ed.). *Modified starches: Properties and uses*, CRC Press, Boca Ratón, 1986.
- [8] Le Bail P., Morin F.G. y Marchessault R.H. *Int. J. Biolog. Macrom.*, 26, 193 (1999).
- [9] Ravenelle R. *et al. Carbohydrate Polymers*, 47, 259 (2002).
- [10] Woo K. y Sieb P.A. *Carbohydr. Polymers*, 33, 263 (1997).

- [11] Kuniak L. y Marchessault R.H. *Die Stärke*, 24, 110 (1972).
- [12] Šimkovic I. *Carbohydrate Polymers*, 31, 47 (1996).
- [13] Lenaerts V. *et al. J. Control. Release*, 53, 225 (1998).
- [14] Sabatier, J., Rosa R.C.R.S. y Andrade C.T. «Entrecruzamiento de un almidón comercial cubano para su uso como matriz de liberación controlada de fármacos» Congreso Internacional Biomat'03, Ciudad de La Habana, Cuba, Marzo 2003; *Revista CENIC, Ciencias Químicas* (En prensa).
- [15] Andrade C. T., Rosa R. C.R.S. y Barbosa L.C. «Compósitos biodegráveis amido / amido reticulado», III Encontro Regional de Polímeros, Rio de Janeiro, 2000 (Firjan, 1, 43, 2000).
- [16] Rosa R.C.R.S. y Andrade C.T. «Obtenção e caracterização de compósitos biodegradáveis amido-amido reticulado». Anais do 60 Congresso Brasileiro de Polímeros, 1, 1282, 2001.
- [17] Kulicke W. M. *et al. Starch/Stärke*, 41, 140 (1989).
- [18] Lenaerts V., Dumoulin Y. y Mateescu M.A. *J. Control. Release*, 15, 39 (1991).
- [19] Kulicke W.M., Aggour Y.A. y Elsabee M.Z. *Starch / Stärke*, 42, 134 (1990).
- [20] Bordallo E., Sabatier J. y Bermello A. *Revista ICIDCA «Sobre los Derivados»*, XXVII, 75 (1998).
- [21] Bermello A., Bordallo E. y Sabatier J. *Revista ICIDCA «Sobre los Derivados»*, XXVII, 84 (1998).
- [22] Okuma S. *et al.* «Fine cellulose particles and process for production thereof». U.S. Patent 5 064 950, Nov. 12, 1991.
- [23] Departamento de Aseguramiento de la Calidad de Proveedores. Laboratorios Autex S.A. «Método de ensayo para determinar Capacidad de Absorción bajo presión» N.º 10-002 (01), 1995.
- [24] Amiji M.M. «Drug delivery using pH-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels». U.S. Patent 5 904 927, May. 18, 1999.