

CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO-ALCOHOL POLIVINÍLICO OBTENIDOS POR RADIACIÓN GAMMA

Wilson Carhuapoma Bernabé¹ y Julio Santiago Contreras^{2,3}

- 1) Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Perú.
- 2) Instituto Peruano de Energía Nuclear, Dirección de Promoción y Desarrollo Tecnológico, Avenida Canadá 1470, Lima, Perú. Correo electrónico: jsantiago@ipen.gob.pe
- 3) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Avenida Venezuela s/n, Lima – Perú. Correo electrónico: jsantiagoc@unmsm.edu.pe

RESUMEN

Se han obtenido hidrogeles de quitosano con alcohol polivinílico (PVA) utilizando radiación gamma. Se presenta un análisis del tipo de interacción entre las cadenas de quitosano y del PVA en estos hidrogeles. El quitosano en solución disminuye rápidamente su peso molecular, por efecto de la radiación gamma, mientras que el PVA en solución acuosa forma hidrogeles luego de ser irradiadas a dosis mayores de 5 kGy. Sin embargo, las mezclas de quitosano y PVA forman hidrogeles en los cuales estos polímeros no se degradan significativamente y, al contrario, forman hidrogeles estables. Presentamos evidencias que sugieren que las cadenas de PVA y quitosano están entrecruzadas covalentemente. Esto se explica en términos de probabilidad de reacción de los radicales formados por radiación gamma.

Palabras claves: Hidrogel, quitosano, alcohol polivinílico, radiación gamma

INTRODUCCIÓN

El procesamiento de polímeros por radiación gamma permite producir nuevos materiales con mejores propiedades que los obtenidos por los métodos químicos. La radiación puede producir un acortamiento de la cadena, promover la polimerización, formar copolimerizaciones o generar entrecruzamiento entre las diferentes cadenas (1-4). El tamaño, forma o estructura química de los polímeros favorece uno de estos fenómenos. Además, los materiales obtenidos de

esta manera quedan esterilizados facilitando su aplicación en biomedicina. Aplicaciones potenciales de estos nuevos materiales en biomedicina y biotecnología incluyen tratamientos locales, implantes, dispositivos de liberación controlada de drogas, inmovilización de enzimas y matrices para cultivo celular (3).

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional, que tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua formando materiales blandos y elásticos. Se pueden clasificar en dos tipos, en función de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional que los constituyen. En los hidrogeles físicos las cadenas entrecruzadas están unidas por interacciones de van der Waals, mientras que en los hidrogeles químicos se encuentran unidas firmemente por enlaces covalentes. Los hidrogeles pueden prepararse por radiación (rayos gamma (5,6), electrones (7), UV (8)) o con la ayuda de agentes de entrecruzamiento químicos (9). Los hidrogeles tienen aplicación práctica en agricultura y en biomedicina (10-13).

El quitosano es un biopolímero muy estudiado debido a sus potenciales aplicaciones en diferentes campos de la ciencia y tecnología. Este interés proviene de sus propiedades: biocompatible, biodegradable y buen adsorbente. A esto se le suma su actividad antimicrobiana por la presencia de grupos amino que se encuentran en forma catiónica. Sus propiedades dependen directamente del peso molecular y de su grado de deacetilación. Las aplicaciones del quitosano son muy diversas. En agricultura es usado como regulador de plantas y como preservante de frutos, en medicina como portador de drogas o en el tratamiento de lesiones a la piel (14, 15).

El alcohol polivinílico es un polímero sintético obtenido por hidrólisis ácida o básica del acetato de polivinilo. A pesar de su origen sintético es un polímero biodegradable y biocompatible. Sus propiedades dependen de su peso molecular y de su grado de hidrólisis. El PVA con grado de hidrólisis del 90% es soluble en agua caliente. El PVA es obtenido por hidrólisis del poliacetato de vinilo, obtenido a su vez a partir del acetato de vinilo (16). Este polímero forma fácilmente hidrogeles por métodos físicos y es muy utilizado en la preparación de biomateriales (17-18).

En un trabajo previo presentamos la preparación de hidrogeles de quitosano-PVA utilizando radiación gamma, cuyos grados de hinchamiento depende de la temperatura, fuerza iónica del medio y de la proporción de quitosano presente en el hidrogel (19). En este trabajo presentamos la formación de estos hidrogeles en función del peso molecular del quitosano y de la

dosis de irradiación al igual que la estabilidad de los mismos frente a soluciones ácidas y en caliente. Igualmente, presentamos evidencias que nos permiten discutir el tipo de interacción intermolecular entre las cadenas poliméricas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. El quitosano ha sido preparado a partir de langostinos (*Penaeus vannamei*) y caracterizado siguiendo los procedimientos previamente publicados ($M = 356.000$ g/mol, DD 82%) (19). El PVA proviene de Aldrich ($M = 100.000$ g/mol grado de hidrólisis 89%). El ácido acético, HCl y NaOH provienen de Merck Peruana y son de grado reactivo. El equipo de radiación gamma utilizado fue un Gammacell 220 Excell con una fuente de Co-60 doblemente encapsulado en acero inoxidable, con una tasa de irradiación de 16 kGy/h.

PROCEDIMIENTOS

Degradación del quitosano por radiación gamma. Se preparó una solución de quitosano al 0,12% en una mezcla de AcOH 0,1 M y NaCl 0,2 M, en una proporción de 1:2, e inmediatamente se irradió con rayos gamma a diferentes dosis (1, 3, 5, 7, 10 y 15 kGy). Los pesos moleculares del quitosano fueron medidos inmediatamente después de la irradiación por el método de viscosimetría capilar (19).

Degradación del quitosano en medio ácido. Se prepararon varias soluciones de quitosano al 0,12% en una mezcla de AcOH 0,1M y NaCl 0,2 M (AcOH/NaCl 1:2) y se midió el peso molecular en función del tiempo.

Preparación de los hidrogeles: Efecto de la dosis de irradiación. Se prepararon mezclas de quitosano-PVA (19), con un contenido de quitosano de 11,8%, y se irradiaron a 1, 3, 5, 7, 10 y 15 kGy. para estudiar el efecto de la radiación en la formación de hidrogeles.

Preparación de los hidrogeles: Efecto del peso molecular Quitosano, en solución al 1% en HCl 0,1 M, fue degradado por radiación gamma a diferentes dosis (1, 3, 5, 7, 10 y 15 kGy) para disminuir su peso molecular. Inmediatamente fueron mezclados con PVA al 10% de tal manera que la proporción de quitosano en las mezclas fue 4,8, 11,8, 23 y 44,4%. Finalmente fueron irradiados a 10 kGy para conseguir el entrecruzamiento.

Determinación del porcentaje de hinchamiento. Se determinó pesando una pequeña muestra del hidrogel seco, tomando este peso como masa a tiempo cero. Luego se sumerge en agua destilada y se va pesando el hidrogel con el agua absorbida en función del tiempo. Se utiliza la siguiente fórmula: $\%H = 100(m_t - m_0)/m_0$, donde %H es el porcentaje de hinchamiento, m_0 es la masa inicial, seca, y m_t es la masa del hidrogel con agua en función del tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesto que ya se conocía que tanto el quitosano (20) como el PVA (21) se degradan por efecto de la radiación gamma, era interesante saber porqué se forman hidrogeles en mezclas de quitosano-PVA. La formación de estos hidrogeles y sus propiedades fueron descritas previamente (19). Decidimos estudiar la degradación de estos polímeros en las condiciones de nuestros experimentos para tener un mejor conocimiento del efecto de la radiación gamma, para luego contrastar estas observaciones con los resultados obtenidos en la formación de los hidrogeles a partir de mezclas de estos polímeros. Además, en la literatura se encuentra información parcialmente contradictoria respecto al efecto de la radiación gamma sobre el alcohol polivinílico.

Degradación del quitosano en solución. Estos experimentos se diseñaron de manera a tener el quitosano disuelto en la solución apropiada para la determinación del peso molecular, por viscosimetría inmediatamente después de la irradiación. El peso molecular del quitosano de partida fue relativamente bajo (356.000 g/mol) mientras que el DD fue de 82%. Después de irradiarlo con rayos gamma se observó que los pesos moleculares disminuían dramáticamente (Figura 1). Luego de aplicar sólo 1 kGy el peso molecular disminuyó en un 80%. Las soluciones de quitosano irradiadas con más de 5 kGy ya no presentaban la suficiente viscosidad como para ser medidas por viscosimetría. El peso molecular más bajo que pudo ser medido fue de 90.000 g/mol, obtenido con 5 kGy de irradiación.

Puesto que la degradación del quitosano se da tanto por efecto de la radiación gamma como por hidrólisis ácida, en un experimento aparte se midió la contribución a la disminución del peso molecular del quitosano debido al medio ácido en función del tiempo (Figura 1b). Efectivamente, el peso molecular disminuye pero lentamente. Esto se explica porque la hidrólisis ácida del enlace glucosídico involucra varias etapas en equilibrio. Luego de un día de contacto

con la solución ácida el peso molecular del quitosano disminuye solamente en un 8%. Teniendo en cuenta que 1 kGy se obtiene luego de una exposición de aproximadamente 6 minutos, deducimos que la radiación gamma es el factor más importante para la degradación del quitosano.

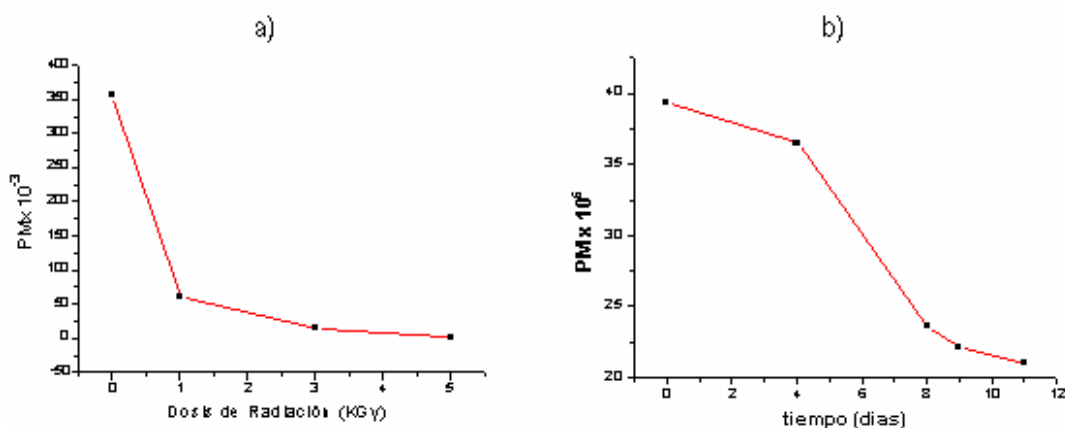


Figura 1. Disminución del peso molecular del quitosano a) por radiación gamma, yb) en medio ácido.

Se sabe que al estado sólido, la radiación gamma produce la abstracción de un átomo de H. Este radical captura un átomo de hidrógeno de los carbonos C(1) ó C(4) ó C(5) de los fragmentos glucosídicos provocando la escisión de las cadenas y disminuyendo el peso molecular del quitosano (22). Este proceso es lento y requiere de dosis relativamente altas, por encima de los 30 kGy, para que los cambios sean observables. En el caso de soluciones, el quitosano se encuentra en su forma protonada, con cargas positivas sobre los grupos amino. En las condiciones del experimento, presencia de H_3O^+ y agua, el proceso inicial durante la irradiación debe ser la radiólisis del agua por ser la especie más abundante, produciendo radicales H^\bullet y OH^\bullet según la ecuación (1). Ambos radicales pueden provocar la degradación del quitosano de manera similar al descrito para el estado sólido. Este proceso es mucho más rápido y requiere de dosis bajas debido a la facilidad con que se produce la radiólisis del agua:



Irradiación del PVA en solución acuosa. Para estos experimentos, se irradió una solución acuosa de PVA al 10% a 0,5, 1, 3, 5, 7 y 15 kGy. A dosis bajas se observó que la viscosidad se incrementaba en función de la dosis de irradiación. A partir de 7 kGy se observó la formación de hidrogeles con grados de gelificación que se incrementan con la dosis de irradiación. Estas observaciones difieren de los reportes encontrados en la literatura, que mencionan la disminución de la viscosidad del PVA en atmósfera inerte y en presencia de oxígeno, sin mencionar la formación parcial de hidrogeles (21). Sin embargo, también se encuentran reportes que indican que el PVA forma hidrogeles al ser irradiados en forma de películas con absorción previa de agua (23). Nosotros estamos demostrando que es posible obtener hidrogeles de PVA con radiación gamma partiendo de soluciones acuosas concentradas (10%) mientras que con soluciones diluidas ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) sólo se obtiene la degradación del PVA (21). Es probable que la relativa alta concentración de PVA favorece la interacción entre las cadenas, gracias a los puentes de hidrógeno, haciendo que estén próximas entre ellas. La proximidad de las cadenas de PVA incrementa la probabilidad de reacción entre el radical que se forma en una cadena con el centro sensible de otra cadena, logrando un entrecruzamiento químico.

En otro experimento, se prepararon soluciones acuosas de PVA al 10%, se le añadió 2 mL de solución de HCl 0,1 N y se irradiaron a 0,5, 1, 3, 5, 7 y 10 kGy. Con esto se quería tener las mismas condiciones de acidez en la que se encuentra el PVA cuando se mezcla con el quitosano. En este caso se formaron hidrogeles a partir de 7 kGy con grados de gelificación más bajos que los obtenidos en medio neutro.

Comparando estos dos experimentos, observamos que el PVA tiene menor tendencia a formar hidrogeles en medio ligeramente ácido. Adicionalmente se observó que los hidrogeles formados en medio acuoso neutro son opacos mientras que los obtenidos en medio ácido son transparentes.

Hidrogeles de quitosano-PVA. En el caso de las mezclas de quitosano y PVA se esperaría, según lo observado en los experimentos precedentes, que los procesos de disminución del peso molecular del quitosano y formación de hidrogel de PVA se dieran en forma paralela. En el caso del quitosano, ya se ha mencionado que para dosis mayores de 5 kGy la degradación es tal que la viscosidad de dicha solución es demasiado baja para ser medida con un viscosímetro Ubbelohde. Además este quitosano es completamente soluble en el medio de preparación y en

agua. En el caso del PVA, en las condiciones ácidas en las que se mezcla con quitosano, la formación de hidrogeles es limitada, es decir su grado de gelificación es relativamente bajo. Pero contrariamente a nuestras expectativas, se obtuvieron hidrogeles con alto grado de gelificación, mayores a 90% (19).

Si analizamos la situación a 10 kGy, el quitosano debería estar completamente degradado y constituido de cadenas pequeñas y ser completamente soluble. De otro lado, el PVA tendría cierta tendencia a formar hidrogeles. Sin embargo, las mezclas de quitosano-PVA en diferentes proporciones (0, 4,8, 11,8 y 23% de contenido de quitosano) gelificaron todas con 10 kGy de irradiación (19). Este experimento fue repetido, con la mezcla de 11,8 % de contenido de quitosano, a diferentes dosis de irradiación obteniéndose hidrogeles desde 5 kGy de irradiación. En la figura 2 se muestra el grado de gelificación en función de la dosis de irradiación. Estos hidrogeles presentan porcentajes de gelificación altos, por encima de 80%, y aumentan con la dosis de irradiación. Esto significa que los radicales formados por la radiólisis del agua durante la radiación gamma promueven el entrecruzamiento de las cadenas.

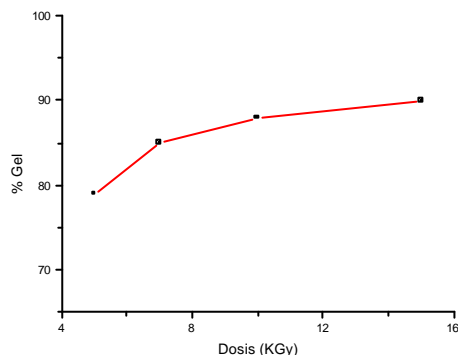


Figura 2. Grado de gelificación de la mezcla quitosano-PVA (contenido de quitosano 11,8%).

Todos los hidrogeles preparados presentan porcentajes de hinchamiento del orden de 600%. Sin embargo, aquellos obtenidos con dosis bajas de irradiación, 5 y 7 kGy, fueron los que absorbieron agua más rápido y en mayor cantidad, pero luego comenzaron a perder masa paulatinamente (Figura 3). Los hidrogeles obtenidos a 10 y 15 kGy alcanzaron lentamente su punto de saturación pero en cambio la pérdida posterior de masa fue menos importante que en los casos anteriores.

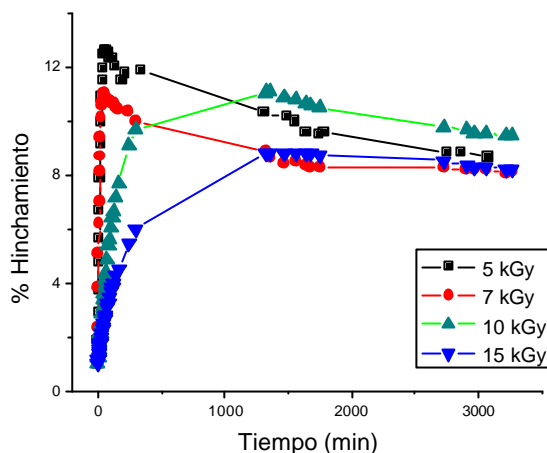


Figura 3. Grado de hinchamiento de los hidrogeles en función de la dosis de irradiación (contenido de quitosano 11,8%)

El espectro IR de los hidrogeles obtenidos están constituidos de una superposición de los espectros del quitosano y PVA (Figura 4), lo cual significa que ambos polímeros no han sufrido importantes transformaciones durante la irradiación gamma. Sin embargo, las evidencias de que ha habido entrecruzamiento son la textura gelatinosa del material obtenido después de la irradiación y las diferentes propiedades del material obtenido respecto a sus precursores. La insolubilidad mostrada por los hidrogeles en medios ácidos y calientes contrasta con la solubilidad del quitosano en medio ligeramente ácido, y la solubilidad del PVA en solución caliente. Los espectros IR de los hidrogeles obtenidos con otras dosis de radiación gamma son muy similares al mostrado en la Figura 4.

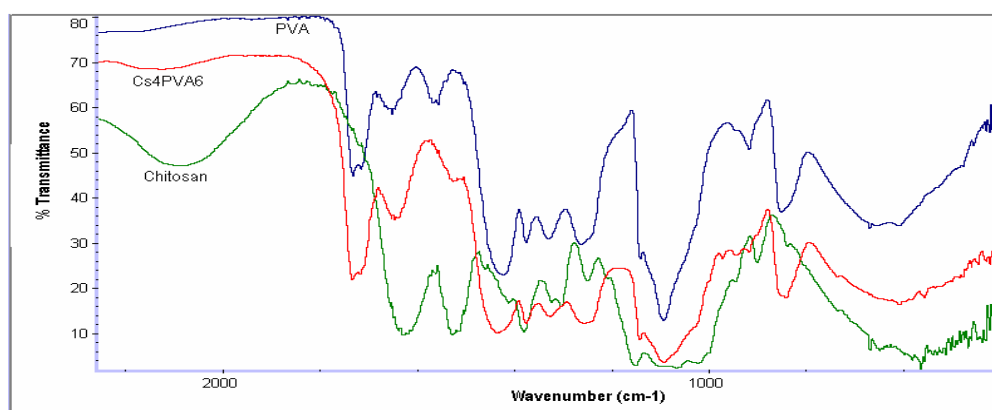


Figura 4. Espectro FT-IR del quitosano, PVA y el hidrogel de quitosano-PVA con un 11,8% de contenido de quitosano (Cs4PVA6).

Los hidrogeles obtenidos con las mezclas de quitosano-PVA presentan propiedades mecánicas diferentes a las presentadas por el hidrogel de PVA puro. Este último es poco flexible y con bajo poder absorbente. En cambio los hidrogeles de las mezclas tienen buena flexibilidad y buen poder absorbente (mayor a 600%). Para explicar estas observaciones necesitamos conocer cómo están interactuando las cadenas de quitosano con las de PVA, y sobretodo si la radiación gamma ha reducido el peso molecular del quitosano y/o del PVA. Existen tres posibilidades de interacción entre las cadenas de quitosano y PVA (véase la figura 5) teniendo en cuenta el efecto de la radiación gamma:

i) Se obtiene una red tridimensional solamente con las cadenas entrecruzadas de PVA y en su interior se encontrarían enredadas las cadenas de quitosano con peso molecular bajo, Figura 5a,

ii) La radiación gamma provoca solamente el entrecruzamiento de las cadenas de PVA sin degradar al quitosano, Figura 5b, y

iii) El hidrogel se forma por uniones covalentes entre las cadenas de quitosano y PVA, Figura 5c.

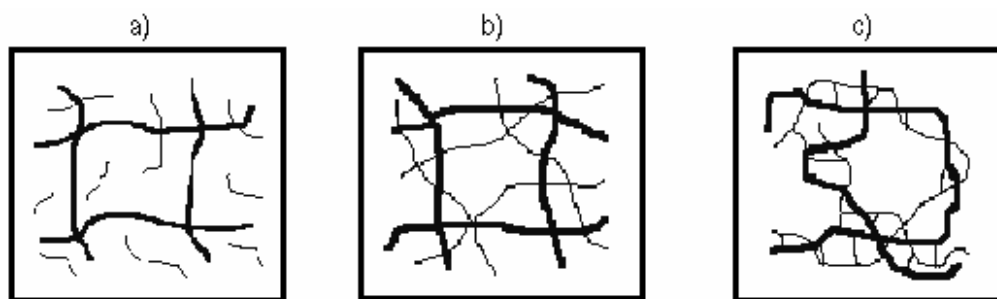


Figura 5. Posibilidades de interacción entre las cadenas del quitosano y PVA (líneas gruesas)

La situación de la figura 5a sería la más plausible teniendo en cuenta el comportamiento observado para el quitosano y el PVA por separado. La pérdida de masa observada luego de llegar al punto de saturación se explicaría con este modelo, ya que el quitosano de bajo PM es soluble en agua, especialmente en medio ácido. Sin embargo, la formación de hidrogeles con mezclas de quitosano-PVA se da desde dosis bajas, 5 kGy, a la cual el PVA sólo no forma hidrogeles. Este hecho nos indica que el mecanismo de reacción de los radicales formados

durante la radiólisis no es igual al que se observa para los sistemas de quitosano y PVA aislados. Por lo tanto la formación de redes tridimensionales solamente a base de cadenas de PVA es puesta en duda, a menos que la presencia de cadenas de quitosano ayude a estabilizar esta red, Figura 5b.

Antes de la irradiación, los grupos funcionales del quitosano interactúan con los del PVA, por medio de puentes de hidrógeno entre los grupos $-NH_2$ y $-OH$ del quitosano con los $-OH$ del PVA, manteniendo cerca ambas cadenas. Cuando se irradia la mezcla en solución, los radicales producen en el PVA la abstracción del H del carbono portador del grupo OH, mientras que en el quitosano se produciría la abstracción del H en los carbonos C(1), C(4) o C(5). Estos radicales podrían unirse entre ellos formando un enlace covalente entre las cadenas. La proximidad de las cadenas haría de que los radicales formados sigan esta vía y no produzcan la degradación del quitosano, obteniéndose la situación ilustrada en la Figura 5c.

Para tener una evidencia adicional de que el quitosano no se degrada por radiación gamma cuando se encuentra mezclado con PVA, degradamos previamente el quitosano por radiación gamma y luego le agregamos una solución de PVA (contenido de quitosano 11,8%) e irradiamos a 10 kGy. En estas condiciones se forman hidrogeles solamente cuando el PM del quitosano es mayor a 200.000 g/mol. El comportamiento de estos hidrogeles durante el hinchamiento es diferente al de los hidrogeles obtenidos sin la degradación previa del quitosano. Estos últimos hidrogeles pierden consistencia sólida cuando llegan a la saturación y luego conforme pasa el tiempo el contenido de agua disminuye. Este comportamiento puede explicarse si consideramos que sólo las cadenas del PVA han entrecruzado y que las cadenas cortas de quitosano, inicialmente enredadas en la red de PVA, van saliendo de esta.

Para obtener más información sobre el estado en el que se encuentra el quitosano luego de la formación de los hidrogeles por radiación gamma, se realizó el hinchamiento de estos hidrogeles en caliente y a pH 2. Si el quitosano se encuentra unido a la red 3D de PVA debería tener tendencia a salir del sistema, sobretodo a pH 2 debido a su solubilidad. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Una muestra de los hidrogeles obtenidos a diferentes dosis de irradiación fue calentada en agua a 50 °C durante 4 horas, secados a temperatura ambiente y pesados. Se representa el porcentaje de pérdida de masa para cada tipo de hidrogel. Se observa que los hidrogeles obtenidos a bajas dosis de irradiación son los que presentan la mayor pérdida de masa. Esto significa que para estas dosis las cadenas de quitosano no están covalentemente

unidas con las cadenas de PVA y de ahí que van saliendo paulatinamente del hidrogel. La salida del quitosano es acelerada por calentamiento. Pero como el quitosano no es soluble en agua, podemos deducir de que el quitosano que sale es aquel cuyo peso molecular ha sido drásticamente disminuido por acción de la radiación gamma. Repitiendo este experimento a todas las muestras, se observó que después de un segundo calentamiento la pérdida de masa era mucho menor, inclusive los hidrogeles obtenidos a 10 y 15 kGy ya no mostraron variación de masa (Figura 6a). Esto significa que por efecto de la irradiación, una fracción de quitosano se ha degradado mientras que otra fracción forma hidrogeles estables en los cuales las cadenas de quitosano y PVA se encuentran enlazados covalentemente. No se puede descartar que parte de la masa perdida se deba a la salida del sistema del PVA.

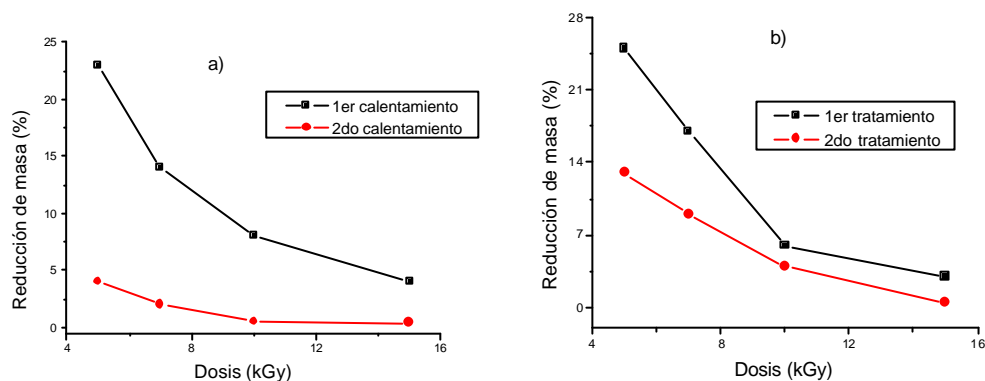


Figura 6. Pérdida de masa de los hidrogeles por contacto con a) agua a 50°C y b) en medio ácido, pH 2.

Un comportamiento similar se observa cuando se dejan los hidrogeles en un medio ácido, pH 2. Nuevamente nos percatamos que la mayor pérdida de masa se produce en los hidrogeles obtenidos con baja dosis de irradiación. Esta pérdida es ligeramente mayor en estas condiciones (Figura 6b), lo cual resulta lógico teniendo en cuenta que el quitosano es soluble en este medio. La pérdida de masa se debería no solo a la salida del quitosano de bajo peso molecular sino también a la del quitosano no degradado y que no está covalentemente unido al PVA.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que el efecto de la radiación gamma produce una degradación rápida del quitosano en comparación con el tratamiento ácido, llegándose a obtener materiales que son

completamente soluble en medio acuoso. Contrariamente a lo reportado en la literatura, se ha obtenido hidrogeles de PVA por radiación gamma en solución acuosa al 10%. Sin embargo, en medio ácido la gelificación es limitada. Estos últimos hidrogeles son transparentes mientras que los obtenidos en medio neutro son opacos.

Los hidrogeles de quitosano-PVA obtenidos por radiación gamma se forman a partir de 5 kGy para un contenido de quitosano de 11,8%. Estos hidrogeles son transparentes y pierden masa cuando llegan a su punto de saturación de absorción de agua. Esta pérdida de masa es mayor en medio ácido, sugiriendo que la pérdida de masa se debe principalmente a la salida de quitosano degradado por efecto de la radiación gamma. Los quitosanos con pesos moleculares por debajo de 200.000 g/mol ya no forman hidrogeles al ser mezclados con PVA e irradiados.

Se ha reunido evidencias que sugieren que las cadenas de quitosano y PVA se encuentran entrecruzadas covalentemente y que la radiación gamma no produce una degradación importante en las cadenas de quitosano y de PVA. Los radicales generados por la radiólisis del agua formarían radicales en la cadena de PVA y estos, debido a la proximidad con las cadenas del quitosano, formarían enlaces covalentes con estos.

Agradecimientos. Al Laboratorio de Radiación Gamma del Instituto Peruano de Energía Nuclear por su gran disponibilidad para irradiar todos nuestros materiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Güven, M. Sen, E. Karadag, D. Saraydin “A review on the radiation synthesis of copolymeric hydrogels for adsorption and separation purposes”, *Radiation Phys. Chem.*, **56**, 381 (1999)
2. Chapiro en “*Encyclopedia of Materials: Science and Technology*”, Amsterdam, 2004, Elsevier Ltd.
3. Chapiro “*Polymer irradiation: past, present and future*”, *Radiation Phys. Chem.*, **63**, 207 (2002)
4. F. Yoshii en “*Radiation processing of polysaccharides*”, IAEA-TECDOC 1422, IAEA Viena 2004
5. M. Széliga, C. Bregni “*Hidrogeles Obtenidos por Radiación Gamma como Sistemas de Liberación Sostenida de Flutamida*”, *Rev. Iberoamer. Polím.*, 2, 1 (2001)

6. Y. Nho, K. Park “Preparation and properties of PVA/PVP hydrogels containing chitosan by radiation”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **85**, 1787 (2002)
7. D. Meinhold, R. Schweiss, S. Zschoche, A. Janke, A. Baier, F. Simon, H. Dorschner, C.
8. Werner “Hydrogel characteristic of electron-beam-immobilized poly(vinylpyrrolidone) films on poly(ethylene terephthalate) supports”, *Langmuir*, **20**, 396 (2004).
9. L. Bourke, M. Al-Khalili, T. Briggs, B. Michniak, J. Kohn, and L. Poole-Warren “A Photo-Crosslinked Poly(vinyl Alcohol) Hydrogel Growth Factor Release Vehicle for Wound Healing Applications”, *AAPS Pharm. Sci.*, **5**, 1 (2003).
10. D. García, J. Escobar, N. Bocourt, N. Bada, D. Zaldívar, I. Katime “Influencia del agente entrecruzante y la composición en hidrogeles de poli(ácido itacónico-ácido metacrílico)”, *Rev. Iberoamer. Polím.*, **41**, 93 (2003).
11. Rojas, R. Aguilera, J. Prin, H. Cequea, J. Cumana, E. Rosales, M. Ramírez, *Rev. Iberoamer. Polím.*, **5**, 17 (2004).
12. I. Katime, O. Katime, D. Katime “Los materiales inteligentes de este Milenio: Los hidrogeles macromoleculares”. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao 2004; V. Sáez, E. Hernández, L. Sanz., *Rev. Iberoamer. Polím.*, **4**, 21 (2003)
13. Refojo, *Rev. Plásticos Modernos*, **27**, 369 (1987).
14. Kikuchi, T. Okano en “Biorelated Polymers and Gels”, Boston, 1998, Academic Press.
15. Q. Li, E. Dunn, E. Grandmaison, M. Goosen en “Applications of Chitin and Chitosan”, Lancaster, 1997, Technomic Publishing.
16. Peniche, M. Aguilar, I. Aranaz, A. Mayorga, I. Paños, C. Tapia en “Quitina y Quitosano: Obtención Caracterización y Aplicaciones”, Lima, 2004, Fondo Editorial de la PUCP.
17. Finch “Poly(vinyl alcohol): Properties and Applications”, New York, 1973, Wiley.
18. Hassan, N. Peppas “Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freeze/thawing methods” en *Advances in Polymer Science*, Vol. **153**, 37 (2000)
19. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz, M. Epple “A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoid sintering”, *Biomaterials*, **25**, 3335 (2004).
20. W. Carhuapoma, J. Santiago “Preparación de hidrogeles de quitosano-PVA por radiación gamma”, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **71**, 185 (2005).

21. L. Hai, T. Bang, N. Nagasawa, F. Yoshii, T. Kume “Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers”, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*, **208**, 466 (2003).
22. S-J. Zhang, H-Q. Yu, X-W. Ge, R-F. Zhu “Optimisation of radiolytic degradation of poly(vinyl alcohol)”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, 1995 (2005).
23. R. Yoksan, M. Akashi, M. Miyata, S. Chirachanchai “Optimal γ -ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure”, *Radiation Res.*, **161**, 471 (2004).
24. M. Katz ,T. Wydeven “Selective Permeability of PVA Membranes. I. Radiation-Crosslinked Membranes”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 2935 (1981).