

Tesis de Posgrado

Utilización de las radiaciones ionizantes en procesos industriales

Fernández Degiorgi, Cristina Haydeé Carolina

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández Degiorgi, Cristina Haydeé Carolina. (2001). Utilización de las radiaciones ionizantes en procesos industriales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3403_FernandezDegiorgi.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández Degiorgi, Cristina Haydeé Carolina. "Utilización de las radiaciones ionizantes en procesos industriales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3403_FernandezDegiorgi.pdf

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Comisión Nacional de Energía Atómica
Departamento de Radiobiología**

***UTILIZACIÓN DE LAS RADIACIONES
IONIZANTES EN PROCESOS
INDUSTRIALES***

Tesis

Autora: Cristina Haydeé Carolina Fernández Degiorgi

Director: Eduardo E. Smolko

Consejero de Estudios: Jorge Zorzópulos

2001

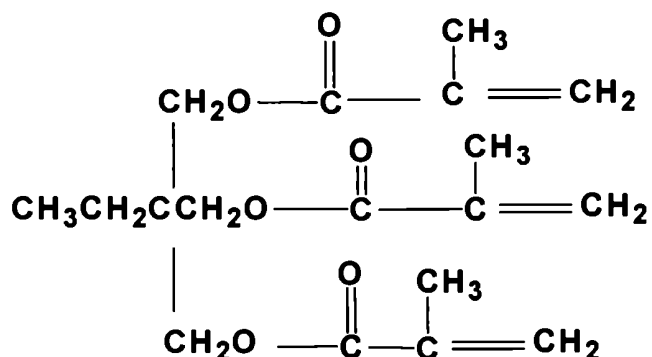
0.3
3402

Fe de erratas

Pág. 34, renglón 1: donde dice "o alcohol polivinílico entrecruzados" debería decir, "o alcohol polivinílico no entrecruzados".

Pág. 75: La fórmula estructural correcta del "Trimetacrilato de trimetilolpropano" es:

Trimetacrilato de trimetilolpropano (TMPTMA)



Pág. 88, renglón 12: donde dice "BDV", debería decir "BVD".

Pág. 91, renglón 3 : donde dice "coomasie", debería decir "coomassie".

A la memoria de mi padre

A mi madre

A mis hijos Joaquín y Julián

A Carlos

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo E. Smolko por el apoyo y el estímulo brindados para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jorge Zorzópulos por el asesoramiento en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ramón A. Pizarro por el estímulo y colaboración permanente en la realización de mis trabajos y por su amistad.

Al Dr. Rubén O. Fernández por el tiempo que ha dedicado para mi aprendizaje en el área informática, por su colaboración permanente y su amistad.

Al Dr. Enzo R. Muñoz por su constante estímulo en la realización de mis trabajos.

Al Lic. Daniel Quattrini por su asesoramiento técnico en el área de los cultivos de tejidos y por su amistad.

A la Lic. Mariana Rosenbuch por su colaboración técnica en el área de la microscopía electrónica de barrido.

A las Dras. Cristina S. Costa y Giselle Saint Martin por su apoyo y amistad.

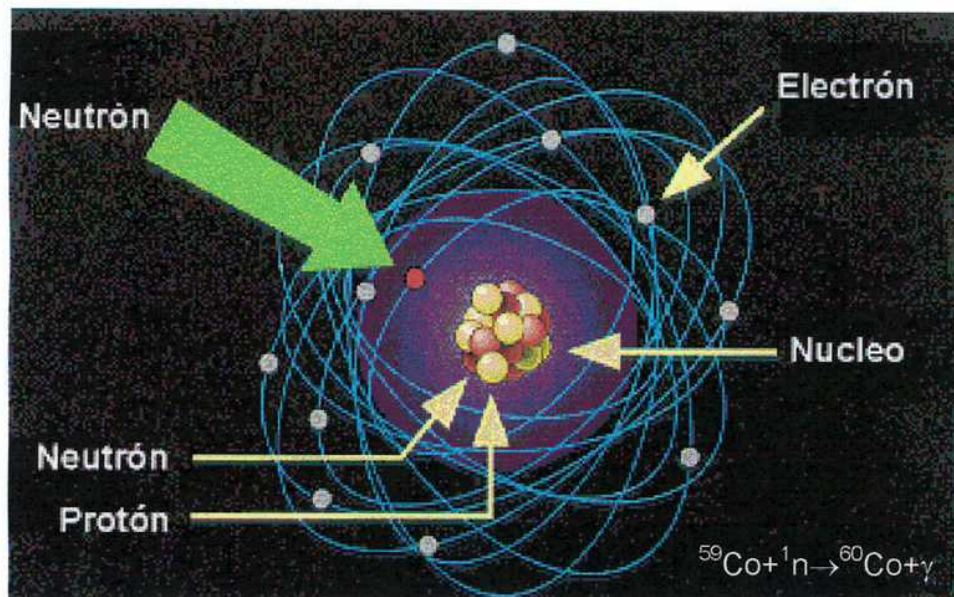
Al personal técnico y auxiliares de laboratorio del Departamento de Radiobiología de la CNEA que colaboraron en la realización de este trabajo.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en:

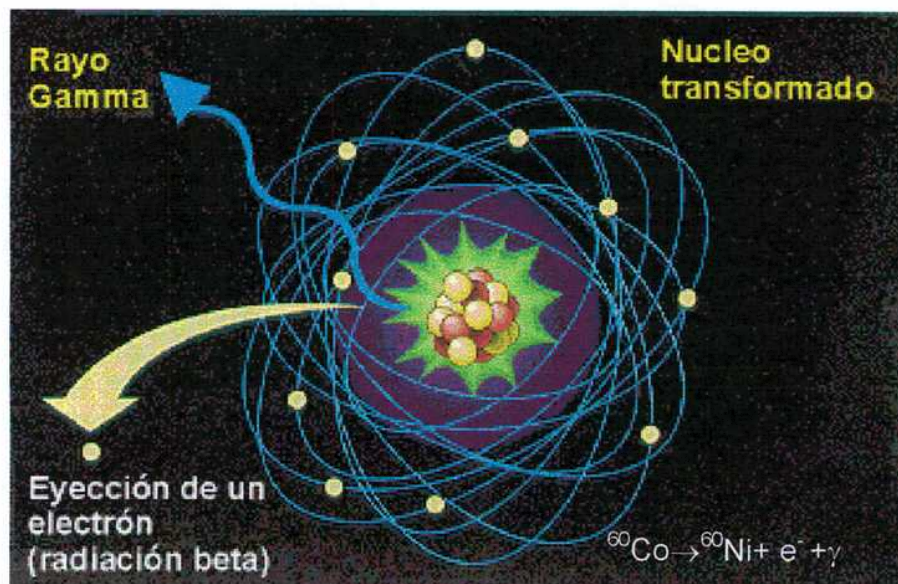
Fernández Degiorgi, C., R. A. Mallo, E. E. Smolko, J. H. Lombardo (1995) Ampicillin release from swellable controlled system. *Journal of Controlled Release* **33**, 343-348.

Jorge H. Lombardo, Cristina Fernández Degiorgi, Daniel Quattrini, Severino Michelin and Eduardo E. Smolko. (1995) Sera radiosterilization: studies and applications. *Radiat. Phys. Chem.* **45**, 275-281.

Fernández Degiorgi, C., E. E. Smolko, J. H. Lombardo (1999) Cryo-gamma radiation inactivation of bovine herpesvirus type-1. *Radiat. Phys. Chem.* **55**, 469-471.



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las radiaciones ionizantes

1.1.1 Generalidades

1.1.1.1 Proceso ionizante

Las radiaciones ionizantes pueden ser definidas como aquellas que tienen energía suficiente para convertir un átomo o molécula eléctricamente neutros en un par iónico; donde un componente tiene una carga neta negativa y el otro positiva, ya sea directamente o a través de la acción de alguna radiación secundaria. El proceso de ionización ocurre cuando suficiente energía es transferida “en forma apropiada”. La frase “en forma apropiada” es el fundamento por el cual las radiaciones ionizantes son estudiadas separadamente de otras formas de deposición de energía en la materia. La energía depositada por estas radiaciones es tan elevada y tan localizada que las uniones químicas, las cuales caracterizan a las especies moleculares, pueden ser rotas y posiblemente reconfiguradas después de intervalos de tiempo muy cortos. La presencia de estas especies alteradas dentro de un material puede tener profundas consecuencias. Los sistemas biológicos son notablemente sensibles a tales eventos y además, son la base físico-química del uso de las radiaciones ionizantes en investigaciones en polímeros y en procesos industriales.

La ionización no es el único medio por el cual la energía de la radiación puede ser transferida a un material. Un segundo importante mecanismo de transferencia de energía es el de excitación, en el cual un átomo o molécula es llevado a un nivel de energía más elevado por la acción de la radiación, sin

ganancia suficiente de energía por el electrón para ser liberado y formar un par iónico. Este proceso puede también tener importantes consecuencias físicas, químicas o biológicas. Convencionalmente se usa el término “ionizantes” para radiaciones que a la vez ionizan y excitan.

Cada especie molecular tiene niveles de energía electrónicos cuantizados, bien definidos. Por lo tanto, la energía requerida para ionizar depende del orbital desde el cual el electrón es liberado y puede variar desde pocos electrón-voltios (eV) para el electrón menos ligado, hasta varios miles de electrón-voltios (keV) para electrones de las capas internas en un átomo pesado. Un 1 eV es equivalente a $1,602 \times 10^{-19}$ J. Usualmente las radiaciones primarias tienen varias veces la energía suficiente para ionizar o excitar átomos o moléculas de cualquier material. Sin embargo al atravesar la materia, la energía de estas radiaciones es degradada y al mismo tiempo genera radiaciones de baja energía. El conocimiento de cual fracción de la mezcla resultante es todavía capaz de la ionización o excitación del material, es una dificultad. Generalmente, la energía depositada por esa parte de la radiación, la cual no tiene energía suficiente para excitar o ionizar el material, es suficientemente pequeña y no necesita ser específicamente considerada.

El promedio de energía requerida para ionizar un átomo es dado por E_i , la media del potencial de ionización/excitación de un átomo. La siguiente fórmula aproximada se usa para estimar E_i para un elemento caracterizado por su número atómico Z :

$$E_i = \begin{cases} 19,0 \text{ eV} & Z=1 \\ (11,2+ 11,7 Z) \text{ eV} & 2 \leq Z \leq 13 \\ (52,8+ 8,7 Z) \text{ eV} & Z > 13 \end{cases}$$

La energía promedio gastada en producir un simple par iónico, W , incluye también la energía usada en interacciones de excitación entre ionizaciones y depende tanto del material absorbedor como del tipo y energía de la radiación ionizante. El valor de W en un gas es siempre más grande que el potencial de ionización puesto que parte de la energía se utiliza en procesos no ionizantes tales como la excitación ($E = N_i W$, donde N_i es el número de pares iónicos producidos cuando es absorbida una partícula cargada de energía total E). Un electrón, originalmente liberado cuando un átomo es ionizado, tiene energía más que suficiente para excitar (o ionizar) otros átomos

El valor medio de W (1) para aire es 33,8 eV, mientras que para agua es 29,6 eV y para metano 27,3 eV. La relación E_i / W para electrones de alta energía es del orden de 0,4 en varios gases orgánicos (2) (0,58 para gases nobles mientras que para gases moleculares es del orden de 0,38 a 0,48), indicando que la energía W es dividida aproximadamente por igual para producir ionizaciones y excitaciones. Puesto que este último proceso involucra pequeñas cantidades de energía, entonces la proporción de excitaciones excede ampliamente a la de ionizaciones. Hay mayor dificultad para medir W en líquidos y sólidos que en gases, puesto que las cargas de signo opuesto son más difíciles de ser colectadas. En sólidos conductores, los electrones liberados por la radiación son una pequeña proporción del total de los que pueden ser colectados en un campo

eléctrico. En sólidos semiconductores no se habla de energía para producir un par iónico sino de energía para producir un par electrón–agujero. Siempre que una partícula cargada pierde energía en un sólido, los electrones son movidos de la banda de valencia a la banda de conducción. El “agujero” dejado en la banda de valencia tiene todas las propiedades de una partícula de carga positiva; tiene el mismo papel que el ion positivo resultante de la ionización de un gas (3).

1.1.1.2 Radiaciones directamente e indirectamente ionizantes

Las radiaciones ionizantes pueden ser divididas en dos grupos principales. El primero consiste en **partículas cargadas** tales como electrones, protones, partículas α e iones pesados los cuales tienen suficiente energía para causar ionización por colisión y producir así interacciones Coulombianas con electrones en el material absorbedor. Estas son **radiaciones directamente ionizantes**.

Esta situación contrasta con las **radiaciones indirectamente ionizantes**, las cuales no son cargadas. Los fotones incidentes (rayos X y rayos γ) liberan electrones secundarios, y los neutrones incidentes liberan núcleos de retroceso cargados también secundarios, los cuales al desviarse producen la mayoría de las excitaciones e ionizaciones en el absorbedor. Por ejemplo, el simple electrón secundario resultante de la interacción con un rayo γ de 1,33 MeV de una fuente de ^{60}Co es capaz de producir 40.000 pares de iones. Por lo tanto la mayor diferencia entre la interacción de radiaciones directamente ionizantes e indirectamente ionizantes es que las últimas experimentan relativamente pocas

colisiones, cada una involucra una gran pérdida de energía mientras que las primeras sufren un gran número de interacciones, con poca pérdida de energía en cada una de forma tal que parece que las partículas pierden energía en forma continua.

1.1.2 Interacción de la radiación con la materia

Las radiaciones nucleares, ya sean partículas cargadas, neutras o radiaciones electromagnéticas se individualizan por su interacción con la materia.

Las **partículas cargadas** pierden energía en sucesivos choques con los átomos a medida que recorren una trayectoria. Las partículas cargadas tales como protones, deuterones, partículas α interactúan fundamentalmente por colisiones inelásticas (con pérdida de energía) con electrones atómicos. Este choque de partículas pesadas no produce prácticamente desviación en ellas y por lo tanto sus trayectorias son rectilíneas. En cambio, **los electrones**, por su pequeña masa pueden interactuar con los electrones de los átomos o con los núcleos por colisiones elásticas (sólo sufren desviación) o inelásticas (pierden energía por ionización o por emisión de radiación).

Las **partículas neutras** (neutrones) se detectan mediante la interacción que tienen con la materia las partículas cargadas producidas en reacciones nucleares de las primeras con el medio absorbente.

La **radiación electromagnética** interactúa en procesos únicos con átomos, electrones o núcleos de acuerdo con la energía del fotón incidente es

decir, que el cuanto se pierde totalmente en una única interacción, sin degradación parcial de energía.

De todos los tipos de radiaciones ionizantes existentes los más frecuentemente utilizados en el campo de los procesos industriales y biotecnológicos son los haces de electrones y las fuentes de radiación gamma. Dado que en el presente trabajo de Tesis se utilizó una fuente de radiación gamma solamente se mencionarán las interacciones de los fotones con un absorbedor.

1.1.2.1 Interacción de la radiación electromagnética con la materia

1.1.2.1.1 Coeficientes de atenuación y sección eficaz de interacción

A diferencia de los electrones, los fotones no están eléctricamente cargados y no pierden energía en forma continua cuando penetran en un material. La distancia que un fotón viaja antes de interactuar es determinada estadísticamente por la probabilidad de interacción por unidad de longitud de la trayectoria. Esta probabilidad depende del número atómico efectivo Z y la densidad ρ del absorbedor así como de la energía del fotón E . Si cada átomo en un material presenta un área de **sección eficaz efectiva** σ al haz de fotones (la sección eficaz microscópica), y hay N átomos blanco por unidad de volumen, luego una medida de la **probabilidad de que un fotón interactúe en una unidad**

de espesor del absorbedor es $\mu = N \sigma$. Si N se expresa en términos del número de Avogadro, N_A ; de la densidad ρ y la masa atómica relativa del absorbedor, A_r :

$$\mu = \frac{N_A \rho \sigma}{A_r}$$

donde μ es la probabilidad de interacción macroscópica y se denomina **coeficiente lineal de atenuación** con unidades de m^{-1} . En general, μ aumenta con Z y ρ , y disminuye con la energía del fotón E .

Cuando un fotón interactúa con un blanco en un material, puede ser absorbido y así desaparecer o puede ser dispersado, cambiando la dirección de la trayectoria, usualmente con pérdida de energía. Por lo tanto, la atenuación es una combinación de absorción y dispersión. Puesto que los coeficientes lineales de atenuación dependen directamente de la densidad del medio, tienen valores diferentes para cada estado físico diferente de las especies químicas. También absorbedores de números atómicos similares, pero de diferentes densidades, tienen diferentes valores de μ . Debido a esto, el coeficiente de interacción es más comúnmente citado en términos de unidad de masa de absorbedor. El **coeficiente másico de atenuación** es

$$\mu / \rho = N_A \sigma / A_r$$

y tiene unidades de m^2/kg .

Diferentes tipos de centros de interacción en un absorbedor tienen diferentes secciones eficaces microscópicas σ para un haz de un fotón particular. El coeficiente másico de atenuación de una mezcla de diferentes átomos puede ser calculado a partir de los coeficientes de los constituyentes de la mezcla:

$$\mu/\rho = \sum_i w_i \mu_i/\rho_i$$

donde μ_i/ρ_i es el coeficiente másico de atenuación de los componentes i y w_i la fracción de masa.

El número de fotones que pasan a través de una unidad de área del absorbedor por segundo es llamado tasa de fluencia ϕ . La intensidad de un haz, o la energía de la tasa de fluencia es $\Psi = \phi E$. Para un haz monoenergético, la variación de intensidad con la profundidad del absorbedor es

$$\Psi = \Psi_0 e^{-\mu x}$$

donde Ψ_0 es la intensidad incidente en la superficie. Cuando el fotón incidente tiene un espectro de energías, esta ecuación tiene que ser aplicada separadamente para la energía de cada componente. La penetración media de un haz de fotones es el promedio de la distancia recorrida antes de su primera interacción, y es igual a $1/\mu$.

Los principales tipos de interacción de fotones en materiales, cada uno de los cuales contribuyen al coeficiente másico de atenuación, son absorción fotoeléctrica, dispersión Compton y producción de pares.

1.1.2.1.2 Absorción fotoeléctrica

En el proceso fotoeléctrico, el fotón incidente entrega toda su energía E a un electrón interno en un átomo, el cual es luego liberado desde el átomo con una energía cinética T_e , siendo

$$T_e = E - E_B$$

y E_B la energía de unión del electrón requerida para remover el electrón de la influencia del núcleo. La absorción fotoeléctrica es energéticamente posible cuando $E > E_B$, y la probabilidad es grande cuando $E = E_B$. La dirección en la cual los electrones son liberados desde los átomos depende de la energía del fotón. A bajas energías, la tendencia es la emisión perpendicular a la dirección del fotón, pero a altas energías estos fotoelectrones son emitidos en dirección opuesta a la incidente. La interacción fotoeléctrica está representada esquemáticamente en la Fig. 1.1

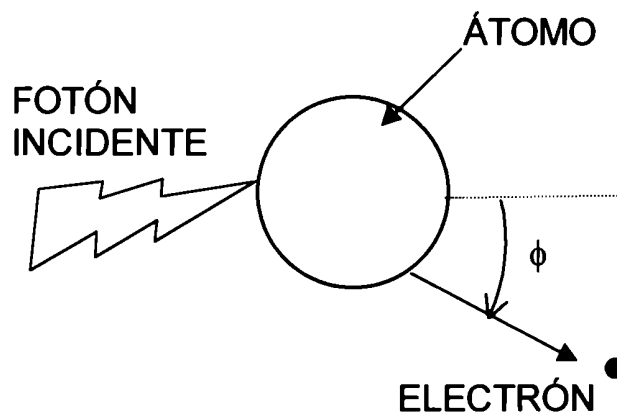


Fig. 1.1 Representación esquemática de la absorción de un fotón por efecto fotoeléctrico. El fotoelectrón es emitido según un ángulo ϕ respecto del sentido de incidencia del fotón.

El ion remanente cargado positivamente es energéticamente inestable, con una vacante en las capas electrónicas internas. Esta es llenada por un electrón que cae desde las órbitas externas, con emisión de energía. Esta emisión a menudo aparece como un fotón de rayos X que tiene una energía igual a la diferencia de energía de unión de los dos niveles electrónicos. Como la energía de los niveles electrónicos es específica para cada átomo, el fotón de rayos X tiene

una energía característica del átomo del cual es originado. Estos fotones son llamados radiación característica. Sin embargo, no todas las desexcitaciones atómicas dan una radiación característica. Pueden ocurrir transiciones no radiantes en las cuales la energía de desexcitación es usada para liberar un electrón de las capas externas de un ion positivo. Este es el **efecto Auger** y los electrones liberados son los electrones Auger. La probabilidad de que la desexcitación de un átomo emita una radiación característica es llamada producción fluorescente. Los materiales de bajo número atómico dan muy poca radiación característica, la probabilidad de emisión de rayos X luego de la ionización fotoeléctrica de la capa K del átomo de oxígeno resulta mucho menor que un 1%.

La sección eficaz de interacción fotoeléctrica por átomo depende del número atómico del átomo absorbedor y de la energía del fotón, y es aproximadamente proporcional a Z^4/E^3 . Es importante en elementos pesados los cuales son, además, muy fuertes absorbedores de fotones, pero a energías suficientemente bajas el proceso predomina en todos los elementos.

1.1.2.1.3 Efecto o dispersión Compton

Cuando un fotón interactúa con los electrones más externos del átomo, el fotón es sólo capaz de transferir una proporción de su energía al electrón, el cual es liberado del átomo y el fotón desviado de su dirección original con una energía reducida E' . La energía cinética del electrón

$$T_c = E - E'$$

depende del ángulo de dispersión. La dispersión Compton se muestra esquemáticamente en la Fig. 1.2 y el resultado es un espectro de energía continuo

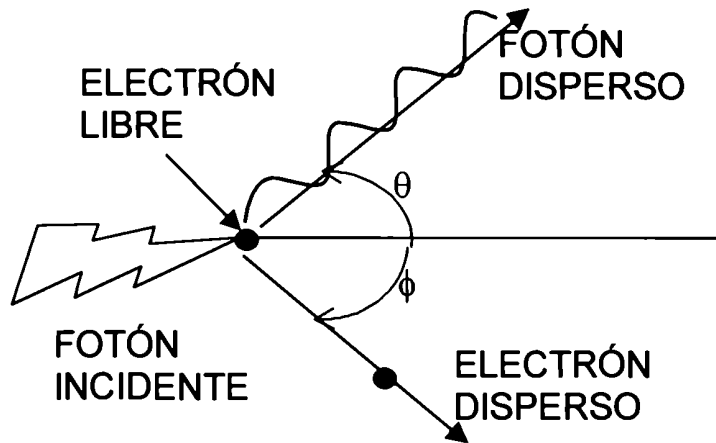


Fig. 1.2 Representación esquemática del efecto Compton. El fotón disperso sale según una dirección que forma un ángulo θ con la del fotón incidente y el electrón Compton sale en una dirección que forma un ángulo ϕ .

del electrón desde cero a algún valor máximo que corresponde a la colisión frontal entre el fotón y el electrón. A mayor energía del fotón mayor es la tendencia de los electrones de ser emitidos en dirección contraria a la del fotón incidente.

Las proporciones de energía máxima y promedio del fotón que dan electrones de retroceso están dadas en la Tabla 1.1 para varios valores de E .

Tabla 1.1 Proporciones de energías máxima y promedio de fotones que dan electrones de retroceso Compton

Energía del fotón, E (MeV)	T_{max}/E	$T_{prom.}/E$
0,01	0,038	0,019
0,1	0,281	0,138
1,0	0,796	0,440
10,0	0,975	0,684

Puede deducirse que, para fotones de alta energía, una gran proporción de la energía puede ser entregada a electrones de retroceso, mientras que en el caso

de fotones de baja energía el electrón es liberado con una muy pequeña fracción de la energía disponible.

Es necesario recalcar que en el efecto fotoeléctrico el fotón interactúa con el átomo considerado como un todo; en cambio, en el efecto Compton el fotón interactúa directamente con un electrón, supuesto libre. Se define así el efecto Compton, como una colisión inelástica incoherente. Sin embargo, un estudio detallado de los fotones dispersados da cuenta del efecto de ligadura de los electrones en el átomo (4).

La energía total del fotón disperso por unidad de área por segundo por electrón es $\Psi_e \sigma_s$, donde $e\sigma_s$ es la sección eficaz de dispersión promedio por electrón.

La energía cinética correspondiente a los electrones de retroceso es $\Psi_e \sigma_a$, siendo $e\sigma_a$ la sección eficaz de absorción promedio. La sección eficaz de atenuación Compton por electrón es

$$e\sigma = e\sigma_s + e\sigma_a$$

y la contribución relativa de las dos secciones eficaces parciales mostrados en la

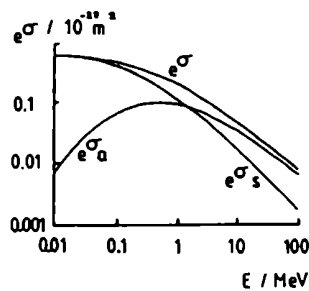


Fig. 1.3: La variación de la sección eficaz de atenuación Compton por electrón, $e\sigma$, y sus componentes, con la energía del fotón

Fig. 1.3, reflejan la variación de T_{prom}/E con la energía del fotón.

La sección eficaz Compton por átomo es $\sigma_e Z$, y la contribución de este proceso al coeficiente másico de absorción macroscópico depende de la relación Z/A_i ; el cual es aproximadamente constante para elementos con número atómico Z bajo excepto el hidrógeno.

1.1.2.1.4 Producción de pares

Cuando la energía de un fotón tiene una energía mayor que el doble de la masa en reposo del electrón ($2m_0c^2 = 1,022 \text{ MeV}$), es energéticamente posible que se convierta espontáneamente en un par positrón- electrón en el campo de un núcleo atómico. La presencia de un núcleo es necesaria para que se conserve la energía y el momento simultáneamente. La energía del fotón es convertida en la energía de dos masas en reposo más la energía cinética del par:

$$T_e + T_p = E - 2m_0c^2$$

donde T_e y T_p son continuamente distribuidas, cada una desde 0 hasta un máximo de $E - 2m_0c^2$. La producción de pares se torna más probable con el incremento de

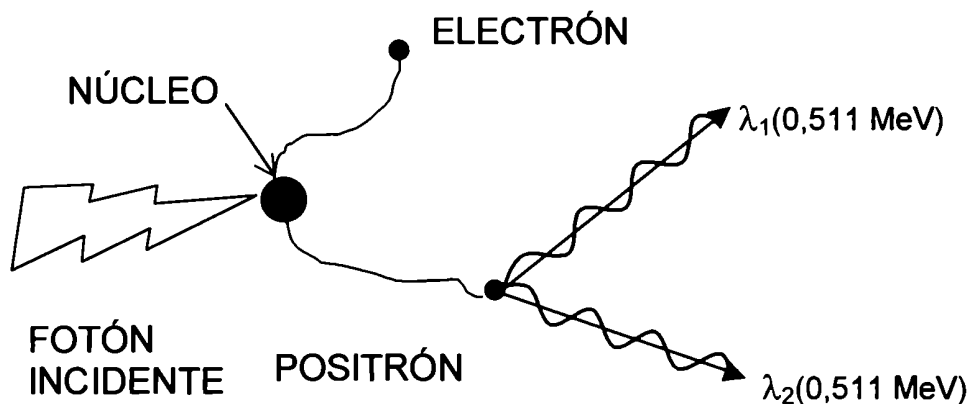


Fig. 1.4: Representación esquemática del proceso de formación de pares

la energía del fotón E y aumenta con el número atómico, aproximadamente con Z^2 . El positrón deposita su energía cinética T_p en el absorbedor por el mismo mecanismo que un electrón, y se degrada lentamente. En este estado se combina con un electrón para formar un positronio, un sistema ligado consistente en un par electrón-positrón rotando alrededor de su centro de masa. La vida media del positronio es del orden de 10^{-10} segundos, antes de que el electrón se aniquile con su antipartícula, el positrón. Las dos masas electrónicas son convertidas en radiación de aniquilamiento, compuesta de dos fotones de energía igual a $0,511$ MeV. El efecto total de la interacción es la transferencia de energía $E - 2m_0c^2$ al entorno inmediato. En la Fig. 1.4 se muestra esquemáticamente la formación de pares.

1.1.2.1.5 Coeficiente másico de absorción de energía

La figura 1.5 muestra la importancia relativa de los tres procesos de interacción en carbono en función de la energía del fotón. Se puede observar que entre 20 keV y 20 MeV, la dispersión Compton es el principal mecanismo de pérdida de energía y corresponde a elementos de Z bajo. Aunque en los elementos pesados la extensión de la franja de energía donde predomina este efecto se va reduciendo gradualmente, es el principal proceso de todos los elementos entre $0,8$ y 4 MeV.

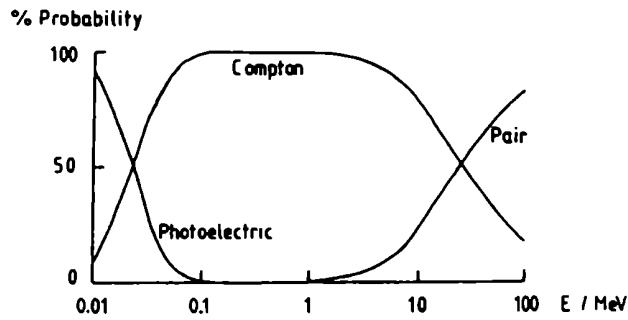


Fig. 1.5: Probabilidades relativas de los tres procesos de interacción en carbono con fotones de energías diferentes.

Los coeficientes lineales de atenuación parciales para cada uno de los tres procesos son obtenidos multiplicando la sección eficaz microscópica de cada centro de interacción por el número de estos centros por unidad de volumen. Si estos son designados por τ (fotoeléctrico), σ (Compton) y κ (pares), luego, el **coeficiente másico de atenuación total** es la suma de los coeficientes másicos de atenuación de los procesos individuales:

$$\mu = \frac{\tau}{\rho} + \frac{\sigma}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho}$$

En la determinación de la energía depositada por un haz de fotones en un material, un parámetro importante es la cantidad de energía transferida a los electrones secundarios, los cuales producen ionizaciones localmente, en la vecindad de la interacción primaria. La proporción de energía transferida a los electrones secundarios por el fotón primario está dada por el coeficiente másico de transferencia de energía:

$$\mu_{tr} = \mu \left(\frac{T_{prom}}{E} \right)$$

Por ejemplo, en la absorción fotoeléctrica, si f es la energía promedio emitida como radiación característica por fotón absorbido, luego la contribución del proceso a μ_{tr}/ρ sería

$$\frac{\tau}{\rho} \left[1 - \frac{f}{E} \right]$$

para elementos de Z bajo es aproximadamente igual τ/ρ debido a que la producción de fluorescencia es muy baja.

En el efecto Compton, el fotón disperso puede dejar el centro de interacción con una gran proporción de su energía original, y se tiene el coeficiente másico de absorción σ_a/ρ y el coeficiente másico de dispersión σ_s/ρ , los cuales son una medida de la energía promedio $T_{prom.}$ dada al electrón de retroceso y de la energía modificada del fotón que deja al haz para interactuar subsecuentemente en otra locación.

En la producción de pares, la energía cinética dada al electrón-positrón es importante, y el coeficiente másico parcial de energía transferida tiene la siguiente forma

$$\frac{\kappa}{\rho} \left[1 - \frac{2m_0 c^2}{E} \right]$$

El coeficiente másico total de energía transferida es:

$$\frac{\mu_{tr}}{\rho} = \frac{\tau}{\rho} \left[1 - \frac{f}{E} \right] + \frac{\sigma_a}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} \left[1 - \frac{2m_0 c^2}{E} \right]$$

No toda la energía del fotón transferida a la energía cinética del electrón es necesariamente absorbida localmente, sino que una proporción g de la energía transferida es convertida en “bremsstrahlung” o radiación de frenamiento.

El parámetro que finalmente representa la deposición local de energía es el **coeficiente másico de absorción de energía**:

$$\frac{\mu_{en}}{\rho} = (1-g) \frac{\mu_{tr}}{\rho}$$

La variación de μ/ρ y μ_{en}/ρ con la energía del fotón se grafica en la Fig. 1.6 para poliestireno (5). Se puede observar que los dos coeficientes difieren marcadamente a bajas energías, donde el coeficiente másico de dispersión Compton es elevado.

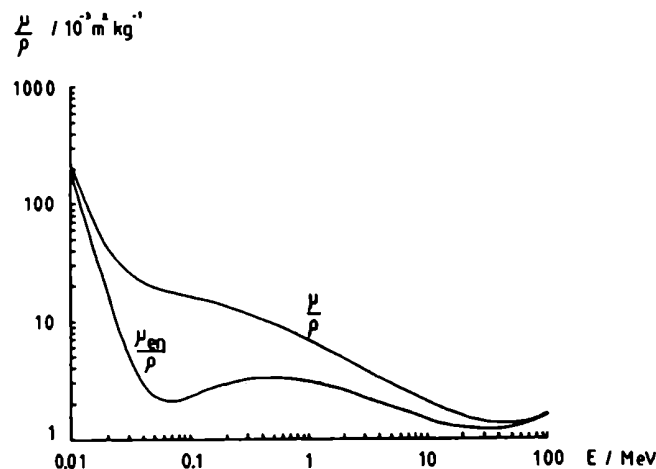


Fig. 1.6: La variación del coeficiente másico de atenuación y de los coeficientes másicos de absorción de energía en poliestireno en función de la energía del fotón. Las contribuciones de la absorción fotoeléctrica, dispersión Compton y producción de pares son aparentes.

1.1.3 Dosis absorbida

El resultado de las interacciones de los electrones y fotones con el material absorbente es la deposición de energía en el material por ionizaciones producidas por electrones secundarios. Para clarificar la relación entre causa y efecto, es necesario definir una cantidad llamada dosis absorbida, la cual es una medida de la energía depositada por unidad de masa de material.

La "International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU)" (6) ha definido la dosis absorbida como

$$D = d\bar{\varepsilon} / dm$$

donde $d\bar{\varepsilon}$ es la energía promedio impartida a un material absorbente de masa dm . La forma diferencial implica que la dosis absorbida D puede ser definida en cualquier punto del material, y se trata efectivamente de una cantidad microscópica.

La energía ε impartida por radiaciones ionizantes a un volumen dado de materia es definida como la diferencia entre la energía total (cinética y masa en reposo) de todas las radiaciones (partículas y fotones) que hayan entrando al volumen y la energía total de todas las radiaciones que hayan abandonado al volumen, menos cualquier incremento de energía de masa en reposo en el volumen después de las reacciones nucleares. En la mayoría de los casos, esta definición formal se simplifica en

$$\varepsilon = \text{Energía total entrada} - \text{Energía total salida}$$

La unidad de dosis absorbida es el gray, donde 1Gy corresponde a la absorción de 1 J /kg de material. La unidad antigua de la dosis absorbida era el rad. Una dosis absorbida de un rad corresponde a la deposición de energía de 10^{-2} J / kg y así 1 Gy = 100 rad.

1.1.4 Química de las radiaciones

1.1.4.1 Efectos directos e indirectos de las radiaciones

En los efectos de las radiaciones a nivel molecular se pueden distinguir entre los llamados efectos directos y los indirectos.

Un efecto directo es aquel que es producido en la misma molécula en la que ocurre el proceso primario. Este es el proceso dominante cuando se consideran radiaciones con alta transferencia lineal de energía, tales como neutrones y partículas α .

Alternativamente, la radiación puede interactuar con otros átomos o moléculas del material (particularmente agua) para producir radicales libres que son capaces de difundir suficientemente lejos para alcanzar y dañar "blancos" críticos. Este es el llamado efecto indirecto de las radiaciones. La acción indirecta puede ocurrir en medio sólido y seco. La irradiación de compuestos orgánicos puede dar átomos de hidrógeno libres los cuales pueden reaccionar con moléculas no dañadas. Un radical libre es un átomo o molécula libre que tiene un orbital

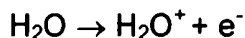
electrónico no apareado en la capa externa.

Un orbital electrónico no sólo gira alrededor del núcleo del átomo o de la molécula sino que también sus spines giran alrededor de su propio eje. En un átomo o molécula con un número par de electrones, los spines están apareados, para cada electrón con spin paralelo hay otro antiparalelo. Este estado está asociado con un alto grado de estabilidad química.

Un átomo o molécula con un número impar de electrones tiene un electrón en la capa más externa para el cual no hay otro electrón con spin opuesto, este es un electrón desapareado. Este estado está asociado con alto grado de reactividad química.

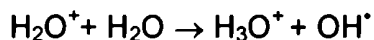
1.1.4.2 Radiólisis del agua

Un ejemplo típico de producción de radicales libres secundarios es la radiólisis del agua. Como resultado de la interacción de un fotón de rayos X o γ , o de una partícula cargada tal como un electrón o un protón, la molécula de agua puede ser ionizada. Esto puede ser expresado como:



El evento radiolítico inicial lleva usualmente a la formación de H_2O^+ y e^- ; pero inmediatamente se forman radicales hidroxilo (OH^\bullet) y electrones solvatados (e_{aq}^-). El H_2O^+ es un ion radical, es un **ion** pues ha perdido un electrón y un **radical libre** porque contiene un electrón desapareado en su capa externa resultando altamente reactivo. La vida media de estos radicales libres es extremadamente

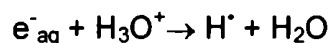
corta del orden de 10^{-10} segundos. Decaen para formar otros radicales libres, los cuales no están eléctricamente cargados pero siguen teniendo un electrón desapareado. En el caso del agua, el ion radical reacciona con otra molécula de agua para formar el radical hidroxilo que es altamente reactivo:



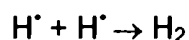
El radical hidroxilo posee nueve electrones, uno de ellos desapareado, lo cual le confiere una elevada reactividad. En el proceso de formación del radical hidroxilo se forma también el ion hidronio.

También se observan con bajo rendimiento hidrógeno atómico (H^{\bullet}) y peróxido de hidrógeno y se deben a reacciones de las especies primarias, esto es, e^-_{aq} , H_3O^+ y OH^{\bullet} , en las regiones de elevada pérdida de energía o ramales.

La existencia del e^-_{aq} fue cuestionada por varios años, se consideraba como principal agente reductor al H^{\bullet} y otras formas más exóticas. El electrón solvatado (o electrón acuoso o electrón hidratado) fue descrito por Platzman en 1953 (7) y esta descripción ha sido ampliamente aceptada. Su identidad fue principalmente confirmada tanto por mediciones cinéticas como por la identificación del singular espectro de absorción. El electrón acuoso es completamente estable con respecto a su reacción con agua, la constante de velocidad de esta reacción es de 200 mol/s (8).

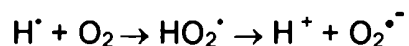
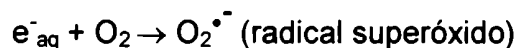


Estas especies se recombinan dando:



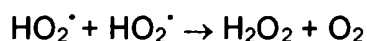


La presencia de un exceso de oxígeno durante la irradiación permite la formación de radicales libres adicionales:

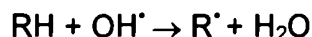


(hidroperóxido)

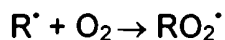
Los radicales HO_2^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet -}$ están en equilibrio con pK de 4,7.



Además, cuando las moléculas orgánicas (RH) se combinan con radicales libres hidroxilos, se forman radicales libres orgánicos (R^\bullet).



Los radicales libres orgánicos (R^\bullet) se combinan con O_2 para formar radical libre peróxido RO_2^\bullet (radical peróxido).



Por lo tanto, la presencia de un exceso de oxígeno permite la formación de dos radicales libres adicionales, el hidroperóxido (HO_2^\bullet) y el peróxido (RO_2^\bullet). Estos pueden, en parte explicar el incremento del daño por radiaciones, especialmente en sistemas biológicos, en presencia de un exceso de oxígeno (9).

1.1.4.3 Localización espacial de los eventos.

Para cada tipo de radiación (α , β , γ , neutrones, etc.) los eventos químicos producidos por el pasaje de la radiación a través del medio se extiende a lo largo de la traza de radiación. La química subsiguiente depende críticamente de la transferencia lineal de energía (LET, por sus siglas en inglés).

La radiólisis con radiación de bajo LET, tal como electrones rápidos y radiación γ , lleva a la producción de eventos químicos aislados a lo largo de la traza de radiación en el medio. La radiólisis de alto LET pone los eventos juntos en

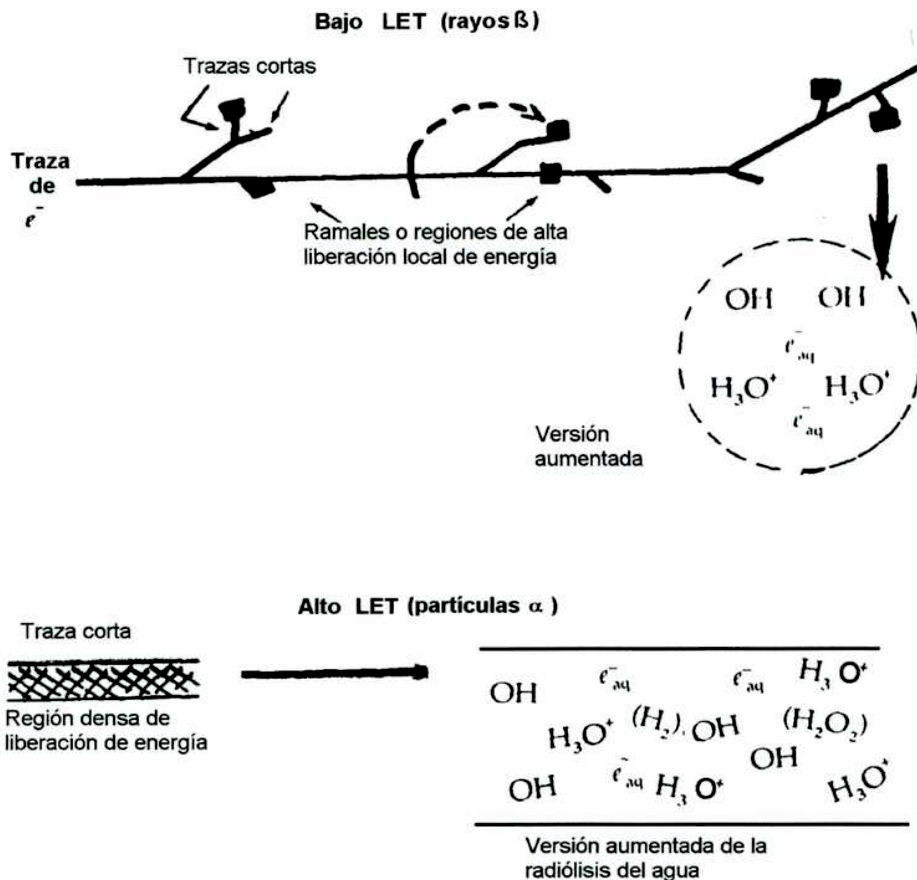


Fig. 1.7: Esquema de los eventos de la radiación con radiaciones de bajo y alto LET.

una traza muy corta y los eventos químicos agrupados, apretadamente juntos, en

cortos cilindros. Bajo condiciones de alto LET, la radiación produce especies químicas de alta concentración y la reacción intra-traza es más grande que la interacción traza-soluto. Con radiación de bajo LET, la interacción traza-soluto es más importante. La radiólisis del agua con radiación de bajo LET pero alta intensidad (v. gr. haces de electrones por pulsos), tiende a simular los efectos de las partículas α (alto LET). Las trazas de bajo LET se superponen y la concentración de radicales libres incrementa; estos eventos llevan a reacciones radical-radical similares a aquellas que ocurren en la traza simple de alto LET de radiación (10). La Fig.1.7 ilustra este efecto para radiaciones de alto y bajo LET.

1.1.4.4 Valores G

Para comparar el rendimiento relativo de las diferentes especies químicas producidas como resultado de la deposición de energía de partículas ionizantes se utilizan los valores G. El valor G se define como el número de moléculas formadas o destruidas como resultado de la deposición de 100 eV de energía de un electrón secundario ionizante.

En la Tabla 1.2 se dan los valores iniciales de G de los productos

Tabla 1.2: Rendimiento de productos primarios de la radiólisis del agua a pH neutro.

Productos	Valores G
e_{aq}^-	2,6
H^\cdot	0,6
OH^\cdot	2,6
H_2	0,45
H_2O_2	0,75

radiolíticos primarios del agua a pH neutro [datos compilados por Thomas (11)].

1.2 Utilización de las radiaciones ionizantes en la obtención de biomateriales usados en biotecnología

Antes de la segunda guerra mundial, las radiaciones se utilizaron, fuera del laboratorio, en radiografía, en medicina y en la industria de los diales luminosos. Con el desarrollo posguerra de la energía nuclear, las radiaciones tuvieron amplio uso en la industria, la medicina y las investigaciones. Sus aplicaciones presentes son tan numerosas y variadas que no se puede dar aquí una lista completa de ellas.

Desde el descubrimiento de la radiación, del espectro de la radiación y de la capacidad de causar ionización en la materia, una tremenda cantidad de investigaciones ha sido realizada sobre los efectos de este fenómeno. La profundización de estos conocimientos científicos ha resultado en un gran número de aplicaciones que beneficiaron a la humanidad. Especialmente, en los cuidados de la salud y la prevención de enfermedades se han usado ampliamente las radiaciones X, beta y gamma.

La aplicación industrial de las radiaciones para procesos químicos, esto es, la química de las radiaciones, ha sido de un gran valor para la salud y el bienestar de la sociedad. Un ejemplo lo constituyen las reacciones de polimerización por radiaciones que han permitido la producción de materiales poliméricos puros sin las impurezas que produce el uso de los iniciadores de la polimerización convencional.

Los primeros polímeros hechos por el hombre que lograron aceptación fueron los poli(metacrilato de metilo). Al final de la guerra se observó que muchos

pilotos tenían en sus ojos astillas de PMMA de las torretas de los aviones y que eran sorprendentemente muy bien toleradas. Pero el primer polímero de elección, precursor de los hidrogeles, fue el alcohol polivinílico (PVA). Este fue entrecruzado con formaldehído y resistió las temperaturas de autoclavado. La reacción del tejido a los implantes fue muy suave, pero después de períodos prolongados se observaron encogimiento y calcificación. Sin embargo sus aplicaciones en cirugía plástica, como prótesis en reemplazo de tejido óseo y luego de la extirpación de tumores han sido informadas como exitosas.

En la década del 50 Wichterle y Lim sintetizaron un polímero hidrofílico, basado en metacrilato de hidroxietilo (HEMA) y entrecruzado con diésteres del ácido metacrílico y mono, di y tri-etilenglicoles (12). A pesar de algunos problemas tecnológicos en los comienzos, los poli(HEMA) han hecho una tremenda carrera como material biotolerable, fundamentalmente como el principal componente de los lentes de contacto, pero también en muchos otros campos de la medicina. Los polímeros de HEMA y sus varias combinaciones con otros polímeros (hidrofílicos e hidrofóbicos) son, hasta ahora, los materiales hidrogélicos más frecuentemente usados para propósitos médicos.

Al comienzo de la década de los cincuenta, los pioneros de la química de radiaciones de polímeros realizaron algunos experimentos de entrecruzamiento por radiaciones, también con polímeros hidrofílicos. Sin embargo, los hidrogeles fueron analizados principalmente desde el punto de vista de los fenómenos asociados con mecanismos de reacción, topología de la trama, y las relaciones entre los parámetros de los procesos de radiación.

Pertenecen a esta época las monografías fundamentales de la física y la química de la radiación de polímeros que fueron escritos por Charlesby (13) y Chapiro (14).

El interés en la aplicación de la radiación para obtener hidrogeles con propósitos biomédicos comenzó al final de la década del sesenta con el resultado de publicaciones y patentes realizadas por científicos japoneses y americanos. Entre otros, el grupo encabezado por Kaetsu del "Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment" así como también el de Hoffman y sus colegas del "Center of Bioengineering, University of Washington", han creado la base para difundir el interés en el campo de los biomateriales obtenidos por medio de la técnica de radiación. La inmovilización de especies biológicamente activas en matrices de hidrogeles, su uso como sistemas de liberación de drogas y el entrapamiento de enzimas así como también la modificación de la superficie de materiales para mejorar su biocompatibilidad y su capacidad para ligar antígenos y anticuerpos han sido los principales temas de sus investigaciones (15, 16).

1.2.1 Inmovilización de biocomponentes en matrices poliméricas

La aplicación de las técnicas de radiación en biociencias, tales como la biotecnología y la bioingeniería, es uno de los más importantes campos de investigación en el presente y el futuro.

Este campo de investigación puede clasificarse en dos grupos: a) Uno es el de las investigaciones biotecnológicas de los efectos de las radiaciones en los biocomponentes para modificar sus propiedades, que incluyen inactivación,

mutación y estimulación y b) el otro, el de las investigaciones de bioingeniería en los tratamientos de manufactura de biocomponentes con materiales poliméricos usando radiaciones, que comprenden: inmovilización, protección y cultivos celulares (17).

De acuerdo a otra clasificación, la aplicación de las radiaciones en la técnica de polimerización puede dividirse en dos grupos: a) Estudio y desarrollo de polímeros biocompatibles para usos biomédicos tales como órganos artificiales; b) Estudio de materiales poliméricos biofuncionales para usos biomédicos y bioquímicos tales como inmovilización, sistemas de liberación de drogas, materiales para inmunodiagnóstico y cultivos de células.

El estudio y desarrollo de materiales poliméricos biofuncionales puede ser adicionalmente clasificado en dos grupos de acuerdo al método técnico usado para la inmovilización de los biocomponentes: a) Inmovilización por uniones químicas y b) Inmovilización por entrapamiento físico. La técnica de inmovilización por unión química consiste en injertar por radiación sobre un soporte polimérico hidrofóbico, como por ejemplo el polietileno, un monómero hidrofílico como el ácido acrílico, de esta forma se introducen en la cadena hidrocarbonada grupos químicos funcionales (-COOH) que pueden ser activados por reacciones químicas específicas, así luego pueden formar uniones primarias con las especies que deben ser inmovilizadas (usualmente a través de grupos $-NH_2$ de estas especies). Hay numerosos trabajos usando procesos con radiaciones, más técnicas de inmovilización química. Muchos trabajos en este campo han sido realizados en Estados Unidos y Europa. Hoffman y colaboradores (18, 19, 20) han usado dos técnicas químicas para ligar heparina y varias

proteínas a hidrogeles injertados (grafeados) por radiaciones. Los dos principales monómeros usados como sitios de unión fueron metacrilato de hidroxietilo, usando la activación del bromuro de cianógeno, y el ácido metacrílico, usando la activación de la carbodiimida.

Rembaun y colaboradores (21, 22, 23, 24, 25) han originado e investigado extensivamente la radiopolimerización de emulsiones de monómeros y entrecruzadores produciendo microesferas de 100 Å a 1 μ de tamaño, sobre las cuales ha sido inmovilizada una amplia variedad de especies biológicamente activas. Las aplicaciones bioquímicas y biomédicas de estas únicas y funcionales esferas poliméricas han sido enumeradas de acuerdo al tamaño de las partículas:

1) Microesferas de 100-3000 Å: marcadores celulares para microscopía electrónica de barrido.

2) Microesferas de 3000-10.000 Å: marcadores celulares para microscopía óptica, radioinmunoensayo, pruebas de aglutinación, estudios de fagocitosis, estudios de circulación sanguínea, estudios de inhalación.

3) Partículas de 1 μ -100 μ : cromatografía por afinidad (inmunoadsorbentes) y reactores químicos.

En numerosos estudios han ligado químicamente anticuerpos específicos para el uso como inmunoadsorbentes. Estas esferas pueden ser adsorbidas sobre sitios antigénicos específicos de las superficies de las células o reaccionar con antígenos solubles dentro del cuerpo o pueden ser usadas para marcar células para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido o microscopio óptico

o para diagnóstico clínico de varias enfermedades por pruebas de aglutinación del suero.

Una amplia variedad de composiciones de microesferas ha sido preparada con el grupo funcional principal ligado al -OH del metacrilato de hidroxietilo o al grupo -CO₂H del ácido acrílico o ácido metacrílico, usando la misma técnica de inmovilización química que en los trabajos de injertos de Hoffman. La principal ventaja de la radiación es que las microesferas resultan prácticamente libres de impurezas tales como catalizadores y emulsificadores.

El otro método de inmovilización es por entrapamiento físico que consiste en la polimerización, curado y entrecruzamiento por radiaciones de las soluciones y/o dispersiones de biocomponentes con polímeros o monómeros. El grupo de Kaetsu y colaboradores (26, 27, 28, 29, 30), han estudiado este campo desde 1979, desarrollando varias formas de aplicación en los años recientes (31).

1.2.2 Características del método de inmovilización por entrapamiento físico

El principio fundamental de este método es la mezcla de los biocomponentes y los componentes monoméricos o poliméricos, el moldeado y la gelación con radiación proveniente de un acelerador de electrones o de una facilidad gamma.

La primera característica es la aplicabilidad general a biocomponentes. Este método puede ser aplicado para la inmovilización de compuestos de bajo y alto peso molecular, células y microorganismos sin límite de tamaño, forma, estructura química y propiedades físicas.

La segunda característica es la aplicabilidad general a monómeros, prepolímeros y polímeros como portadores (carriers) o soportes materiales. Estos materiales, que no tienen ningún grupo funcional específico al cual se ligue el biocomponente, pueden ser usados para producir la gelación formando compuestos sólidos insolubles bajo condiciones suaves. Por lo tanto, de acuerdo al uso se pueden elegir diferentes "carriers" o soportes que tengan amplio rango de propiedades químicas, físicas y biológicas tales como hidrofiliidad, hidrofobicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, permeabilidad para varias sustancias y resistencia mecánica.

La tercera característica es la aplicabilidad general para la obtención de las más variadas formas y estructuras del producto como también de los diferentes estados de distribución de los biocomponentes en el polímero. La mezcla de los componentes puede ser moldeada y solidificada dentro de cualquier forma deseada de acuerdo a su uso. Se pueden obtener varillas cilíndricas, tabletas, agujas, clavos, usando el método de distribución dentro de un molde de forma deseada. Para obtener membranas, láminas o tubos la mezcla se distribuye en una capa sobre la superficie de una base de material tal como films plásticos o tubos y luego se cura o polimeriza por radiación. También la mezcla se puede polimerizar en tubos cilíndricos formando varillas cilíndricas que luego se cortan con un micrótopo en membranas muy delgadas. Por otra parte, para preparar productos en forma de partículas, la mezcla se dispersa en un medio adecuado de acuerdo al método convencional para formar una suspensión o una emulsión y luego se irradia para formar pequeñas partículas, como microesferas. Partículas tipo microcápsulas y liposomas se pueden preparar de acuerdo, a los métodos

convencionales incluyendo los biocomponentes dentro de una capa polimérica. No sólo se han usado polímeros de vinilo, sino que también policondensación y poliadición de polímeros tales como polipéptidos y ácido poliláctico, o polímeros naturales tales como celulosa y proteínas. En estos casos, el polvo de los polímeros se mezcla con los biocomponentes, se les da forma por moldeado con calor y presión (método de prensado en caliente) y después se irradian produciendo entrecruzamiento o degradación para controlar las propiedades del producto final.

El estado de distribución de los biocomponentes en el polímero también puede ser controlado por entrapado. La distribución puede ser concentrada en la superficie del polímero usando algunas técnicas como la dispersión directa sobre la superficie y la separación de fases por congelado. Los biocomponentes pueden ser concentrados en el centro del polímero usando una técnica tal como el laminado en capas y solapado repetido. La distribución homogénea en la matriz polimérica se logra mezclando homogéneamente los componentes y luego polimerizando. La distribución superficial resulta ventajosa cuando se necesita que sustancias de alto peso molecular tales como polímeros naturales y anticuerpos o antígenos estén disponibles para reaccionar. La distribución central o interior tiene su mérito para la liberación controlada de compuestos de moléculas relativamente pequeñas tales como las drogas. La distribución homogénea puede ser usada tanto para la liberación como para la fijación. En general, la característica más importante del método de entrapamiento es que puede ser aplicado tanto para la liberación como para la fijación de biocomponentes. La firmeza o fuerza de la inmovilización puede ser variada o controlada en el método de entrapamiento

dependiendo de varios factores tanto de los biocomponentes (peso molecular, concentración, solubilidad en el medio) como de los polímeros (hidrofilicidad, porosidad, degradabilidad) y de las condiciones de uso (pH, temperatura, etc).

Comparado con el método de unión química, el método de entrapamiento físico resulta único y ventajoso para el propósito de liberación controlada de sustancias de peso molecular relativamente bajo y para la fijación y el cultivo de células de gran tamaño, vivas y en crecimiento. Por supuesto, este método sirve también para la fijación de enzimas y anticuerpos para su uso repetido o continuo.

1.2.3 Propiedades de los hidrogeles obtenidos por polimerización radioinducida

Existen algunas diferencias en los significados del término hidrogel. Hablando simplemente, los hidrogeles son una forma física de polímeros. Usualmente son sistemas de dos o más componentes, uno de los cuales tienen propiedades hidrofílicas. Son insolubles en agua pero se hidratan hasta llegar a un estado de equilibrio. En el estado hinchado son flexibles y elásticos pero mantienen en la memoria la forma del estado seco. En los hidrogeles formados por radiaciones las macromoléculas están conectadas entre sí a través de uniones covalentes. Esto hace que no se disuelvan aún a altas temperaturas, en contraste con los llamados hidrogeles físicos, formados como resultado de una débil interacción entre cadenas. Las uniones hidrógeno, usualmente responsables de su formación son rotas fácilmente a temperaturas elevadas, así que los hidrogeles físicos pueden disolverse. Ejemplos de tales polímeros son: gelatina, agar,

alginatos, dextrano, así como también el poli(óxido de etileno) o alcohol polivinílico entrecruzados. Estos dos últimos son capaces de formar agregados con una estructura parcialmente cristalina. A menudo se usa para formación de tales hidrogeles un procedimiento de enfriamiento-descongelamiento. Las uniones covalentes que unen las cadenas de los hidrogeles “verdaderos” son las mismas uniones que las de las cadenas principales, y resultan resistentes a cualquier solvente o calentamiento. Pueden ser rotas por reacciones químicas o por tensión, tal escisión es irreversible. Las cadenas del hidrogel están conectadas en forma de una red tridimensional, por lo tanto su peso molecular tiende a infinito. Esta red se muestra esquemáticamente en la Fig. 1.8.



Fig. 1.8: Esquema de la red de hidrogel. El círculo muestra el espacio disponible para la difusión.

El espacio entre cadenas representado por un círculo, es accesible para la difusión de solutos. En el estado hinchado este espacio contiene agua, o en forma general, las moléculas de solvente. La dimensión característica de esta región, el tamaño de la malla, depende del grado de entrecruzamiento o sea de la densidad

de los puntos de unión. Si el grado de entrecruzamiento es alto, solamente pequeñas cantidades de agua pueden ser absorbidas. Este esquema tan “idealizado” de la red no tiene en consideración algunos defectos que pueden aparecer durante la formación: cruzamientos colgantes, rulos de cadenas o enredamiento, etc. También la funcionalidad de los entrecruzamientos puede ser diferente. Sin embargo, la representación esquemática de la red de hidrogel, tratada como una red tipo “fantasmal”, permite describir las propiedades de los hidrogeles con una precisión razonable y predecir su comportamiento.

La condición general de formación de la red de hidrogel es la existencia de la cadena de polímero. Esto es verdadero si el sistema inicial bajo irradiación contiene solamente monómero(s). El primer proceso que ocurre en ese caso es la polimerización del monómero. Las reacciones de entrecruzamiento, necesarias para la formación de las cadenas de polímero, pueden aparecer después de algún tiempo. Si la composición inicial contiene, por ejemplo, no sólo el monómero vinílico sino que también pequeñas cantidades de aditivos bi- o multifuncionales, esto es un monómero con dos grupos vinilo, la reacción de polimerización del monómero principal va acompañada por la formación de algunos puentes entre las cadenas recientemente formadas, construidas con las especies multifuncionales. Esto último puede ser incorporado vía doble unión entre dos cadenas diferentes (copolímero) o puede ser injertado sobre las dos cadenas.

Estos procesos son llamados “aumento de entrecruzamiento” y a menudo son aplicados en tecnología. Permiten alcanzar un alto grado de entrecruzamiento con pequeñas dosis y manipular las propiedades del producto final por cambios de las cualidades de los aditivos. Un ejemplo clásico de tales procesos es el

entrecruzamiento por radiación del metacrilato de hidroxietilo (HEMA) el cual, si no es purificado por un procedimiento especial, siempre contiene alguna cantidad de monómeros bifuncionales, como dimetacrilato de etilenglicol. Se forma un gel insoluble como resultado de la irradiación de una solución con una baja dosis, aunque el monómero no es completamente convertido.

Los polímeros pueden ser entrecruzados por radiaciones en diferentes condiciones tanto en estado sólido como en solución. Sin embargo, el entrecruzamiento en estado sólido requiere altas dosis. Antes que la primera fracción insoluble de gel aparezca en el sistema a una llamada dosis de gelación, D_g , la cantidad de puntos de unión debe ser igual a la cantidad total de macromoléculas. Estadísticamente cada cadena tiene que ser conectada con otra. Tal definición de punto de gelación no significa que todas las cadenas están conectadas. La distribución de puntos de unión a lo largo de las cadenas tiene un carácter aleatorio, para la D_g hay cadenas con un gran número de puntos de unión así como también de cadenas no unidas. En términos prácticos, la dosis de gelación puede ser definida aproximadamente como la dosis en la cual pequeñas cantidades de gel pueden ser separadas del sistema. La irradiación adicional de la muestra por encima de la dosis de gelación incrementa la cantidad de la fracción gelificada, aunque una parte de las macromoléculas pueden permanecer no ligadas.

Como consecuencia de la interacción de la radiación con los polímeros se forman especies reactivas intermedias. Los radicales en las cadenas de polímero, si están favorablemente colocados, pueden reaccionar con otra y formar nuevas uniones covalentes entre cadenas separadas. Usualmente la cantidad de

uniones de entrecruzamiento formadas es mucho menor que la cantidad de macrorradicales, por lo tanto la producción de entrecruzamientos por radiación es considerablemente menor que la producción de macrorradicales. Los macrorradicales pueden sufrir varias transformaciones y sólo algunos de ellos pueden encontrarse en posiciones que le permitan la recombinación mutua. Además, la movilidad de las cadenas en estado sólido es limitada, especialmente en el caso de las regiones cristalinas. La producción de entrecruzamiento se puede aumentar realizando la irradiación a temperaturas por encima de la de fusión de los polímeros, pero los cambios no son demasiado grandes y desde el punto de vista tecnológico se aumenta el consumo de energía. Si el oxígeno está presente durante la irradiación, reacciona con los macrorradicales, los cuales pueden causar reacciones consecutivas llevando a la escisión de las cadenas principales. Como resultado, las dosis de gelación de la mayoría de los polímeros hidrofílicos en estado sólido están por encima de los 100 kGy (32).

Parte de estos problemas desaparecen si los polímeros son irradiados en solución. Las macromoléculas pueden moverse libremente y cambiar su posición, también la remoción de oxígeno resulta relativamente fácil (por saturación de la solución con gases inertes, *v. gr.* argón, nitrógeno o por desgaseado de la solución antes de la irradiación). El solvente más usado es el agua. La aplicación para propósitos biomédicos de los hidrogeles obtenidos en solución acuosa no causan ningún problema adicional como son la interacción de los residuos de solvente con los tejidos vivos y/o los problemas de recuperación del solvente orgánico de los productos. Pero más importante aún, por razones tecnológicas, es el alto rendimiento de los intermediarios de la radiación, es decir las especies reactivas

que se forman por la acción de la radiación en el agua, las cuales pueden promover reacciones en los polímeros.

Las radiaciones ionizantes son absorbidas en la solución proporcionalmente a la fracción electrónica de los componentes. En soluciones diluidas los polímeros absorben directamente sólo una pequeña fracción de energía. Consecuentemente, el efecto directo es relativamente pequeño, y la mayoría de los procesos es causada por la acción de los productos primarios de la radiólisis del agua, es decir por el efecto indirecto de las radiaciones.

El evento inicial, cuando las moléculas de agua absorben la alta energía de la radiación, es la formación de sus estados excitados y iones. La molécula excitada puede ionizarse, disociarse o simplemente retornar a su estado fundamental. El electrón liberado pierde energía en posteriores eventos de ionización y excitación y finalmente se termaliza y solvata. Después de 10^{-12} s del evento de ionización inicial las especies como: electrones, OH^* y H_3O^+ , junto con algunos otros productos de disociación de la molécula de agua excitada se localizan en los ramales y comienzan a difundir. En general se acepta que en 10^{-8} s después del pasaje de la radiación las especies primarias están homogéneamente distribuidas en todo el volumen del sistema (33). Entre los productos primarios son altamente reactivos los radicales hidroxilos, los electrones hidratados y los átomos de hidrógeno. Por esto, en soluciones acuosas de polímeros se puede esperar que ellos reaccionen con las macromoléculas. Las investigaciones de la reactividad de dichas especies dentro de polímeros formadores de hidrogeles como poli (óxido de etileno), alcohol polivinílico, poli(vinil

pirrolidona) y poli(ácido acrílico) han indicado que la velocidad de reacción del electrón solvatado es relativamente baja. La constante de velocidad, medida por la técnica de radiólisis por pulsos, se encontró que es del orden de $10^6 \text{ dm}^3 / \text{mol s}$. Mientras que, las constantes de velocidad de las reacciones de los radicales

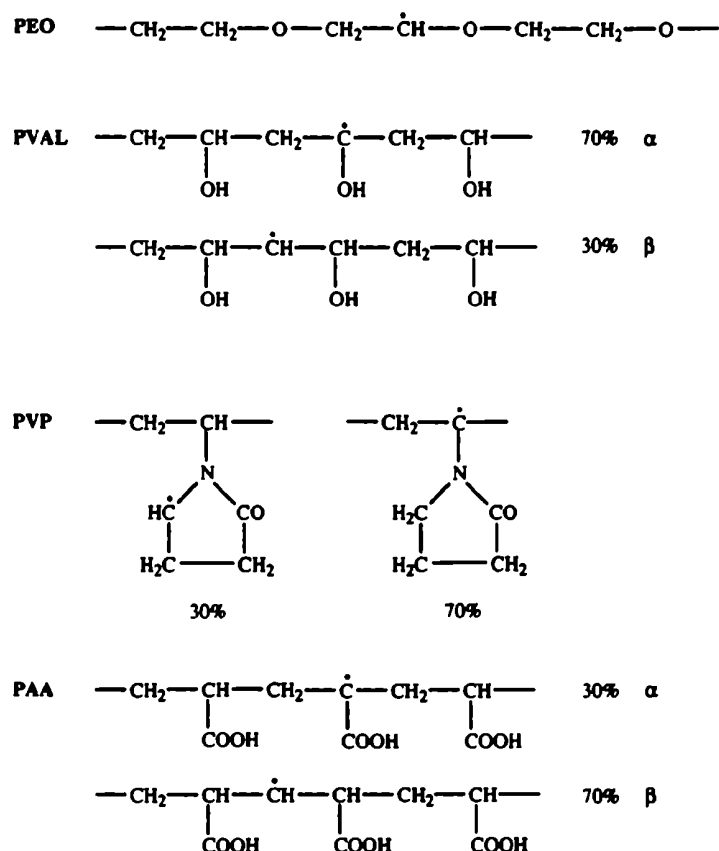


Fig. 1.9: Fracciones estimadas y estructuras de macrorradicales originados por la reacción de radicales hidroxilo con polímeros: PEO- poli(óxido de etileno), PVAL – alcohol polivinílico, PVP- poli(vinil pirrolidona), PAA- poli(ácido acrílico).

hidroxilos con los mismos polímeros resultaron ser tan altas como $10^8 \text{ dm}^3 / \text{mol s}$, se llegó a la conclusión que las principales especies de la radiólisis del agua que reaccionan con los polímeros son los radicales hidroxilos. Ellos atacan las macromoléculas y extraen átomos de hidrógeno. Las estructuras de los

macrorradicales resultantes dependen del tipo de polímero. En el caso del poli(óxido de etileno) sólo un tipo de macrorradical puede ser formado: todos los átomos de hidrógeno en la unidad de monómero son equivalentes y los macrorradicales formados primariamente tienen la misma estructura química. Las estructuras de los macrorradicales formados como resultado de la extracción de hidrógeno por los radicales hidroxilo en el caso de algunos polímeros hidrofílicos son mostrados en la Fig. 1.9 (34, 35).

1.2.4 Aplicaciones de los hidrogeles

1.2.4.1 Sistemas de liberación de drogas

La utilidad de los sistemas de liberación de drogas se atribuye a dos funciones principales: la liberación controlada de drogas desde el polímero con una velocidad y período deseados, y la posibilidad de llegar con una concentración selectiva de droga al tejido u órgano blanco. La liberación controlada en forma prolongada tiene dos propósitos principales: la prevención de las reacciones secundarias indeseables, y evitar en los médicos y los pacientes las incomodidades y el sufrimiento causados por las administraciones frecuentes. Otros propósitos son: la liberación cíclica, la liberación "on-off" y la liberación simultánea de múltiples drogas. Como es sabido, en la quimioterapia del cáncer, se desean prevenir las reacciones secundarias perjudiciales e incrementar la biodisponibilidad de la droga anticáncer. Estos problemas han limitado el desarrollo extensivo de la quimioterapia. Desde 1975, el grupo de Kaetsu (36, 37,

38, 39) ha utilizado en quimioterapia compuestos de polímero-anticáncer obtenidos por la técnica de atrapamiento por radiaciones y colocados localmente en el tumor, de esta forma el anticáncer embebe por contacto directo al tejido tumoral. Este método tiene dos funciones: de blanco local y liberación controlada segura. Principalmente tres formas de compuestos han sido usadas para este propósito: botones, agujas y microesferas. Los compuestos de tipo no biodegradables consisten en un anticáncer tal como: mitomicina C, adriamicina, *cis*-platino o 5-fluorouracilo, y un copolímero vinílico tal como dimetacrilato de dietilenglicol-dimetacrilato de polietilenglicol#600 (80%-20%), en el cual se obtiene el balance hidrofílico-hidrofóbico de los componentes. Los compuestos de tipo biodegradables consisten en un anticáncer y un polímero biodegradable tal como: proteínas, polipéptidos o ácido poliláctico. La implantación en animales enfermos de cáncer produjo efectos tales como la prolongación del período de supervivencia y la inhibición del crecimiento del tumor sin producir reacciones secundarias.

Protocolos clínicos han sido llevados a cabo en pacientes con cáncer severo en varias universidades de todo Japón. Más de 250 personas con cáncer del aparato digestivo y urinario han sido tratadas durante seis años con compuestos anticáncer-polímeros de vinilo. Los compuestos de tipo botón han sido aplicados principalmente en cáncer de páncreas inoperables y los de tipo agujas, en cáncer de hígado. De acuerdo a los resultados de estos estudios clínicos, principalmente tres tipos de efectos han sido informados: la reducción del sufrimiento, reducción del tamaño del tumor y la prolongación de la supervivencia. Una notable desaparición o disminución de los sufrimientos severos fue observada en los estadios serios del cáncer justo después de la implantación y resultó efectiva

en casi el 80% de los pacientes. Sin embargo, también se observó que el aspecto más característico de esta forma de quimioterapia local fue el limitado alcance de difusión de la droga en el tejido tumoral alrededor del compuesto. Los alcances máximos fueron 0.5 cm² para los compuestos tipo aguja y 0.5-1 cm² para los de tipo botón. La necrosis completa del tumor fue observada dentro del alcance de la droga. Por lo tanto el efecto de la quimioterapia resultó limitada por el alcance de difusión de la droga. En este sentido, la quimioterapia local puede ser llamada terapia de necrosis. Además se observó que la liberación y difusión dentro del tumor sólido son completamente diferentes de las observadas en soluciones acuosas en los sistemas *in vitro*. La difusión de la droga anticáncer finalizó dentro de los tres a cinco días, y luego, previno el posterior aumento del tejido alrededor de la necrosis. Por otra parte, la inyección local de anticáncer dentro del tumor sólido no produjo necrosis efectiva. Los investigadores sugieren que aún deben realizarse más estudios para encontrar la efectiva combinación y la óptima composición de drogas, polímeros y otros aditivos para aumentar el alcance de la difusión de drogas y la necrosis del tumor. Se espera que este nuevo campo de terapia reciba mayor desarrollo dependiendo de esta forma de mejoramiento.

1.2.4.2 Inmovilización de hormonas y sus aplicaciones

La inmovilización por entrapamiento fue aplicada a hormonas. La aplicación a hormonas difiere de la aplicación de las drogas anticáncer en los siguientes aspectos. Primero, la mayoría de las hormonas no tienen reacciones secundarias significativas en oposición a las drogas anticáncer. Segundo, la

cantidad de liberación diaria de hormona requerida es mucho más baja que la del anticáncer. Más aún, usualmente la administración de hormona debe ser continuada por un período de tiempo más largo que la administración del anticáncer. El principal propósito de la inmovilización de hormonas es solucionar los grandes errores y sufrimientos de la administración diaria durante largos períodos de tiempo por la liberación constante también durante mucho tiempo de pequeñas cantidades de hormona desde el polímero (40, 41). Se ha determinado que varias hormonas pueden ser liberadas de polímeros de metacrilato por largos períodos manteniendo un nivel constante del orden de algunos microgramos por mililitro de suero.

Las hormonas inmovilizadas han sido aplicadas en terapia hormonal para cáncer de próstata usando compuestos con hormona luteinizante-hormona liberante análoga (LH-RH) inmovilizada. Esta sustancia fue inmovilizada por radiopolimerización de copolímeros no biodegradables de metacrilato y también por prensado en caliente de polímeros biodegradables tales como polipéptidos y ácido poliláctico (42). Estos compuestos fueron embebidos bajo la piel. La liberación de hormona en el suero continúa constantemente hasta dentro de un año desde los polímeros no biodegradables y por varias semanas desde los compuestos biodegradables. Un efecto fisiológicamente notable que se observó fue la reducción de la próstata. Un resultado clínico exitoso fue logrado con los compuestos no biodegradables y pero todavía no se han obtenido resultados clínicos con los biodegradables. Para este propósito, compuestos tipo multicapas fueron preparados por polimerización inducida por radiaciones o curado de

laminados multicapas con las drogas incorporadas en la capa central para mantener una velocidad de liberación constante.

La aplicación a la inmovilización de sustancias inmunológicamente útiles parece ser una de las áreas de mayor interés. Se está estudiando la inmovilización de una hormona específica que estimula el crecimiento de las células T y elimina las células tumorales por una función inmunológica. La liberación controlada y protegida de sustancias inmunológicamente activas es ventajosa debido su inestabilidad *in vivo*.

1.2.4 3. Aplicaciones en cultivos de células

1.2.4.3.1 Inmovilización y cultivo de levaduras

También se ha estudiado la inmovilización de células incluyendo sistemas enzimáticos (43, 44, 45, 46), organelas (47, 48), componentes de la sangre (49) y antígenos (50). La técnica de inmovilización ha sido aplicada y desarrollada en el campo del cultivo de células en crecimiento (51, 52). El propósito de inmovilización de células en matrices poliméricas es promover el crecimiento celular, la fusión y la producción de sustancias útiles de estas células tales como enzimas, hormonas y anticuerpos. Este campo es característico de la aplicación del método de entrapamiento físico puesto que el método de ligaduras químicas no es aplicable a células en crecimiento.

La primera aplicación a cultivos celulares fue investigada en levaduras que por fermentación convierten glucosa en etanol. *Saccharomyces formosensis* fue

inmovilizada en varios polímeros obtenidos por polimerización radioinducida y cultivada (53, 54, 55). Luego, el cultivo de las células inmovilizadas fue usado para el proceso de fermentación de alcohol. De acuerdo a los resultados, las levaduras inmovilizadas tienen mayor actividad fermentativa para producir alcohol que las levaduras libres cultivadas en suspensión. Este fenómeno ha sido atribuido a la mayor concentración de células crecidas por unidad de volumen de la matriz polimérica que en la suspensión de células libres. Se observó que el crecimiento y la actividad fermentativa de las células inmovilizadas se incrementa con el aumento de la hidrofiliidad del polímero. En el caso del cultivo de levaduras, el entrapamiento en un polímero blando, flexible e hidrofílico resulta muy ventajoso para células en crecimiento.

1.2.4.3.2 Inmovilización y cultivo de hongos filamentosos

La técnica de inmovilización fue aplicada también al cultivo de un hongo filamentosos, *Trichoderma reesei*, productor de celulasa (56, 57, 58). En este caso, el grado de crecimiento fue evaluado por la actividad en papel de filtro del medio de cultivo en el cual se libera la enzima, correspondiéndose con la concentración de enzima (celulasa).

Se ha encontrado que el crecimiento y la producción de celulasa de células inmovilizadas de *Trichoderma* fue dos veces más grande que la de células libres cultivadas en suspensión. Se observó que el crecimiento de hongos se promueve con el incremento de porosidad en la matriz polimérica. El entrapamiento o el

cubrimiento completo por polímero no fue conveniente para el crecimiento de estas células de hongos al contrario que en levaduras.

El lecho más conveniente para el crecimiento celular fue un soporte muy poroso consistente en un material de trama fibrosa tal como gasa o tela y un pequeño contenido de polímero. El material fibroso fue tratado con monómero como ligante e irradiado hasta polimerizar. Los hongos se adhieren a las fibras y se dispersan dentro de todo el espacio poroso del soporte. Estas condiciones pueden ser generalizadas para el crecimiento de otros hongos filamentosos.

1.2.4.3.3 Inmovilización y cultivo de células de tejidos

La promoción de crecimiento celular en polímeros fue probada con cultivos de células de tejidos tales como células glial y células de hígado Chang (59). Varias formas de membranas poliméricas fueron sumergidos en la suspensión celular. Las células se adsorbieron y dispersaron homogéneamente sobre la superficie del polímero. La velocidad de adsorción y crecimiento celular cambió dependiendo del tipo de superficie. El efecto en el crecimiento celular de diferentes tratamientos en la superficie de los polímeros como: irradiación, ataque químico e injertos, fue investigado en detalle. De acuerdo a los resultados, el anclaje de células y su crecimiento fue promovido en las superficies que tuvieran una adecuada humidificación y heterogeneidad obtenida por medio de injertos por irradiación.

1.2.4.4 Otras aplicaciones de los hidrogeles

1.2.4.4.1 Aplicaciones tópicas como vendajes de heridas

Los hidrogeles son usados en contacto directo con tejidos vivos. Ellos previenen la contaminación de las heridas con microorganismos externos, inhiben la pérdida de fluidos corporales, liberan oxígeno en la herida y generalmente aceleran el proceso de curación.

Son manufacturados por medio de la tecnología de la radiación en forma de delgadas hojas de hidrogel usando polímeros naturales o sintéticos como: poli(vinil pirrolidona), polietilenglicol y agar; entrecruzados con haces de electrones (60, 61). Los hidrogeles pueden ser usados también como aerosoles, emulsiones, ungüento y cremas, con o sin adición de componentes activos.

Estos vendajes de heridas pueden actuar como sistemas de liberación lenta de drogas o las drogas pueden ser administradas a través de hidrogeles *in situ*.

1.2.4.4.2 Sistemas transdermales

Los hidrogeles ha sido aplicados como un reservorio para especies biológicamente activas. Las propiedades de la piel y la interacción con los solutos así como también las propiedades de la membrana usualmente colocada entre la piel y el contenedor de droga son los principales factores que controlan la entrega de un medicamento. Los primeros dispositivos fueron utilizados por los astronautas. Un pequeño parche conteniendo escopolamina y diseñado para ser colocado detrás de la oreja fue utilizado en esos casos.

Actualmente se han producido y comercializado otros sistemas transdérmicos conteniendo varios agentes terapéuticos tales como trinitrato de glicerol, clonidina, estradiol/progesterona, etc. Un ejemplo de estos sistemas son los dispositivos para pacientes con glaucoma, en los cuales una tira o saco conteniendo pilocarpina son colocados en el fórnix del lecho del ojo. Dispositivos similares en forma de finas folias fabricados utilizando tecnología de las radiaciones han sido probados clínicamente con buenos resultados (62).

1.2.4.4.3 Implantes

El alcohol polivinílico (PVA), el primer hidrogel ampliamente usado para implantes, permanece sujeto a intensivas investigaciones. Por ejemplo, ha sido desarrollado un material de PVA que resistió la temperatura de autoclavado durante unas pocas horas (63).

Los hidrogeles han sido usados como reemplazo de tejidos después de la extirpación de tumores, implantes de mamas, reparación de defectos craneales, nariz, mentón, paladar hundido, como film para reemplazo del tímpano del oído y para otros propósitos específicos. Se han desarrollado también hidrogeles para reemplazo de cartílagos, envolturas de tendones e injertos aórticos.

Los injertos por radiaciones y/o métodos similares, dan la oportunidad de modificar las propiedades de las superficies de varios materiales para implantes obteniendo una biocompatibilidad mejor y permanente (64).

1.2.4.4.4 Aplicaciones oftálmicas

El mercado de las lentes de contacto es completamente dominado por productos basados en poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (HEMA). Hay también una gran variedad de composiciones de hidrogeles, los cuales contienen como copolímeros compuestos tales como poli(vinil pirrolidona), alcohol polivinílico, poli(ácido metacrílico), quitosan, etc. La copolimerización es usada principalmente para mejorar las propiedades mecánicas de los polímeros poli(HEMA) e incrementar su permeabilidad al oxígeno. Algunas lentes de contacto producidas con la tecnología de las radiaciones han sido comercializadas en China (65).

1.2.4.4.5 Sistemas respuesta -estímulo

Varios geles poliméricos sufren un hinchamiento reversible en respuesta a pequeños cambios en la composición del solvente, pH, temperatura, intensidad de la luz como también a campos magnéticos y eléctricos. Se ha sugerido la aplicación de estos hidrogeles en dispositivos como actuadores, músculos artificiales, separadores moleculares controlados, etc., (66).

Hay varias publicaciones dedicadas a la síntesis convencional y por radiaciones ionizantes. Los polímeros usados en estas investigaciones incluyen derivados *N*-sustituidos de poli(acrilamida), poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), alcohol polivinílico y sus combinaciones. Especialmente usados son los poli(*N*-isopropilacrilamida) y poli(vinil metil éter). Sus soluciones acuosas muestran una respuesta térmica característica. Ambos polímeros exhiben una

separación de fases a una temperatura crítica mínima de solución (LCST), la cual es igual a 32 y 38°C, respectivamente (67, 68). Los hidrogeles se hinchan por debajo y se encogen por encima de aquellas temperaturas. En los últimos años, se han dirigido los esfuerzos hacia la obtención de hidrogeles a partir de monómeros que contienen un grupo aminoácido (metil ésteres de acrilolil-L-prolina) para la liberación controlada de drogas (69, 70, 71).

1.2.4.4.6 Órganos artificiales (tipo híbridos)

Tales dispositivos son diseñados para implantación de células vivas dentro de membranas apropiadas. Células metabólicas vivas, *v.gr.* islotes de Langerhans, hepatocitos, hepatoma (Hep G2), etc, colocadas en cápsulas apropiadas secretan compuestos específicos en respuesta a los cambios de los fluidos corporales. El sistema trabaja como un biorreactor autocontrolado. Desde el punto de vista de la bioingeniería, la mayor dificultad se presenta en la elección adecuada de los materiales y los procedimientos de preparación para fabricar la membrana. Se deben satisfacer los siguientes requerimientos:

- debe ser permeable al agua, al oxígeno, a los nutrientes también como a las secreciones específicas de las células vivas;
- debe ser impermeable a los componentes del sistema inmune;
- debe resultar completamente “invisible” para el medio para evitar la deposición de proteínas y la biodegradación.

Existen dos métodos para obtener tales sistemas: microencapsulación y preparación de contenedores especiales grandes.

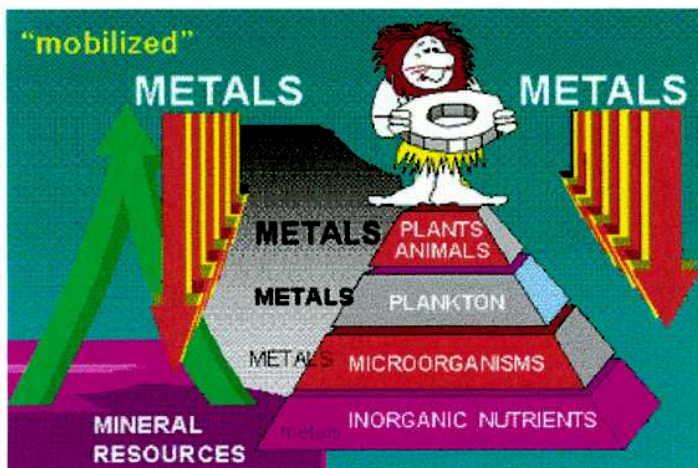
El primero consiste en el entrapamiento de unas pocas células dentro de macrocápsulas, las cuales pueden ser inyectadas dentro del organismo. El segundo consiste en la construcción de un contenedor masivo, cuyas paredes son membranas semipermeables. Estos dispositivos que contienen un gran número de células capaces de sustituir órganos dañados, pueden ser implantados en la cavidad peritoneal de un receptor. Hay alguna información acerca de una aplicación clínica exitosa de dispositivos preparados con alcohol polivinílico implantados como páncreas artificiales (72, 73). La conexión apropiada de algunas funciones de las células vivas y las propiedades de los plásticos hechos por el hombre pueden resultar, en un futuro cercano, en la fabricación de órganos artificiales (tipo híbridos) con hidrogeles.

1.3 Remoción/recuperación de metales pesados

Las especies metálicas movilizadas y eliminadas en el ambiente por las actividades tecnológicas humanas que tienden a permanecer circulando indefinidamente, o eventualmente acumulándose a través de la cadena alimentaria, representan una seria amenaza para el medio ambiente, los animales y los humanos. Se debe recalcar que el metal resulta realmente removido de las soluciones cuando es apropiadamente inmovilizado. El procedimiento de remoción de metales de soluciones acuosas lleva, a menudo, a una efectiva concentración del metal. Este aspecto de la operación se corresponde con la potencial recuperación del metal, la cual idealmente acompaña a la remoción, convirtiendo

al proceso total en un procedimiento finalmente efectivo para controlar la utilización de metales en los procesos tecnológicos.

Además de las fuentes dispersas de disolución y/o lixiviación de metales, grandes proporciones de especies de metales pesados son liberadas al ambiente por desechos acuosos industriales a través de ineficientes estructuras de las actividades tecnológicas usadas directamente en los procesos de metales o a través de otras rutas. Virtualmente cualquier actividad industrial que utiliza metales tiene un problema de desechos metalíferos. En adición, existen numerosas actividades relacionadas con la tecnología que producen especies metálicas. Las industrias que producen descargas metalíferas pueden ser consideradas como fuentes puntales de emisiones, las cuales a su vez ofrecen la posibilidad de la aplicación de procesos basados en acciones de remediación.



La pirámide de la cadena alimenticia recibe metales a través de las actividades humanas. En la punta de la pirámide, el hombre recibe metales tóxicos preconcentrados.

La adsorción y/o complejación de metales disueltos basadas en la actividad química de biomasa microbiológica, conocida como bioadsorción, ha producido el desarrollo de la nueva tecnología de bioadsorción para la remoción y

recuperación de metales, la cual ofrece una promisorio alternativa, desde el punto de vista económico, para el tratamiento de una amplia variedad de efluentes de la industria metalífera (74).

En estos procesos usados para la bio-remediación de metales tóxicos en desechos, se emplean células vivas, biomasas muertas, o biopolímeros como bioadsorbentes. Una amplia variedad de hongos, algas, y bacterias son capaces de adsorber o acumular iones metálicos debido a la composición captadora de las paredes celulares o vía mecanismos dependientes de su metabolismo intracelular (75, 76, 77). La captación metálica por los componentes estructurales o por los polímeros excretados es fortuita, y la eficiencia relativa depende de los atributos del ion metálico como también de la reactividad de los ligandos disponibles (78).

Trabajos recientes en procesos de bioadsorción frecuentemente han utilizado biomasas inmovilizadas para aumentar su estabilidad, reusabilidad, resistencia mecánica y facilidad de manipulación (79). Un diseño preferido de proceso para la bioadsorción con células inmovilizadas han sido los reactores con lecho fijo que contienen biomasas inmovilizadas de diferentes tipos (80, 81, 82).

Cuando se considera el impacto ambiental de los metales movilizados, los “tres gigantes”, mercurio, plomo y cadmio se encuentran en una posición conspicua (83, 84). Acaso, el mercurio sea el menos preocupante puesto que ha sido desplazado de los procesos industriales por la introducción de nuevas tecnologías. Por otra parte, la contaminación con plomo ha quedado reducida a fuentes puntuales bien definidas debido a que la principal diseminación de este metal en el ambiente ha disminuido por la introducción de naftas sin plomo. En consecuencia, mientras el uso del plomo y mercurio se ha limitado, el del cadmio

sigue en aumento, y su toxicidad y ubicuidad representan un peligro potencial para los humanos y el medio ambiente. Respecto del cobre, aunque no es tan tóxico, su uso extensivo y los niveles incrementados en el medio ambiente son causa de preocupación.

1.4 Uso industrial de las radiaciones ionizantes en la inactivación de agentes patógenos

1.4.1 Origen y desenvolvimiento

El uso industrial ampliamente difundido de la radioesterilización es el resultado del esfuerzo pionero de científicos e ingenieros en agencias gubernamentales, universidades e industrias a través del mundo. Sin embargo este trabajo no habría sido fructífero si la radioesterilización no hubiese cumplido con las necesidades básicas. Aún más, el rápido desarrollo de un nuevo mercado de productos médicos descartables hubiera sido imposible sin esta nueva técnica de esterilización.

La esterilización por calor seco o calor húmedo (autoclavado) representan las dos más seguras y aceptadas técnicas de esterilización. Ambos métodos requieren una exposición uniforme de los productos a altas temperaturas y, en el caso del autoclavado, también a la humedad.

Después de la segunda guerra mundial el uso de óxido de etileno fue lentamente aceptado. Mientras el proceso puede llevarse a cabo a temperaturas mucho más bajas, su control es mucho más dificultoso. La temperatura, humedad

y concentración de gas deben ser controladas a través de todo el material que debe ser esterilizado. Estos requerimientos limitan el uso de la esterilización con óxido de etileno a materiales y paquetes que sean suficientemente permeables para ambos: humedad y esterilizante. Un problema adicional es la absorción y retención del relativamente tóxico óxido de etileno o algunos de sus productos de reacción, e.g. β -cloroetanol o etilenglicol; se requiere una prolongada exposición al vacío o una ventilación muy buena del depósito para disipar estos compuestos y obtener productos toxicológicamente seguros.

La utilización de la radioesterilización se remonta al final de la década del 40 y el comienzo de la década del 50.

La disponibilidad de varios tipos de aceleradores de electrones estimuló las investigaciones de la aplicabilidad de las radiaciones ionizantes en la inactivación de algunos tipos de microorganismos, la esterilización de alimentos, productos médicos y farmacéuticos.

El uso de aceleradores de electrones y fuentes de radiación de isótopos para procesos de esterilización industrial fue iniciado en varias corporaciones. Como resultado de la exitosa demostración de seguridad y confiabilidad de ambos tipos de facilidades de radiación, ha habido un sustancial aumento del uso de estos sistemas en todo el mundo.

Debido al gran poder penetrante de los radioisótopos emisores gamma comparado con los haces de electrones de los aceleradores, la mayoría de las fuentes industriales emplean ^{60}Co (vida media 5,3 años y decaimiento con emisión de dos fotones gamma de 1.17 y 1.33 MeV) y ^{137}Cs (vida media 30,1 años y

emisión de un fotón gamma de 0,66 MeV). La elevada energía de los aceleradores de electrones es también usada para esterilizar productos médicos, pero su principal aplicación es en procesos industriales.

Como ocurre con otros métodos, la radioesterilización no es universalmente aplicable. Los materiales pueden ser afectados adversamente en una extensión tal que su uso no es permitido. Sin embargo, la radioesterilización tiene algunas ventajas sobre los métodos más convencionales de esterilización:

1) Es el primer y único proceso continuo para esterilización

2) Es fácil de controlar y extremadamente confiable.

3) Debido a la gran penetrabilidad de los rayos gamma, los productos previamente empaquetados, sellados herméticamente en sus posibles contenedores de transporte, pueden ser convenientemente esterilizados. No se necesita un empaquetado especial puesto que los sellados no son sometidos a esfuerzos tales como presión o vacío.

4) Como la radiación no depende del calor de convección o de la permeación de humedad o gas, la elección del embalaje de los materiales es totalmente libre.

5) Prácticamente ningún calentamiento se produce durante la esterilización y los efectos químicos de la radiación son bajos.

Debido a que la radioesterilización es más costosa que la esterilización por calor o gas, debería ser usada solamente cuando varias ventajas compensan a los costos agregados.

Uno de los más grandes beneficios de la radioesterilización es la obtención fácil de productos seguros de uso médico descartables. Tales productos tienen, en

gran medida la función de reemplazar la necesidad de esterilización de jeringas, agujas, catéteres, tubos y una gran variedad de otros equipamientos usados en los hospitales. La esterilización repetida de esos materiales no sólo implica consumo de tiempo del personal del hospital sino también un importante deterioro de los materiales debido al continuo lavado y exposición al calor, que pueden hacer a la esterilización insegura y al producto inservible. Cuando la esterilización por calor no es aplicable debido a limitaciones del material o diseño, la desinfección química es común en los hospitales. Antes del desarrollo de los efectivos e inobjetables agentes químicos esterilizantes (glutaraldehído buffereado), esta práctica, generalmente inefectiva, ha sido fuente de infecciones cruzadas a gran escala adquiridas en los hospitales que requieren un importante tratamiento médico adicional.

Mientras el primer producto esterilizado comercializado fue un ungüento ocular, el mérito de establecer la radioesterilización en una escala industrial lo llevan las suturas quirúrgicas (85). Desde 1956 la mayoría de las suturas en Estados Unidos han sido radioesterilizadas y en el resto del mundo a partir de 1960. Hay varias razones por las cuales las suturas fueron adecuadas para ser el primer producto radioesterilizado que se comercializó en gran volumen. Los métodos existentes de esterilización eran menos que satisfactorios debido a los efectos adversos en la calidad del producto. Más aún, la elección de los materiales para el empaquetado estaba restringida debido a los procesos de esterilización por calor. Puesto que la manufactura de suturas implica un relativamente alto costo laboral y el producto tiene un alto valor en relación con el volumen, el costo de esterilización no es un factor apreciable en el costo total. La radioesterilización

hizo posible que la industria de las suturas avance en el empaquetado desde la “edad del vidrio” a la “edad del plástico”. Esto representa un significativo beneficio para el consumidor debido a que ambos: el producto y su empaquetado, fueron mejorados.

Además de las suturas, en medicina se usan numerosos materiales no biológicos para implantes permanentes o reabsorbibles y equipos o dispositivos temporarios en contacto con los tejidos o la sangre circulante. En la elección del método de esterilización de estos los materiales, varios requisitos deben ser satisfechos: las propiedades físicas y mecánicas deben ser adecuadas después de la esterilización, el material debe retener su estabilidad física y química durante su uso, el material no debe causar daños físicos en los tejidos de los pacientes ni debe ser tóxico.

Los dos métodos más seguros de esterilización, que pueden ser usados en un amplio rango de materiales, son el autoclavado y la irradiación. Sin embargo, cada uno de estos métodos modifica las propiedades de algunos materiales de forma tal que se vuelven inaceptable para su uso, así el polietileno debe ser irradiado y el politetrafluoretileno PTFE (teflon) debe ser autoclavado. Para materiales en que cualquier método es satisfactorio, la elección se hace teniendo en cuenta aspectos tales como la conveniencia o el costo.

El exitoso uso de las radiaciones ionizantes para la esterilización de equipos y suministros médicos dieron un considerable ímpetu a la aplicación de este método para la esterilización de productos farmacéuticos, particularmente cuando los métodos convencionales son inadecuados. Una dificultad, sin embargo, es que ciertos cambios físicos y químicos no deseados pueden

acompañar el tratamiento con la dosis de irradiación necesaria para la esterilización. En verdad, el desarrollo de este tema se ha inhibido debido a que se dispone de muy poca información definitiva acerca de la extensión y naturaleza de los cambios inducidos por la irradiación de materiales orgánicos usados en la industria farmacéutica. La atención ha sido principalmente localizada en la pérdida de potencia, cambios de color, formación de ácidos, o en la producción de especies absorbedoras de ultravioleta las cuales acompañan a la irradiación e indudablemente este efecto superficial ha sido deletéreo para el desarrollo de este tema. Hay amplias referencias de estudios de irradiación realizados en: antibióticos, vitaminas, hormonas, esteroides, alcaloides, carbohidratos, etc., muchos de los cuales son empleados comercialmente.

Es un método específico, que requiere una elección cuidadosa de las condiciones de irradiación. Sin excepción, el uso del método presenta una batalla entre los requerimientos de la esterilización y la consecuente descomposición química. Pero la extensión del daño por la radiación puede ser reducido a niveles aceptables si los principios básicos de la química de las radiaciones son tenidos en cuenta, es decir, si se seleccionan las condiciones adecuadas de dosis, concentración de soluto, atmósfera, naturaleza de los materiales acompañantes, etc. Si los requerimientos de esterilización demandados son más estrictos, los métodos disponibles no resultan seguros y bajo estas condiciones la radioesterilización puede ofrecer ventajas únicas. Por lo tanto debe darse más atención a la química de las radiaciones del sistema particular que se está estudiando. Si los productos, los valores G, las constantes de velocidad del ataque por los productos de radiólisis, etc., son conocidos, luego pueden ser

seleccionadas las condiciones óptimas para alcanzar los resultados más satisfactorios. Puede ser que el producto tolere una dosis que sólo asegura una esterilización parcial. Sin embargo, si esto representa el mejor resultado que puede ser conseguido y puede reducir apreciablemente la contaminación, el método es justificable. Ninguna panacea puede ser ofrecida para todos los sistemas y todas las condiciones (86, 87).

Se ha informado que existen 133 plantas de ^{60}Co a escala industrial operando en el mundo (88), con alrededor del 90% de su capacidad dedicada a irradiación de dispositivos médicos (89) y que la irradiación de alimentos permanece en el área de potencial uso más que de real importancia (5%). El restante 5% se usa en otras aplicaciones que no muestran signos significativos de crecimiento económico ni estimulan el interés público. Dos aplicaciones de las radiaciones que merecen ser tenidas en cuenta son: tratamiento de los barros cloacales y la industria farmacéutica.

Un número significativo de patógenos bacterianos y virales puede sobrevivir a los procesos convencionales de tratamiento de barros cloacales. Esto constituye un problema para la salud pública debido a que se ha incrementado el uso de estos barros para reacondicionar el suelo de áreas dedicadas a la recreación o como fertilizantes en la cadena de producción de alimentos. El Departamento de Energía de Estados Unidos ha demostrado que este problema pudo resolverse con la construcción de una planta de ^{137}Cs en "Sandia National Laboratories" en 1978 (90).

Dentro de la industria farmacéutica, las farmacopeas reconocen la radiación gamma como un proceso de esterilización aplicable a las sustancias

farmacológicas y a los medicamentos fraccionados para su consumo final, pero la principal aplicación es realmente la esterilización de contenedores plásticos para el llenado aséptico de líquidos esterilizados por filtración. Varios efectos de la radiación gamma en fármacos específicos fueron revisados por Jacobs (91), pero pocas conclusiones generales fueron observadas excepto que las preparaciones sólidas son más estables que las líquidas y que las soluciones congeladas son también más estables que las líquidas. Además, no siempre es posible predecir la estabilidad a la radiación de sustancias farmacológicamente activas por el conocimiento previo de otras sustancias con estructura química similar, pequeñas diferencias en la estructura química pueden resultar en diferencias significativas en la estabilidad del compuesto frente a la radiación.

1.4.2. Características generales de la inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos

El efecto letal de la radiación en los microorganismos fue conocido mucho tiempo antes que cualquier proceso de irradiación a escala industrial se convirtiera en una realidad comercial. A partir del descubrimiento de los rayos X por Roentgen, citado como que tuvo lugar en 1895, investigadores alemanes describieron el daño radioinducido en microorganismos (92). En los años siguientes las radiaciones se convirtieron en el más investigado de todos los sistemas microbiocidas. La complejidad de la influencia del estado bioquímico y fisiológico de las células en el momento de la irradiación y de las condiciones del medio antes, durante y después del tratamiento, ha sido puesta en evidencia en

las investigaciones desarrolladas en los años subsiguientes. Otras contribuciones establecieron la relación cuantitativa entre la reducción del número de viables de la población bacteriana original y el incremento de la dosis. Estas investigaciones resultaron de fundamental importancia para la utilización de las radiaciones ionizantes en la terapia de tumores y en la filosofía adoptada para la esterilización por radiaciones (93, 94).

El criterio más frecuentemente usado para determinar el daño inducido por las radiaciones en los microorganismos (y otros agentes letales) es la habilidad de un organismo irradiado para producir un crecimiento demostrable en un medio apropiado. Las células que no producen colonias visibles en medio sólido (o turbidez en medio líquido) se dice que han sido inactivadas, mientras que aquéllas que son capaces de crecer son llamadas sobrevivientes. Los principales blancos en microorganismos son los ácidos nucleicos y las membranas internas. Las ionizaciones que ocurren en otras moléculas diferentes de los blancos críticos no son de importancia en la inducción de la letalidad.

Los factores que afectan la inactivación de hongos son muy similares a los que afectan a las bacterias (95).

Por otra parte desde los primeros trabajos en radiobiología (96) se ha sabido de la existencia de una relación simple entre la acción de las radiaciones ionizantes y la pérdida de infectividad de los virus. En algunos casos esto es cierto, pero no siempre, debido al carácter ampliamente variable de los virus (97).

La radioinactivación de virus ha recibido atención esporádica durante los últimos 30 años debido a que el éxito de las vacunas virales atenuadas ha ensombrecido el concepto de preparación de vacunas por virus muertos.

Recientemente, un renovado interés se ha generado en el uso de la radiación gamma como un método para la inactivación de virus debido a que se han observado efectos secundarios o alteraciones genéticas debido a virus infecciosos en el uso de algunas vacunas atenuadas.

También, dado que un número de virus capaces de infectar humanos han sido aislados de comidas y alimentos (98, 99, 100, 101) se han realizado estudios de inactivación viral por radiación gamma en estos materiales (102, 103, 104, 105, 106).

El virus herpes bovino tipo-1 (BHV-1), conocido comúnmente como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBRV) ha sido asociado con infecciones respiratorias, reproductivas, entéricas, oculares, del sistema nervioso central, neonatales y dérmicas del ganado (107, 108, 109). También han sido informadas infecciones en otras especies (110, 111). Algunas cepas de este virus han sido aisladas de ganado infectado perteneciente a la Argentina (112).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis ha sido la aplicación de las radiaciones ionizantes, en particular la radiación gamma del ^{60}Co , en dos campos diferentes: la obtención de hidrogeles y la inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos, con la característica común que, en ambos, las condiciones de irradiación fueron en estado supercongelado (-78°C).

Los hidrogeles son matrices poliméricas radioinducidas que absorben y retienen agua sin disolverse. En la polimerización por radiaciones a bajas temperaturas de una solución o suspensión de monómeros (ésteres de ácido metacrílico o ácido acrílico), el agua forma microcristales dispersos en el monómero mientras éste polimeriza en estado líquido supercongelado. Al finalizar la irradiación, cuando el sistema alcanza la temperatura ambiente, los microcristales de hielo retenidos por la matriz polimérica forman poros, en las paredes de los cuales los biocomponentes son inmovilizados principalmente por adhesión. Esta propiedad se puede utilizar para inmovilizar sustancias biológicamente activas o como soporte de especies vivas tales como levaduras, hongos, bacterias, etc.

Los hidrogeles fueron utilizados para la inmovilización de un antibiótico con el fin de obtener un sistema de liberación controlada y como soporte para la inmovilización de bacterias para ser empleadas en la remoción de metales pesados de soluciones contaminadas.

En los dispositivos obtenidos con ampicilina inmovilizada se realizaron estudios de liberación *in vivo* e *in vitro* para determinar los parámetros farmacocinéticos y la determinación de la estabilidad del antibiótico en las condiciones de irradiación.

Por otra parte, dada la capacidad de los hidrogeles para ser usados como soporte de bacterias y al uso potencial de biomasas de microorganismos inmovilizadas como bioadsorbentes de metales, en el presente trabajo se realizaron estudios de adhesión de bacterias aisladas del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en hidrogeles obtenidos por polimerización radioinducida y su aplicación en procesos de remoción de tales iones metálicos.

Con este propósito, se obtuvieron diferentes hidrogeles variando el tipo de monómero (diferente hidrofiliidad), la cantidad de agua y glicerina, y también incluyendo otros monómeros (copolimerización), con el objeto de obtener la matriz polimérica más adecuada para lograr la máxima adhesión de los microorganismos. A estos fines, se estudiaron: la hidrofiliidad de los hidrogeles por determinación de los valores del contenido de agua en equilibrio; la adhesividad de bacterias por microscopía electrónica para seleccionar el soporte polimérico adecuado, y por último, la inmovilización de bacterias aisladas del Río de la Plata en hidrogeles con el propósito de realizar estudios de descontaminación de soluciones.

Respecto de la inactivación de agentes patógenos por radiaciones ionizantes a bajas temperaturas (-78°C) se utilizaron dos sistemas de estudio: i) la radioesterilización de sueros fetales bovinos para su uso en cultivos celulares y ii) la inactivación de virus herpes bovino tipo-1. En el primero, el propósito fue

determinar si se producían cambios en las propiedades fisico-químicas o en las funciones biológicas específicas de las proteínas séricas por efecto de las dosis necesarias para obtener una esterilización eficiente y controles microbiológicos de los sueros irradiados a bajas temperaturas. En el segundo, el propósito fue determinar la dosis necesaria que reduce la población viral en un 90% (D_{10}) en medio Glasgow-MEM libre de suero, antes y después de la remoción de los restos celulares a bajas temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.A HIDROGELES

3.A.1 Inmovilización de fármacos

3.A.1.1 Materiales

3.A.1.1.1 Reactivos

Se usó ampicilina como trihidrato (Sigma Chemical Company).

Se utilizó como monómero metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, según abreviatura inglesa) (Sigma Chemical Company) y como entrecruzador trimetacrilato de trimetilolpropano (TMPTMA) (Aldrich Chemical Inc.). Todos los reactivos fueron utilizados como se proveyeron.

3.A.1.1.2 Líneas celulares, cepas bacterianas y medios de cultivo

Para realizar estudios de biocompatibilidad de los hidrogeles se usaron líneas celulares Baby hamsters kidney [BHK 21 (C-13)] ATCC CCL 10 (113).

Las células fueron mantenidas en medio Glasgow-MEM (Medio esencial mínimo, Gibco) suplementado con caldo fosfato de triptosa 0.3%; suero fetal

bovino 10%; glutamina 2 mM; penicilina 200 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Richet). El pH del medio se ajustó a 7,2-7,4.

Medio sólido para mantenimiento celular: Medio Glasgow-MEM (2x) y agar 2% en agua bidestilada, en una relación 1:1.

La replicación de células se realizó con soluciones de tripsina (1:250) al 0,25% en solución de Hank's sin calcio ni magnesio.

La cepa bacteriana utilizada para la determinación de la actividad biológica de ampicilina fue: *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

Agar N° 1 para antibióticos de Merck: extracto de carne 1,5 g; extracto de levadura 3 g; peptona de caseína 4 g; peptona de carne 6 g; glucosa 1 g; agar 15 g y agua destilada c.s.p. 1l. Ajustado a pH 6,5. Agar N° 11 para antibióticos de Merck: idem al agar Agar N° 1 pero ajustado a pH 7,9.

Buffer fosfato: KH_2PO_4 13,61 g; agua destilada c.s.p. 1 l y ajustado a pH 4,5.

Solución fisiológica: NaCl 9 g y agua destilada c.s.p. 1l.

3.A.1.1.3 Animales

Hamsters adultos (*Mesocricetus aureatus*) de 12-30 semanas, de ambos sexos, provistos por el Bioterio de la CNEA, fueron usados para estudios de toxicidad de polímeros.

Perros adultos (German shepherd) de (20±2) kg, de 18 meses de edad y de ambos sexos fueron usados para estudios *in vivo* de cinética de liberación de drogas.

3.A.1.1.4 Dispositivos de entrega de fármacos

Soluciones acuosas de ampicilina fueron mezcladas con una solución de monómero más entrecruzador al 1% (50% v/v), homogeneizadas y colocadas unas en tubos de cloruro de polivinilo de 3,5 mm de diámetro y otras en tubos eppendorf de 1.8 ml de volumen para obtener balines. Fueron congeladas a -78°C e irradiadas con rayos gamma de una fuente de ^{60}Co con dosis de 10 y 25 kGy con una tasa de dosis de 5 kGy/h.

La concentración de ampicilina resultante en las varillas cilíndricas poliméricas fue 45,22 mg/cm y 444 mg/ balín.

3.A.1.1.5 Fuente de irradiación

Las muestras fueron irradiadas con una fuente de ^{60}Co de 18.5 PBq (5×10^5 Ci) de la Instalación Industrial de Irradiación de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

3.A.1.1.6 Dosimetría

Se utilizó un método químico llamado dosímetro de Fricke (114), basado en la medición espectrofotométrica de los iones férricos producidos por irradiación de una solución de sulfato ferroso.

Aunque existen numerosos dosímetros químicos en uso el sistema sulfato ferroso-férrico descrito por Fricke es aceptado por numerosos investigadores y

trabajadores de la industria nuclear como el mejor método químico para la medición de rayos X y γ . Es independiente de la tasa de dosis hasta 10^{10} rad/segundo y es dependiente del LET, lo cual limita su uso a rayos X, rayos γ y rayos β de alta energía.

Procedimiento:

Se disolvieron 2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.3 g de NaCl y 110 ml de H_2SO_4 concentrado (95-98%), grado analítico, en agua destilada hasta obtener 5 litros de solución.

Un volumen de esta solución se colocó en un envase de polietileno que previamente fue cuidadosamente lavado con la misma solución. [Puesto que la geometría de la fuente (haz) es tal que la intensidad de radiación varía con la posición, se hizo la dosimetría colocando los envases con la solución de sulfato ferroso en la misma posición dentro del haz donde se colocaron las muestras experimentales]. La duración del tiempo de irradiación fue cuidadosamente registrada. Un espectrofotómetro Beckman modelo DU se utilizó para medir la cantidad de ion férrico producido por la radiación.

La absorción máxima del ion férrico es aproximadamente a 304 nm. La absorbancia (densidad óptica) de la solución irradiada fue comparada con la solución sin irradiar. La dosis se calculó por la siguiente fórmula:

$$\text{Dosis en rads} = 10^9 (A_i - A_{si}) / \epsilon b Y$$

Donde A_i y A_{si} = las absorbancias de soluciones irradiadas y no irradiadas, respectivamente; ϵ = coeficiente de extinción molar; Y = rendimiento de sulfato ferroso, μM de iones férricos/litros/1000 rads= $15,3\pm 0,3 \mu\text{M}$, y b = longitud de celda de absorción en cm. El coeficiente de extinción molar, ϵ , del Fe^{3+} es 2174 a $23,7^\circ\text{C}$ con un coeficiente de temperatura de 0,7% por grado centígrado. La tasa de dosis se calculó dividiendo la dosis por el tiempo de irradiación. La tasa de dosis se expresó en rad/hora, donde el rad especifica la energía absorbida por el material blanco, o sea 100 erg/g. Un rad es igual a 0,01 Gy.

3.A.1.2 Métodos

3.A.1.2.1 Método de titulación de ampicilina

La actividad biológica de la ampicilina se determinó por el método de difusión en agar de la FAO-OMS (115). Brevemente este consistió en preparar una suspensión de *M. luteus* en solución fisiológica de transmitancia 25% (D.O.=0.600) a 580 nm. Para lo cual se hizo un cultivo en agar N° 1 para antibiótico a partir de un pico de flauta. Después de incubar 24 horas a 35°C , se preparó la suspensión bacteriana estándar colectando el crecimiento bacteriano de la superficie del agar en 50 ml de solución fisiológica y a partir de esta suspensión estándar se preparó el inóculo con una dilución apropiada.

Se prepararon cajas de Petri con una capa basal de 14 ml del agar N° 11 para antibiótico, cuando ésta solidificó, fue recubierta con 4 ml del mismo medio pero conteniendo el inóculo de bacterias apropiado. Cuando el medio de cultivo se encontraba en vías de solidificarse, se agregaron los cilindros de acero Oxford (6 por cada caja), algunos de ellos fueron cargados con 200 μ l de solución estándar de ampicilina y otros con las muestras. Se incubaron las cajas de Petri a 35°C durante 18 horas (116) y se midieron los halos de inhibición con calibre.

Para realizar la curva de calibración se utilizaron diluciones de una solución patrón de ampicilina de 100 μ g/ml en buffer fosfato.

La actividad biológica de la ampicilina se determinó antes y después de la irradiación en las mismas condiciones en que se realizó la polimerización de los hidrogeles.

3.A.1.2.2 Estudios de liberación de ampicilina

Estudios *in vitro*: El ensayo de liberación fue realizado de acuerdo al método ligeramente modificado de Chien (117). Brevemente, consistió en sumergir separadamente una pequeña varilla de 1 mm de longitud y un balín, en frascos de disolución con 10 y 20 ml de agua destilada (pH 6), respectivamente, y fueron mantenidos a 37°C con agitación constante (100 rpm).

Se tomaron muestras del medio de elución, se renovó después de cada muestreo y el contenido de droga en las muestras fue determinado espectrofotométricamente a 211 nm.

Por otra parte, la cantidad de fármaco liberado desde los balines fue determinado por el método de difusión en agar. El monómero libre fue determinado en el medio de elución de varillas poliméricas placebo por espectrofotometría a 210 nm. La concentración de HEMA fue menor que 2 ppm.

Estudios *in vivo*: Se usaron perros adultos para estudios *in vivo*. Un grupo recibió balines de hidrogeles con ampicilina y otro grupo recibió pastillas comerciales a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal. Se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos después de la administración. La actividad biológica de la ampicilina en el plasma se determinó por el método de difusión en agar.

3.A.1.2.3 Estudios de biocompatibilidad de hidrogeles

Los estudios de biocompatibilidad fueron realizados investigando el daño por toxicidad en cultivos celulares y en hamsters, por observación con microscopio óptico y por autopsia, respectivamente.

3.A.1.2.3.1 Estudios en cultivos celulares

Se usaron cultivos de células BHK en botellas de 25 cm² (Corning Tissue Culture Flask):

i) Sobre una monocapa confluyente de células BHK, se distribuyó una capa de agar y antes de que solidificara se colocaron varillas de hidrogel placebo de 1.5 mm de longitud. Las células fueron observadas en un microscopio óptico 24 horas después del implante.

ii) Implantes de hidrogeles placebo se colocaron en cultivos en fase logarítmica. Cuando las células crecieron a confluencia se trataron con tripsina para su replicación, y se realizaron cinco pasajes sucesivos.

3.A.1.2.3.2 Estudios en animales

Varillas de hidrogel placebo (1,5 cm de longitud) se implantaron en la cavidad intraperitoneal de 10 hamsters. Los animales se sacrificaron a los 60 días post-implante y se realizaron las autopsias.

3.A.2 Inmovilización de bacterias

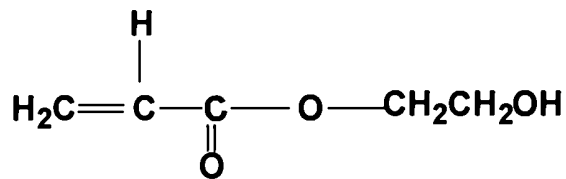
3.A.2.1 Materiales

3.A.2.1.1 Reactivos

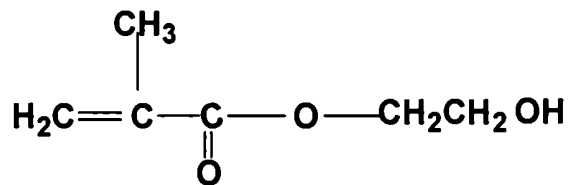
Se utilizaron como monómeros: metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), acrilato de 2-hidroxietilo (HEA), N-vinil pirrolidona (NVP), dimetilacrilamida (DMAA); metacrilato de 2-dimetilaminoetilo (DMAEMA) y como agente entrecruzador, trimetacrilato de trimetilolpropano (TMPTMA) (Sigma-Aldrich). Glicerina y glutaraldehído, de C. Erba y Merck respectivamente. Todos los reactivos fueron usados como se proveyeron.

En la Fig. 3.1 se muestran las estructuras de los monómeros y el entrecruzador utilizados.

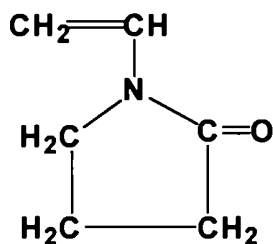
Acrilato de 2-hidroxietilo (HEA)



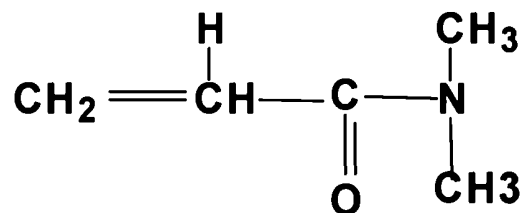
Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA)



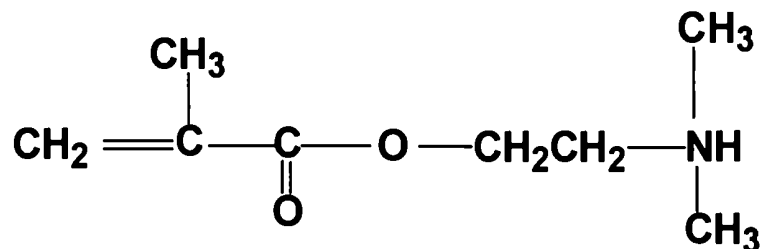
N-vinil pirrolidona (NVP)



Dimetilacrilamida (DMAA)



Metacrilato de 2-dimetilaminoetilo (DMAEMA)



Trimetacrilato de trimetilolpropano (TMPTMA)

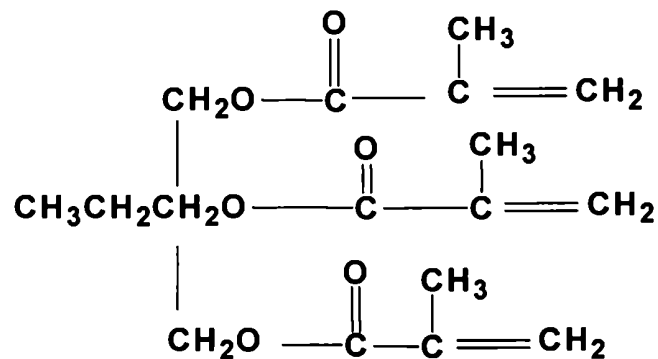


Fig. 3.1: Estructuras de los monómeros y el entrecruzador utilizados en la obtención de hidrogeles por polimerización radioinducida a -78°C .

3.A.2.1.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para los estudios preliminares de adhesión se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las células bacterianas fueron cultivadas en caldo nutritivo (CN) de Difco. Los medios con metales fueron preparados por agregado de soluciones estériles de $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Cd II); CuCl_2 (Cu II) o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Pb II), a medios nutritivos estériles.

3.A.2.1.3 Aislación de bacterias

Cepas bacterianas autóctonas del suelo y agua del Río de la Plata, fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de iones Pb(II), Cd(II) y Cu(II), aisladas e identificadas por el Dr. R. A. Pizarro (CNEA) según procedimientos bacteriológicos estándares (118).

3.A.2.1.4 Preparación de hidrogeles acrílicos

Soluciones de monómeros, agua y/o glicerina más entrecruzador (2%) fueron colocadas en tubos cilíndricos de 3 x 2 cm, desaireadas con N_2 , congeladas a -78°C e irradiadas para su polimerización con una fuente de ^{60}Co del "Istituto di Fotochimica e Radiazioni d'Alta Energia, Consiglio Nazionale delle Ricerche", Legnaro, Italia, a una tasa de dosis de 0,14 Gy/s (dosis total = 10 kGy).

3.A.2.2. Métodos

3.A.2.2.1 Determinación del contenido de agua en equilibrio

Discos de las matrices poliméricas obtenidas de 2-3 mm de espesor se hidrataron durante 4 días en 40 ml de agua, que se renovó diariamente hasta obtener peso constante, después de lo cual se procedió al secado en vacío a 45-50 °C, también durante 3-4 días hasta obtener peso constante. Luego se determinó el valor del contenido de agua en equilibrio (W_e) de acuerdo a la ecuación:

$$W_e = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100$$

donde W_s y W_d son los pesos de la matriz totalmente hidratada y completamente seca, respectivamente.

3.A.2.2.2 Inmovilización de bacterias en hidrogeles acrílicos

i) Inmovilización de *P. aeruginosa* en hidrogeles: Se seleccionaron 10 hidrogeles para realizar los ensayos de inmovilización de bacterias. Pequeños discos de hidrogeles se esterilizaron en autoclave (20 minutos, 120°C) y se hidrataron durante toda la noche en CN. Luego se sumergieron en CN fresco y se agregó un inóculo (1:1000) de un cultivo de densidad óptica a 650 nm ($(D.O.)_{650} = 0.600$, obtenido a partir de un cultivo de toda la noche (119). Se incubaron durante 48 horas con agitación, se renovó el 20% del medio dos veces,

luego se sacaron los hidrogeles y se prepararon para ser observados en un microscopio electrónico de barrido según se indica en la sección 3.A.2.2.4-ii).

ii) Inmovilización de bacterias aisladas del Río de la Plata: Las cepas bacterianas aisladas del río fueron incubadas en soluciones acuosas de CN (30%) conteniendo el metal bajo estudio y porciones del polímero, sin agitación a 30°C. Después de 18 días de incubación, se sacaron las matrices poliméricas y las bacterias en suspensión se colectaron por filtración (filtro de nylon Cole-Parmer, 0,2 μm). Se realizaron controles de hidrogeles sumergiéndolos en soluciones idénticas a las descritas, pero sin inóculo bacteriano. Las matrices poliméricas (con y sin bacterias adheridas) y las bacterias filtradas, se prepararon para ser examinadas en un microscopio electrónico de barrido con un analizador de energía de rayos X (EDAX) acoplado, según se indica en la sección 3.A.2.2.4-ii).

3.A.2.2.3 Estudios de remoción de metales pesados

Las cepas bacterianas aisladas del Río de la Plata e inmovilizadas en hidrogeles fueron utilizadas para realizar ensayos de remoción de iones metálicos de soluciones acuosas.

Para la inmovilización se prepararon 20 g de suspensiones bacterianas ($D.O_{.650} = 0,600$) en CN (70%), conteniendo cantidades estándares del ion metálico en estudio. Se sumergieron porciones del soporte polimérico ($2 \pm 0,3$ g de peso húmedo) y se mantuvieron sin agitación a 30°C hasta que los cultivos bacterianos llegaron a estado estacionario (6-7 días).

Los hidrogeles con las bacterias adheridas fueron transferidos dos veces en soluciones frescas de CN (70%) conteniendo iones metálicos y se mantuvieron en las mismas condiciones descriptas anteriormente durante una semana cada vez. Se determinaron las D.O.₆₅₀ de las suspensiones donde permanecieron sumergidas las matrices poliméricas.

Se tomaron muestras para la determinación de las cantidades de iones metálicos por absorción atómica, según se indica en la sección 3.A.2.2.5, en: los hidrogeles (lavados dos veces por inmersión en solución fisiológica), las bacterias que fueron colectadas por centrifugación (10.000 g, 10 minutos, 100 mg de peso húmedo promedio y lavadas dos veces con solución fisiológica) y en las soluciones sobrenadantes resultantes, en cada tiempo.

3.A.2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis por EDAX

i) Los hidrogeles fueron liofilizados, cubiertos con una capa de oro y observados en un microscopio electrónico de barrido Cambridge Stereoscan 25 (20 kV) perteneciente al C.U.G.A.S, Padua, Italia.

ii) Las bacterias inmovilizadas en los hidrogeles fueron fijadas con glutaraldehído 2,5% (v/v) en solución salina (0,9% NaCl en agua) durante 3 horas, lavados dos veces con agua destilada a 4°C y luego deshidratados en mezclas de agua-acetona. Finalmente las muestras fueron secadas a punto crítico y metalizadas con oro. Fueron examinadas en un microscopio electrónico de barrido, Philips 515 (20 kV), con un analizador de energía de rayos X (EDAX) acoplado, perteneciente a la CNEA, Buenos Aires, Argentina.

3.A.2.2.5 *Determinación de la cantidad de iones pesados*

Después del tratamiento ácido (ácido nítrico 70%), las cantidades de los iones pesados fueron determinadas en: las soluciones sobrenadantes, los pellets de bacterias y las membranas de hidrogeles con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo Analyst 100, perteneciente a la CNEA, Buenos Aires, Argentina.

3.B INACTIVACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS EN MATERIALES BIOLÓGICOS

3.B.1. Radioesterilización de sueros

3.B.1.1 Materiales

3.B.1.1.1 *Recolección de sueros*

La sangre se obtuvo por punción cardíaca evitando la hemólisis. Después de 1 hora a temperatura ambiente, la sangre se mantuvo durante 24 horas a 4°C para su coagulación. Se sacaron los coágulos y el suero se filtró usando filtro de lana de vidrio y luego se centrifugó a 3.000 g durante 30 minutos a 4°C. Después de esto el suero fue fraccionado en frascos de plástico y guardado a -20°C hasta el momento de su irradiación.

3.B.1.1.2 Fuente de radiación y dosimetría

Los sueros en frascos de plástico fueron congelados a -78°C e irradiados con una fuente de ^{60}Co de 18.5 PBq (5×10^5 Ci) de la Instalación Industrial de Irradiación de CNEA. La irradiación fue llevada a cabo con dosis de 25, 32 y 50 kGy. La dosimetría se realizó con un dosímetro Fricke como se ha mencionado.

3.B.1.1.3 Líneas celulares y virus

A lo largo de todo el estudio se utilizaron las siguientes líneas celulares: Baby hamsters kidney [BHK 21 (C-13)] ATCC CCL 10, 3T3 (Swiss mouse embríos) ATCC CCL 92, Madin Darby bovine kidney (MDBK) ATCC CLL 22, mieloma P3x63-Ag8.653 ATCC CRL 1580; cultivos primarios de testículo fetal bovino (TFB) libres de virus fueron gentilmente provistos por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA).

Mycoplasma orali fue gentilmente cedido por la Dra. Rosa Mallo.

Virus: Foot and Mouth disease virus (FMDV) o virus de la aftosa cepa "A" fueron provistos por CICV-INTA (Castelar) y virus herpes bovino tipo-1 (BHV-1) ATCC VR-188 cepa Los Angeles (LA).

3.B.1.1.4 Medios de cultivo, reactivos y buffers

Las células 3T3 fueron crecidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (Gibco) suplementado con glucosa 4,5 g/l, con L-glutamina

4 mM, piruvato de sodio 1 mM y gentamicina 20 μ g/ml; las células P3x63-Ag8.653 en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con L-glutamina 2 mM; glucosa 4,5 g/l; HEPES 10 mM; piruvato de sodio 1 mM; penicilina 200 U/ml y estreptomina 100 μ g/ml. Las demás líneas celulares fueron crecidas en Glasgow-MEM (Gibco) preparado como se indica en la sección 3.A.1.1.2. Todos los medios fueron ajustados a pH 7,2-7,4 con bicarbonato de sodio y suplementados suero fetal bovino 10%.

Caldo nutritivo: caldo nutritivo (polvo, Difco) 8 g; NaCl 5 g y agua destilada c.s.p. 1l.

Medio de cultivo tioglicolato (Difco): casitona 15 g; glucosa 5,5 g; extracto de levadura 5 g, NaCl 2,5 g; L-cistina 0,5 g; tioglicolato de sodio 0,5 g; reazurina sódica 0,001 g; agar 0,75 g y agua destilada c.s.p. 1l. El pH fue ajustado a $7,1 \pm 0,2$ después de la esterilización.

Agar glucosa Sabouraud (Difco): glucosa 40 g, agar 15 g, neopeptona de Difco 10 g y agua destilada c.s.p. 1l.

Medio en caldo para PPLO (Difco): infusión de corazón bovino 50 g; peptona 10 g; NaCl 5 g y agua destilada c.s.p. 1l. Después de la esterilización el pH resultó a igual a $7,8 \pm 0,2$. Luego se agregó penicilina 100 U/ml .

Agar para PPLO: se agregó agar (1,4%) al medio caldo para PPLO antes de esterilizar.

Colorante de Dienes (Difco)

Titulación de virus:

Goma karaya: 0,2% en Glasgow-MEM (2x) sin suero.

Colorante violeta de genciana: cristal violeta 1%, formol 5%, etanol 10% y agua destilada c.s.p. 100 ml.

Suero anti-BVDV (Diarrea vírica bovina) conjugado con fluoresceína fue provisto por INTA, Castelar.

Glóbulos rojos de cobayo: fueron obtenidos por punción yugular en condiciones asépticas, se recogieron en solución Alsevar diluida (1:3) y se mantuvieron a 4°C. Antes de ser usados se lavaron 3 veces con PBS, se centrifugaron 1800 rpm 10 minutos y se hizo una dilución 0,4% en PBS.

Electroforesis en acetato de celulosa:

Se usaron tiras de acetato de celulosa (Cellogel, Chemetron) embebidas en buffer.

Buffer de electroforesis: dietilbarbiturato de sodio 1,04%, ácido barbitúrico 0,134%.

Colorante indicador: azul de bromofenol (0,1%) en etanol.

Colorante negro amido 10B: negro amido 10 B 0,5 g en metanol: ácido acético: agua (45:10:45)

Decolorante: metanol 45%, ácido acético 10% y agua 45%.

Electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE):

Solución acrilamida 30%; N,N'-bis-metilen acrilamida 0,8% en agua.

Buffer del gel concentrador Tris(3 M)–HCl pH 8,8: Tris base 18,15 g, HCl 1 N 24 ml y agua destilada c.s.p. 50 ml.

Buffer del gel de corrida (o gel separador) Tris(0,5 M)–HCl pH 6,8: Tris base 6,05 g, HCl 1 N 48 ml y agua destilada c.s.p. 100 ml.

	Gel concentrador	Gel de corrida (o separador)	
		7,5 %	12%
Acrilamida – <i>bis</i> acrilamida	3,33 ml	7,5 ml	12,0 ml
Buffer del gel concentrador	5 ml	---	---
Buffer del gel separador	---	3,75 ml	3,75 ml
SDS 10%	0,2 ml	0,3 ml	0,3 ml
Persulfato de amonio 1,5%	0,8 ml	1,5 ml	1,5 ml
Agua destilada	10,4 ml	16,95 ml	12,45 ml
TEMED	7 μ l	10 μ l	10 μ l
(tetrametiletilendiamina)		30 ml	30 ml

Buffer muestra: Tris 0,203 g; SDS 0,4 g; 2–mercaptoetanol 1 ml; glicerol 2,2 ml y agua destilada c.s.p. 20 ml.

Buffer de corrida Tris- glicina (10x): Tris 30,3 g, glicina 144 g, SDS 10 g y agua destilada c.s.p. 1000 ml. Se usa diluido 1/10. Ajustar el pH 8,3.

Colorante: coomassie brilliant blue 0,1% en ácido acético: metanol: agua (10: 30: 60).

Decolorante: ácido acético10%, metanol 25% y agua 65%.

Isoelectroenfoque (IEF)

Solución de acrilamida (30%): acrilamida 2,838 g, N,N'-*bis*–metilen acrilamida 0,162 g y agua destilada c.s.p. 10 ml. Se filtra con Whatman N° 1.

Nonidet P-40 (10%): Nonidet P-40 1 g y agua destilada c.p.s. 10 ml

		Concentración final
Acrilamida/bis acrilamida (30%)	3,99 ml	4%
Nonidet P-40 (10%)	6 ml	2%
Anfolito pH 3-10	0.6 ml	1:50
Urea	17.1 g	9,5 M
Agua destilada c.s.p.	30 ml	
Persulfato de amonio (10%)	45 μ l	
TEMED	30 μ l	

Buffer de lisis A; urea 2,85 g; NP-40 0,1 ml; anfolito pH 3-10 0,1 ml, β -mercaptoetanol 0,250 ml y agua c.s.p. 5 ml.

Buffer K: urea 1,08 g, anfolito pH 3-10 0,02 ml y agua destilada c.s.p. 2 ml.

Agarosa 1%: agarosa 0,05 g y agua c.s.p. 5 ml.

Buffers de compartimientos catodico y anódico: NaOH 0,2 M y H_3PO_4 0,1 M, respectivamente.

Solución salina de buffer fosfato (PBS): NaCl 0,15 M, KCl 2,5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $Na_2 HPO_4$ 8 mM, pH 7,4.

Buffer DOC-NP40 para lisis celular: Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 10 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; deoxicolato de sodio 0,5%; Nonidet P-40 1%; fenil metil sulfonill fluoruro (PMSF) 0,5 mM.

3.B.1.1.5 Radiactivos

L-[^{35}S]-metionina (actividad específica 1000 Ci/ mmol o 37 TBq/mmol) fue provista por ICN Biomedicals Research Products, USA

3.B.1.2 Métodos

3.B.1.2.1 *Análisis químico y ensayos microbiológicos*

Se determinaron el contenido de proteínas, el pH, la osmolalidad y la hemoglobina de los sueros. Las determinaciones se realizaron antes y después de la irradiación. La concentración de hemoglobina se determinó por el método de Drabkin and Austin (120) para verificar la correcta recolección de las muestras. La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Lowry (121).

La presencia de bacterias y hongos fue investigada por técnicas convencionales. Se sembraron muestras de sueros en caldo nutritivo, se incubaron 48 horas con agitación a 37°C para la detección de bacterias aeróbicas. Para la determinación de microorganismos anaeróbicos estrictos y facultativos se utilizaron tubos con medio de cultivo tioglicolato, donde se sembraron en profundidad las muestras de sueros, se agregó una capa de aproximadamente 1 cm de parafina líquida estéril y se incubaron a 35°C por 30 días. Para control de hongos se usó agar dextrosa Sabouraud en cajas de Petri, se sembraron muestras de sueros y se incubaron a 35°C durante 7 días.

La detección de micoplasmas en sueros irradiados, se realizó por el método de cultivo de micoplasmas según Freundt (122). Brevemente, 5 ml de suero irradiado se agregó en 50 ml de medio en caldo para PPLO y se incubaron 72 horas a 36°C. Después de esto, se subcultivaron en placas de agar para PPLO

durante 5 días y se tiñeron con colorante de Dienes (123). Las placas teñidas fueron observadas por microscopio (x100).

Con el propósito de determinar si las dosis usadas para irradiar los sueros inactivaban a los micoplasmas, éstos fueron agregados al suero, irradiados y ensayada su viabilidad.

En este estudio se empleó *Mycoplasma orali*. Los micoplasmas fueron inoculados en 50 ml de medio en caldo e incubados a 36°C durante 72 horas. Después de dos subcultivos, 3 alícuotas de 5 ml cada una fueron manipuladas de la siguiente forma: una fue irradiada, otra fue suplementada con suero fetal bovino (Gibco) e irradiada y la tercera se dejó como control. Después del tratamiento, las tres muestras fueron inoculadas en 50 ml de medio en caldo, incubadas a 36°C durante 72 horas, subcultivadas en placas de agar durante 5 días y teñidas como ya fue descrito.

Para detectar la presencia de virus, tales como virus herpes bovino tipo-1 (BHV-1) y Foot and Mouth disease virus (FMDV) o virus de la aftosa se utilizaron líneas celulares MDBK y BHK, respectivamente. Se realizaron tres pasajes de las células correspondientes en medio Glasgow-MEM conteniendo 15% de suero irradiado. Las células fueron teñidas con hematoxilina y eosina y observadas en microscopio óptico para detectar los efectos citopáticos. Cultivos controles fueron crecidos en presencia de suero control (fetal bovino de Gibco).

En otro ensayo viral, FMDV cepa "A" y BHV-1 cepa Los Angeles fueron agregados al suero en una concentración viral de 10^4 UFP/ml y luego irradiado. El BHV-1 fue titulado antes y después de irradiar de acuerdo al método de Talens y Zee (124) con algunas modificaciones. Brevemente, 0,1 ml de inóculo viral fue

agregado sobre monocapas de MDBK por duplicado. Después de la adsorción por 45 minutos a 37°C, las monocapas fueron cubiertas con goma karaya al 0,2% en Glasgow-MEM sin suero. Se incubaron durante tres días a 37°C, se tiñeron con colorante violeta de genciana y se contaron las placas. El mismo ensayo se realizó para el FMDV usando células BHK 21 (C-13) como células huésped.

Para detectar la presencia de virus tales como el de la BVD (diarrea viral bovina) y PI3 (paragripe bovina), se usaron células de testículo fetal bovino (TFB) libres de virus. Un ml de suero fue adsorbido por una hora sobre células TFB en frascos de 25 cm². Luego el suero fue removido y se agregó Glasgow-MEM sin suero. Cultivos celulares en tres pasajes ciegos fueron examinados antes de considerar a la muestra negativa.

Todos los pasajes fueron examinados para detectar la presencia BDV con la técnica de anticuerpos por fluorescencia directa (125).

Para PI3 se realizó el ensayo de hemoadsorción (126) en el tercer pasaje. Brevemente, monocapas de TFB fueron lavadas con PBS y cubiertas con 100 µl de la suspensión de glóbulos rojos obtenidos según se indica en la sección 3.B.1.1.4. Luego fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente y lavadas tres veces con PBS. Finalmente, las monocapas fueron observadas en un microscopio óptico (x40) para determinar la presencia de glóbulos rojos adheridos a las células.

3.B.1.2.2 *Mantenimiento celular y curvas de crecimiento.*

Células MDBK, BHK y 3T3 se propagaron a través de 7 subcultivos, usando medios suplementados con 15% de suero irradiado y suero control (SFB Gibco). Las células fueron examinadas en los subcultivos para evidenciar cambios morfológicos o efectos citotóxicos.

Por otra parte, 5×10^4 células MDBK, BHK 21 (C-13) y 3T3 se sembraron en cajas de Petri (Falcon Tissue Dish) y fueron mantenidas en medio de cultivo suplementado con 10% de suero irradiado y suero fetal bovino control (SFB Gibco). El número total de células fue contado cada 24 horas, se hicieron triplicados de cada tiempo. Los cultivos fueron controlados hasta el fin de la fase logarítmica.

3.B.1.2.3 *Ensayos de eficiencia de clonado*

Las células utilizadas para determinar los ensayos de eficiencia de clonado fueron P3x63-Ag8.653. Las células fueron crecidas en medio RPMI 1640 suplementado con 5 y 10% de suero irradiado y suero control (SFB Gibco). Las células fueron inoculadas a una concentración de 1 y 5 células/pozo en placas de 96-pozos con 200 μ l de medio de crecimiento e incubados por 15 días a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5%. El porcentaje de eficiencia de clonado fue calculado como el número de células positivas/número total de pozos inoculados x 100.

3.B.1.2.4 *Análisis de proteínas del suero*

La electroforesis en acetato de celulosa fue realizada según el método convencional. Las muestras fueron corridas a 1.5 mA por cada cinta. Las proteínas fueron visualizadas por tinción de las cintas con negro amido 10B y decoloradas. La determinación cuantitativa de las proteínas fue hecha por espectro-densitometría a 620 nm.

La SDS-PAGE fue realizada según Laemmli (127) en placas de geles de 0,75 mm de espesor con 7,5% de poliacrilamida usando un aparato vertical de 18 cm de altura por 20 cm de ancho. Se prepararon las placas con gel separador, se dejó polimerizar y luego se agregó una capa de gel concentrador. Luego de la polimerización de este último se sembraron las muestras de sueros que previamente habían sido tratadas con el "buffer muestra" durante 3 minutos en un baño de agua hirviendo para su desnaturalización. La corrida se efectuó a corriente constante de 20 mA por gel durante 3 horas. Las proteínas fueron visualizadas por tinción con coomassie brilliant blue y decoloradas antes de su secado.

La focalización isoelectrica (isoelectroenfoque) fue realizada como la describe O'Farrell (128) con algunas modificaciones. Los geles fueron preparados en placas (200 x 180 x 0,75 mm) con 4% de acrilamida; 0,2% de *bis* acrilamida, 2% NP-40, anfolitos de pH entre 3-10 y 9,5 M urea. Las soluciones de los electrodos superior e inferior fueron 0,2 M NaOH (cátodo) y 0,1 M H₃PO₄ (ánodo) respectivamente. El gel fue precorrido sin muestra (con buffer A y NaOH 0,2 M) durante 15 minutos a 200 V, 30 minutos a 300 V y 30 minutos a 400 V. Las muestras se mezclaron (1:1) con una solución de NP-40 en buffer A (1:50) y se sembraron 20 µl. Luego se agregaron 20 µl de una solución Buffer K en agua

(1:1,3) y finalmente 50 μ l de agarosa. Después de la aplicación de las muestras, la corrida fue realizada durante 12 horas a 400 V y 1 hora a 800 V. Los geles fueron teñidos con coomasie brilliant blue y decolorados antes de ser secados.

La electroforesis en gradiente de pH no equilibrado (NEPHGE) fue llevada a cabo de acuerdo a O'Farrell (129) para la separación de proteínas básicas. Las condiciones de los geles fueron las mismas que las descritas para el isoelectroenfoque. Las soluciones de los electrodos superior e inferior fueron 0,1 M H_3PO_4 (ánodo) y 0,2 M NaOH (cátodo), respectivamente. El gel fue precorrido durante 35 minutos a 200 V y durante 35 minutos a 300 V. La corrida con muestra fue realizada a 400 V durante 5 horas (2.000 V.h).

3.B.1.2.5 Incorporación de L-[^{35}S] metionina y análisis de proteínas celulares.

La síntesis de proteínas fue estudiada en células MDBK por incorporación de L-[^{35}S]-metionina en presencia de suero irradiado o suero control.

Las células fueron propagadas a través de 7 subcultivos, usando medio suplementado con 5 y 10% de suero irradiado y suero referencia. Las células fueron inoculadas en placas de 24-pozos. Las monocapas fueron lavadas una vez con Glasgow-MEM libre de metionina y luego fueron agregados a cada pozo 100 μ Ci de L-[^{35}S]-metionina en 400 μ l de Glasgow-MEM libre de metionina. Después de 12 horas a 37°C, el medio fue removido y las células fueron lavadas tres veces con PBS fría. Las células fueron removidas con tripsina y contadas en una cámara de Neubauer. Por otro lado, las células fueron lisadas con 400 μ l de

buffer DOC-NP40 frío. Después de la lisis, el extracto celular fue centrifugado a 8.000 g durante 20 minutos a 4°C para separar las células enteras y el sobrenadante fue congelado a -20°C para el análisis de las proteínas celulares.

Se precipitaron 5 µl de sobrenadante con 2 ml de ácido tricloroacético al 10%, se dejaron en un baño de hielo durante 10 minutos, se filtraron a través de membranas tipo Millipore y se lavaron 3 veces con tricloroacético 5%. Los filtros se secaron, se transfirieron a viales conteniendo 5 ml del líquido de centelleo de Bray y se contaron en un sistema de centelleo líquido Tricarb 4530 (Packard Instruments Co., Downers Grove, ILL, USA).

Para el análisis de proteínas celulares, el sobrenadante del extracto celular fue ajustado a las condiciones del buffer muestra de la electroforesis SDS-PAGE según el procedimiento de Laemmli anteriormente mencionado. La SDS-PAGE fue realizada en geles de poliacrilamida al 12%. La fluorografía se efectuó sumergiendo los geles en dimetilsulfóxido (DMSO) puro 2 veces durante 30 minutos (deshidratación total) y luego en una solución de 2,5-difenil oxazole (PPO) al 20% (p/p) en DMSO al 22,2% (p/v) durante 3 horas, de acuerdo al procedimiento de Bonner and Laskey (130). Los geles fueron nuevamente hidratados durante 1 hora en agua destilada, lavados con metanol:ácido acético:agua (50:10:40), secados y colocados en contacto con un film para rayos X (AGFA) a -70°C.

3.B.2 Inactivación del Virus Herpes Bovino tipo-1 (BHV tipo-1)

3.B.2.1 Materiales

3.B.2.1.1 *Virus, líneas celulares y medios de cultivo*

Se usó a través de todo el estudio el virus herpes bovino tipo-1 (BHV-1) ATCC VR-188 cepa Los Angeles (LA). Las partículas virales se replicaron en células Madin Darby bovine kidney (MDBK ATCC CLL 22) previamente cultivadas en Glasgow-MEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino 10% (Gibco); caldo fosfato de triptosa 0,2 %; glutamina 2 mM; 0,021 % de NaHCO₃ 7 %; penicilina 200 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Richet).

Se usó Bactoagar 2% (Difco) para cubrir las monocapas.

Colorante violeta de genciana: cristal violeta 1%, formol 5%, etanol 10% y agua destilada c.s.p. 100 ml.

3.B.2.1.2 *Fuente de irradiación y dosimetría*

La irradiación se efectuó con radiación gamma de una fuente de ⁶⁰Co de 18,5 PBq (5 x 10⁵ Curie) de la Planta Industrial de CNEA. La dosimetría fue realizada usando un dosímetro de Fricke.

3.B.2.2 Métodos

3.B.2.2.1 *Irradiación de las muestras*

Las células infectadas fueron cultivadas en medio libre de suero. Las monocapas de células que presentaron efecto citopático fueron congeladas y descongeladas tres veces y el virus fue cosechado. La suspensión viral fue fraccionada en dos alícuotas; una fue clarificada por centrifugación durante 15 minutos a 1.060 g a 4°C y la otra fue usada sin clarificar.

Se determinó el título viral y después de esto la suspensión viral fue colocada en criotubos de policarbonato y guardada a -20°C hasta su irradiación.

Luego las suspensiones virales fueron congeladas -78°C e irradiadas con dosis comprendidas entre 2.5 y 30 kGy.

Después de la irradiación las muestras fueron conservadas a -20°C hasta que fueron empleadas en los ensayos virales. Muestras sin irradiar, sometidas al mismo tratamiento, fueron usadas como controles. Para determinar el título viral los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.B.2.2.2 Titulación Viral

Para obtener el título viral, se utilizó el sistema de unidades formadoras de placas (UFP). Para la infección, monocapas confluentes de MDBK fueron lavadas una vez con medio Glasgow-MEM libre de suero. Después se prepararon diluciones seriadas al décimo, usando medio libre de suero, pH 7,2-7,4, como diluyente. 0,2 ml de estas diluciones fueron agregados a monocapas celulares y se dejaron adsorber durante 1 hora a 37°C. Luego, 3 ml de agar de cubrimiento más Glasgow-MEM libre de suero (2x) (1:1) fueron agregados sin remover el

inóculo. Los cultivos infectados fueron incubados a 37°C hasta que se observó un extenso efecto citopático (generalmente entre 48-72 horas). Luego se removió la capa de agar y se agregaron 3 ml de colorante. Después de 10 minutos las botellas fueron lavadas con agua, secadas al aire y se contaron las placas.

3.B.2.2.3 Cálculo de los valores D_{10}

El valor D_{10} es la dosis de radiación que reduce la población viral en un 90%. Los valores D_{10} fueron calculados por la siguiente fórmula que asume un modelo lineal (131) $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \epsilon$ donde, Y es el \log_{10} [(Placas contadas en muestras irradiadas/Placas contadas en muestras no irradiadas) \times 100], donde β_0 y β_1 , son coeficientes de regresión verdaderos pero desconocidos; X es la radiación gamma en kGy y ϵ es el error experimental. Este modelo fue usado para obtener una estimación de la radioresistencia viral. El valor de uno sobre la pendiente estimada (β_1) fue el valor D_{10} en kGy. El valor de r^2 fue también calculado para cada línea de regresión, una medida de asociación con 1 equivale a un perfecto ajuste.

3.B.2.2.4 Factor modificador de dosis (FMD)

La modificación de la respuesta biológica a las radiaciones debido a la presencia de sensibilizadores, protectores o factores físicos, puede ser cuantificada por el “factor modificador de dosis” (FMD) descrito por Jagger (132)

como la relación de dosis que producen un mismo efecto (por ejemplo, las dosis correspondientes al 10% de sobrevida) en ausencia y presencia del modificador:

$$\text{FMD} = \frac{D_{10\% \text{ en ausencia del modificador}}}{D_{10\% \text{ en presencia del modificador}}$$

Si el modificador disminuye el efecto de la radiación, el FMD es un número menor que uno, y es llamado "factor reductor de dosis" (FRD), debido a que el modificador reduce la dosis efectiva por ese factor. Si el modificador incrementa el efecto de la radiación, el FMD es mayor que 1, y es llamado "factor aumentador de dosis" (FAD).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.A HIDROGELES

4.A.1 Inmovilización de ampicilina

Los perfiles de liberación de ampicilina desde los hidrogeles obtenidos por polimerización radioinducida a -78°C con dosis de 10 y 25 kGy se muestran en la Fig. 4.1, en la cual la cantidad acumulada de droga liberada por unidad de área de dispositivo Q (g/cm^2) fue graficada en función del tiempo.

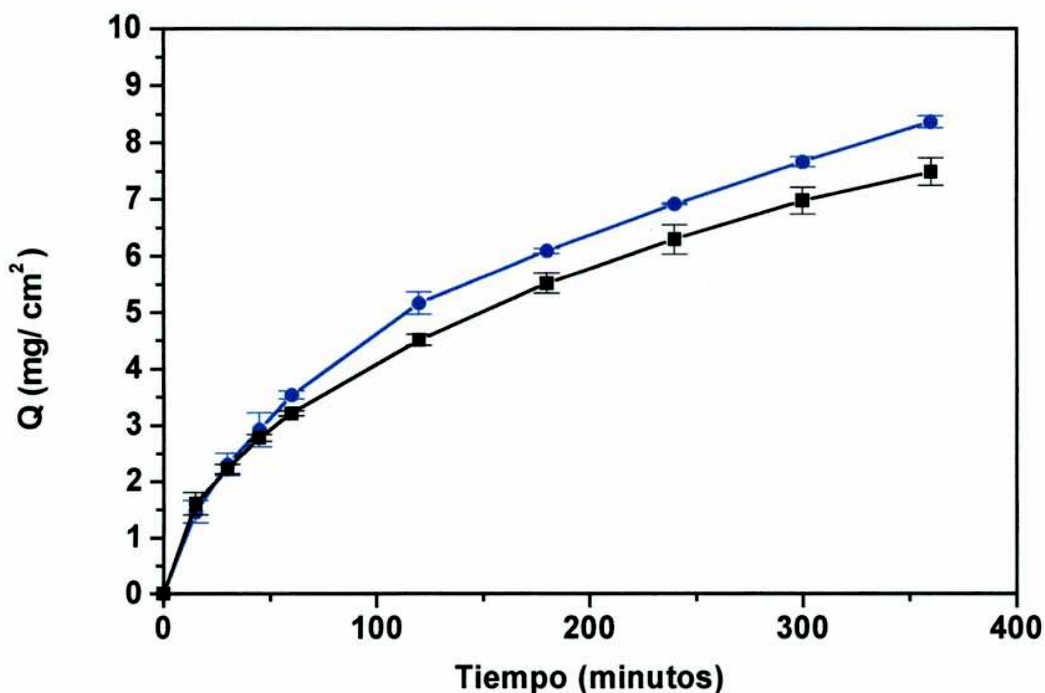


Fig. 4.1: Cantidad acumulada de ampicilina liberada por unidad de área (Q) desde hidrogeles obtenidos con 10 kGy (●) y 25 kGy (■) en función del tiempo (Promedio \pm DS de tres experimentos)

La alta liberación inicial puede ser atribuida ya sea a la liberación de moléculas de droga de la superficie de la matriz como al bajo potencial químico de la ampicilina en el estadio temprano, que produce una gran fuerza impulsora, causando una rápida liberación.

La liberación de drogas desde una matriz polimérica insoluble (v. gr. el polímero de HEMA usado en la presente investigación) es normalmente descrita por la ecuación desarrollada por Higuchi (133) si la difusión es el factor determinante del proceso de liberación de droga:

$$Q = (D_m(2A - C_p) C_p t)^{1/2} \quad (1)$$

donde Q es la cantidad acumulada de droga liberada por unidad de área de dispositivo (g/cm^2); A es la cantidad de droga sólida impregnada en una unidad de volumen de dispositivo (g/cm^3); C_p es la solubilidad de droga en el hidrogel, t es el tiempo y D_m es la difusividad efectiva de droga en la matriz polimérica.

De acuerdo a la ecuación 1, la cantidad acumulada de ampicilina liberada (Q) por unidad de área de hidrogel resultaría una función lineal de la raíz cuadrada del tiempo ($t^{1/2}$).

Como se demuestra en la Fig. 4.2, esta relación lineal fue obtenida cuando los datos de liberación de droga de la Fig. 4.1 fueron graficados en función de la raíz cuadrada del tiempo de acuerdo a la ecuación 1.

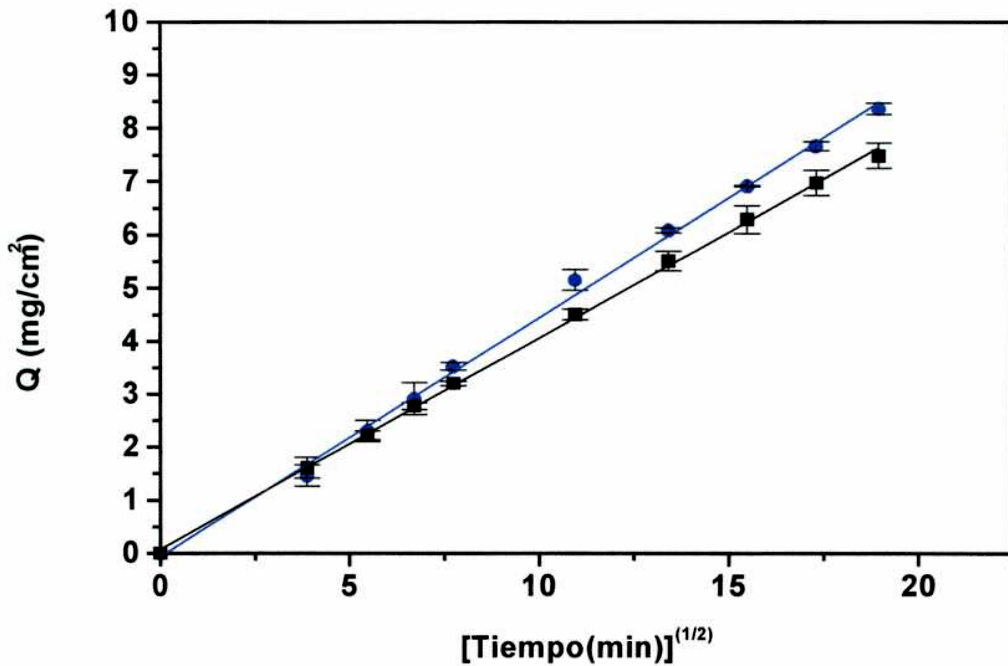


Fig. 4.2: Relación lineal entre la cantidad acumulada de ampicilina liberada por unidad de área (Q) desde hidrogel obtenidos con 10 kGy (●) y 25 kGy (■) y la raíz cuadrada del tiempo ($t^{1/2}$).

Las velocidades de liberación de droga calculada de las respectivas pendientes fueron $(0,454 \pm 0,010) \text{ mg/cm}^2 \cdot (\text{min})^{1/2}$ para 10 kGy y $(0,395 \pm 0,005) \text{ mg/cm}^2 \cdot (\text{min})^{1/2}$ para 25 kGy.

Para obtener el perfil de liberación de ampicilina en relación con la cantidad inicial de droga presente, la cantidad acumulada expresada como porcentaje de la cantidad inicial fue graficada en función del tiempo (Fig. 4.3). En ambos casos, la cantidad liberada después de 6 horas fue el 50% del valor inicial.

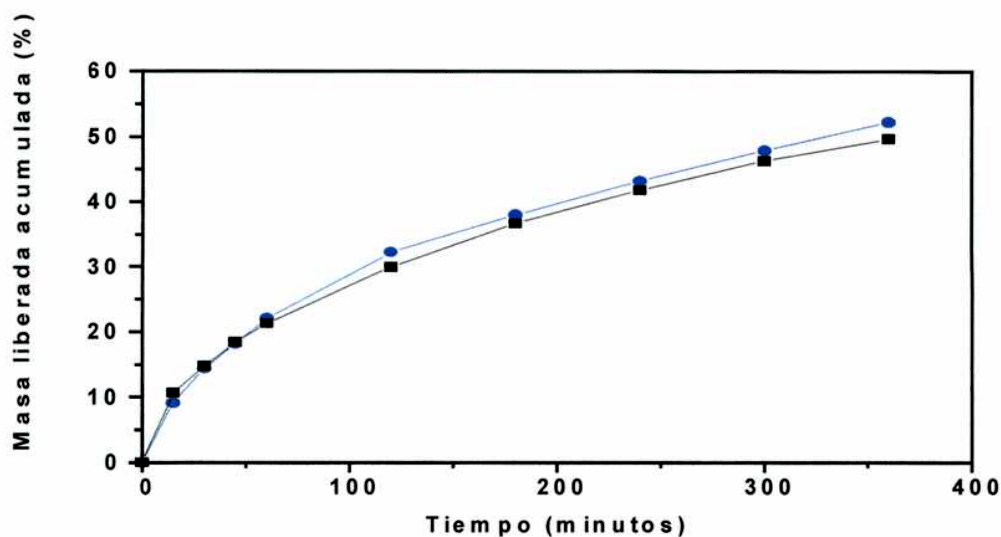


Fig. 4.3: Masa acumulada de ampicilina liberada (% de la cantidad inicial) desde hidrogeles obtenidos con 10 kGy (●) y 25 kGy (■) en función del tiempo.

Con el fin de determinar si el perfil de liberación obtenido microbiológicamente se correlacionaba con el determinado espectrofotométricamente, la actividad biológica y la concentración acumulada de droga liberada desde los pequeños balines fueron graficados en función del tiempo (Fig. 4.4).

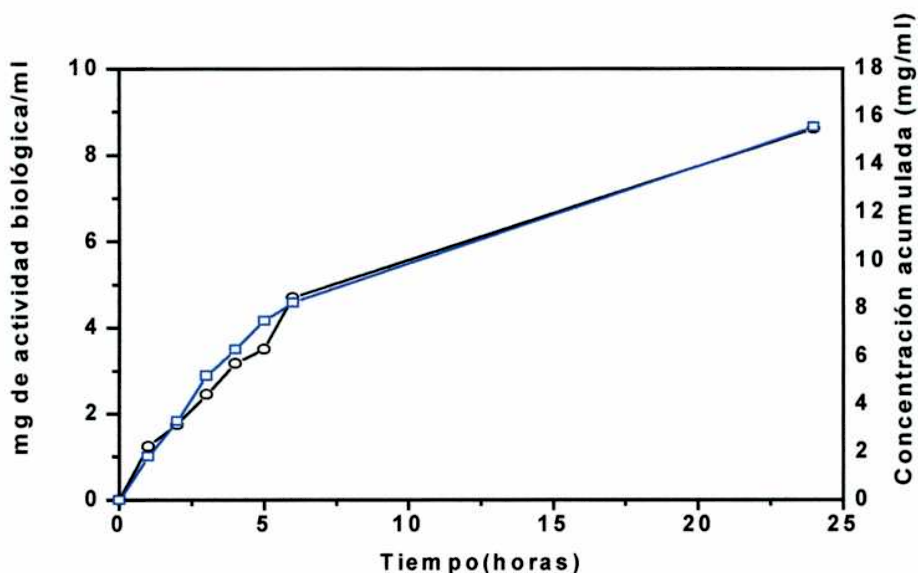


Fig. 4.4: Liberación de ampicilina *in vitro* desde hidrogeles en forma de pequeños balines. Concentración acumulada (□) y actividad biológica (○) en función del tiempo.

Finalmente, con el fin de comparar los niveles de ampicilina en plasma de perros tratados con balines de hidrogeles o con tabletas convencionales, la actividad biológica en ambos casos fue graficada en función del tiempo (Fig. 4.5).

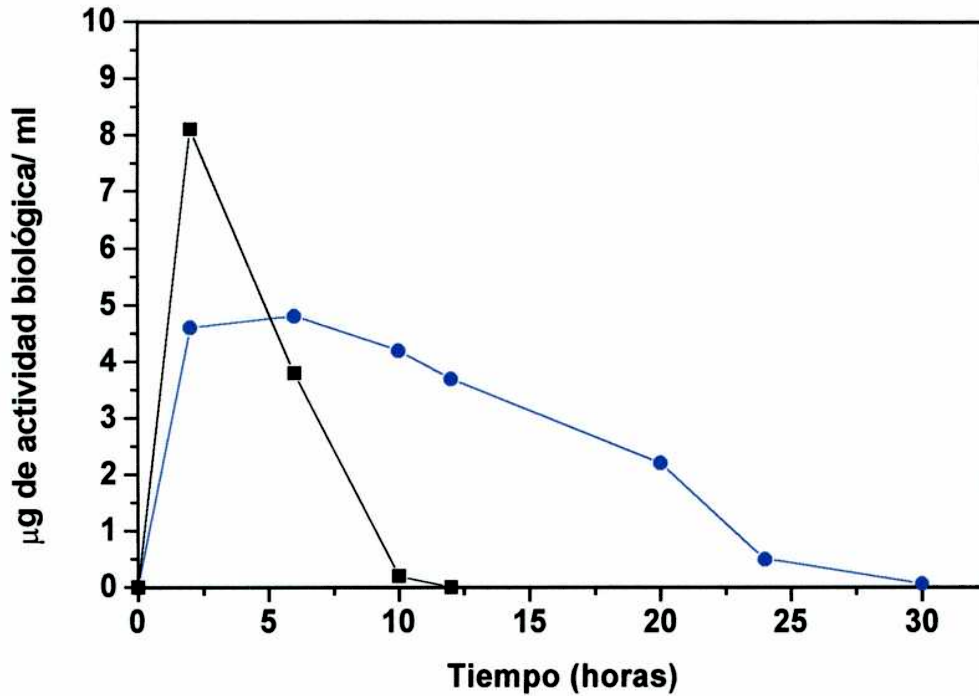


Fig. 4.5: Perfiles de liberación de ampicilina *in vivo* desde hidrogeles (•) y tabletas (■)

Se determinó en cada caso los siguientes parámetros fármaco-cinéticos: Tiempo de concentración máxima (T_{max}) 2 y 6 horas; Concentración máxima (C_{max}) 8 µg/ml y 4,8 µg/ml; Área bajo la curva concentración en plasma/tiempo $(ABC)_{0-12} = 40,1 \mu\text{g}\cdot\text{horas/ml}$ y $(ABC)_{0-30} = 84,2 \mu\text{g}\cdot\text{horas/ml}$ para tabletas y balines, respectivamente.

Los implantes de hidrogeles en cultivos celulares de BHK 21 (C-13) no produjeron daño visible microscópicamente ni alteraciones en el crecimiento. La autopsia de animales con implantes de hidrogeles placebo en la cavidad intraperitoneal no presentaron ninguna alteración con respecto a los controles.

Se examinó la estabilidad de la ampicilina sola después de la irradiación. Fue estable a dosis usadas para la polimerización (Fig. 4.6).



Fig 4.6. Halos de inhibición de crecimiento de *M. luteus* por ampicilina según la técnica de difusión en agar.

4.A.2 Inmovilización de bacterias

4.A.2.1 Determinación del contenido de agua en equilibrio (W_e)

Se determinó el contenido de agua en equilibrio de los 22 hidrogeles obtenidos. En la Tabla 4.1 se muestran los valores de W_s , W_d y W_e , obtenidos según la ecuación de la sección 3.A.2.2.1, de hidrogeles con un porcentaje

constante de monómeros HEMA o HEA, y cantidades variables de glicerina y agua. Se puede observar que los porcentajes de W_e resultaron mayores en los hidrogeles de poli(HEA) que en los de poli(HEMA), indicando la mayor hidrofiliidad de los primeros.

Tabla 4.1: Valores W_s , W_d y del contenido de agua en equilibrio (W_e) de los hidrogeles de HEMA y HEA con diferente porcentaje de agua y glicerina

Muestra N°	HEMA (%)	H ₂ O (%)	Glicerina (%)	W_s (g) ^a	W_d (g) ^a	W_e (%)
11	50	50	0	0,5838	0,2368	59,4
12	50	40	10	0,4963	0,2208	55,5
13	50	30	20	0,4040	0,2056	49,1
14	50	20	30	0,5850	0,2854	51,2
15	50	10	40	0,4524	0,2187	51,6
16	50	0	50	0,6694	0,3602	46,2
Muestra N°	HEA (%)	H ₂ O (%)	Glicerina (%)	W_s (g)	W_d (g)	W_e (%)
21	50	50	0	0,7934	0,1816	77,1
22	50	40	10	0,9585	0,2680	72,0
23	50	30	20	0,7417	0,2283	69,2
24	50	20	30	0,7206	0,178	69,8
25	50	10	40	0,7342	0,2159	70,6
26	50	0	50	0,8992	0,842	68,4

^a W_s y W_d masa del hidrogel hidratado y seco, respectivamente.

En la Figura 4.7 se muestra el comportamiento de los valores de W_e en función del contenido de glicerina para los hidrogeles de poli(HEMA) y poli(HEA).

El contenido de agua en equilibrio disminuyó a medida que aumentó el contenido de glicerina, pudiéndose inferir que la presencia de glicerina produjo una disminución de la hidrofiliidad de la matriz polimérica.

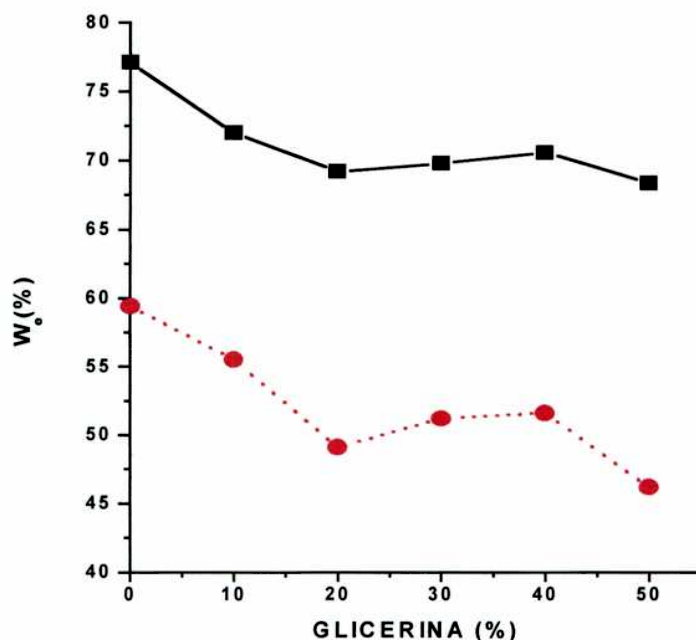


Fig. 4.7: Comportamiento de los valores del contenido de agua en equilibrio (W_e) en función del contenido de glicerina en hidrogeles de HEMA ($\cdots \bullet \cdots$) y HEA ($\text{---} \blacksquare \text{---}$).

En la Tabla 4.2 se muestran los valores de W_s , W_d y W_e de los hidrogeles obtenidos por copolimerización de monómeros diferentes con HEMA, se puede observar que la hidrofiliidad disminuyó en el siguiente orden DMAA>NVP>DMAEMA.

Tabla 4.2: Valores W_s , W_d y del contenido de agua en equilibrio (W_e) de los hidrogeles obtenidos por copolimerización de HEMA con NVP, DMAA y DMAEMA.

Muestra N°	HEMA (%)	NVP (%)	DMAA (%)	DMAEMA (%)	H ₂ O (%)	W_s (g)	W_d (g)	W_e (%)
31	25	25	-	-	50	0,7271	0,1981	72,7
32	25	-	25	-	50	0,7400	0,1645	77,8
33	25	-	-	25	50	0,325	0,1902	64,3

En la Tabla 4.3 se muestran los valores de W_s , W_d y W_e de los hidrogeles obtenidos variando tanto las cantidades de monómeros (HEMA o HEA) como las de glicerina y agua.

Tabla 4.3: Valores W_s , W_d y del contenido de agua en equilibrio (W_e) de los hidrogeles con cantidades variables de monómeros (HEMA o HEA), agua y glicerina

Muestra N°	HEMA (%)	H ₂ O (%)	Glicerina (%)	W_s (g)	W_d (g)	W_e (%)
41	30	35	35	*	*	*
42	30	50	20	0,5517	0,2378	56,9
43	30	20	50	0,4206	0,2362	43,8
44	70	15	15	0,6567	0,3639	44,6

Muestra N°	HEA (%)	H ₂ O (%)	Glicerina (%)	W_s (g)	W_d (g)	W_e (%)
45	30	35	35	1,0067	0,1424	85,8
46	30	50	20	1,1905	0,599	86,6
47	30	20	50	1,1751	0,1511	87,1
48	70	15	15	0,8350	0,3188	61,8

* No polimerizó

Se puede observar que la hidrofiliidad de las matrices de poli(HEA) resultó en general más elevada que la de las matrices obtenidas con 50% de HEA mientras que la hidrofiliidad de las de poli(HEMA) resultaron similares a las obtenidas con un 50% de monómero.

Con el propósito de analizar la porosidad de los hidrogeles, pequeños discos de las matrices poliméricas fueron liofilizados, metalizados con oro y observados en un microscopio electrónico de barrido (SEM) Cambridge Stereoscan 25 (ver sección 3.A.2.2.4-i). En la Fig. 4.8 se muestran las microfotografías de los hidrogeles de poli(HEMA) N° 11, 12, 13, 14, 15 y 16; y en la Fig. 4.9 las microfotografías de los hidrogeles de poli(HEA) N° 21, 22, 23 y 24; cuyas composiciones se detallan en la Tabla 4.1. En las matrices de poli(HEMA) se observó que el tamaño del poro aumentó con el incremento del contenido de glicerina alcanzando un máximo en la muestra N° 14 y luego disminuyó.

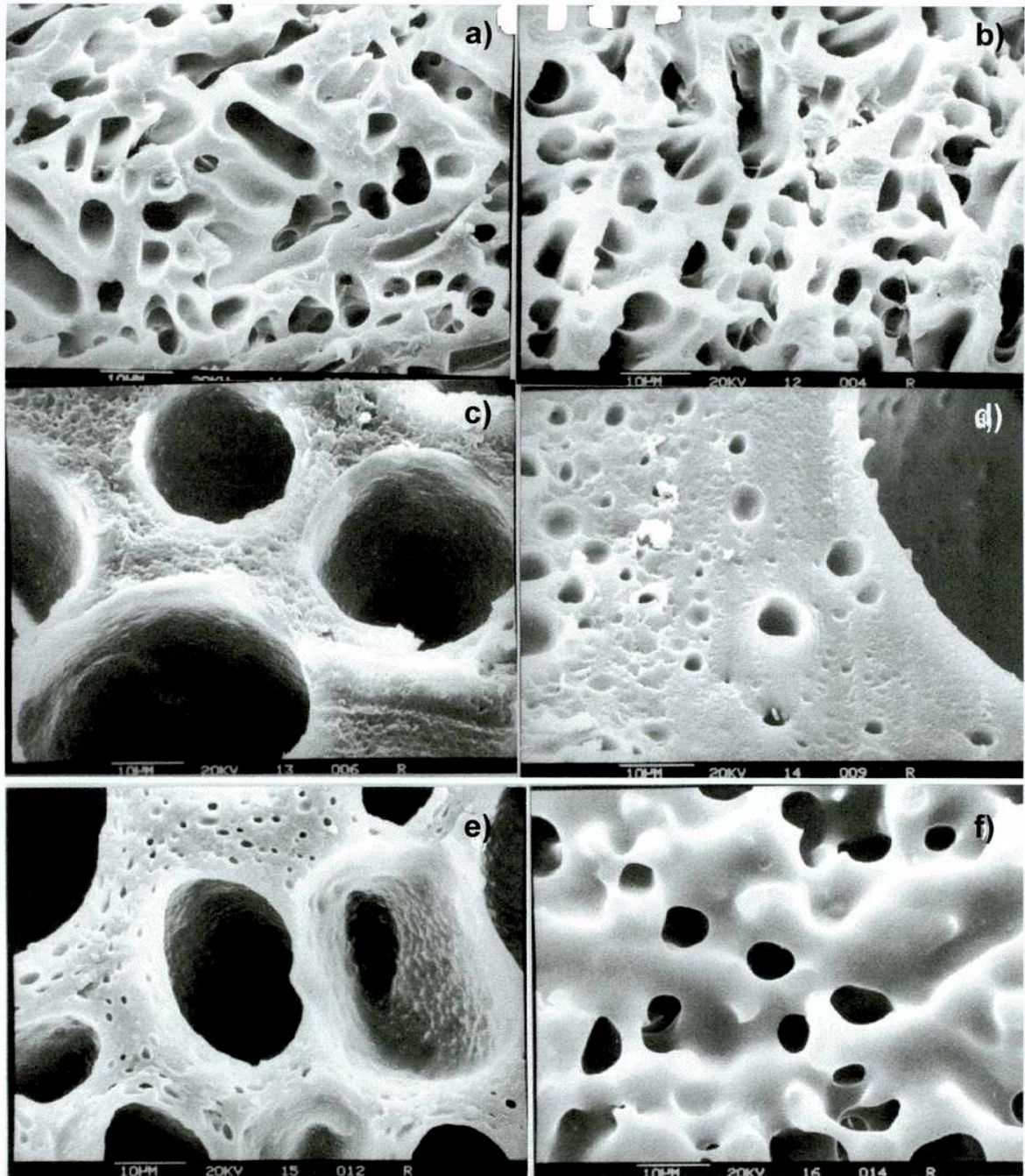


Fig. 4. 8: Microfotografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido (SEM) de hidrogeles de poli(HEMA): (a) N° 11, (b) N° 12, (c) N° 13, (d) N° 14, (e) N° 15 y (f) N° 16. Las barras representan 10 μ m.

En los hidrogeles de poli(HEA), el tamaño del poro disminuyó en forma sostenida con el contenido de glicerina.

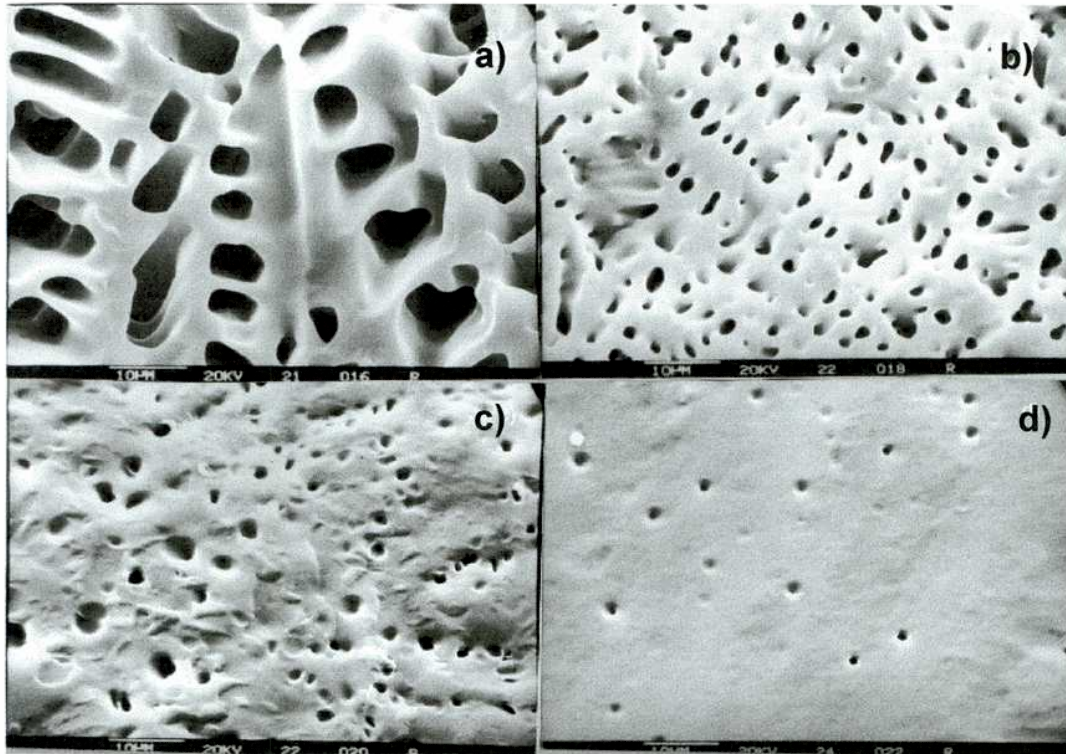


Fig. 4.9: Microfotografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido (SEM) de hidrogeles de poli(HEA): (a) N° 21, (b) N° 22, (c) N° 23 y (d) N° 24. Las barras representan 10 μ m.

4.A.2.2 Ensayos de inmovilización de *P. aeruginosa* ATCC 27853

Se seleccionaron 10 hidrogeles para realizar los estudios preliminares de adhesión de *P. aeruginosa*. Se utilizaron los hidrogeles N° 11, 13, 15, 21, 23, 25, 31, 32, 42 y 46. En la Fig. 4.10 se muestran las microfotografías de la microscopía electrónica de barrido de las diferentes matrices después de 48 horas de incubación (ver sección 3.A.2.2.2-i). La evaluación de las mismas sugirió que la adhesión bacteriana fue en el siguiente orden N° 46 > N° 11 > N° 15 > N° 25 > N° 23 > N° 21, mientras que las matrices N° 13, N° 31 y N° 32 presentaron una adhesión despreciable y la N° 42 se disolvió en el proceso de preparación para la SEM.

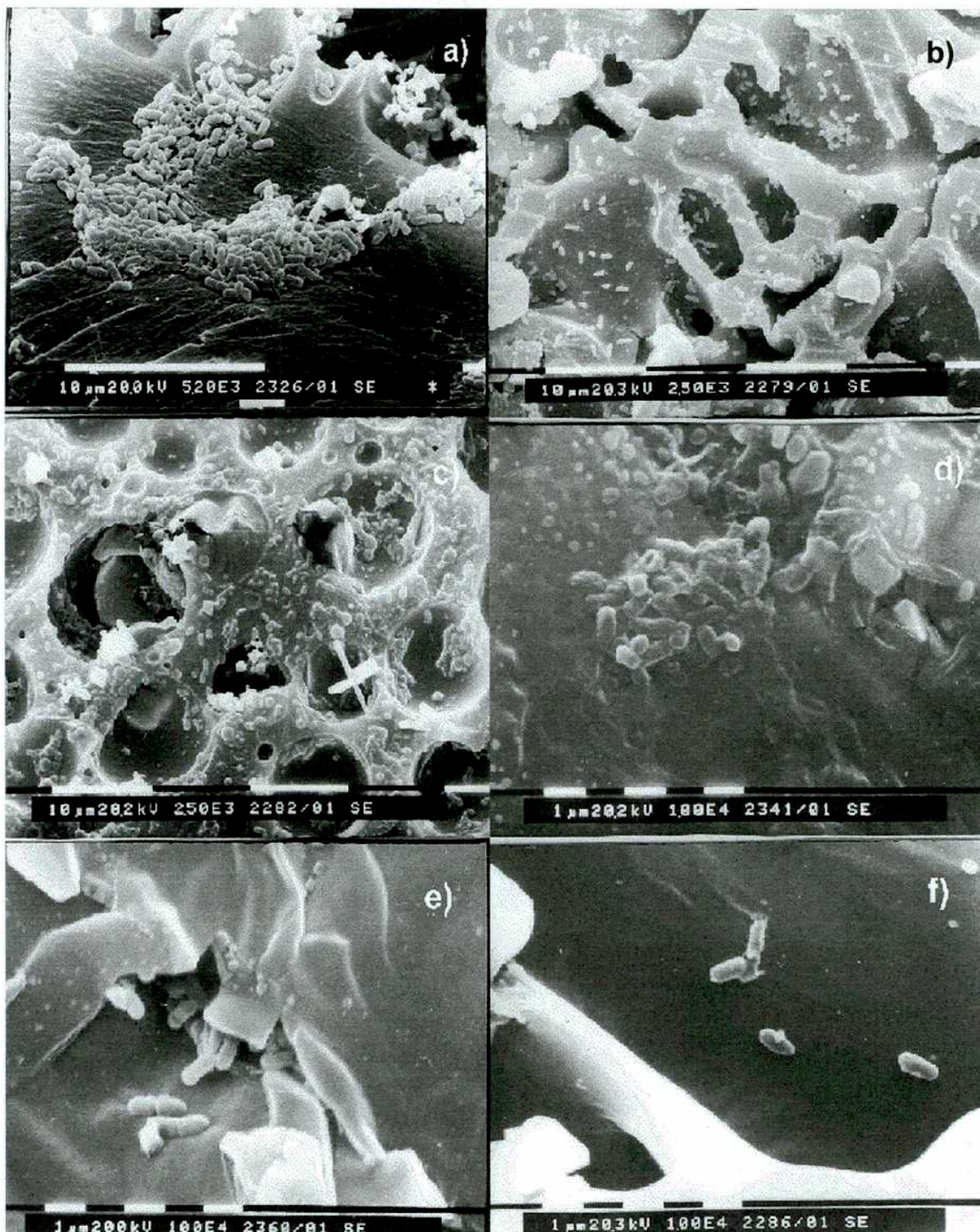


Fig. 4.10: Microfotografías SEM de *P. aeruginosa* adheridas a hidrogeles (ver Materiales y Métodos): (a) N° 46, (b) N° 11, (c) N° 15, (d) N° 25, (e) N° 23 y (f) N° 21. Las barras de (a), (b), (c) representan 10μm y las de (d), (e) y (f) representan 1μm.

4.A.2.3 Inmovilización de bacterias aisladas de la costa del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de iones pesados.

Se inmovilizaron en el hidrogel N° 46 [HEA/agua/glicerina, (30:50:20)] bacterias aisladas del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de Pb(II), Cd(II) y Cu(II), según se indica en la sección 3.A.2.2.2-ii. En la tabla 4.4 se muestran las cepas bacterianas aisladas que toleran la presencia de los iones metálicos y las cantidades de iones metálicos agregadas en cada medio.

Tabla 4.4: Cepas bacterianas aisladas del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de iones metálicos inmovilizadas en el hidrogel N° 46 [HEA/agua/glicerina (30:50:20)] y la concentración de los iones metálicos.

Cepas bacterianas	Ion metálico	Concentración inicial
<i>E. coli</i>	Pb(II)	0,3 mM
<i>E. coli</i>	Cd(II)	1 mM
<i>Flavobacterium</i> sp y <i>Acinetobacter</i> sp.	Cu(II)	1,5 mM

Finalizado el proceso de inmovilización se sacaron muestras de los hidrogeles con bacterias adheridas y de las bacterias libres, y fueron preparadas para ser examinadas en un microscopio electrónico de barrido con EDAX acoplado según se indica en la sección 3.A.2.2.4-ii

En la Fig. 4.11 se muestran las microfotografías y los espectros de rayos X del hidrogel N° 46 [HEA/agua/glicerina (30:50:20)] con bacterias adheridas que crecen en presencia de Cd(II), del hidrogel sin bacterias y bacterias colectadas por filtración. Se puede observar que el pico de energía de rayos X correspondiente al

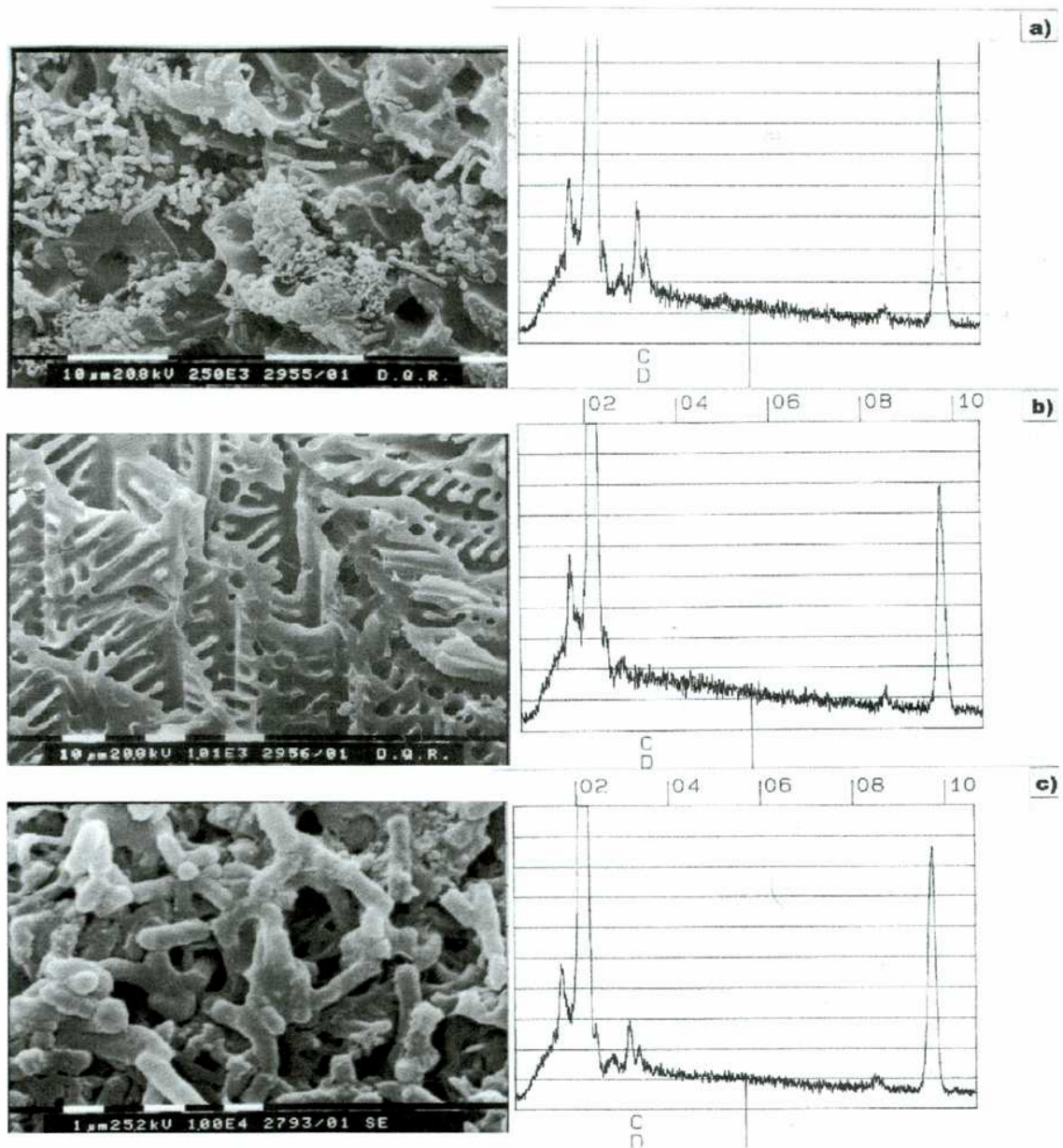


Fig 4.11: Microfotografías SEM y espectros de rayos X obtenidos EDAX (ver Materiales y Métodos): (a) Bacterias aisladas del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de Cd(II) inmobilizadas en hidrogel N° 46, (b) Hidrogel sin bacterias y (c) Bacterias libres colectadas por filtración. Las barras de (a) y (b) representan 10 μ m y la de (c) 1 μ m.

Cd(II) fue detectado en el hidrogel con bacterias y en las bacterias libres colectadas por filtración. El pico de energía correspondiente al cadmio no fue detectado en el hidrogel sin bacterias.

En la Fig. 4.12 se muestran la microfotografía de las bacterias que toleran la presencia de Pb(II) adheridas al hidrogel N° 46 y los picos de energía de rayos X correspondientes al metal.

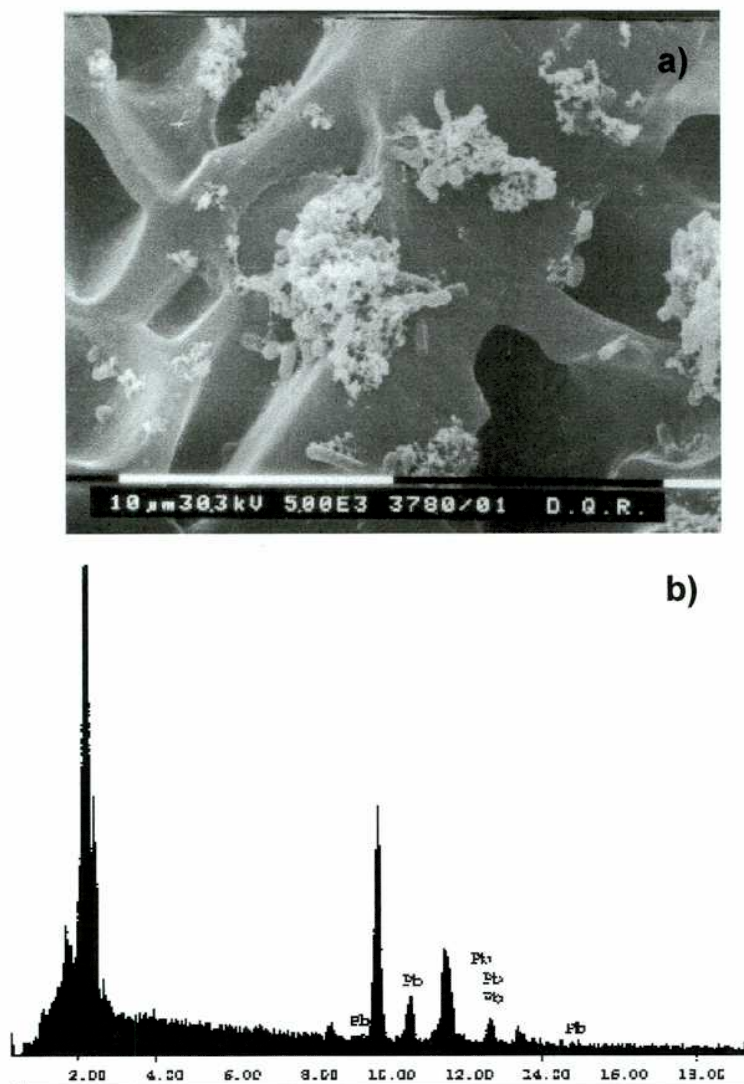


Fig. 4.12: Microfotografía SEM (a) y espectro de rayos X obtenidos por EDAX (b) de bacterias aisladas del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de Pb(II) e inmobilizadas en el hidrogel N° 46 según se indica en Materiales y Métodos. La barra representa 10 μm.

Resultados similares se encontraron en las bacterias libres colectadas por filtración pero no se detectaron picos de energía en los hidrogeles sin bacterias (datos no mostrados).

En la Fig. 4.13 se muestra la microfotografía SEM de las bacterias que toleran la presencia de Cu(II) adheridas a la matriz polimérica en estudio. Los picos de energía correspondientes al Cu(II) no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas por EDAX.

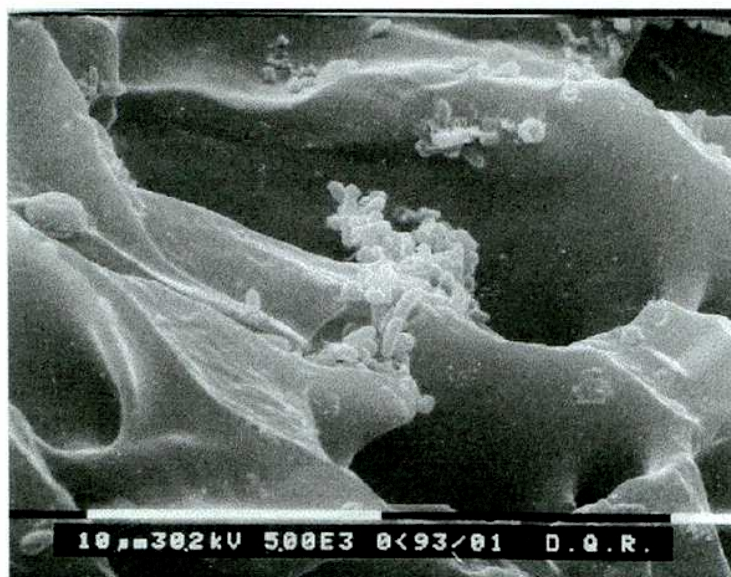


Fig. 4.13: Microfotografía SEM de bacterias aisladas del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de Cu(II) e inmovilizadas en el hidrogel N° 46 según se indica en Materiales y Métodos. La barra representa 10 μm .

Los resultados de la SEM indican que la adhesión de las células bacterianas a los hidrogeles N° 46 resultó, según la capacidad de los microorganismos de tolerar la presencia de los iones metálicos, en el siguiente orden : Cd(II) > Pb(II) > Cu(II). Del análisis cualitativo por EDAX se puede inferir que mientras *E. coli* [Cd(II)] y *E. coli* [Pb(II)] acumularían iones metálicos, la asociación de *Acinetobacter* sp y *Flavobacterium* sp[Cu(II)] no lo haría.

4.A.2.4 Estudios de remoción de iones metálicos

Hidrogeles N° 46 [HEA/agua/glicerina (30:50:20)] con bacterias inmovilizadas fueron utilizados para estudios de remoción de metales de soluciones acuosas contaminadas, según se indica en la sección 3.A.2.2.3. En la Fig. 4.14 se muestran las cantidades de iones metálicos presentes en los pellets de bacterias y en los sobrenadantes, al finalizar cada incubación de una semana.

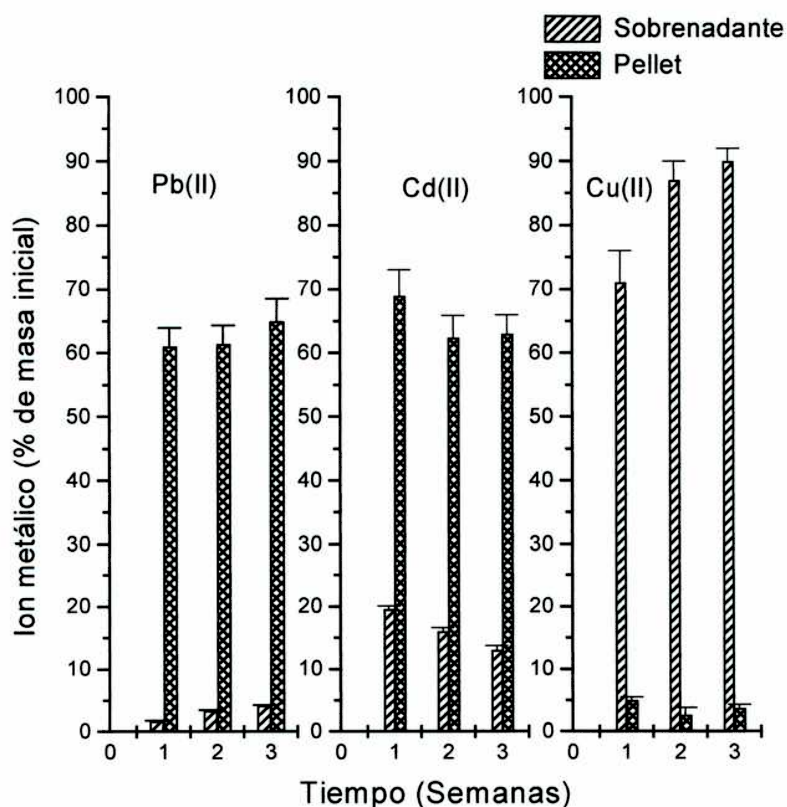


Fig. 4.14: Cantidades de iones metálicos (% de la masa inicial en solución) en los pellets de bacterias y las soluciones sobrenadantes correspondientes a cada descontaminación, determinados según se indica en Materiales y Métodos. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

Se puede observar que las cepas de *E. coli* removieron Pb(II) y Cd(II) de las soluciones acuosas contaminadas pero la asociación de *Acinetobacter* sp y *Flavobacterium* sp no removieron eficientemente Cu(II).

En la Fig. 4.15 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas que toleran la presencia de Cd(II) en la suspensión utilizada para la inmovilización en los soportes poliméricos, donde se agregó un inóculo proveniente de un cultivo de toda la noche (inmovilización), como también en las soluciones frescas de medio nutritivo (dos transferencias) donde se sumergieron los hidrogel después de la inmovilización.

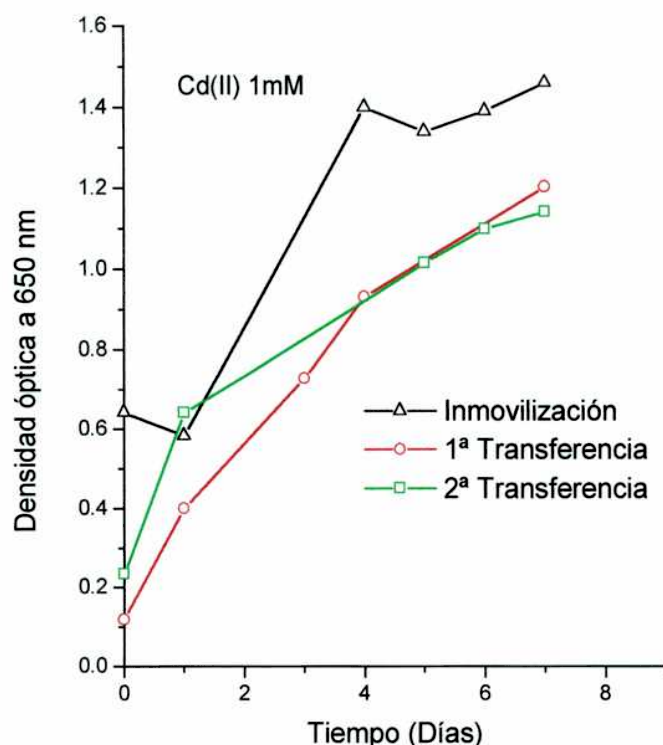


Fig. 4.15: Curvas de crecimiento de bacterias capaces de tolerar la presencia de Cd(II) en las soluciones donde se efectuó la inmovilización en hidrogel N° 46 (—△—) y en las soluciones donde se sumergieron los hidrogel en la primera (—○—) y la segunda (—□—) transferencia, según se indica en Materiales y Métodos.

Las suspensiones bacterianas, donde se sumergieron las matrices poliméricas para la inmovilización de bacterias, crecieron hasta llegar a estado estacionario. El crecimiento bacteriano observado en las dos soluciones frescas de medio nutritivo se debió a que parte de la población bacteriana se desprendió de las matrices y comenzó a crecer nuevamente llegando a estado estacionario (1ª y 2ª transferencia). Se observó que cada vez que los hidrogeles con bacterias adheridas fueron sumergidos en soluciones frescas del medio nutritivo, conteniendo el ion metálico en estudio, algunas bacterias recuperaron la capacidad de crecer y repetirían el proceso de remoción de metales.

En la Fig. 4.16 se muestran las cantidades de iones metálicos removidas por las bacterias inmovilizadas en los hidrogeles. Los valores fueron determinados al finalizar cada semana de incubación del medio nutritivo conteniendo los iones metálicos en estudio.

Las cantidades de iones metálicos removidas por las bacterias inmovilizadas en los hidrogeles después de dos transferencias en medio fresco se triplicaron para el Pb(II) y el Cd(II). Tal como se esperaba, las bacterias asociadas *Acinetobacter sp* y *Flavobacterium sp* capaces de tolerar la presencia de Cu(II), inmovilizadas en los soportes poliméricos, retienen cantidades despreciables del ion metálico.

Teniendo en cuenta que los hidrogeles no retienen los iones metálicos (microanálisis de rayos X) y que los ensayos de remoción de metales con bacterias inmovilizadas en hidrogeles dieron rendimientos reproducibles, se puede

concluir que ha sido logrado el requerimiento de obtener una adecuada firmeza mecánica de la biomasa bacteriana inmovilizada en la matriz polimérica.

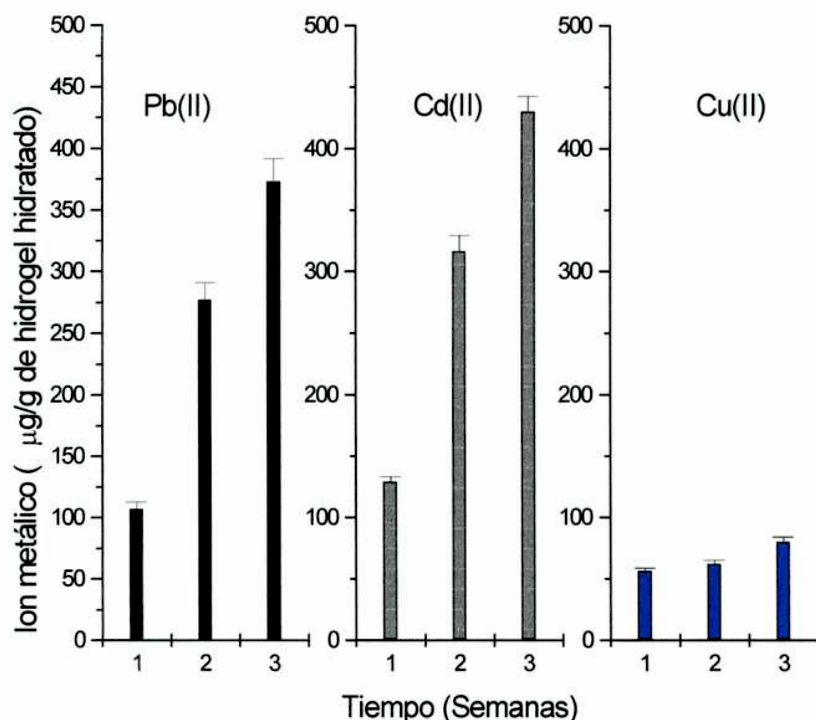


Fig 4.16: Iones metálicos ($\mu\text{g/g}$ de hidrogel hidratado) en bacterias aisladas del Río de la Plata inmovilizadas en hidrogeles N° 46 [HEA/agua/glicerina (30:50:20)]. Los hidrogeles se sumergieron dos veces en soluciones frescas de CN conteniendo cantidades estándares de los iones. Al finalizar cada semana se tomaron muestras de los hidrogeles para la determinación del contenido metálico según Materiales y Métodos. Los valores indican el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

Aunque no haya sido determinado aún el grado de carga bacteriana, el sistema [HEA/agua/glicerina (30:50:20)] polimerizado por radiación gamma en estado supercongelado, puede ser utilizado en procesos continuos o seriados de remoción metálica.

4.B INACTIVACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS EN MATERIALES BIOLÓGICOS

4.B.1 Radioesterilización de sueros

4.B.1.1 Pruebas químicas y microbiológicas

Las pruebas microbiológicas fueron realizadas en sueros irradiados con 25, 32 y 50 kGy. Las pruebas químicas fueron realizadas solamente en sueros irradiados con 25 kGy.

En quince lotes de sueros se determinó el pH, osmolalidad, contenido de proteínas y hemoglobina, antes y después de la irradiación. Los resultados no presentaron diferencias significativas aplicando el test estadístico de Fisher para un nivel de significación de 5% (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Valores físico-químicos de sueros irradiados y no irradiados

	pH a 25°C	Proteínas totales (g/dl)	Hemoglobina (mg %)	Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)
No irrad.	7,4 ± 0,2	3,6 ± 0,2	5,5 ± 0,3	289 ± 15
Irrad.	7,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2	5,3 ± 0,3	315 ± 18

Además estos lotes de sueros no presentaron contaminación bacteriana ni fúngica, después de la incubación en los medios específicos según se indica en la sección 3.B.1.2.1. No se detectaron micoplasmas en los sueros irradiados cuando

fueron incubados y subcultivados en placas de agar para PPLO según se indica en la sección 3.B.1.2.1. Por otra parte, cuando suspensiones de *Mycoplasma orale* (con o sin suero) fueron irradiados e incubados no se detectaron colonias visibles al microscopio. En contraste, cuando se observaron las placas de agar inoculadas con *Mycoplasma orale* sin irradiar por microscopio de contraste de fases (x20) las colonias presentaron las características propias de los micoplasmas: un centro denso con una periferia menos densa; y al ser teñidas con colorante Dienes se observaron colonias densamente azules.

En las pruebas virales no se observaron células redondeadas, formación de policariocitos, cuerpos de inclusión nuclear ni efecto citolítico. Aún cuando virus FMDV cepa "A" o BHV-1 fueron agregados en algunos experimentos al suero, no fueron detectados después de la irradiación.

El virus de la BVD no fue detectado por inmunofluorescencia en ninguno de los tres pasajes sucesivos de los sueros analizados. Tampoco se detectó PI3 en los ensayos de hemoadsorción.

4.B.1.2 Pruebas de rendimiento

Después de 7 subcultivos usando medio suplementado con suero irradiado o control, las células fueron examinadas microscópicamente. Las características morfológicas y las curvas de crecimiento para dosis de radiación de 25 y 32 kGy fueron equivalentes a las de los controles. Esto sugirió que la radioesterilización no causó alteraciones citotóxicas. Los resultados obtenidos con 50 kGy no fueron

claros. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió usar los sueros irradiados con 25 kGy para los experimentos subsiguientes.

Se realizaron curvas de crecimiento de células MDBK, BHK 21(C-13) y 3T3 en presencia de sueros irradiados y no irradiados. No se observaron diferencias

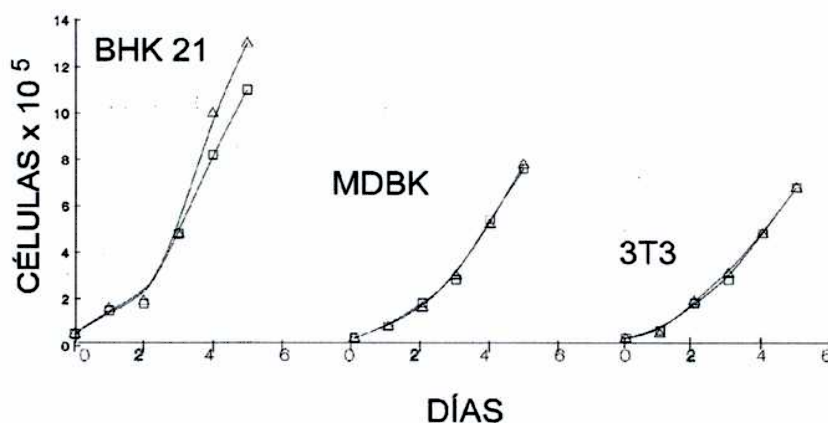


Fig. 4.17: Curvas de crecimiento de líneas celulares BHK, MDBK y 3T3 en presencia de sueros irradiados (Δ) y no irradiados (□).

significativas (Fig. 4.17).

Los resultados de los ensayos de eficiencia de clonado son mostrados en la Tabla 4.6. Las células crecidas con suero irradiado crecieron ligeramente más rápido que las crecidas en suero de referencia, pero este resultado no es estadísticamente significativo.

Tabla 4.6: Eficiencia de clonado de células P3x63-Ag8.653 en presencia de sueros irradiados y no irradiados

	5% SFB irradiado	10% SFB irradiado	5% SFB no irradiad.	10% SFB no irradiad.
1 células/pozo	33,5	71,4	29,1	62,5
5 células/pozo	81,2	96,5	79,1	91,6

Con el fin de determinar que no se produce degradación de las proteínas del suero durante la irradiación, se realizaron los siguientes estudios: electroforesis en acetato de celulosa, SDS-PAGE, isoelectroenfoque y electroforesis en gradiente de pH no equilibrado. Los perfiles electroforéticos en acetato de celulosa fueron usados para el análisis espectrofotométrico de las fracciones proteicas. Se compararon sueros irradiados y no irradiados.

Las proteínas totales y los valores de las diferentes fracciones se muestran en la Tabla 4.7. No se observaron diferencias significativas entre los datos de sueros irradiados y no irradiados.

Tabla 4.7: Concentraciones de las fracciones proteicas en sueros irradiados y no irradiados

Fracciones proteicas	Suero fetal bovino irradiado		Suero fetal bovino no irradiado	
	g/dl	%	g/dl	%
Proteínas totales	3,13	100,0	3,22	100,0
Albúmina	2,50	79,9	2,56	79,5
Globulina	0,63	20,2	0,66	20,5
α_1	0,04	1,3	0,04	1,2
α_2	0,50	16,0	0,52	16,2
β	0,09	2,9	0,10	3,1
γ	0	0	0	0
Albúmina/Globulina	4.0		3.9	

Los resultados de electroforesis en acetato de celulosa, electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis en gradiente de pH no equilibrado (NEPHGE) se muestran en las Figs.: 4.18; 4.19; 4.20 y 4.21, respectivamente. En todos estos estudios los perfiles polipeptídicos de los sueros irradiados y sin irradiar resultaron idénticos.

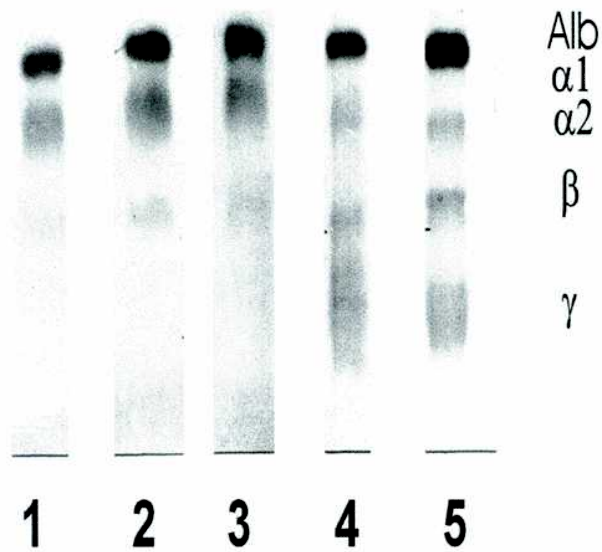


Fig. 4.18: Electroforesis en acetato de celulosa de suero fetal irradiado línea 1, no irradiado líneas 2 y 3; suero bovino línea 4 y suero testigo normal línea 5

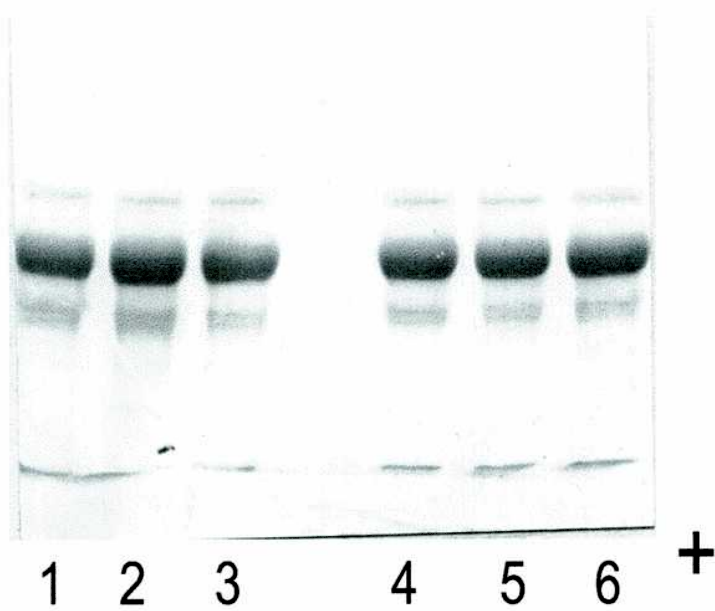


Fig. 4.19: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): sueros no irradiados (líneas 1-3) y sueros irradiados (líneas 4-6).

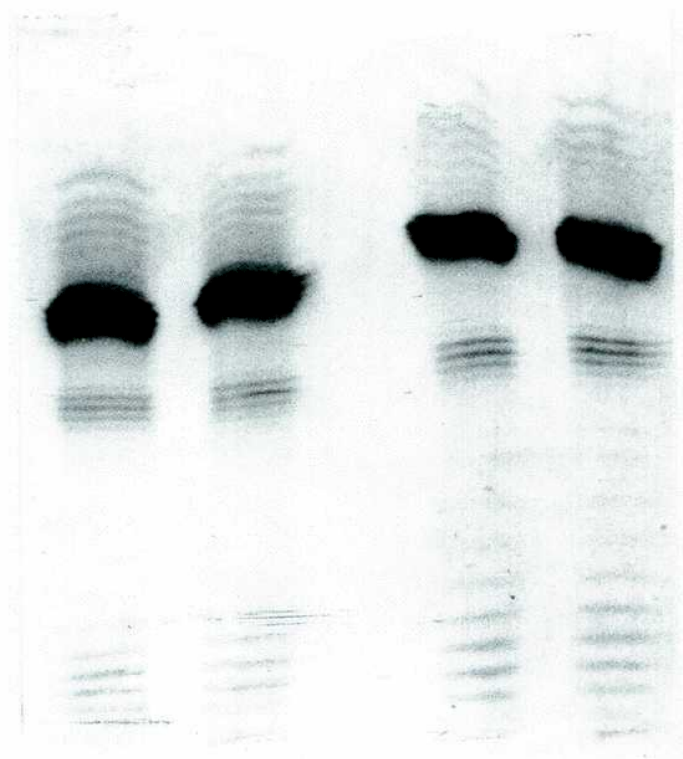


Fig. 4.20: Isoelectroenfoque (IEF) de sueros no irradiados (líneas 1-2) y sueros irradiados (líneas 3-4)

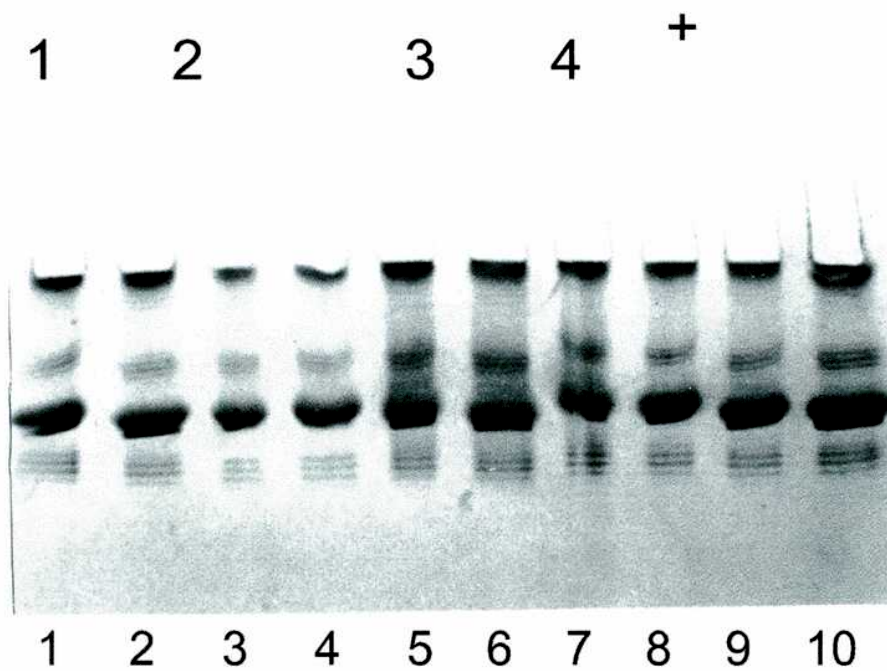


Fig. 4.21: Electroforesis en gradiente de pH no equilibrado (NEPHGE) de sueros no irradiados (líneas 1-5) y sueros irradiados (líneas 6-10)

En la Tabla 4.8 se muestra la incorporación de L-(³⁵S)-metionina en células MDBK. Se observó una ligera reducción en la incorporación cuando se usó 5% de suero, pero no se observaron diferencias significativas entre sueros irradiados y no irradiados.

Tabla 4.8: Incorporación de L-[³⁵S] Metionina en células MDBK crecidas en presencia de sueros irradiados y no irradiados.

Tratamiento	Actividad (cpm/cel)
MDBK- 5% suero irradiado	6.9 ± 0.7
MDBK-10% suero irradiado	7.7 ± 0.8
MDBK- 5% suero no irradiado	6.7 ± 0.7
MDBK-10% suero no irradiado	7.4 ± 0.8

La separación de los polipéptidos celulares por electroforesis SDS-PAGE se muestra en la Fig. 4.22. Por lo menos 46 polipéptidos pudieron ser resueltos. Una vez más, ninguna diferencia fue observada en el perfil de proteínas celulares crecidas en presencia de sueros irradiados y no irradiados.

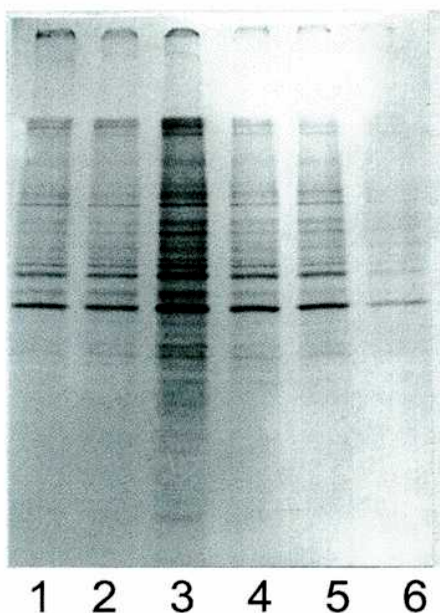
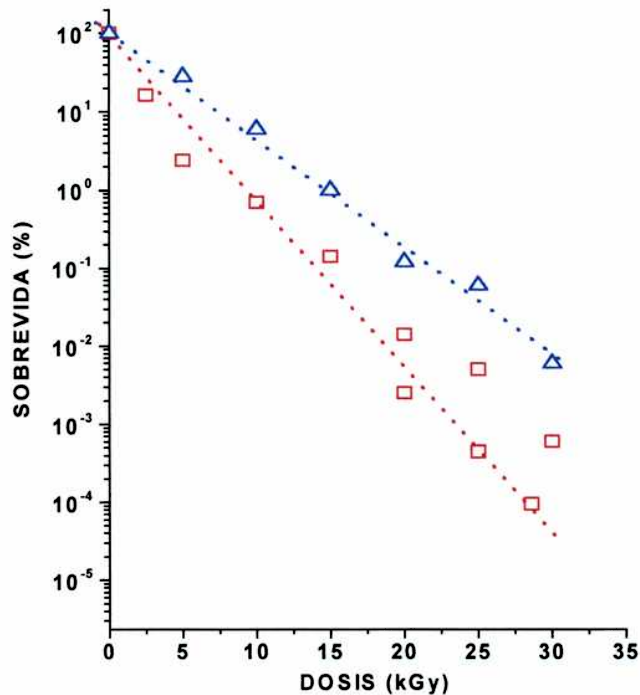


Fig. 4.22: Imágenes fluorográficas de polipéptidos separados electroforéticamente obtenidos de células MDBK marcadas con L-[³⁵S]-metionina crecidas en sueros no irradiados (líneas 1-3) y sueros irradiados (líneas 4-6)

4.B.2 Inactivación del Virus Herpes Bovino tipo-1 (BHV tipo1)

En la Fig. 4.23 se muestran las curvas de inactivación del BHV-1 en medio Glasgow-MEM libre de suero antes y después de la remoción de los restos celulares a -78 °C.



	Con restos celulares □	Sin restos celulares Δ
$\beta_0 \pm DS$	1,966±0,043	2,006±0,011
$\beta_1 \pm DS$	-0,196±0,004	-0,137±0,001
r	-0,992	-0,998
r ²	0,983	0,996
DS	0,240	0,061
N	39	36
P	<0,0001	<0,0001

Fig. 4.23: Inactivación con radiación gamma del virus herpes bovino tipo-1 (BHV tipo-1) con restos celulares y sin restos celulares a -78 °C. Los puntos representan el promedio de los valores obtenidos en por lo menos tres experimentos independientes.

Los datos de los experimentos fueron estadísticamente analizados usando un modelo de regresión lineal y los valores D_{10} fueron computados como la inversa de la pendiente.

La D_{37} fue calculada, como la dosis en kGy que reduce el título de sobrevivencia del virus a e^{-1} o al 37% del original ($D_{37} = 0,43 \times D_{10}$).

El virus antes de la remoción de los residuos celulares resultó más radiosensible, como puede ser observado por los valores obtenidos de $D_{10} = 5,10$ kGy y $D_{37} = 2,19$ kGy; que el virus después de la remoción de residuos celulares: $D_{10} = 7,29$ kGy y $D_{37} = 3,13$ kGy, a la temperatura investigada (-78°C).

El factor modificador de dosis (FMD) calculado, según se indica en la sección 3.B.2.2.4, como la relación entre los valores de D_{10} del virus crudo y D_{10} del virus clarificado, resultó igual a 0,70.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.A HIDROGELES

En el método de obtención de hidrogeles por polimerización radioinducida de metacrilatos y acrilatos en estado supercongelado, los monómeros poseen una viscosidad extremadamente alta por lo que pueden alcanzar un estado sólido casi vítreo y por ello son llamados monómeros formadores de vidrios (glass-forming monomers). Esta característica es muy ventajosa para mantener dispersas homogéneamente varias sustancias funcionales en el monómero y también una alta polimerización aún a bajas temperaturas.

Se ha encontrado que numerosos componentes biofuncionales tales como enzimas, anticuerpos y otras sustancias biológicamente activas, organelas, microorganismos y células de tejidos pueden ser inmovilizados en matrices poliméricas por polimerización radioinducida en forma efectiva. La polimerización en estado supercongelado resulta conveniente debido a que las bajas temperaturas y la alta polimerización permiten mantener la actividad original de los componentes biofuncionales y la alta viscosidad ayuda a mantener estable el estado de dispersión homogénea de los biocomponentes.

La técnica de inmovilización es una técnica que permite contener o incluir biocomponentes funcionales en un espacio limitado. Los propósitos de la inmovilización son la fijación o inclusión para la utilización repetida o en procesos continuos, la estabilización frente el calor, solventes y otras estimulaciones

externas, el moldeo y la obtención de las formas adecuados para los diferentes usos, el mejoramiento de los cultivos celulares, y la obtención de sistemas para liberación controlada de sustancias. Se ha demostrado que pueden ser efectivamente utilizados como soportes para la inmovilización tanto polímeros naturales y polímeros sintéticos hidrofílicos como polímeros hidrofóbicos de metacrilatos y acrilatos. Esto se debe a que en el mecanismo de inmovilización, el componente biofuncional se dispersa en la superficie de la fase del monómero supercongelado, cuando se enfría el sistema monomérico. Luego cuando ocurre la polimerización, el componente biofuncional se fija por adhesión al soporte polimérico. Por consiguiente, se pueden usar para la inmovilización tanto monómeros hidrofílicos como hidrofóbicos debido a este heterogéneo mecanismo de dispersión y adhesión. Otra característica importante de esta técnica es que si se utiliza un solvente que cristalice a bajas temperaturas, cuando se calienta después de la polimerización, se obtiene un soporte polimérico con una estructura porosa.

La inmovilización por entrapamiento físico es una técnica eficiente para la liberación controlada de compuestos moleculares. En este campo de aplicación, el método de entrapamiento físico resulta más fácil y conveniente para el control de los perfiles de liberación que el método de las uniones químicas (134).

En el campo de los sistemas de liberación de fármacos, las investigaciones han promovido varios desarrollos: i) Muchos productos farmacéuticos de uso corriente o compuestos moleculares nuevos, pueden ser administrados por vías que no sólo mejoran la seguridad o eficacia sino que también, en algunos casos,

permiten nuevas terapias. ii) Sustancias nuevas y complejas, tales como las proteínas obtenidas por medio de técnicas de ingeniería genética, necesitan sistemas de entrega originales, debido a que la liberación de estas sustancias es mucho más complicada que la de las sustancias convencionales. iii) Se ha logrado un mayor conocimiento respecto de cómo los perfiles de liberación de fármacos (continuo *versus* pulsátil) afectan significativamente la respuesta terapéutica. iv) Los avances en ciencia de materiales y biotecnología permitirían mejorar, por un lado, los polímeros y por otro, sintetizar otras sustancias para ser usadas efectivamente en sistemas de liberación (135).

Los avances en el campo de la medicina, que han permitido aumentar el promedio de vida del hombre, generaron la necesidad de desarrollar nuevos materiales que puedan ser utilizados como reemplazo de tejidos y órganos, así como sistemas de liberación de fármacos y componentes de dispositivos utilizados en terapia y diagnóstico. Los hidrogeles parecen ser uno de los más promisorios materiales para aplicaciones biomédicas. Usualmente muestran buena biocompatibilidad en contacto con la sangre, fluidos corporales y tejidos. Por ello han sido usados como lentes de contacto, vendajes para quemaduras, cartílagos artificiales o membranas, así como también para recubrir materiales que deben ser aplicados en contacto con organismos vivos, por ejemplo, recubriendo la superficie de catéteres, electrodos, prótesis vasculares, etc. Debido a la capacidad de los hidrogeles para hincharse como de liberar partículas atrapadas en el medio circundante, son frecuentemente usados como sistemas de liberación de fármacos.

En general, el uso de las radiaciones para la formación y modificación de hidrogeles para propósitos biomédicos tiene algunas ventajas generales. Primero, soluciona el problema de esterilización de productos y en algunos casos permite utilizar una tecnología más simple y compacta que la convencional. Segundo, permite fabricar un producto puro no contaminado con los residuos tóxicos de los iniciadores utilizados en la polimerización química. Finalmente, la aplicación de radiaciones ionizantes originadas por un acelerador de electrones o por facilidades gamma es segura para la existencia humana y el medio ambiente (136).

Por otra parte, en el presente trabajo de Tesis se han obtenido hidrogeles acrílicos para inmovilizar bacterias capaces de crecer en presencia de metales tóxicos con el propósito de ser utilizados en la remoción de soluciones contaminadas. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden ser destruidos, pero pueden ser estabilizados o removidos. Los microorganismos catalizan las transformaciones de los compuestos orgánicos e inorgánicos y pueden ser usados efectivamente en la solubilización o inmovilización de varias formas de metales tóxicos presentes en los desechos industriales (137).

Los procesos biológicos de recuperación de metales de desechos acuosos han sido recientemente revisados. En procesos de remoción y bioadsorción han sido informados valores de captación de Pb(II) entre 166-351 mg/g de peso seco de biomasa de hongos (138); 220-360 mg/g de algas marinas (139); y también en bacterias, aunque no pueden compararse los valores de captación de metales

debido a la diferente expresión de los resultados, se han informado que, *Citrobacter* sp (81), *P. aeruginosa* PU21 (82), bacterias aisladas de Albuquerque (140), exhiben una capacidad razonable de adsorción. También se han realizado investigaciones con diferentes organismos capaces de remover y adsorber Cd(II), tales como hongos con valores de captación entre 19-56 mg de Cd/g de peso seco(138), algas marinas 135 –215 mg/g (141), hongos), levaduras 20-40 mg/g (142), y bacterias v. gr. *E. coli*, (78). Para Cu(II) se han utilizado envolturas de *Bacillus subtilis* (143), levaduras 11-80 mg/g (144), etc.

Pero también un importante problema planteado en las investigaciones existentes es que las biomasas no pueden ser usadas como tales en los procesos de adsorción estándares. Usualmente son muy blandas y sin un refuerzo y granulación no pueden ser usadas en operaciones en columnas. El modo más efectivo de un proceso de adsorción está indudablemente basado en una configuración de reactor/contactador de lecho fijo. El lecho de adsorción debe ser poroso para permitir que el líquido fluya a través de él con una resistencia mínima pero permitiendo la máxima transferencia de masa posible dentro de las partículas tan pequeñas como prácticamente sea conveniente para que haya una razonable presión de goteo dentro del lecho.

Se han realizado diferentes ensayos para reforzar las biomasas entre los cuales se pueden mencionar: entrecruzamiento de *Penicillium* sp. (145) con una mezcla de urea-formaldehído obteniéndose éteres de los polisacáridos naturales presentes en las biomasas; entrecruzamiento de biomasas nativas de *Ascophyllum nodosum* con dietenil sulfona para aumentar la capacidad de

biadsorción (138); inmovilización de *Pseudomonas aeruginosa* con alginato-calcio (82) e inmovilización de *Citrobacter* sp. en geles de poliacrilamida (81) para aumentar la firmeza mecánica. Pero para sistemas a gran escala la inmovilización de cepas bacterianas no resultaron eficientes pues se requieren soportes más resistentes (146).

En el presente trabajo de Tesis se aislaron cepas bacterianas autóctonas del Río de la Plata que crecieran en presencia de metales pesados y se inmovilizaron en hidrogeles obtenidos por radiaciones, que resultan: flexibles, elásticos, no tóxicos y resistentes; con el propósito de obtener un sistema que facilite la utilización de las biomasas capaces de remover iones metálicos y la potencial aplicación en procesos seriados o continuos.

5.B INACTIVACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS EN MATERIALES BIOLÓGICOS

Las radiaciones ionizantes han sido usadas para la radioesterilización de substratos biológicos y en la inactivación viral selectiva para su aplicación en reactivos de diagnóstico y vacunas (147, 148). El mayor beneficio de los procesos industriales con radiación gamma es que los logros de las investigaciones de laboratorio pueden ser aplicados directamente a mayor escala sin ninguna de las dificultades observadas con otros sistemas microbiocidas.

El principal blanco para las transformaciones químicas inducidas por las radiaciones ionizantes, como ha sido establecido, es el ADN, y estos cambios son fundamentales para la supervivencia de los microorganismos.

Sin embargo, muchos de los efectos bioquímicos de las radiaciones, potencialmente letales, por ejemplo la dimerización de las bases de ADN y la escisión de las uniones fosfato-pentosa del ADN, pueden ser prevenidas o reparadas. La forma en que varios microorganismos responden a la radiación es determinada por sus capacidades para reparar el daño radioinducido.

El efecto del oxígeno y el agua también modifican la respuesta a la radiación. Está bien establecido que la presencia de oxígeno aumenta la sensibilidad de los microorganismos a las radiaciones, debido a la reacción que ocurre entre el oxígeno y los radicales libres formados por ionización de las moléculas blanco (149). La acción de las radiaciones ionizantes depende de los radicales libres difusibles producidos cuando el medio de suspensión del material absorbe energía de la radiación. Estos son principalmente derivados de la radiólisis del agua (i. e. H^{\bullet} , OH^{\bullet} , e^{-}_{aq} , HO_2^{\bullet} , H_2O_2 , etc.). Todas estas especies son capaces de reaccionar con el ADN, aunque la importancia relativa de cada una no es totalmente conocida. Las constantes de velocidad de OH^{\bullet} y e^{-}_{aq} con el ADN son casi idénticas: $3 \times 10^8 \text{ mol. s}^{-1}$ y $1,4 \times 10^8 \text{ mol s}^{-1}$, respectivamente y mayores que la de H^{\bullet} ($8 \times 10^7 \text{ mol. s}^{-1}$). Sin embargo, los estudios con secuestrantes de radicales, han mostrado, por una razón que no es del todo clara, que OH^{\bullet} resulta la especie predominantemente reactiva (150). Cuando los ácidos nucleicos son irradiados en solución diluida, las bases de los mismos son afectadas por estos

radicales mientras que los grupos pentosa-fosfato son dañados menos frecuentemente (151). Los peróxidos orgánicos y los productos radiomiméticos de los iones fosfatos, de vida media más larga que los productos de la radiólisis del agua, potencian la acción de las radiaciones en el material biológico en bajas concentraciones y su acción es linealmente dependiente del logaritmo de la concentración de los iones fosfatos (152). Por otra parte, el medio puede proteger a las moléculas blanco del efecto de la radiación, especialmente la presencia de moléculas orgánicas con grupos -SH (glutathion, cisteína, cisteamina) son capaces de proteger a los microorganismos irradiados donando átomos de hidrógeno a los radicales libres, los cuales de otra manera reaccionan con el oxígeno produciendo un daño letal (153).

Las condiciones físicas también influyen en la respuesta de los microorganismos a la radiación. El efecto de la temperatura es complejo, pero en términos generales, los incrementos en la temperatura producen un significativo aumento de la sensibilidad de los microorganismos irradiados en presencia de oxígeno. Se ha informado que los virus en estado congelado requieren mayor energía ionizante para la inactivación y tienen altos valores de D_{10} (154). El elevado valor de D_{10} observado para virus en material congelado (155) puede ser debido a la inhibición de la formación de los radicales libres o al impedimento del movimiento de los radicales libres en el material congelado (156) resultando el producto final menos dañado (157).

Otros dos aspectos físicos de la irradiación que deben ser tenidos en cuenta son: el efecto de la tasa de dosis y el efecto de la dosis fraccionada. La

inactivación de microorganismos por radiación gamma resulta independiente de la tasa de dosis solamente para las tasas de dosis extremas de las plantas industriales de ^{60}Co pero no es cierto para los aceleradores de electrones los cuales entregan altas tasas de dosis en pocas fracciones de segundo. Es importante considerar también los efectos de las dosis fraccionadas en los microorganismos, especialmente cuando existe la posibilidad de un sustancial intervalo de tiempo entre las irradiaciones. Cuando el medio donde se encuentran los microorganismos para su irradiación no es conveniente para su metabolismo y reproducción, como el caso de la esterilización de los materiales para uso médico, la dosis fraccionadas no tienen efecto en la respuesta a la radiación, por el contrario, cuando el medio permite que el metabolismo continúe, como en la irradiación de sustancias biológicas, la reparación de los daños radioinducidos puede ocurrir entre los intervalos de las dosis fraccionadas y puede reducirse la aparente sensibilidad de los microorganismos a la radiación.

En conclusión, el conocimiento de la dosis absorbida es uno de los más importantes parámetros necesarios para la utilización de las radiaciones ionizantes para la esterilización en distintas plantas industriales de radiación gamma. A una dosis dada, los efectos de la radiación pueden cambiar si las condiciones exógenas tales como la temperatura, la presencia de O_2 o la tasa de dosis, son modificadas. Con respecto a la esterilización de microorganismos contaminantes, la radioresistencia es una función del contenido de agua presente en el citoplasma, el tamaño y la estructura del ADN y de la existencia y eficacia de los sistemas de reparación (158).

La radiación gamma ha sido usada para la inactivación de contaminantes virales en aguas cloacales (159, 160); medios de cultivos (131, 161), tejidos (157, 162, 163, 164) y productos de origen animal dudosos (curios) (165). Dado que las viremias son específicas de cada región, los sueros para exportación y/o importación han sido irradiados con radiación gamma para evitar que virus foráneos sean introducidos en países libres de ellos, así como también en sueros utilizados en cultivos de tejidos con dosis comprendidas entre 0,5 y 6,0 Mrad (5-60 kGy) (166). Excesivas dosis de radiación pueden causar efectos no deseados en el producto final, tal como la desnaturalización de las proteínas, que alteran la capacidad de los sueros para mantener el crecimiento celular. Por lo tanto, es importante conocer la dosis de radiación necesaria para inactivar los contaminantes virales sospechados para que el tratamiento resulte efectivo, mientras que los efectos deletéreos secundarios de la irradiación resulten minimizados.

Los virus presentan alta resistencia, la cual puede variar de acuerdo a la concentración salina, los materiales orgánicos en el substrato, la temperatura de irradiación y la hidratación. También existe una relación inversa general, aunque no estricta, entre el tamaño del blanco (genoma) y los valores de dosis D_{10} . Los valores D_{10} para virus [Coxsackievirus B-2 (155); Akabane, Aino, Bluetongue, Foot and mouth disease (167), IBRV (168); diarrea bovina (BVD), estomatitis vesicular (VS), etc. (169)] irradiados en substratos complejos y a bajas temperaturas informados por otros autores están comprendidas entre 3 y 10 kGy.

Idealmente, los valores de D_{10} para cada virus en cada medio y a una temperatura definida deben ser determinados. Varios autores han determinado que la inactivación viral con radiaciones ionizantes para la preparación de vacunas resulta efectiva y ventajosa. Las principales ventajas de las radiaciones gamma son: el carácter penetrante, inactivan principalmente los ácidos nucleicos reduciendo la infectividad viral sin alteraciones importantes de las proteínas antigénicas (97, 170), y desde el punto de vista operacional son fáciles de controlar y extremadamente confiables.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.A HIDROGELES

6.A.1 Inmovilización de ampicilina

Recientemente, ha adquirido particular interés la posibilidad de reemplazar el método de la administración repetida de drogas por una única administración que asegure una continua y efectiva biodisponibilidad de los fármacos.

De acuerdo a los resultados de los ensayos biológicos y físico-químicos obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- i) La ampicilina fue estable a las dosis usadas para la polimerización.
- ii) Los hidrogeles no producen efectos tóxicos en cultivos celulares ni en los animales utilizados.
- iii) La cantidad acumulada de ampicilina liberada desde los hidrogeles fue linealmente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, de acuerdo a la ecuación de Higuchi.
- iv) Hay pequeñas diferencias entre la ampicilina liberada desde polímeros obtenidos con dosis de radiación de 10 y 25 kGy. Fue posible obtener una efectiva polimerización con 10 kGy en las condiciones experimentales.
- v) La ampicilina liberada de los hidrogeles durante 24 horas inhibe el crecimiento en agar de *Micrococcus luteus*. Luego, la actividad biológica de la

ampicilina permanece inalterada después de ser inmovilizada en los dispositivos poliméricos.

vi) El nivel *in vivo* de ampicilina liberada desde los hidrogeles permanece estacionario por casi 24 horas después de la administración, mientras que la ampicilina liberada desde las tabletas, hace un pico a las dos horas y decrece drásticamente dentro de las 8 y 10 horas después de la administración. La biodisponibilidad del fármaco, evaluada por el área bajo la curva concentración/tiempo, resulta el doble en los hidrogeles que en las tabletas convencionales.

6.A.2 Inmovilización de bacterias

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

i) Los hidrogeles de poli(HEA) son más hidrofílicos que los de poli(HEMA) dado que las mezclas con HEA alcanzan los valores más elevados de agua en equilibrio (W_e). Para una misma cantidad de monómero, los hidrogeles compuestos por mezclas de agua y glicerina se hidratan menos que los compuestos por agua solamente. El tamaño del poro de los hidrogeles de poli(HEMA) aumenta con el incremento del contenido de glicerina, alcanzando un máximo en el hidrogel N° 14 [HEMA/agua/glicerina, (50:20:30)] y luego disminuye. En contraste en los hidrogeles de poli(HEA) el tamaño del poro disminuye en forma sostenida con el contenido de glicerina.

ii) Estos hidrogeles fueron usados para estudios preliminares de adhesión de *P. aeruginosa*. Después de 48 horas de incubación la evaluación de las

microfotografías de SEM sugirieron que la adhesión bacteriana en los hidrogeles fue en el siguiente orden: N° 46>N° 11>N° 15>N° 25>N° 23>N° 21; mientras que las matrices N° 13, N° 31 y N° 32 presentaron una adhesión despreciable. Una amplia variedad de parámetros desempeñan un importante papel en los fenómenos de adhesión, tales como la porosidad y el contenido de agua de la matriz polimérica, y la naturaleza de la superficie (flexibilidad, rugosidad, hidrofiliidad) entre otros. En el presente trabajo, el balance más favorable de las condiciones microambientales para la adhesión de microorganismos parece ser logrado por la matriz N° 46 [HEA/agua/glicerina (30:50:20)], en la cual se observaron numerosas colonias bacterianas.

iii) Los estudios realizados con microscopía electrónica de barrido (SEM) indicaron que la adhesión de las cepas bacterianas autóctonas del Río de la Plata a la matriz N° 46 resulta, según la capacidad de los microorganismos de tolerar la presencia de iones metálicos, en el siguiente orden: Cd(II)> Pb(II)> Cu(II). En los estudios cualitativos de microanálisis de rayos X, fueron detectados los picos de energía correspondientes al cadmio y plomo, tanto en las bacterias inmovilizadas en los hidrogeles como en las bacterias libres colectadas por filtración. En los hidrogeles sin bacterias no se detectó el ion metálico en estudio. Los picos característicos del cobre no fueron observados en ninguna de las muestras estudiadas. Estos resultados sugieren que *E. coli* [Cd(II)] y *E. coli* [Pb(II)] acumularían iones metálicos mientras que la asociación de *Acinetobacter* sp y *Flavobacterium* sp [Cu(II)] no lo haría.

iv) Las cepas de *E. coli* aisladas del Río de la Plata son capaces de remover Pb(II) y Cd(II) de soluciones contaminadas tal como lo indicaron los altos

porcentajes de los mismos, cuando fueron determinados por absorción atómica, en los pellets de bacterias. La asociación de *Acinetobacter* sp. y *Flavobacterium* sp, no remueve efectivamente Cu(II) de las soluciones contaminadas. Se ha encontrado también que se triplican las cantidades de Pb(II) y Cd (II) extraídos de los medios contaminados por las bacterias inmovilizadas en matrices poliméricas después de dos descontaminaciones

Los resultados del presente trabajo sugieren que se obtuvo una adecuada adhesión bacteriana a los hidrogeles acrílicos seleccionados. Los datos obtenidos respecto de la captación de metales tóxicos con microorganismos han ampliado la información disponible contribuyendo a la comprensión de los procesos de descontaminación de desechos peligrosos. Los microorganismos aislados del ambiente (no obtenidos por ingeniería genética) proveen una base para implementar bioprocesos eficaces en el tratamiento de desechos tóxicos y la inmovilización de estos microorganismos en hidrogeles obtenidos por polimerización radioinducida en estado supercongelado facilitaría la manipulación para su reusabilidad en procesos seriados y lograría la firmeza mecánica requerida para procesos continuos o seriados.

6.B INACTIVACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS EN MATERIALES BIOLÓGICOS

6.B.1 Radioesterilización de sueros

Los resultados obtenidos indican que la radioesterilización puede ser aplicada como método para la esterilización de sueros teniendo en cuenta que:

i) La facilidad de radiación usada en este trabajo consiste en una fuente de ^{60}Co con una energía máxima de 1,33 MeV. En estas condiciones ninguna radiactividad es inducida en la muestra irradiada.

ii) La irradiación fue realizada en suero congelado con el fin de minimizar los efectos deletéreos de los radicales libres difusibles (efecto indirecto de las radiaciones ionizantes) cuando el medio absorbe energía de radiación.

iii) Los ensayos biológicos y físico-químicos llevados a cabo en este trabajo demostraron que el suero irradiado no es significativamente alterado, si la irradiación se realiza en estado congelado.

iv) No se observó contaminación bacteriana ni fúngica en todos los sueros irradiados con 25 kGy. Esto es particularmente importante debido a que la esterilidad es la condición primaria requerida para los sueros que deben ser usados para cultivos de tejidos. Los micoplasmas constituyen otro problema crítico. Una apropiada dosis de radiación para la inactivación de *Acholeplasma laidlawii* parecería ser de 3 kGy (171), entonces la dosis de 25 kGy utilizada en este trabajo sería 8 veces más alta que la necesaria para inactivar micoplasmas.

v) No se detectó contaminación viral (PI-3, BVD, FMDV, BHV) en los sueros ensayados ni aún cuando inóculos virales (FMDV y BHV tipo-1) fueron agregados a los sueros antes de la irradiación. La dosis adecuada de radiación determinada en este trabajo fue de 25 kGy. Esta dosis resulta 2,5 a 8 veces más alta que las

D_{10} encontradas por otros investigadores para diferentes virus ARN y ADN similares a los mencionados anteriormente.

vi) Análisis de cultivos celulares tales como mantenimiento celular, curvas de crecimiento, ensayos de eficiencia de clonado, indican que la radioesterilización no causa alteraciones citotóxicas cuando son usadas dosis de 25 kGy. Dosis de 32 kGy no producen modificaciones de los sueros, pero 25 kGy fue elegido para los ensayos, para no aplicar una dosis más alta que la necesaria para la esterilización.

vii) Tampoco se observaron bandas de posibles productos de degradación en el análisis electroforético de las proteínas de los sueros irradiados.

viii) La radiación no afecta la incorporación de L-(³⁵S)-metionina dentro de proteínas celulares, así que se puede inferir que la síntesis de proteínas no es inhibida por el suero irradiado.

Los resultados sugieren que el suero no es afectado por la irradiación en las condiciones descritas. En conclusión, la radioesterilización a bajas temperaturas es un método simple y seguro de esterilización el cual parece más conveniente que el método convencional de filtración de sueros.

6.B.2 Inactivación del Virus Herpes Bovino tipo-1

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que:

i) La cinética de inactivación con radiación gamma del virus Herpes bovino tipo-1 (BHV tipo-1) suspendido en medio Glasgow-MEM libre de suero, presenta la configuración de una curva de primer orden y por lo tanto, la D_{10} ha sido calculada como la inversa de la pendiente de la curva.

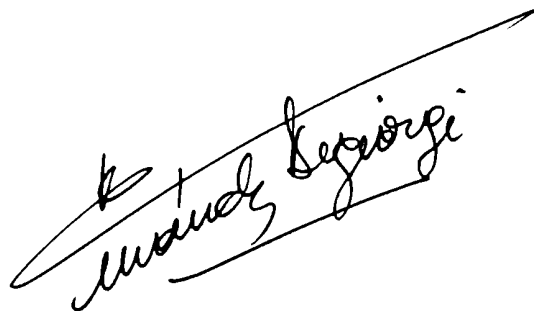
ii) En el presente trabajo los virus irradiados en presencia de restos celulares fueron más sensibles que los virus clarificados. De acuerdo a varios autores que han trabajado con diferentes virus, las variaciones en las D_{10} muestran un amplio rango de factores modificadores de dosis (FMD), determinados como la relación entre los valores de D_{10} en ausencia y en presencia del modificador. Por ejemplo, cuando Coxsackievirus B-2 fue irradiado a temperaturas de 0,5°C y -60°C, se obtuvo un $FMD = D_{10} \text{ a } 0,5 \text{ °C} / D_{10} \text{ a } -60\text{°C} = 0,76$ (155). En el presente trabajo se obtuvo un valor FMD igual a 0,70; donde $FMD = D_{10} \text{ virus crudo} / D_{10} \text{ virus clarificado}$, lo cual indica que es un valor similar a aquel causado por la variación de temperatura durante la irradiación.

iii) Este resultado puede ser atribuido a la presencia en el medio de sustancias que modifican los efectos secundarios de la radiación. El efecto de las radiaciones en los “blancos” biológicos puede ser modificado por diferentes vías, resultando una sensibilización o protección de los mismos. En adición a los radicales primarios formados por irradiación del agua, los radicales secundarios inducidos directa o indirectamente en el material orgánico pueden ser considerados como los posibles agentes que atacarían a los ácidos nucleicos cuando son irradiados en solución o en estado congelado (procesos lentos) (172). Otra posibilidad sería que los radicales atrapados en los restos celulares estarían

distribuidos en forma no uniforme en la suspensión viral, con un lento proceso de recombinación a bajas temperaturas, pero que podría aumentar cuando el material biológico se descongela.

iv) Si bien la irradiación en estado congelado requiere dosis mayores para reducir la infectividad del virus, se minimizan los efectos secundarios de las radiaciones, que podrían afectar a las proteínas involucradas en la respuesta antigénica (97).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la inactivación del virus BHV tipo-1 por radiación gamma del ^{60}Co en estado congelado puede ser usada para la preparación de vacunas y reactivos de diagnóstico.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. B. ...', written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Manuel Sepiorgi', written in a cursive style and underlined.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ICRU, Report 31 (1979) Average energy requires to produce an ion pair, ICRU Publications, Washington, DC,.
2. Makhlis, F.A. (1975) Radiation Physics and Chemistry of Polymers, Wiley, New York.
3. Myers, I.T. (1968) Ionization. En *Radiation Dosimetry I*, F.H. Attix, W.C. Roesch and E. Tochilin, (Eds), Academic Press, London.
4. Bosch, H. E. (1970) En *Elementos de Física Nuclear, Parte A, Fascículo II*, Interacciones de radiaciones nucleares con la materia. Editorial CAECE, Buenos Aires, Argentina.
5. Biggin, H.C. (1991) An introduction to radiation units and measurement. En *Irradiation effects on polymers*, D. W. Clegg and A. A. Collyer (Eds), Elsevier Applied Science, London, pp 2-17.
6. ICRU, Report 33 (1980) Radiation quantities and units, ICRU Publications, Washington, DC.
7. Platzman, R. (1953) Conference on basic Mechanisms in Radiation Biology, *National Research Council Publication 305*. National Academy of Sciences, Washington, DC.
8. Alpen, E. L. (1990) *Radiation Biophysics*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, USA.
9. Prasad, K. N. (1995) *Handbook of Radiobiology*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

10. Thomas, J. K. (1984) *The Chemistry of excitation at interfaces*, ACS *Monographs* **181**, Washington, D.C.
11. Thomas, J. K. (1967). En *Radiation Research*, G. Silini, Ed. North-Holland, Amsterdam.
12. Wichterle O., and Lim D. (1960) Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**,117.
13. Charlesby A. (1960) *Atomic radiation and polymers*. Pergamon Press, New York.
14. Chapiro A. (1962) *Radiation chemistry of polymeric systems*. Interscience, New York.
15. Kaetsu I. (1981) Immobilization of biofunctional substances. *Radiat. Phys. Chem.* **18**, 343-356.
16. Hoffman A.S. (1981) A review of the use radiation plus chemical and biochemical processing treatments to prepare novel biomaterials. *Radiat. Phys. Chem.* **18**, 323-342.
17. Kaetsu I. (1985) Recent progress on the immobilization of biocomponent by radiation polymerization and the application to biomedical uses. *Radiat. Phys. Chem.* **25**, 517-528.
18. Hoffman, A. S., Schmer, G. Harris, C., and Kraft, W. G. (1972) Covalent binding of biomolecules to Radiation-grafted hydrogels on inert polymer surfaces. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Org.* **18**, 10-17.
19. Hoffman, A. S., Schmer, G. (1973) New approaches to non-thrombogenic materials. En *Current topics in coagulation*, G. Schmer, ed., Academic Press, pp. 201-226.

20. Hoffman, A. S., Schmer, G. (1973) New-biocompatible and biofunctional materials via radiation-chemical synthesis. En *Paroi arterielle-Arterial wall* **1**, 95.
21. Yen, S. P. S., Rembaum, A. Molday, R. W., and Dreyer, W. (1975) Latex particles for immunoresearch. *ACS Polymer Preprints* **16**, 181-186.
22. Rembaum, A., Yen, S. P. S., Cheong, E., Wallace, S., Molday, R. S., Gordon, I. L., and Dreyer, W. J. (1976) Functional polymeric microspheres based on 2-hydroxyethyl methacrylate for immunochemical studies, *Macromol.* **9**, 328-336.
23. Rembaum, A., Yen, S. P. S., and Volksen, W. (1978) Labeled cells. *Chem. Tech.* **8**, 182-190.
24. Rembaum, A. (1979) Polymeric immonumicrospheres for cell labeling and separation. *ACS Polymer Preprints* **20**, 354-356.
25. Rembaum, A., Yen, S. P. S., and Molday, R. W. (1979) *J. Macromol. Sci.-Chem.* **A13**, 603-632.
26. Kaetsu, I., Kumakura, M., and Yoshida, M. (1979) Enzyme immobilization by radiation-induced polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate at low temperatures. *Biotech. Bioeng.* **21**, 847-861.
27. Kaetsu, I., Kumakura, M., and Yoshida, M. (1979) Enzyme immobilization by radiation-induced polymerization of hydrophobic glass-forming monomers at low temperatures. *Biotech. Bioeng.* **21**, 863-873.
28. Kaetsu, I., Kumakura, M., Yoshida, M., Asano, M., Himei, M., Tamura, M., and Hayashi, K. (1979) Immobilization of enzymes by radiation. *Radiat. Phys. Chem.* **14**, 595-602.
29. Kaetsu, I., Kumakura, M., Asano, M., Yamada, A., and Sakurai, Y. (1980) Immobilization of enzymes for medical uses on plastic surfaces by radiation-

- induced polymerization at low temperatures. *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 199-210.
30. Yoshida, M., Kumakura, M., and Kaetsu, I. (1979) Immobilization of enzymes by radiation-induced polymerization of glass-forming monomers. 2. Effects of cooling rate and solvent on porosity and activity of immobilized enzymes. *Polymer* **20**, 9-12.
 31. Kaetsu, I. (1995) Radiation synthesis and fabrication for biomedical applications. *Radiat. Phys. Chem.* **46**, 1025-1030.
 32. Rosiak, J. M., Ulanski, P., Pajewski, L. A., and Makuuchi, K. (1995) Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. *Radiat. Phys. Chem.* **46**, 161-168.
 33. Tabata, Y., Ito, I., and Tagawa, S. (1991) *Handbook of radiation chemistry*. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
 34. Ulanski, P., Bothe, E., Rosiak, J. M., and von Sonntag, C. (1994) OH –radical-induced crosslinking and strand breakage of poly(vinyl alcohol) in aqueous solution in absence and presence of oxygen. A pulse radiolysis and product study. *Macromol. Phys. Chem.* **195**, 1443.
 35. Rosiak, J. M., Olejniczak, J., and Pekala, W. (1990) Fast reaction of irradiated polymers-I. Crosslinking and degradation polyvinylpyrrolidone. *Radiat. Phys. Chem.* **36**, 747-755.
 36. Yoshida, M., Kumakura, M., and Kaetsu, I. (1979) Controlled release of 5-fluorouracil from adsorbents containing matrices polymerized by radiation. *Polymer Journal Japan* **11**, 775-779.

37. Li, X., Shen, W., Liu, C., Nishimoto, S., and Kagiya, T. (1991) Controlled release of 5-fluorouracil or mitomycin-C from polymer matrix: preparation by radiation polymerization and *in vivo* evaluation of the anticancer drug/polymer composites. *Radiat. Phys. Chem* **38**, 377-382.
38. Kaetsu, I., Yoshida, M., and Yamada, A. (1980) Controlled slow release of chemotherapeutic drugs for cancer from matrices prepared by radiation polymerization at low temperatures. *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 185-197.
39. Kaetsu, I., Yoshida, M., Kumakura, M., Yamada, A., and Sakurai, Y. (1980) Controlled release of multi-component cytotoxic agents from radiation polymerized composites. *Biomaterials*. **1**, 17-22.
40. Yoshida, M., Asano, M., Kaetsu, I., Nakai, K., Yamanaka, H., Suzuki, T., Shida, K., and Suzuki, K. (1982) In vivo release of testosterone from protein-vinyl polymer composites. *Biomaterials* **3**, 204-208.
41. Yoshida, M., Asano, M., Kaetsu, I., Nakai, K., Yamanaka, H., Suzuki, T., Shida, K., and Suzuki, K. (1983) In vivo release of testosterone from protein-vinyl polymer composites prepared by radiation-induced polymerization. *Biomaterials* **4**, 33-38.
42. Yamanaka, H., Nakai, K., Shida, K., Shiraishi, A., Yoshida, M., and Kaetsu, I. (1983) *J. Steroid Biochem.* **19**, 12s.
43. Kumakura, M., and Kaetsu, I. (1984) Immobilization of cellulase using porous polymer matrix. *J. Appl. Polym. Sci.* **29**, 2713-2718.
44. Kumakura M., Kaetsu I., and Adachi S. (1984) Preparation by irradiation of a solid support for enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* **69**, 9-15.

45. Kumakura, M., and Kaetsu, I. (1986) Continuous enzyme reactions with immobilized enzyme tubes prepared by radiation cast-polymerization. *Appl. Radiat. Isotopes*, **37**, 195-196.
46. Rella, R., Ferrara, D., Barison, G., Doretti, L., and Lora, S. (1996) High-temperature operating biosensor for the determination of phenol and related compounds. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 83-88.
47. Fujimura, T., Yoshii, F., Kaetsu, I. Inoue, Y., and Shibata, K. (1980) Effect of irradiation and immobilization on spinach chloroplast activities. *Z. Naturforsch.* **35c**, 477-481.
48. Kaetsu, I., Yoshii, F., and Fujimura, T. (1980) Effect of viscous solvents and monomer on conservation of intact and immobilized chloroplast. *Z. Naturforsch.* **35c**, 1052-1056.
49. Yoshii, F., Kaetsu, I., and Yamada, A. (1981) Immobilization of erythrocytes by radiation polymerization of glass-forming monomers at low temperatures. *Z. Naturforsch.* **36c**, 1062-1067.
50. Kaetsu I., Kumakura M., Kikuchi S., Adachi S., and Suzuki M. (1983) Immobilization of *E. coli* cell as an antigen by radiation polymerization method. *Z. Naturforsch.* **38c**, 812-814.
51. Shivakumar, K., Renuka Nair, R., Jayakrishnan, A. Chithambara Thanoo, B., and Kartha, C. (1989) Synthetic hydrogel microspheres as substrata for cell adhesion and growth. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **25**, 353-357.
52. Nagaoka, S., Tanzawa, H., and Suzuki, J. (1990) Cell proliferation on hydrogels. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **25**, 51-56.

53. Fujimura T., and Kaetsu I. (1981) Immobilization of yeast cells by radiation-induced polymerization. *Z. Naturforsch.* **37c** 102-106.
54. Xin, L. Z., Carezza, M., Kaetsu, I., Kumakura, M., Yoshida, M., and Fujimura, T. (1992) Immobilization of yeast cells on hydrogel carriers obtained by radiation-induced polymerization. *Radiat. Phys. Chem.* **40**, 579-584.
55. Carezza, M., Yoshida, M., Kumakura, M., and Fujimura, T. (1993) Hydrogels obtained by radiation-induced polymerization for yeast cells immobilization. *Eur. Polym. J.* **29**, 1013-1018.
56. Kaetsu, I., Kumakura, M., Fujimura, T., Yoshii, F., Kojima, T., and Tamada, M. (1981) Utilization of radiation technique on the saccharification and fermentation of biomass. *Radiat. Phys. Chem.* **18**, 827-835.
57. Kumakura, M., and Kaetsu, I. (1983) Immobilization of *Trichoderma reesei* cells by radiation polymerization. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 197-198.
58. Kumakura, M., and Kaetsu, I. (1983) Immobilization of microbial cells on cellulose-polymer surfaces by radiation polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **28**, 3759-3765.
59. Yoshii, F., and Kaetsu, I. (1983) Cell culture on polymers prepared by radiation-induced polymerization of various glass-forming monomers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **8**, 115-126.
60. Rosiak, J. M. (1991) Hydrogel dressings. En *Radiation effects on polymers*, ACS Book Ser. 475, Washington, D.C., pp. 271
61. Wu-Minghong, Bao-Borong, Yoshii, F. and Makuuchi, K. (2000) Improvement of poly(vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone) blended hydrogel by radiation crosslinking. *Nucl. Sci. Techn.* **11**, 72-78.

62. Czechowicz-Janicka, K., Romaniuk, I., Piekarniak, A., Galant, S., Kaminska, E., and Rosiak, J. (1992) Polymer ocular implants for controlled release of drug. II Preliminary testing of implants with incorporated pilocarpine. *Klin. Oczna* **94**, 42-43.
63. Yoshii, F., Makuuchi, K., Zainuddin, Suradjat, A., Darwis, D., and Razzak, M. T. (1992) Heat stability of radiation crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Jpn. J. Med. Instrum.* **62**, 285-290.
64. Hoffman, A.S. (1990) Adsorption and immobilization of proteins on gas discharge-treated surfaces. *J. Appl. Polym. Sci. Polym. Symp.* **46**, 341.
65. Carenza, M. (1992) Recent achievements in the use of radiation polymerization and grafting for biomedical applications. *Radiat. Phys. Chem.* **39**, 485-493.
66. De Rossi, D. Kajiware, K., Osada, Y., and Yamauchi, A. (1991) *Polymer gels. Fundamentals and Biomedical Applications*. Plenum Press, New York.
67. Taylor, L. D., and Cerankowski, L. D. (1975) Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions- a study of lower consolute behavior. *J. Polym. Sci. Chem. Ed.* **13**, 2551-2570.
68. Kaetsu, I., Uchida, K., Sutani, K., Nakayama, H., and Tamori, A. (2000) Synthesis and application of intelligent hydrogels. Yamaoka, H., Hase, H. and Makuuchi, K. (eds), JAERI, Tokio. *Proceeding 8th Jpn-China Bilateral Symposium on Rad. Chem.* 352, pp 189-191.
69. Yoshida, M., Safranji, A., Omichi, H., and Katakai, R. (1995) Intelligent biomedical gels based on pendant L-proline methyl ester. *Radiat. Phys. Chem.* **46**, 1053-1056.

70. Yoshida, M., Safranji, A., Omichi, H., and Katakai, R. (1996) Polymerization, self-bridging and degradation of acryloyl- and methacryloyl-L-proline methyl esters induced by radiation and characteristics of gel swelling. *Macromolecules* **29**, 2321-2323.
71. Kaetsu, I. (1996) Biomedical materials, devices and drug delivery systems by radiation techniques. *Radiat. Phys. Chem.* **47**, 419-424.
72. Burczak, K., Fujisato, T., Ikada, Y., and Hatada, M. (1991) Protein permeation through polymer membranes for hybrid-type artificial pancreas. *Proceedings Jpn Acad. Serie-B* **67**, 83-88.
73. Inoue, K., Fujisato, T., Gu, Y. J., Burczak, K., Sumi, S., Kogire, M., Tobe, T., Uchida, K., Nakai, I., Maetani, S., and Ikada, Y. (1992) Experimental hybrid islet transplantation: application of polyvinyl alcohol membrane for entrapment of islets. *Pancreas* **7**, 562-568.
74. Volesky, B. (1999) Biosorption for the next century. *ibid*, 161-170.
75. Gadd, G. M. (1992) Microbial control of heavy metal pollution. En *Microbial control pollution*, J. C. Fry, G. M. Gadd, R. A. Herbert, C. W. Jones, and I. A. Watson-Craik (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp 59-87.
76. Macaskie, L. E., and Dean, A. C. R. (1990) Metal sequestering biochemicals. En *Biosorption of heavy metals*, B. Volesky (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 200-248.
77. Volesky, B., and Holan, Z. R. (1995) Biosorption of heavy metal. *Biotechnol. Prog.* **11**, 235-250.

78. Kotrba, P., Dolecková, L., de Lorenzo, V., and Ruml, T. (1999) Enhanced bioaccumulation of heavy metals ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1092-1098.
79. Philips, C. R., and Poon, Y. C. (1988) *Immobilization of cells*, Springer-Verlag, New York.
80. Volesky, B., and Prasetyo, I. (1994) Cadmium removal in a biosorption column. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1010-1015.
81. Macaskie, L. E. (1990) An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **49**, 357-379.
82. Chang, J.-S., and Huang, J.-C (1998) Selective adsorption/recovery of Pb, Cu, and Cd with multiple fixed beds containing immobilized bacterial biomass. *Biotechnol. Prog.* **14**, 735-741.
83. Volesky, B. (1990) Biosorption by fungal biomass. En *Biosorption of heavy metals*, B. Volesky (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 139-172.
84. Volesky, B. (1990) Removal and recovery of heavy metals by biosorption. En *Biosorption of heavy metals*, B. Volesky (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 7-44.
85. Artandi, C. (1973) Suturas. En *Manual on radiation sterilization on medical and biological materials*. Technical reports series N° 149, IAEA, pp 171-186.
86. Phillips, G. O. (1973) Medicines and pharmaceutical basic materials. En *Manual on radiation sterilization on medical and biological materials*. Technical reports series N° 149, IAEA, pp 207-228.

87. Harrison, N. (1991) Radiation sterilisation and food packaging. En *Irradiation effects on polymers*, D. W. Clegg and A. A. Collyer (Eds), Elsevier Applied Science, London, pp 319-343.
88. Cuda, J. (1983) Industrial gamma processing overview. En *AECL Gamma processing seminar*, Ottawa, Technical Paper GPS 311.
89. Fraser, F. M. (1985) Cobalto-60 availability for radiation processing. En *17th Japan Conference on radiation and radioisotopes*, Tokyo.
90. Sivinski, J. S. (1991) Environmental application of cesium-137 irradiation technology: sludges and foods. *Radiat. Phys. Chem.* **22**, 99-118.
91. Jacobs, G. P. (1985) A review: radiation sterilisation of pharmaceuticals. *Radiat. Phys. Chem.* **26**, 133-142.
92. Frohnsdorff, R. S. M. (1981) Sterilisation of medical products in Europe. *Radiat. Phys. Chem.* **17**, 95-106.
93. Ley, F. J. (1973) The effect of ionizing radiation on bacteria. En *Manual on radiation sterilization on medical and biological materials*. Technical reports series N° 149, IAEA, pp 37-64.
94. Halls, N. A. (1991) Gamma-irradiation processing. En *Irradiation effects on polymers*, D. W. Clegg and A. A. Collyer (Eds), Elsevier Applied Science, London, pp 253-296.
95. Sommer, N. (1973) The effect of ionizing radiation on fungi. En *Manual on radiation sterilization on medical and biological materials*. Technical reports series N° 149, IAEA, pp 73-79.

96. Lea, D. E. (1956) *Action of radiation on living cells*, 2nd ed. Cambridge University Press.
97. Pollard, E. C. (1973) The effect of ionizing radiation on viruses. En *Manual on radiation sterilization on medical and biological materials*. Technical reports series N° 149, IAEA, pp 65-71.
98. Abinanti F. R. (1961) Respiratory and enteric viruses in man and animals. *Publ. Health Rep.* **76**, 897-902.
99. Bagdasarlyan G. A. (1964) Survival of viruses of the enterovirus group (poliomyelitis, ECHO, coxsackie) in soil and on vegetables. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **8**, 497-505.
100. Bendinelli M., and Ruschi A. (1969) Isolation of human enterovirus from mussels. *Appl. Microbiol.* **18**, 531-532.
101. Ernek E.; Kozuch O., and Nosek J. (1968). Isolation of tick-borne encephalitis virus from blood and milk of goats grazin in the Tribec Focus Zone. *J. Hyg. Epidermiol. Microbiol. Immunol.* **12**, 32-39
102. Danes L., Hrukova J., and Blazek K. (1966) Poxvirus officinale inactivated by gamma radiation: immunogenicity of the antigen. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **10**, 210-218.
103. Logan D. M., Whitmore G.F. (1964) Radiation effects on polyoma virus. *Virology* **25**, 495-501.
104. Polley, J. R. (1962). The use of gamma radiation for the preparation of virus vaccines. *Can. J. Microbiol.* **8**, 455-459.

105. Burducea, O. (1990) Trente-cinq ans de recherches et d'études dans le domaine de la radiovirologie à l'Institut de virologie "Stefan S. Nicolau". *Rev. Roum. Virol.* **41**, 157-169.
106. Lombardo J. H., and Smolko E. E. (1990) A biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 Ci. *Radiat. Phys. Chem.* **35**, 585-589.
107. Schroeder R.J., and Moys M. D. (1954) An acute upper respiratory infection of dairy cattle *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **125**, 471.
108. Kahrs R.F. (1977) Infectious bovine rhinotracheitis. A review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **171**, 1055-1064.
109. Moorthy A. R. S. (1985) Outbreak of balanoposthitis in breeding bulls. *Vet. Rec.* **116**, 98.
110. Lupton H. W., Barne, H. J., and Reed, D. E. (1980) Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet.* **70**, 77-95.
111. Joo H. B., Dee S. A., Molitor T. W., and Thacker B. J. (1961) In utero infection of swine fetuses with infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus-1) *Am. J. Vet. Med. Assoc.* **139**, 236.
112. Metzler, A. E., Schudel, A. A., and Engels, M. Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolates from calves with neurological disease. *Arch. Virol.* **87**, 205-217.
113. Stoker M., and Mac Pherson I. (1967) Syrian hamster fibroblast cell line BHK 21 and its derivatives. *Nature* **283**, 1355-1357.
114. Swallow A.J. (1960) *Radiation Chemistry of Organic Compound*, , Pergamon Press, Oxford, pp 42-43.

115. Normes d'identité et de pureté et évaluation toxicologique des additifs alimentaires divers antibiotiques douzième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires. En "*Réunions de la FAO sur la nutrition*" Rapport N° 45 A. OMS additifs alimentaires 69.34 (1969).
116. Archimbault P., Boutier C. et Muscat G. (1978) L'ampicilline chez la volaille. Etude des résidus après administration per os chez la poule pondeuse. *Rev. Méd. Vét.* **129**, 1541-1551.
117. Chien, Y. W., and Lua, E. P. K. (1976) Controlled drug release from polymeric delivery devices IV: *In vitro-In vivo* correlation of subcutaneous release of Norgestomet from hydrophilic implants. *J. Pharm. Sci.* **65**, 488-492.
118. Lennette, E. H. (1985) Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology, Washington.
119. Sobot, F., Khoury, A. E., Zamboni, A. C., Davidson, D., Mittelman, M. W., (1995) Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobiol. Agents. Chemother.* **39**, 1281-1286.
120. Drabkin D.L., and Austin J.H. (1935) Spectrometric Studies; Preparations from Washed Blood Cells; Nitric Oxide Hemoglobin and Sulfhemoglobin. *J. Biol. Chem.* **112**, 51.
121. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-267.
122. Freundt E.A. (1983) Culture Media for Classic Mycoplasmas. En *Method in Mycoplasmaology* , Academic Press, Vol I, pp 127-135.

123. Dienes L. J. (1939) L organisms of Klieneberger and streptobacillus moniliformis. *Infect. Diseases* **65**, 24-42.
124. Talens L.T., and Zee Y.C. (1976) Purification and Bouyant Density of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (39159). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **151**, 132-135.
125. Rossi C.R., Bridgman C.R., and Kiesel G.K. (1980) Viral contamination of Bovine Fetal Lung Cultures and Bovine Fetal Serum. *Am. J. Vet. Res.* **41**, 1680-1681.
126. Cunningham C.H. (1966) *A Laboratory Guide in Virology*. 6th Edition Burgess Public Co.
127. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
128. O'Farrell, P. H. (1975) High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
129. O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., and O'Farrell, P. H. (1977) High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *Cell* **12**, 1133-1142.
130. Bonner W.N., and Laskey R.A. (1974) A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88.
131. Sullivan R., Fassolitis A. C., Larkin E. P., Read, R. B., Jr., and Peeler, J. T. (1971) Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl. Microbiol.* **22**, 61-65.
132. Jagger, J. (1967) *Introduction to research in ultraviolet photobiology*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc. pp 89-91.

133. Higuchi T. (1963) Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* **52**, 1145-1149.
134. Kaetsu I., Kumakura M., Fujimura T., Yoshida M., Asano M., Kasai N., and Tamada M. Studies on the immobilization of biofunctional components by radiation polymerization and their applications. *Radiat. Phys. Chem.* **27** (1986) 246-263.
135. Langer, R. (1990) New methods of drug delivery. *Science* **249**, 1527-1533.
136. Rosiak J. M., Ulanski, P., and Rzeznicki, A. (1995) Hydrogels for medical purposes. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* **105**, 335-339.
137. Francis, A. J. (1994) Microbial transformations of radioactive wastes and environmental restoration through bioremediation. *J. Alloys. Compounds* **213/214**, 226-231.
138. Holan, Z. R., and Volesky, B. (1995) Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **53**, 133-146.
139. Holan, Z. R., and Volesky, B. (1994) Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1001-1009.
140. Barton, L. L., Fekete, F. A., Huybrechts, M. M. E., Sillerud, L. O., Blake II, R.C., and Pigg, C.J. (1994) *Radioactive Waste Management and Environmental Restoration* **18**, 13-25.
141. Holan, Z. R., Volesky, B., and Prasetyo, I. (1993) Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 819-825.
142. Volesky, B., May, H., and Holan, Z. R. (1993) Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 826-829.

143. Beveridge, T. J. (1986) The immobilization of soluble metals by bacterial walls. En *Biotechnology and Bioengineering Symposium N° 16: Biotechnology for the mining, metal-refining and Fossil fuel processing industries*. Ehrlich, H.L., Holmes, D. S. (Eds.), J. Wiley Interscience, New York, pp 127-140.
144. Mattuschka, B., Junghaus, K., and Straube, G. (1993) Biosorption of metals by waste biomass. En *Biohydrometallurgical Technologies*. Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (Eds.), The minerals, Metals & Metals Society: Warrendale, PA, Vol. 2, pp 125-132.
145. Jilek, R., Fuska, J., and Nemeč, P. (1978) Biologicky sorbent pro dekontaminaci vod od uranu. *Biologia (Bratislava, Czechoslovakia)* **33**, 201-207.
146. Macaskie, L. E., Wates, J. M., and Dean, C.R. (1987) Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. immobilized on gel and solid supports: applicability to the treatment of liquid wastes containing heavy metal cations. *Biotech. Bioeng.* **30**, 66-73.
147. Nordheim W., Bräuniger S., and Petzold G. (1985) Application of Ionizing Radiation for production of drugs, vaccines and biochemicals. *Isotopenpraxis* **21**, 375-379.
148. White, L. A., Freeman, C. Y., Hall, H. E., and Forrester, B. D. (1990) Inactivation and stability of viral diagnostic reagents treated by gamma radiation. *Biologicals* **18**, 271-280.
149. Howard-Flanders, P., and Alper, T. (1957). The sensitivity of microorganisms to irradiation under controlled gas conditions. *Radiat. Res.* **7**, 518-540.

150. Alpen, E. L. (1998). Radiation chemistry. En *Radiation biophysics*, 2nd. edition Academic Press, California, USA, pp 120-122.
151. Scholes G., Ward J.F., and Weiss J. (1960) Mechanism of the Radiation-Induced Degradation of Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* **2**, 379-391
152. Ginoza W. (1963) Radiosensitive Molecular Weight of Single-Stranded Virus Nucleic Acids. *Nature* **199**, 453-456.
153. Biaglow, J. E., Varnes, M. E., Clark, E. P., and Epp, E. R. (1983) The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. *Radiat. Res.* **95**, 437-455.
154. Jordan, R.T., and Kempe L. L. (1956) Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from ⁶⁰Cobalt. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**, 212-215.
155. Sullivan R., Scarpino, P. V., Fassolitis, A. C., Larkin, E. P., and Peeler, J. T. (1973) Gamma Radiation Inactivation of Coxsackievirus B-2. *Appl. Microbiol.* **26**, 14-17.
156. Ginoza,W. (1968) Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat. En *Methods in virology*, Academic Press, New York, pp. 139-179.
157. Coleby, B., Ingram, M., Sheperd, H. J., Thornley, M. J., and Wilson, G. M. (1961) Treatment of meats with ionizing radiation. VII. Effect of low temperatures during irradiation. *J. Sci. Food Agric.* **12**, 483-490.
158. Hall E. (1994) *Radiobiology for the Radiologist*. 4th edition. J. B. Lippincott Company , Philadelphia.
159. Thomas, F. C., Ouwkerk, T., and McKercher, P. (1982) Inactivation by gamma irradiation of animal viruses in simulated laboratory effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1051-1056.

160. Simoni, J., Mocsari, E., DiGleria, M., and Felcai, V. (1983) Effect of radiation of certain animal viruses in liquid swine manure. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **34**, 793-795.
161. Thomas, F. C., Davies, A. G., Dulac, G. C., Willis, N. G., Papp-Vid, G., and Girard, A. (1981) Gamma ray irradiation of some animal viruses. *Can. J. Comp. Med.* **45**, 397-399.
162. Massa, D. (1966) Radiation inactivation of foot-and-mouth disease virus in the blood, lymphatic glands, and bone marrow of the carcasses of the infected animals. *International Symposium on Food Irradiation*. IAEA, Vienna. ST1 PUB **127**, 329-345.
163. McVicar, J. W., Mebus, C. A., Brynjolfsson, A., and Walker, J. S. (1982) Inactivation of African swine fever virus in tissues by gamma irradiation. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 318-319.
164. Thomas, F. C., and Samagh, B. S. (1985) Gamma ray sensitivity of bluetongue, EHD, and African horsesickness viruses and their precipitating and complement fixing antigens. *Prog. Clin. Biol. Res.* **178**, 413-415.
165. Paxton, D. W. (1982) Gamma irradiation of curios. *Animal Quarterly* **82**, 1-4.
166. Erickson, G. A., Landgraf, J. G., Wessman, S. J., Koski, T. J., and Moss, L. M. (1989) Detection and elimination of adventitious agents in continuous cell lines. *Dev. Biol. Standard* **70**, 59-66.
167. House, C., House, J., and Yedloutschnig, R. J. (1990) Inactivation of viral agents in bovine serum by gamma irradiation. *Can. J. Microbiol.* **36**, 737-740.

168. Nonomiya, T., Yamashiro, T., Tsutsumi, T., Ito, H., and Ishigaki, I. (1990) Inactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by gamma irradiation. *Fd. Irradiat. Jap.* **25**,83-88.
169. Nonomiya T., Ito, H., Morimoto, A., Yamashiro, T., Ishigaki, I., Iwatsuki, K., and Tsutsumi, T. (1992). Inactivation of RNA viruses by gamma irradiation. *Fd Irradiat. Jap.* **27**, 19-26.
170. Smolko E. E., Lombardo J. H., and Rivenson S. (1992) First antiviral vaccine commercially produced by Gamma-Ray Processing Technology. (Abst) *8th Int. Mtg on Radiat. Processing* , Beijing, pp. 347.
171. Bender E., Fritsche J., Nordheim W., and Bär M. (1984) *Third Working Meeting on Radiation Interaction*, Leipzig.
172. Hotz, G. (1978) Modification of radiation damage. En *Effects of ionizing radiation on DNA*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 304-311.

ÍNDICE

INDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Las Radiaciones Ionizantes.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.1.1 Proceso ionizante.....	1
1.1.1.2 Radiaciones directamente e indirectamente ionizantes.....	4
1.1.2 Interacción de la radiación con la materia.....	5
1.1.2.1 Interacción de la radiación electromagnética con la materia.....	6
1.1.2.1.1 Coeficientes de atenuación y sección eficaz de interacción.....	6
1.1.2.1.2 Absorción fotoeléctrica.....	8
1.1.2.1.3 Efecto o dispersión Compton.....	10
1.1.2.1.4 Producción de pares.....	13
1.1.2.1.5 Coeficiente másico de absorción de energía.....	14
1.1.3 Dosis absorbida.....	18
1.1.4 Química de las radiaciones.....	19
1.1.4.1 Efectos directos e indirectos de las radiaciones.....	19
1.1.4.2 Radiólisis del agua.....	20
1.1.4.3 Localización espacial de los eventos.....	22
1.1.4.4 Valores G.....	24
1.2 Utilización de las radiaciones ionizantes en la obtención de biomateriales usados biotecnología.....	25
1.2.1 Inmovilización de biocomponentes en matrices poliméricas.....	27

1.2.2	Características del método de inmovilización por entrapamiento físico.....	30
1.2.3	Propiedades de los hidrogeles obtenidos por polimerización radioinducida.....	33
1.2.4	Aplicaciones de los hidrogeles.....	40
1.2.4.1	Sistemas de liberación de drogas.....	40
1.2.4.2	Inmovilización de hormonas y sus aplicaciones.....	42
1.2.4.3	Aplicaciones en cultivos de células.....	44
1.2.4.3.1	Inmovilización y cultivo de levaduras.....	44
1.2.4.3.2	Inmovilización y cultivo de hongos filamentosos.....	45
1.2.4.3.3	Inmovilización y cultivo de células de tejidos.....	46
1.2.4.4	Otras aplicaciones de los hidrogeles.....	46
1.2.4.4.1	Aplicaciones tópicas como vendajes de heridas.....	47
1.2.4.4.2	Sistemas transdermales.....	47
1.2.4.4.3	Implantes.....	48
1.2.4.4.4	Aplicaciones oftálmicas.....	49
1.2.4.4.5	Sistemas respuesta-estímulo.....	49
1.2.4.4.6	Órganos artificiales (tipo híbridos).....	50
1.3	Remoción/recuperación de metales pesados.....	51
1.4	Uso industrial de las radiaciones ionizantes en la inactivación de agentes patógenos	54
1.4.1	Origen y desenvolvimiento.....	54
1.4.2	Características generales de la inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos.....	61
2	Objetivos.....	64

3 Materiales y Métodos	67
3.A Hidrogeles	67
3.A.1 Inmovilización de fármacos	67
3.A.1.1 Materiales	67
3.A.1.1.1 Reactivos	67
3.A.1.1.2 Líneas celulares, cepas bacterianas y medios de cultivo	67
3.A.1.1.3 Animales	68
3.A.1.1.4 Dispositivos de entrega de fármacos	69
3.A.1.1.5 Fuente de irradiación	69
3.A.1.1.6 Dosimetría	69
3.A.1.2 Métodos	71
3.A.1.2.1 Método de titulación de ampicilina	71
3.A.1.2.2 Estudios de liberación de ampicilina	72
3.A.1.2.3 Estudios de biocompatibilidad de hidrogeles	73
3.A.1.2.3.1 Estudios en cultivos celulares	73
3.A.1.2.3.2 Estudios en animales	74
3.A.2 Inmovilización de bacterias	74
3.A.2.1 Materiales	74
3.A.2.1.1 Reactivos	74
3.A.2.1.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo	76
3.A.2.1.3 Aislación de bacterias	76
3.A.2.1.4 Preparación de hidrogeles acrílicos	76
3.A.2.2 Métodos	76

3.A.2.2.1 Determinación del contenido de agua en equilibrio.....	77
3.A.2.2.2 Inmovilización de bacterias en hidrogeles acrílicos.....	77
3.A.2.2.3 Estudios de remoción de metales pesados.....	78
3.A.2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis por EDAX.....	79
3.A.2.2.5 Determinación de la cantidad de iones pesados.....	80
3.B Inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos.....	80
3.B.1 Radioesterilización de sueros.....	80
3.B.1.1 Materiales.....	80
3.B.1.1.1 Recolección de sueros.....	80
3.B.1.1.2 Fuente de irradiación y dosimetría.....	81
3.B.1.1.3 Líneas celulares y virus.....	81
3.B.1.1.4 Medios de cultivo, reactivos y buffers.....	81
3.B.1.1.5 Radiactivos.....	85
3.B.1.2 Métodos.....	86
3.B.1.2.1 Análisis químico y ensayos microbiológicos.....	86
3.B.1.2.2 Mantenimiento celular y curvas de crecimiento.....	88
3.B.1.2.3 Ensayos de eficiencia de clonado.....	89
3.B.1.2.4 Análisis de las proteínas del suero.....	89
3.B.1.2.5 Incorporación de L-[³⁵ S]-metionina y análisis de proteínas celulares.....	91
3.B.2 Inactivación del Virus Herpes Bovino tipo-1 (BHV tipo-1).....	92
3.B.2.1 Materiales.....	93
3.B.2.1.1 Virus, líneas celulares y medios de cultivo.....	93

3.B.2.1.2 Fuente de irradiación y dosimetría.....	93
3.B.2.2 Métodos.....	93
3.B.2.2.1 Irradiación de las muestras.....	93
3.B.2.2.2 Titulación Viral.....	94
3.B.2.2.3 Cálculo de los valores D_{10}	95
3.B.2.2.4 Factor modificador de dosis (FMD).....	95
4. Resultados.....	97
4.A Hidrogeles.....	97
4.A.1 Inmovilización de ampicilina.....	97
4.A.2 Inmovilización de bacterias.....	102
4.A.2.1 Determinación del contenido de agua en equilibrio.....	102
4.A.2.2 Ensayos de inmovilización de <i>P. aeruginosa</i>	107
4.A.2.3 Inmovilización de bacterias aisladas de la costa del Río de la Plata capaces de crecer en presencia de iones pesados.....	109
4.A.2.4 Estudios de remoción de iones metálicos.....	113
4.B Inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos.....	117
4.B.1 Radioesterilización de sueros.....	117
4.B.1.1 Pruebas químicas y microbiológicas.....	117
4.B.1.2 Pruebas de rendimiento.....	118
4.B.2 Inactivación del Virus Herpes Bovino tipo-1 (BHV tipo1).....	124
5. Discusión.....	126
5.A Hidrogeles.....	126
5.B Inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos.....	131
6. Conclusiones.....	137

6.A Hidrogeles.....	137
6.A.1 Inmovilización de ampicilina.....	137
6.A.2 Inmovilización de bacterias.....	138
6.B Inactivación de agentes patógenos en materiales biológicos.....	140
6.B.1 Radioesterilización de sueros.....	140
6.B.2 Inactivación del Virus Herpes Bovino tipo-1 (BHV tipo-1).....	142
7. Bibliografía.....	145