

Síntesis y toxicidad de hidrogeles de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo-co-acrilamida) obtenidos mediante irradiación con cuantos gamma

Manuel Rapado¹, Marioly Vernhes¹, Carlos Peniche²

¹Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear, (Ceaden), Cuba

²Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana, (Biomat), Cuba

rapado@ceaden.edu.cu

Resumen

En el presente trabajo se reporta la obtención de hidrogeles de copolímeros de polimetacrilato de 2-hidroxietilo-co-acrilamida mediante la copolimerización y reticulación simultánea a partir de sus correspondientes monómeros y mediante irradiación con cuantos gamma. La composición del copolímero se determinó mediante análisis elemental y espectroscopia infrarroja. Adicionalmente se muestran los resultados de toxicidad de sus matrices, para ello se evaluó la acrilamida libre y se realizó el ensayo SOS en bacterias. Se comprobó que los extractos de lavados de las matrices de estos copolímeros contenían muy bajos niveles de acrilamida libre y no mostraron efecto tóxico en las células de E. coli para ninguno de los tiempos evaluados.

Palabras clave: toxicidad, escherichia, hidrogeles, radiación gamma, acrilamida.

Synthesis and toxicity of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) hydrogels obtained by gamma photon irradiation.

Abstract

In this paper is reported the obtaining of hydrogels from poly hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide, by simultaneous crosslinking copolymerization from corresponding monomers by gamma photon irradiation. The composition of network chains in the copolymer was estimated from elemental analysis and infrared spectroscopy. Additionally, the toxicity of these materials was tested finding the free acrylamide and biological assay SOS in bacteria. The extracts of washed matrices of copolymers showed low level of free acrylamide. Moreover, they were non toxic on the E. coli cells tested at any time.

Key words: toxicity, escherichia coli, hydrogels, gamma radiation, acrylamide

Introducción

Los polímeros son, actualmente, el grupo de estudio más amplio en la gama de los biomateriales. Dentro de ellos juegan un papel importante las matrices poliméricas hidrofílicas denominadas hidrogeles. Estas tienen una extraordinaria capacidad para absorber grandes cantidades de agua, hidratándose hasta alcanzar el equilibrio [1].

Uno de los métodos empleados para obtener nuevos polímeros a partir de sus correspondientes monómeros es la polimerización radioinducida. Entre sus bondades se destacan la posibilidad de polimerizar algunos monómeros que no lo logran por los métodos convencionales, como los compuestos fluorogenados,

además, facilita la polimerización en fase sólida [2]. Particularmente, la radiación gamma permite la iniciación homogénea en todo el volumen del monómero. Por esta vía se obtienen polímeros de un alto grado de pureza, sin residuos de iniciadores, catalizadores ni otros compuestos [3-4].

Los hidrogeles pueden ser usados con fines médicos siempre que sean biocompatibles y no tóxicos. Por tanto, ante nuevos materiales sintéticos de este tipo, se hace imprescindible la evaluación de la toxicidad de estos candidatos antes de su posible aplicación en el sector de la salud. Se ha reportado que generalmente los efectos tóxicos de los hidrogeles se deben a restos de monómeros, oligómeros e iniciadores de la reacción [5]. Los copolímeros de polimetacrilato de 2-hidroxietilo-co-

acrilamida (poli(HEMA-co-AAm)) han sido preparados y estudiados por diferentes autores [6, 7], sin embargo, un estudio de toxicidad de los mismos no ha sido reportado. En tal sentido, la estimación de acrilamida libre brinda información relacionada según lo establecido en la farmacopea [8]. Por otra parte, el ensayo SOS en bacterias también ha sido empleado para la detección de efectos tóxicos de diversos agentes, tanto químicos como físicos [9-11]. Con este ensayo es posible cuantificar el daño en el ADN o genotoxicidad que puede ejercer algún compuesto mediante la fusión transcripcional de un gen involucrado en la respuesta SOS, en bacterias con un gen reportero que puede codificar para una proteína o una enzima que en presencia del sustrato apropiado desarrolla color o fluorescencia. También se puede evaluar la citotoxicidad mediante de la disminución de los niveles proteicos de enzimas como la fosfatasa alcalina [12-14].

Considerando lo anterior, el presente trabajo aborda la síntesis y evaluación de la toxicidad de matrices de copolímeros (poliHEMA-co-AAm) con la determinación de la acrilamida residual y mediante el ensayo biológico SOS en células de *Escherichia coli*, cepa PQ37.

Materiales y métodos

Reactivos

El metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) 99 % de pureza (Fluka, Suiza) se purificó mediante filtración por columnas rellenas con resinas HQ/MEHQ de la firma Polysciences (Eppenheim, Alemania) para eliminar el inhibidor e inmediatamente antes del uso, se destiló al vacío (10 Pa) a 50 °C. Solo se empleó la fracción intermedia. La acrilamida (AAm, Fluka, Suiza) se utilizó sin previa purificación. En todas las experiencias se utilizó agua bidestilada.

Síntesis de los hidrogeles

Los hidrogeles de poli(HEMA-co-AAm) se prepararon por copolimerización y reticulación simultáneas, inducidas por irradiación con cuantos gamma sin el uso de agentes de entrecruzamiento químico.

Se realizó un estudio preliminar donde se evaluó la consistencia mecánica de los hidrogeles en su estado completamente hinchado. Las consideraciones para la selección de las composiciones de alimentación utilizadas en el presente trabajo fueron la solubilidad de la AAm en HEMA y la consistencia mecánica de los hidrogeles obtenidos en su estado hinchado en el equilibrio. Primero se realizó un experimento preliminar de copolimerización en masa donde se variaron las composiciones de los comonomeros HEMA y AAm, manteniendo la concentración total entre 2 y 5 mol/L. Se ensayaron cinco composiciones de HEMA/AAm, las cuales se denotan por las matrices M1- M5 y representan los xerogeles (geles sin agua) de los experimentos en masa y con disolvente de los copolímeros obtenidos de las mezclas de reacción de HEMA y AAm indicadas en la Tabla 1. Los experimentos se realizaron por tri-

plicado y se reportan los resultados de la media y su desviación estándar.

Las síntesis se llevaron a cabo en una instalación de irradiación autoblindada con fuentes radioisotópicas de Co-60, modelo ISO GAMMA LL-CO de fabricación húngara, a una dosis absorbida de 10 kGy con una homogeneidad del campo de 1,3. El proceso de irradiación se controló mediante dosimetría Fricke con una incertidumbre del 1,0 % y fílmica con el empleo de dosímetros Perpex [15].

Tabla 1. Composición de las mezclas de reacción empleadas en las síntesis por irradiación con cuantos gamma a 10 kGy, de HEMA y AAm saturados con N₂O a 25 °C

Matriz	Composiciones de las mezclas reaccionantes (% en peso)				
	Experimento en masa		Experimento con disolvente		
	HEMA	AAm	HEMA	AAm	H ₂ O
M1	40	5	40	5	55
M2	40	12	40	12	48
M3	23	18	23	18	59
M4	10	10	10	10	80
M5	5	24	5	24	71

Determinación de la composición del hidrogel

La determinación de la composición química de los hidrogeles fue calculada a partir de un análisis elemental de C, H, y N, mediante la determinación de la relación C(%)/N(%) efectuada en un analizador elemental CHNS-OCHA 1108 (Carlo Erba Instruments, Reino Unido).

Caracterización espectral mediante FTIR

Los espectros infrarrojos se obtuvieron usando un espectrofotómetro (AVATAR, Nicolet Instrument Corp., Madison, Reino Unido), las mediciones se realizaron en el intervalo de 4 000 hasta 500 cm⁻¹ con una resolución de 2 cm⁻¹ y se promediaron sobre los 100 barridos. Se utilizaron 5 mg de cada muestra en pastillas de KBr, preparadas mediante compresión al vacío a 20 MPa.

Evaluación de la toxicidad de las disoluciones de lavados de hidrogeles

Determinación de acrilamida libre

Se determinó la absorbancia de las disoluciones del primer lavado de matrices de hidrogeles poli(HEMA-co-AAm) obtenidos por irradiación a 10 kGy en presencia de disolvente y en masa de las matrices (M1-M5). La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 199 nm en un espectrofotómetro UV/VIS T60 U (PG Instruments, EEUU).

Para determinar la concentración de la AAm libre se construyó una curva de calibración a partir de disoluciones de acrilamida en un intervalo de concentración de 1·10⁻⁴ a 1·10⁻² mg·L⁻¹.

Evaluación de la toxicidad en células bacterianas

Se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad solo de los extractos de lavado de hidrogeles obtenidos según

la composición descrita para M5, por ser la matriz de más alto contenido de pAAm y obtenidos a diferentes dosis absorbidas: 3, 5, 10, 15, 25 y 40 kGy respectivamente.

Se empleó el ensayo SOS en células de *Escherichia coli*, versión fluorescente [16]. Se utilizó la cepa PQ-37 de genotipo: (F7 *thr, leu, his-4, pyrD, thi, galE, galK (o galT), lacAU169, srl-300::TnlO, rpoB, rpsL, rfa, uvrA, sulA::Mud(Ap, lac) cts, trp::Muc* + y PhoC. Esta cepa que expresa constitutivamente la enzima fosfatasa alcalina es resistente a la ampicilina y presenta una fusión transcripcional entre el promotor de un gen SOS, el gen *sfhA* y la región codificadora de la enzima β -galactosidasa [9].

El medio de cultivo utilizado fue Luria-Bertani, suplementado con 50 μ g/mL de ampicilina. Los cultivos fueron crecidos durante toda la noche a 100 rpm y 37 °C; posteriormente se diluyeron en medio fresco (1/25) y se incubaron a igual temperatura y agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Posteriormente se realizó una dilución 1/10 en medio LBA (2X) y distribuidos en viales estériles que contenían disoluciones de lavados de las matrices de lavados (M5) (v:v). Los viales se incubaron durante 30, 60 y 120 minutos a 8 °C. Posteriormente, las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C para su recuperación. Seguidamente se realizaron los ensayos enzimáticos [16].

Como criterio de citotoxicidad se utilizó la inhibición de la síntesis de proteínas en las células tratadas. Para ello se cuantificó la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina [13, 16].

Para la evaluación de la genotoxicidad se tomó como criterio la inducción de la respuesta SOS, medida a través del Factor de Inducción SOS (FISOS) y calculada según lo indicado por Quillardet y Hofnung [13, 16].

En cada experimento se incluyó un control negativo no tratado y un control positivo, células *E. coli*, irradiadas con rayos gamma a 150 Gy.

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de actividad fosfatasa alcalina obtenidos mediante el ensayo SOS. Se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos por medio de una prueba de Kolmogorov-Smirnov y de F máxima, respectivamente. Los valores medios fueron comparados respecto al control negativo utilizando una prueba de Dunnett con una significación del 95 %. Para este análisis se empleó el software Statistic 6.0.

Resultados y discusión

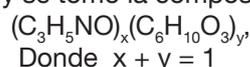
Obtención de hidrogeles por irradiación con cuantos gamma

La reacción de copolimerización del HEMA y la AAm se puede representar en forma simplificada, según el esquema que se muestra en la Figura 1.

Los hidrogeles obtenidos mostraron buena consistencia mecánica, eran estables, fáciles de manipular y todos resultaron ser transparentes. Las matrices M4 y M5 fueron más blandas y de mayor elasticidad. En la Figura 2 se evidencia la transparencia de los hidrogeles hinchados y su apariencia vítrea en su forma de xerogel (primero a la izquierda).

Determinación de la composición del copolímero

La composición de las cadenas de la red polimérica en los hidrogeles se estimó a partir del análisis elemental y se tomó la composición del copolímero como:



Así, se tiene que la composición de carbono del copolímero será:

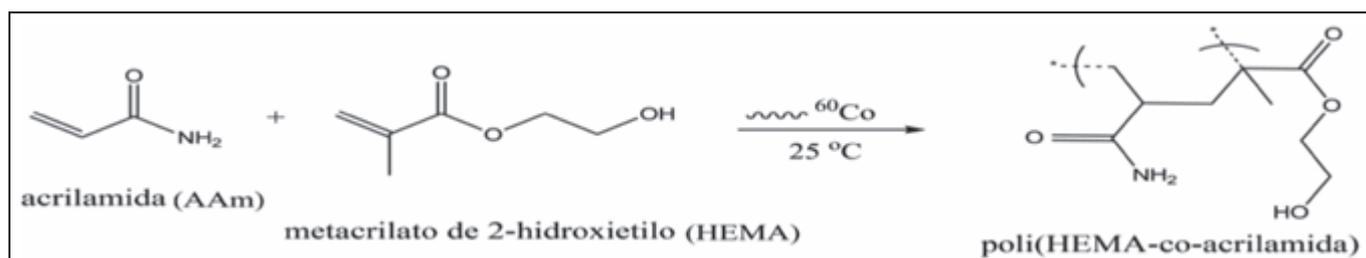


Figura 1. Representación esquemática simplificada de la obtención del poli(HEMA-co-AAm).

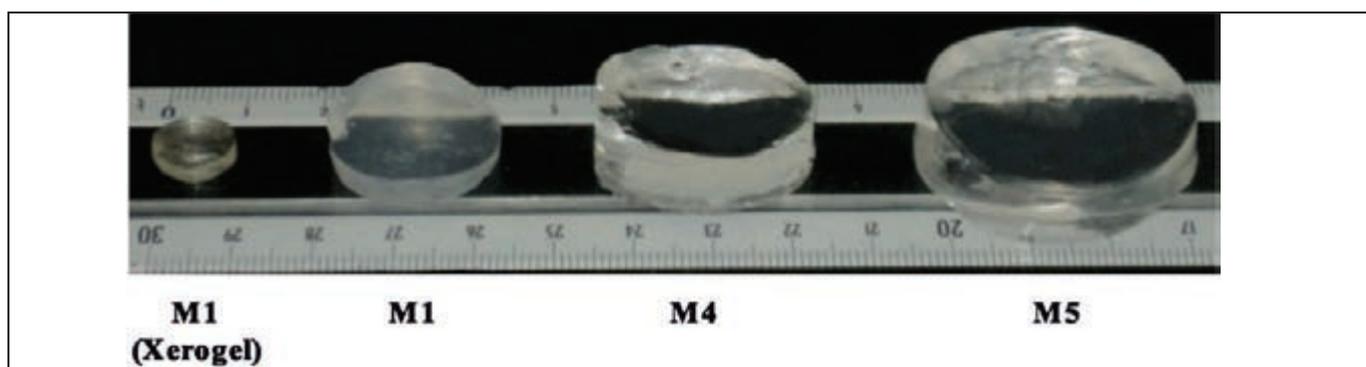


Figura 2. Imágenes de los hidrogeles de poli(HEMA-co-AAm), obtenidos a 10 kGy. Aparecen de izquierda a derecha el xerogel de M1 y los hidrogeles de las matrices M1, M4 y M5, hinchados en agua a 25 °C hasta el equilibrio.

$x\text{C}_3 + y\text{C}_6$, que en términos de peso será $12(3x+6y) = 12(3x + 6(1-x)) = 72 - 36x$

La composición en nitrógeno será $x\text{N} = 14x = 14x$

Por tanto, la relación C/N será: $36 - 18x/7x$

De donde la fracción molar x de AAm en el copolímero se calculó utilizando la relación:

$$\frac{C(\%)}{N(\%)} = \frac{(36 - 18x)}{7x}$$

Donde, C(%) y N(%) son los correspondientes contenidos de nitrógeno y carbono en el copolímero. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Las reactividades relativas de los monómeros reportadas para la copolimerización del HEMA (1) con la AAm (2) son $r_1 = 1,84$ y $r_2 = 0,41$ [6], pero debido a que los grados de conversión logrados en este trabajo estuvieron cercanos al 100 %, las composiciones de los copolímeros prácticamente fueron las mismas que las de las mezclas de alimentación. No existen diferencias significativas en las densidades de los xerogeles con respecto a su composición (Tabla 2).

Caracterización espectral mediante FTIR

En la Figura 3 se muestran los espectros infrarrojos de los hidrogeles pertenecientes a los homopolímeros de HEMA, AAm y sus correspondientes copolímeros M1 y M3, obtenidos a partir de las disoluciones de sus respectivos monómeros (Tabla 2), a una dosis suministrada constante de 10 kGy. Los espectros IR de los copolímeros M1 y M3 exhiben todas las bandas características de los homopolímeros correspondientes. Las bandas de absorción observadas a 1 277 y 1 460 cm^{-1} , características de los grupos metílicos y amida del poliHEMA y la poliAAm, respectivamente, también están presentes en los espectros de M1 y M3 [17].

La poliAAm presenta una banda de absorción característica a los 1 657 cm^{-1} correspondiente al (estiramiento C=O, amida I). La banda de estiramiento N-H, (amida II) absorbe en el intervalo de 3 500 a 3 100 cm^{-1} y la banda de absorción a 1 460 cm^{-1} se asoció con la vibración de estiramiento de grupos aminoacilos [18]. Por otro lado, el poliHEMA exhibe una banda de absorción fuerte a 1 730 cm^{-1} , que es característica de la vibración de estiramiento del grupo C=O. La banda de absorción

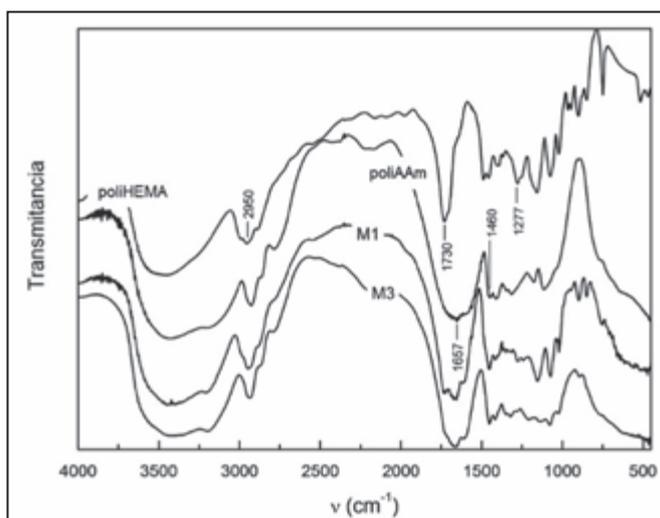


Figura 3. Espectros infrarrojos de los homopolímeros poliHEMA, poliAAm y de los copolímeros M1 y M3 obtenidos a una dosis absorbida de 10 kGy.

a 2 950 cm^{-1} con un “hombro” débil se atribuye a la vibración de estiramiento C-H de los grupos metileno.

Los copolímeros de poli(HEMA-co-AAm) con otras composiciones exhibieron espectros cualitativamente similares y no se muestran.

Toxicidad de los extractos de lavados de matrices de copolímeros

Determinación de acrilamida libre

La farmacopea de los EEUU ha legislado que el límite de exposición de la acrilamida para uso en humanos es de 0,003 mg/kg de peso [8]. Los resultados obtenidos muestran que cuando los experimentos fueron realizados con disolvente, los valores de acrilamida libre son menores que el señalado con anterioridad. Sin embargo, los experimentos realizados en masa muestran valores de concentraciones por encima de lo permitido en la norma, por tanto, los compuestos obtenidos de este modo no se consideraron en la continuidad del trabajo (Tabla 3).

Es interesante señalar que en las disoluciones de los lavados de los hidrogeles obtenidos, los niveles de acrilamida son muy inferiores al compararlos con los reportados para numerosos productos de consumo ha-

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción, f, del copolímero, F, y fracción gel (%) para la copolimerización en H_2O por irradiación con cuantos gamma de HEMA y AAm, a 10 kGy en N_2O

Matriz	Composiciones de las mezclas reaccionantes (wt-%)			HEMA fracción molar		Fracción Gel (%)	Densidad del Xerogel (g/cm^3)
	HEMA	AAm	H_2O	f	F*		
pHEMA	40	0	60	--	--	97±0,4	1,31±0,02
M1	40	5	55	0,83	0,81	99±0,2	1,36±0,02
M2	40	12	48	0,63	0,65	97±0,3	1,38±0,04
M3	23	18	59	0,41	0,41	99±0,6	1,34±0,05
M4	10	10	80	0,36	0,37	97±0,8	1,27±0,01
M5	5	24	71	0,10	0,11	98±0,5	1,32±0,02
pAAm	0	24	76	--	--	95±0,3	1,30±0,05

*La composición fue determinada mediante microanálisis elemental.

Tabla 3. Cuantificación de la acrilamida libre en el primer lavado de hidrogeles de pAAM y poli(HEMA-co-AAM) saturados con N₂O, obtenidos a una dosis absorbida de 10 kGy

	Copolimerización en masa		Copolimerización con disolvente	
	Fracción molar de AAM	AAM libre	Fracción molar de AAM	AAM libre
M1	0,17	0,0046	0,17	0,0002
M2	0,37	0,0052	0,37	0,0002
M3	0,59	0,0067	0,59	0,0004
M4	0,64	0,0070	0,64	0,0006
M5	0,90	0,0096	0,90	0,0009
pAAM	1,0	0,011	0,046	0,0012

bitual, según estudios realizados por la Food and Drug Administration (FDA) [19].

Toxicidad de las disoluciones de los extractos de lavados de las matrices M5 en células de *E. coli*

En la Tabla 4 se presentan los valores medios de la actividad de la fosfatasa alcalina de células de *E. coli*, expuestas a extractos del primer lavado de las matrices de copolímeros M5, irradiadas a distintas dosis absorbidas durante diferentes tiempos.

Tabla 4. Toxicidad de soluciones del primer lavado de hidrogeles de la matriz M5, utilizando el ensayo SOS en células de *E. coli* (PQ-37). Valores medios de la actividad fosfatasa alcalina y sus desviaciones estándar.

Tratamientos	Tiempo (min)		
	30	60	120
C (-)	33,65 ± 4,45	29,15 ± 5,02	21,39 ± 2,66
M5 (3 kGy)	32,99 ± 4,05	29,69 ± 3,48	20,61 ± 4,57
M5 (5 kGy)	31,11 ± 1,47	29,84 ± 2,22	21,76 ± 3,81
M5 (10 kGy)	31,61 ± 2,06	28,31 ± 3,06	22,08 ± 1,44
M5 (25 kGy)	32,82 ± 2,08	28,68 ± 5,82	21,00 ± 3,59
M5 (40 kGy)	32,04 ± 3,36	27,41 ± 4,71	20,27 ± 3,77
C+ (150 Gy)a	19,11 ± 5,33 *	16,57 ± 5,22*	12,09 ± 4,85*

a: control positivo células irradiadas con cuantos gamma (150 Gy)

* estadísticamente significativo en prueba de Dunnett ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos con relación a la citotoxicidad mostraron que los niveles de fosfatasa alcalina en las células de *E. coli* no disminuyeron en presencia de los extractos evaluados para los tiempos de exposición estudiados. Los lavados de hidrogeles no fueron tóxicos en estas células bacterianas.

El estudio de genotoxicidad de los extractos mostró que estos no indujeron daño primario en el ADN en las células de *E. coli*. Para ninguno de los tratamientos evaluados se duplicó el factor de inducción (FISOS) en relación al control no tratado (Figura 4). Los valores de FISOS fueron menores de 1,5 lo que permitió calificar a los extractos evaluados como compuestos no genotóxicos según lo sugerido por Kevekordes y colaboradores [20].

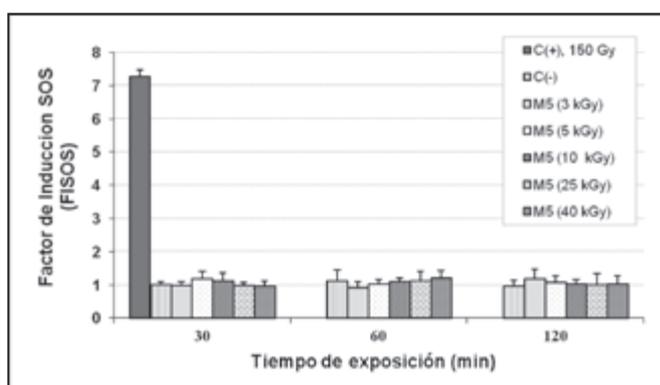


Figura 4. Genotoxicidad de soluciones del primer lavado de hidrogeles de la matriz M5, utilizando el ensayo SOS en células de *E. coli* (PQ-37). Son presentados los valores medios FISOS y sus desviaciones estándar.

Conclusiones

La irradiación con cuantos gamma de las disoluciones acuosas de acrilamida y metacrilato de 2-hidroxietilo, bajo las condiciones experimentales aplicadas, permite obtener copolímeros de poli(HEMA-co-AAM) con rendimientos de síntesis mayores del 97 % en un amplio intervalo de composiciones.

Los hidrogeles de copolímeros de poli(HEMA-co-AAM) evaluados no mostraron efecto tóxico. Los niveles de acrilamida residual están en el intervalo permisible para su uso en humanos, según lo reportado por la norma USP XXX [8]. Adicionalmente, bajo las condiciones experimentales ninguno de los extractos estudiados mostraron un efecto citotóxico ni genotóxico en las células de *Escherichia coli*.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al profesor Januz M. Rośniak del Instituto de Química de las Radiaciones Aplicadas de la Universidad Técnica de Lotdz, Polonia; por su valiosa ayuda durante las discusiones y revisión de parte de éste trabajo.

Referencias bibliográficas

- [1] OTTENBRITTE RM, PARK K, OKANO P. Biomedical applications of hydrogels handbook. Springer, 2010. ISBN: 978-1-4419-5919-5.
- [2] YASSINE O, et. al. Highly efficient thermoresponsive nanocomposite for controlled release applications. *Sci. Rep.* 2016; 6(2): 28539.
- [3] RAPADO M, PENICHE C. Synthesis and characterization of pH and temperature responsible poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-acrylamide) hydrogels. *Polímeros: Ciencia e Tecnología.* 2015; 25(6): 547-555.
- [4] CANTON I, WARREN NJ, CHAHAL A, et. al. Mucin-Inspired Thermoresponsive synthetic hydrogels induce stasis in human pluripotent stem cells and human embryos. *ACS Central Science.* 2016; 2(2): 65-74.
- [5] YOSHII E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37(4): 517-524.
- [6] DUŠEK K & JANÁČEK J. Hydrophilic gels based on copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with methacrylamide and acrylamide. *J Appl Polim Sci.* 1975; 19(11): 3061-3075.
- [7] SINGH B, CHAUHAN N, KUMAR S, BALA R. Psyllium and copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylamide- based no-

- vel devices for the use in colon specific antibiotic drug delivery. *Int J Pharm.* 2008; 352(1-2): 74-80.
- [8] Unites States Pharmacopeial Convention. USP XXX. United States Pharmacopeia Convention. 30 ed. Rockville: Mack Printing, 2007. p. 2883-2885.
- [9] QUILLARDET P, DE BELLECOMBE C, HOFNUNG M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat Res.* 1985; 147(3): 79-95.
- [10] KOSUBEK S, OGIEVETSKAYA MM, KRASAVIN EA, et. al. Investigation of the SOS response of *Escherichia coli* after irradiation by means of the SOS Chromotest. *Mutat. Res.* 1990; 230(1): 1-7.
- [11] MONTANO M. Actividad fotoprotectora de la fracción aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (DC) Staff, sobre el DNA de *Escherichia coli* frente a la radiación UVC [tesis de diploma]. Universidad de La Habana: Facultad de Biología, 2011.
- [12] QUILLARDET P, HUISMAN O, D'AIR R, HOFNUNG M. The SOS chromotest: direct assay of the expression of gen *SfiA* as a measure of genotoxicity of chemicals. *Biochimie.* 1982; 64(8-9): 797-801.
- [13] QUILLARDET P, HOFNUNG M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research.* 1985; 147(3): 65-78.
- [14] JANION C. Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci.* 2008; 4(6): 338-344.
- [15] International Organization for Standardization (ISO). Practice for using the Fricke Reference Standard Dosimetry System. ISO/ASTM 51205. ISO, 2002.
- [16] CUÉTARA E, ÁLVAREZ A, VERNHE M, SÁNCHEZ-LAMAR A. A microanalytical variant of the SOS Chromotest for genotoxicological evaluation of natural and synthetic products. *Biotechnología Aplicada.* 2012; 29(2): 108-112.
- [17] SOTO D, OLIVA H. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Rev. LatinAm. Met. Mat.* 2012; 32(2): 154-175.
- [18] MURUGAN R, MOHAN S, BIGOTTO A. FTIR and Polarised Raman Spectra of Acrylamide and Polyacrylamide. *Journal of the Korean Physical Society.* 1998; 32(4): 505-512.
- [19] U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry: analytical procedures and methods validation. FDA & Center for Drugs Evaluation and Research (CDER), 2000.
- [20] KEVEKORDES S, MERSCH-SUNDERMANN V, BURGHHAUS CH, et. al. SOS induction of selected naturally occurring substances in *Escherichia coli* SOS chromotest. *Mutation Research.* 1999; 445(1): 81-91.

Recibido: 30 de junio de 2016

Aceptado: 27 de agosto de 2016