



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**SISTEMA QUITOSANA/POLI(N-VINILCAPROLACTAMA):
INFLUENCIA DE LA ARQUITECTURA MOLECULAR EN
LAS PROPIEDADES DEL COPOLÍMERO**

Por:

Jesús Daniel Fernández Quiroz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Guaymas, Sonora


Agosto de 2015

APROBACIÓN

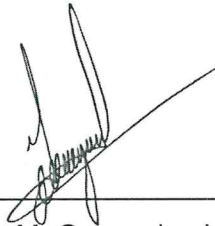
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de **Jesús Daniel Fernández Quiroz**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Waldo Manuel Argüelles Monal
Director de Tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Asesor



Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia
Asesor



Dr. Julio San Román del Barrio
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el sustento económico brindado durante el periodo de mis estudios doctorales. Así también, deseo agradecer el apoyo de beca mixta para completar mis estudios doctorales con la realización de dos estancias de investigación en el ICTP-CSIC en Madrid, España.

Al CIAD, por permitirme la oportunidad de formar parte de esta Institución. En especial quiero agradecer los apoyos otorgados a través de la Coordinación de Programas Académicos, complementando los recursos para llevar a cabo las estancias de investigación. Al ICTP, por abrir las puertas de sus laboratorios para llevar a cabo parte de este proyecto.

Deseo agradecer muy especialmente al primer motivador de este trabajo, mi asesor, *Dr. Waldo Argüelles*. Gracias por la paciencia, “jalones de oreja”, y su orientación en momentos decisivos de esta etapa. Sus palabras y consejos oportunos, han sido imprescindibles para alcanzar este paso en mi vida profesional. Gracias ante todo, por su valiosa amistad.

Al *Dr. Julio*, por brindarme la oportunidad de formar parte del Grupo de Biomateriales del ICTP, durante mis estancias en este Instituto. Gracias por alentarme en todo momento con sus palabras; sus consejos y asesoría, siempre acertados, han sido elementales para culminar este proyecto de investigación.

Gracias a mis asesores en CIAD, *Dr. Jaime Lizardi*, por todas las facilidades para utilizar las instalaciones en el grupo de biopolímeros de Hermosillo. Sus consejos y orientación han sido fundamentales, sobre todo en la parte final de este proyecto. Al *Dr. Francisco Goycoolea*, por su disposición y asesoría oportuna con el fin de orientar este proyecto de la mejor forma posible.

A mis asesores y motivadores cotidianos en Madrid, *Dr. Álvaro González*, por la enorme paciencia que ha tenido en este tiempo para ayudarme a sacar adelante este trabajo. Por sus “jalones de oreja”, que tan a menudo me daba, siempre con el afán de motivar el análisis propio. A la *Dra. Blanca Vázquez*, porque siempre se ha dado

tiempo para orientarme en el desarrollo de mis proyectos. Agradezco el respaldo incondicional y los comentarios oportunos que siempre ha brindado a mi trabajo. Gracias a ambos por su amistad.

Agradezco al personal del CIAD-Guaymas, por las facilidades para el uso de las instalaciones. En especial a la *Dra. Maricarmen Recillas* y la *Mtra. Luisa Silva* por la asesoría y apoyo técnico en todo momento para la realización de mi proyecto de tesis.

Agradezco al personal del CIAD-Hermosillo, *Mtra. Karla Robinson* y *Mtra. Alma Campa* por el apoyo técnico brindado y por la confianza para el uso de los laboratorios de biopolímeros. Al *Dr. Miguel Martínez*, *Emmanuel Aispuro* y *Panchito* por las facilidades para el uso del equipo UV-vis.

Al personal del ICTP del CSIC-Madrid, en especial a la *Dra. Isabel Quijada* por todas las facilidades para el uso del espectrofotómetro UV-vis. A mis compañeros del grupo de biomateriales. En primer lugar a Raquel, por compartirme su amistad, generosidad y el entusiasmo con el cual vive la ciencia. Gracias por tu gran apoyo en todo momento durante mis estancias en Madrid. A Sergio, por su amistad, y por mostrarme vías menos sinuosas para el desarrollo de mis experimentos. A ambos, por sus constantes consejos en la parte experimental de mis estancias. A Ceci por su amistad y el apoyo brindado cada vez que me veía “con el tiempo encima”. A Paco por su valiosa asesoría, en la parte de Química Orgánica, para el desarrollo de mi proyecto.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos por su confianza y motivarme día a día a salir adelante. A Leda Salmerón, por ser mi compañera y cómplice en cada etapa de mi vida.

A mis grandes compañeros y amigos del CIADE-Guaymas y los BIOPOLITOS-Hermosillo por compartir gratos momentos y hacer más amena la estadía en esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor, por su presencia.

A Leda, por su amor, complicidad y comprensión.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
I. Sinopsis.....	1
1.1. Hipótesis.....	4
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo General.....	4
1.2.2. Objetivos Específicos.....	4
II. Marco Teórico.....	6
2.1. Polímeros Sensibles ante Estímulos.....	6
2.1.1. Polímeros Termosensibles.....	7
2.1.2. Hidrogeles.....	10
2.1.3. Nanopartículas.....	12
2.2. Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama).....	16
2.2.1. Polimerización Radicálica.....	17
2.2.2. Comportamiento Termosensible de la PVCL en Agua.....	18
2.2.3. Influencia de la Longitud de Cadena en la LCST.....	20
2.2.4. Caracterización Físico-Química.....	21
2.2.5. Citotoxicidad.....	23
2.2.6. Aplicaciones.....	23
2.3. Quitosana.....	24
2.3.1. Propiedades Químico-Físicas.....	25
2.3.2. Modificación Química.....	27
2.3.3. Copolimerización por Injerto.....	28
2.3.4. Caracterización de Quitosana Modificada.....	30
III. Materiales y Métodos.....	31
3.1. Reactivos.....	31
3.2. Reacciones.....	31
3.2.1. Síntesis de Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama).....	31
3.2.1. Síntesis de Quitosana- <i>graft</i> -poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama).....	32

CONTENIDO (continuación)

	Página
3.2.3. Obtención de Nanopartículas de Copolímero.....	33
3.2.4. Obtención de Criogeles de Copolímero.....	33
3.2.5. Obtención de Criogeles de glicol quitosana-PVCL.....	34
3.3. Técnicas de caracterización de los materiales obtenidos.....	35
3.3.1. Espectroscopía RMN de ¹ H.....	35
3.3.2. Espectroscopía FTIR.....	35
3.3.3 Espectroscopía RAMAN.....	35
3.3.4. Análisis Termogravimétrico.....	35
3.3.5. Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC).....	36
3.3.6. Espectroscopia de Masas.....	36
3.3.7. Turbidimetría (UV-vis).....	36
3.3.8. Micro-calorimetría de barrido diferencial (micro-DSC).....	37
3.3.9. Dispersión de luz dinámica(DLS).....	37
3.3.10. Morfología.....	38
IV. Resultados y Discusiones.....	39
4.1 Effect of the Molecular Architecture on the Thermosensitive Properties of Chitosan- <i>g</i> -poly(<i>N</i> -vinylcaprolactam).....	39
4.2 Conformational Study on Thermal Transition of Chitosan- <i>g</i> -poly(<i>N</i> -vinylcaprolactam) in Aqueous Solutions.....	66
4.3 Preparación y Caracterización de Nanopartículas de Quitosana- <i>g</i> -poli(<i>N</i> -vinil Caprolactama).....	82
4.4 Síntesis y caracterización de criogeles termosensibles a partir de derivados de quitosana.....	85
Conclusiones.....	90
Referencias bibliográficas.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de los diagramas de fase para soluciones poliméricas (curvas binodales o de coexistencia) exhibiendo (a) comportamiento LCST, (b) comportamiento UCST y (c) coexistencia de circuito cerrado.....	8
2	Representación esquemática del efecto de un estímulo externo en un hidrogel y su respuesta de hinchamiento/contracción.....	11
3	Esquema del mecanismo de criogelificación para sistemas poliméricos en presencia de un disolvente de punto de congelación asequible (agua, dioxano, dimetilsulfóxido, etc): 1, macromoléculas en solución; 2, solvente; 3, solutos de bajo peso molecular; 4, policristales de solvente congelado; 5, micro-fase líquida sin congelar; 6, estructura polimérica de un criogel; 7, macroporos; 8, solvente.....	12
4	Morfología de sistemas nanoestructurados.....	14
5	Estructura química de la poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama).....	16
6	Proceso de polimerización radicalica en cadena: iniciación, propagación y terminación (acoplamiento y/o desproporción).....	17
7	Representación esquemática de la quitosana.....	24
8	Synthesis of Cs- <i>g</i> -PVCL copolymer by two steps: a) polymerization of <i>N</i> -vinylcaprolactam with carboxyl end group; and b) graft copolymerization onto chitosan with PVCL-COOH. R= -H (85%), -COCH ₃ (15%).....	44
9	Steps in the general approach of the synthesis of the Cs- <i>g</i> -PVCL copolymer. a) Synthesis of PVCL-COOH of different chain length; and b) Graft of the PVCL-COOH onto the chitosan chains.....	50
10	FTIR spectra in the region 1800-700 cm ⁻¹ of PVCL-26, chitosan and Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A.....	52
11	Raman spectra in the region 1000-600 cm ⁻¹ of PVCL-26, Chitosan and Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A.....	53
12	¹ H NMR spectra of chitosan (dissolved in DCI at 70 °C), PVCL-26 and Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A (dissolved in D ₂ O at 30 °C).....	54
13	Thermogravimetric (a) and differential termogravimetric (b) curves of PVCL-26, chitosan and a Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A copolymer	55

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14	Variation of the absorbance of aqueous solutions of PVCL-COOH for different: (a) concentration (PVCL-26 at 0.2, 0.5 and 1 wt%); (b) number-average molecular weight (PVCL-COOH samples with \bar{M}_n 4, 13, 18, 26 and 47 kDa at 1 wt%). Heating rate: 1 °C min ⁻¹ , λ = 450 nm. The insets in panels (a) and (b) show the dependence of LCST values on polymer concentration and \bar{M}_n of homopolymer, respectively.....	57
15	Variation of the absorbance of aqueous solutions of CS- <i>g</i> -PVCL copolymers for different: (a) concentration (Cs- <i>g</i> -PVCL-18 at 0.5, 1.0 and 1.5 wt%); (b) number-average molecular weight of PVCL grafted chains (Cs- <i>g</i> -PVCL samples with \bar{M}_n 4, 13, 18, 26 and 47 kDa at 1.5 wt%). Heating rate: 1 °C min ⁻¹ , λ = 450 nm. The insets in panels (a) and (b) show the dependence of LCST values on polymer concentration and \bar{M}_n of PVCL grafted chains, respectively.....	59
16	Variation of the absorbance of 1.5wt% aqueous solutions of Cs- <i>g</i> -PV-26.A, Cs- <i>g</i> -PV-26.B and Cs- <i>g</i> -PV-26.C and Cs- <i>g</i> -PV-26.D copolymers (heating rate: 1 °C min ⁻¹ , λ = 450 nm). The inset shows the dependence of LCST values on PVCL/Cs mass ratio.....	61
17	Heating DSC scans of 10 wt% aqueous solutions of Cs- <i>g</i> -PV-26.A, Cs- <i>g</i> -PV-26.B, Cs- <i>g</i> -PV-26.C and Cs- <i>g</i> -PV-26.D samples (heating rate: 0.6 °C min ⁻¹ , reference: water).....	62
18	¹ H NMR (500 MHz) spectra of (a) Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A, (b) Cs- <i>g</i> -PVCL-18, (c) Cs- <i>g</i> -PVCL-13 and (d) Cs- <i>g</i> -PVCL-04 (D ₂ O at 25 °C).....	64
19	¹ H NMR (500 MHz) spectra of (a) Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A, (b) Cs- <i>g</i> -PVCL-26.B, (c) Cs- <i>g</i> -PVCL-26.C and (d) Cs- <i>g</i> -PVCL-26.D (D ₂ O at 25 °C).....	65
20	Thermogravimetric (a) and differential termogravimetric (b) curves of Cs- <i>g</i> -PVCL-26.A, Cs- <i>g</i> -PVCL-26.B, Cs- <i>g</i> -PVCL-26.C and Cs- <i>g</i> -PVCL-26.D, identified by colors as shown in the figure.....	65
21	Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D _H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of PVCL-COOH for different number-average molecular weight: \bar{M}_n 4, 13, and 26 kDa at 2 mg mL ⁻¹ (pH 6). Heating rate: 0.6 °C min ⁻¹	72

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
22	Dependence of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential of Cs- <i>g</i> -PVCL on temperature of aqueous solutions of Cs- <i>g</i> -PVCL for different number-average molecular weight of PVCL grafted chains. Cs- <i>g</i> -PVCL samples with \bar{M}_n 04, 13 and 26 kDa at 2 mg mL ⁻¹ (pH 6). Heating rate: 0.6 °C min ⁻¹	74
23	Evolution of the hydrodynamic diameter distribution during heating for PVCL-13 and Cs- <i>g</i> -PVCL-13. Concentration: 2 mg mL ⁻¹ in water (pH 6).....	76
24	Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of PVCL-26 at 2 mg mL ⁻¹ at different pH as shown in the figure. Heating rate: 0.6 °C min ⁻¹	77
25	Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of Cs- <i>g</i> -PVCL-26 at 2 mg mL ⁻¹ at different pH as shown in the figure. Heating rate: 0.6 °C min ⁻¹	79
26	Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of PVCL-26 at 2 mg mL ⁻¹ at different ionic strength as shown in the figure. Heating rate: 0.6 °C min ⁻¹	80
27	Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of Cs- <i>g</i> -PVCL-26 at 2 mg mL ⁻¹ at different ionic strength as shown in the figure. Heating rate: 0.6 °C min ⁻¹	81
28	Curvas de transición de fase para el sistema Cs- <i>g</i> -PVCL-26.C: a) variación de la absorbancia del copolímero y las nanopartículas (0.1 wt% en agua, velocidad de calentamiento: 1°C min ⁻¹ , $\lambda=450$ nm) con la temperatura; y b) dependencia del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas con la temperatura.....	83
29	Micrografías de nanopartículas obtenidas a partir de Cs- <i>g</i> -PVCL-26.C (20% p/p de TPP) por SEM.....	84
30	Esquema representativo de la formación de criogeles a partir de glicol-quitosana y <i>N</i> -vinil caprolactama; entrecruzamiento con genipina y MBA.....	85
31	Imágenes de criogeles de glicol-quitosana/PVCL entrecruzados químicamente con genipina/MBA: (a) estado hidratado sin segmentar; (b) estado deshidratado en forma de tableta; (c) y (d) micrografías obtenidas por ESEM; y del criogel Cs- <i>g</i> -PVCL-26.C (e) y (f) micrografías obtenidas por ESEM.....	86

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
32	Valores del equilibrio de hinchamiento, W , para el criogel: (a) glicol-quitosana/PVCL; y (b) Cs- <i>g</i> -PVCL-26.C, en agua (pH 6) en función de la temperatura. Las muestras permanecieron a 10 °C por 12 h para alcanzar equilibrio. La curva corresponde a los resultados del modelo de la ecuación (4).....	88
33	Variación de hinchamiento en agua pura (pH 6) para el criogel Glicol-quitosana/PVCL/genipina a cambios periódicos escalonados entre 5 y 45 °C.....	89

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Conditions of reaction and parameters of controlled polymerization of <i>N</i> -vinylcaprolactam with COOH-end group in solution and characteristics of the polymers.....	43
2	Conditions of reaction and graft parameters of the series of Cs- <i>g</i> -PVCL copolymers	45
3	Characteristics of the PVCL-COOH homopolymers.....	71
4	Características de la formación de nanopartículas del copolímero Cs- <i>g</i> -PVCL a partir gelificación ionotrópica.....	82

RESUMEN

El estudio de los polímeros inteligentes responsivos ante cambios de temperatura en medio acuoso se ha incrementado notoriamente en las últimas décadas debido a las potenciales aplicaciones que presentan en el campo biomédico. En este trabajo, se sintetizaron una serie de copolímeros termosensibles de quitosana-*g*-poli(*N*-vinil caprolactama), así como sus criogeles y nanopartículas. Se investigó el efecto de la arquitectura molecular sobre las propiedades del copolímero en disolución al variar la longitud de la cadena injertada de poli(*N*-vinil caprolactama) (PVCL) (valores de \bar{X}_n entre 30 y 190), así como la influencia del espaciamiento entre las cadenas de PVCL injertadas a lo largo de la cadena principal de la quitosana. La característica más interesante de este derivado de la quitosana es su solubilidad en agua a valores de pH neutro o ligeramente básico, y temperaturas por debajo de la temperatura de solución crítica inferior. En general, los copolímeros obtenidos exhiben una temperatura de punto de nube cercana a la mostrada por los homopolímeros respectivos, la cual mostró un decremento con el espaciamiento y la longitud de las cadenas de PVCL injertadas. Paralelamente, se estudió la influencia del pH y la fuerza iónica en las propiedades de estos copolímeros en disolución acuosa, por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial- ζ . El diámetro hidrodinámico (D_H) y el potencial- ζ de los ovillos macromoleculares del copolímero dependen fuertemente de la fuerza iónica y el pH del medio. La temperatura de transición ovillo-glóbulo decrece a medida que se incrementa la fuerza iónica y el pH de la disolución. Las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL obtenidas por gelificación ionotrópica con tripolifosfato, mostraron una morfología esférica con $D_H < 250$ nm y $PDI < 2.7$ (DLS y SEM), logrando rendimientos de incorporación hasta 20% de dexametasona. Por otro lado, los criogeles entrecruzados químicamente con glutaraldehído, presentan una estructura macroporosa (tamaños de poro ~50-100 μ m, SEM), y muestran una transición térmica a ~34°C. Los copolímeros obtenidos tienen propiedades ventajosas para la preparación de materiales avanzados y su aplicación en formulaciones bioactivas termosensibles, sistemas inteligentes de liberación de fármacos, así como andamiajes porosos para la ingeniería de tejidos.

Palabras clave: Quitosana, poli(*N*-vinil caprolactama), polimerización radicalica controlada, copolímeros de injerto termosensibles, efecto de fuerza iónica, sensibilidad a pH, nanopartículas, criogeles.

ABSTRACT

The study of thermoresponsive smart polymers has significantly increased in recent decades due to their potential applications in biotechnology. In this investigation, a series of chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam) thermosensitive copolymers has been synthesized, as well as their cryogels and nanoparticles. The effect of molecular architecture on the thermoresponsive properties of the graft copolymers solutions was studied by varying the chain length of the grafted poly(*N*-vinylcaprolactam), PVCL, (\bar{X}_n between 30 and 190) and the spacing between grafted chains onto the chitosan backbone. The most interesting characteristic of this copolymer is its solubility in water at neutral and slightly alkaline solutions and temperatures below its lower critical solution temperature. These solutions presented a cloud point temperature between 36 and 44 °C, which decreases with the spacing and length of grafted PVCL chains onto the chitosan backbone, in contrast with the limited decrease of the LCST of PVCL above a critical value around 18 kDa. At the same time, the influence of the ionic strength and the pH of the solution on the conformational properties of the copolymer were monitored by means of dynamic light scattering and ζ -potential measurements. The hydrodynamic diameter and ζ -potential of the macromolecular coils of the copolymer at room temperature were strongly influenced by the ionic strength and pH of the solution. The coil-to-globule transition temperature significantly decreases with the increasing of the ionic strength in the aqueous dissolutions. Cs-*g*-PVCL nanoparticles obtained by ionotropic gelation with tripolyphosphate, showed hydrodynamic diameters lower than 250 nm and PDI < 2.7. They were loaded with dexamethasone, showing a loading efficiency up to 20 %. Cryogels of the Cs-*g*-PVCL copolymers were prepared by chemical crosslinking with glutaraldehyde, which presented a macroporous structure (pore size 50-100 μ m) and a thermal transition around 34°C. It could be concluded that this copolymer displays advantageous properties for producing advanced materials with potential applications as sensitive bioactive formulations, “smart” drug delivery systems and porous scaffolds for tissue engineering.

Keywords: Poly(*N*-vinylcaprolactam), chitosan, thermosensitive polymers, controlled radical polymerization, graft copolymers, nanoparticles, cryogels.

I. SINOPSIS

Los polímeros sensibles ante estímulos, también denominados “inteligentes”, han sido investigados intensamente debido a su capacidad de producir cambios fisicoquímicos abruptos ante ciertos factores medio ambientales, como el pH, campos eléctricos, actividad iónica específica y temperatura, entre otros. Estos materiales suelen exhibir respuestas en su forma, color o solubilidad, entre otras, conduciendo a potenciales aplicaciones en diversos ámbitos, como la biomedicina, biotecnología tratamiento de aguas, cosméticos y recubrimientos.

Esta capacidad de respuesta suele ocurrir en los sistemas vivos, ya sea como cicatrización de heridas, apertura y cierre de poros, etc. Una buena parte de estos procesos adaptativos y respuestas naturales ante ciertos parámetros medio ambientales por parte en los organismos vivos, son conducidos por cambios conformacionales y/o agregación de proteínas, y bien podrían considerarse como sistemas “inteligentes”.

Las proteínas, los polisacáridos y ácidos nucleicos son polímeros naturales que cumplen funciones esenciales en los organismos y por tanto son denominados biopolímeros. En efecto, casi toda sustancia animal o vegetal posee estructuras macromoleculares sintetizadas de forma biológica, las cuales están presentes en alimentos, tejidos, maderas, etc. Por ejemplo, la quitina tiene la función de actuar como soporte estructural y producir un mecanismo de defensa en los organismos que lo contienen. Este polisacárido representa el segundo biopolímero con mayor abundancia en la naturaleza (después de la celulosa) y se encuentra en gran proporción en el exoesqueleto de ciertos invertebrados y en algunos hongos

Si la quitina se somete a un proceso de desacetilación extensiva, se obtiene quitosana (Cs). Este biopolímero exhibe respuesta reversible ante estímulos de pH, y ha sido ampliamente estudiado debido a que es biodegradable, biocompatible y no-

tóxico. Con el fin de mejorar sus propiedades y desarrollar nuevos materiales avanzados, se ha centrado la atención en su modificación química. La Cs posee dos grupos reactivos susceptibles para este propósito: los grupos hidroxilo primarios (C6) y secundarios (C3) y el grupo amino (C2) en los segmentos desacetilados. La asociación con otras especies químicas constituye posibilidades de adquirir nuevas propiedades y por ende, incrementar su potencial de aplicación.

En años recientes, se ha intentado diseñar polímeros sintéticos que imiten la actividad biológica de los biopolímeros con la finalidad de tener mayor control sobre sus características moleculares y tener la capacidad de reproducirlos de manera industrial. En especial, se ha mostrado interés en emular el comportamiento responsivo ante estímulos que presentan algunos sistemas vivos.

Particularmente, los sistemas que tienen la capacidad de responder ante cambios de temperatura, produciendo una separación de fase en solución acuosa, se han investigado más ampliamente. La variación en la temperatura puede aplicarse externamente a estos sistemas sin presentar efectos colaterales, lo cual ha representado interés en el campo biomédico, como liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos y bioseparación, entre otros.

En este sentido, uno de los polímeros sintéticos más representativos de este género, es la poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL). La peculiaridad de este material no iónico consiste en que la transición de fase en soluciones acuosas ocurre a temperaturas cercanas a las condiciones fisiológicas (~37°C). A diferencia de otros polímeros con comportamiento similar, la longitud de cadena y la concentración de la solución, tienen gran influencia en las propiedades termosensibles de la PVCL. Es decir, controlando el tamaño de sus cadenas macromoleculares es posible variar la temperatura de transición y producir materiales para aplicaciones específicas.

Entre los métodos para modificar químicamente a los polímeros naturales, se encuentra la copolimerización por injerto, una técnica sencilla no degradativa, que permite enlazar covalentemente los grupos terminales del material a injertar, con los grupos funcionales colgantes de la cadena principal de un polímero. En este sentido, la quitosana posee una estructura propicia para efectuar cambios químicos de esta

naturaleza, que conlleve a la formación de derivados funcionales con características particulares.

El sistema quitosana/poli(*N*-vinilcaprolactama) ha atraído la atención de la comunidad científica especializada en el desarrollo de materiales, debido principalmente a la biocompatibilidad que presentan estos polímeros, no-toxicidad y respuesta ante condiciones fisiológicas de pH y temperatura. Estas características constituyen una excelente oportunidad para aplicarse como sistemas acarreadores de liberación de fármacos.

Es conocido que una de las principales problemáticas que presenta la administración tradicional de fármacos, es la distribución no-específica de los compuestos activos biológicos, coartando su eficacia. Ante esto, el uso de la nanotecnología surge como posibilidad de mejorar estas condiciones, puesto que el tamaño de los nanosistemas permite que sean dirigidos hacia zonas celulares e incluso niveles subcelulares.

Otra potencial aplicación importante de estos materiales en el campo biomédico es como andamios porosos que tengan la capacidad de almacenar moléculas o células biológicas con la finalidad de regenerar tejidos. En este sentido, es relativamente sencillo preparar sistemas macroporosos (redes poliméricas hidrofílicas) capaces de retener grandes cantidades de agua sin solubilizarse debido a la presencia de enredos entre cadenas, regiones cristalinas o entrecruzamientos mediante la técnica de criogelación que consiste fundamentalmente en la eliminación del agua que contiene un criogel hinchado mediante técnicas de evaporación como la liofilización. La capacidad de respuesta ante pequeños cambios de temperatura (hinchamiento/contracción) permitiría una liberación controlada de estos componentes, situándolos como atractivos candidatos para cumplir con esta función específica.

Como se ha mencionado, la temperatura a la cual ocurre la transición de fase en las soluciones de PVCL está fuertemente influenciada por el tamaño de sus cadenas; sin embargo, el efecto que puede generar este parámetro molecular en las propiedades termosensibles del copolímero aún no ha sido estudiado. Este trabajo explora el efecto de la arquitectura molecular de los copolímeros termorreversibles a

base de quitosana injertada con poli(*N*-vinilcaprolactama) en sus propiedades termosensibles.

1.1 Hipótesis

La variación de la arquitectura molecular del copolímero quitosana-graft-poli(*N*-vinilcaprolactama) permitirá tener un material con propiedades termosensibles ajustables

Los copolímeros obtenidos tendrán propiedades ventajosas para la preparación de biomateriales avanzados y su aplicación en formulaciones bioactivas termosensibles, sistemas inteligentes de liberación de fármacos, así como andamiajes porosos para la ingeniería de tejidos.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Obtener copolímeros de quitosana-*g*-poli(*N*-vinil caprolactama) con control de la arquitectura molecular, e investigar su comportamiento en disolución acuosa variando la longitud de las cadenas de PVCL injertadas, su espaciamentos a lo largo de la cadena de quitosana, la fuerza iónica y el pH del medio. Sobre la base anterior, evaluar posibles aplicaciones.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar oligómeros funcionalizados de PVCL-COOH con diferente longitud de cadena.
- Sintetizar copolímeros de quitosana-*g*-poli(*N*-vinil caprolactama), con diferente arquitectura molecular (tamaño de cadena injertada y su espaciamento).

- Evaluar el comportamiento de los copolímeros en disolución acuosa, variando la fuerza iónica y pH del medio.
- Obtener nanopartículas y criogeles a partir de los copolímeros, evaluando su comportamiento termosensible en medio acuoso.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Polímeros Sensibles ante Estímulos

Los sistemas vivos tienen la capacidad de responder de manera natural ante estímulos ambientales externos, adaptando su estructura y funcionalidad mediante ciertos mecanismos. Estas propiedades se basan primordialmente en interacciones altamente cooperativas, capaces de impulsar respuestas no-lineales ante cambios en las condiciones medio ambientales.^{1,2} De ahí, nace el interés científico para desarrollar nuevos materiales sintéticos, con propiedades ajustables que puedan imitar este tipo de respuesta ante factores específicos.^{3,4}

Los polímeros sensibles ante estímulos, también denominados polímeros inteligentes, son materiales que tienen la capacidad de producir cambios físicos o químicos, relativamente grandes y abruptos de manera reversible, en respuesta ante pequeñas variaciones en las condiciones medio ambientales como la fuerza iónica, pH, temperatura, luz, entre otros.^{1,2}

Estos materiales son capaces de reconocer un estímulo como una señal, identificar la magnitud de la misma y directamente, exhibir distintos tipos de respuesta en sus conformaciones macromoleculares, en dependencia del estado físico en que se encuentren.² Regularmente, este tipo de respuestas no-lineales suelen manifestarse como disolución/precipitación, degradación, liberación de fármacos, cambio en el estado de hidratación, hinchamiento/contracción, superficie hidrofílica/hidrofóbica, cambio de forma, cambios conformacionales y formación de micelas.⁵

Estos materiales pueden por tanto, ser utilizados en diferentes estados físicos como hidrogeles (sistemas entrecruzados), ya sean permanentes o reversibles, micelas, interfaces modificadas o en solución. Esta versatilidad ha despertado el interés de la

comunidad científica, para ser utilizados en potenciales aplicaciones biomédicas, tales como ingeniería de tejidos (medicina regenerativa), liberación de fármacos, cultivos celulares, entre otros.⁶

2.1.1. Polímeros Termosensibles

La temperatura es, sin duda, el estímulo más ampliamente estudiado en sistemas poliméricos. La relativa facilidad para controlar los cambios en este parámetro, así como la aplicabilidad en sistemas *in vitro* e *in vivo*, hace que estos materiales sean prometedores para aplicaciones en el campo biomédico y recuperación de agua, entre otras.^{2,7} Existen tres clases de polímeros sensibles ante la temperatura:

- a) **Materiales con memoria de forma.** Son materiales termoplásticos que poseen varias temperaturas de transición vítrea (T_g). Estos se pueden deformar cuando se calientan por encima de la T_g superior, resultando en una forma permanente. Cuando estos materiales son subsecuentemente deformados entre dos temperaturas de transición, se puede inducir una forma temporal, la cual puede ser congelada por enfriamiento al estado deformado, debajo de la temperatura de cambio. El material se transformará de nuevo en la forma permanente cuando se caliente por encima de la temperatura de cambio.

- b) **Materiales líquidos cristalinos.** Poseen una fase líquida cristalina, además del estado vítreo y la fase gomosa isotrópica. Esta fase tiene cierto orden anisotrópico de los mesógenos presentes en el polímero. Se ha reportado que los polímeros con bloques líquidos cristalinos nemáticos en la cadena principal tienen un estado elongado cuando se calientan hasta una fase isotrópica, la cual es una transición de fase del polímero completamente reversible que se ha utilizado como el principal mecanismo de cambio para desarrollar músculos artificiales. Al calentarse, se ha logrado obtener por encima de 40% de contracción en estos materiales. Las redes poliméricas con mesógenos de cadena lateral se han desarrollado teniendo una fase líquida cristalina nemática quiral, como es usada también en las pantallas de visualización de cristal líquido (LCD).⁷

c) Disoluciones poliméricas termosensibles. Estos materiales producen una transición de fase líquido-líquido en respuesta a una variación en la temperatura. Es decir, si una disolución homogénea es sometida a cambios pequeños de temperatura, ocurre una separación de fases: una fase concentrada y una fase diluida. Este tipo de transición suele estar acompañada de un cambio en la apariencia óptica del sistema, pasando de ser una disolución clara a un sistema turbio. El punto incipiente de turbidez en el sistema es denominado temperatura de punto de nube (T_{CP}). Esta turbidez es evidencia de la formación de partículas de la fase concentrada, derivado de la diferencia en el índice refractivo entre las dos fases. Cuando la transición ocurre a una temperatura elevada, se ha denominado temperatura de solución crítica inferior (LCST); cuando la transición ocurre de manera inversa, se hace referencia a la temperatura de solución crítica superior (UCST) (Figura 1).⁷

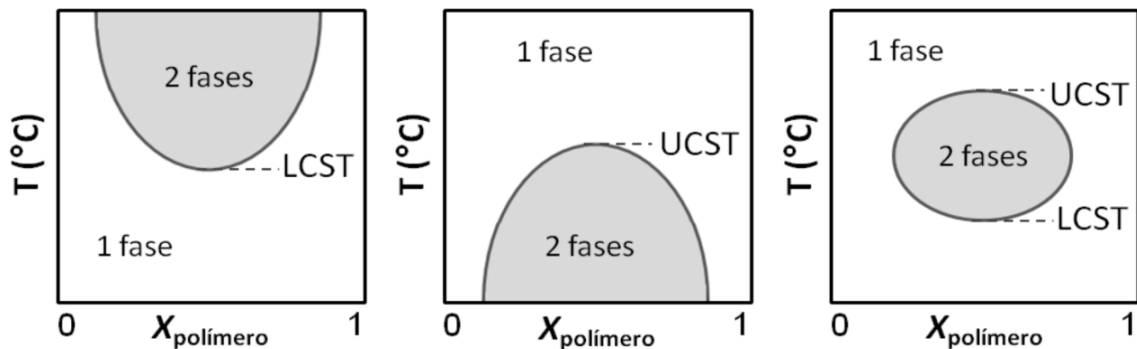


Figura 1. Representación esquemática de los diagramas de fase para soluciones poliméricas (curvas binodales o de coexistencia) exhibiendo **(a)** comportamiento LCST, **(b)** comportamiento UCST y **(c)** coexistencia de circuito cerrado.

Esta última clase de polímeros termosensibles, capaces de producir una transición de fase en soluciones acuosas, ha recibido particular atención debido a ser potencialmente muy interesantes en el ámbito biomédico.

La solubilidad de un material en agua es posible si éste contiene grupos polares, o bien grupos que tengan la capacidad de disociarse (ionizarse), o de formar puentes de hidrógeno (segmentos hidrofílicos). Por ejemplo, los iones tales como Na^+ o Cl^- , orientan las moléculas de agua por fuerzas ion-dipolo; por su parte, sustancias no iónicas, como acetona, tienden a formar enlaces por puentes de hidrógeno con las moléculas de agua.⁸

En el caso de los polímeros que muestran solubilidad en agua, además de la presencia los segmentos hidrofílicos en su estructura molecular, poseen moléculas hidrocarbonadas no-polares (segmentos hidrofóbicos). Estas moléculas, ante la incapacidad de formar enlaces hidrógeno con las moléculas de agua, interactúan con éstas debido a fuerzas de Van der Waals, generando que el agua circundante se organice y forme regiones que presentan *hidratación hidrofóbica*. Lo anterior conduce a que las capas de hidratación que se encuentran alrededor de los segmentos no-polares de la molécula adopten un orden más estructurado y con mayores enlaces hidrógeno entre sí, que cuando se encuentran en ausencia de soluto.^{9,10}

Por tanto, la afinidad de un polímero para mezclarse con agua dependerá de las interacciones específicas que ocurran entre los grupos funcionales del material y las moléculas de agua. Por ejemplo, un polielectrolito debe su solubilidad en este disolvente, a la presencia de grupos iónicos a lo largo de su cadena. La solubilidad de la molécula completa de un polímero anfifílico neutro, en medios acuosos, será favorable si el número de segmentos hidrofílicos es lo suficientemente alta para proveer un balance entre las fuerzas atractivas como repulsivas en el sistema.^{10,11}

Al incrementar la temperatura en el sistema, la magnitud relativa del efecto hidrofóbico incrementa proporcionalmente, favoreciendo la interacción polímero-polímero. Lo anterior, puede conducir a la contracción de la cadena, y eventualmente a una separación de fases si el balance entre los grupos hidrófobos e hidrófilos a lo largo de la cadena polimérica es apropiado. Este parámetro justamente determinará la LCST, y por tanto la transición cambiará hacia temperaturas más altas o más bajas a medida que se incremente la fracción de grupos hidrofílicos o hidrofóbicos, respectivamente.¹²

Este comportamiento es típico de un gran número de polímeros solubles no-iónicos en agua, como la poli(*N*-isopropil acrilamida) (PNIPA), poli(*N*-vinil caprolactama) (PVCL), poli(vinil metil éter) (PVME) y el polióxido de etileno o polietilén licol (PEO). Por ejemplo, en el caso de la PNIPA, es posible detectar y modular el cambio conformacional de una cadena polimérica a partir de un ovillo hidratado a un glóbulo colapsado mientras la calidad del solvente se reduce por el incremento en la temperatura de la solución acuosa.

Los polímeros sensibles ante estímulos se pueden combinar con una gran variedad de moléculas bioactivas para obtener materiales con aplicaciones específicas. Estas moléculas incluyen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas y carbohidratos.¹²

2.1.2. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales capaces de embeber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. La presencia de entrecruzamientos físicos o químicos, permite que estos materiales puedan hincharse de manera significativa sin alcanzar a disolverse.

Existen algunos parámetros estructurales que ayudan a elucidar las propiedades y aplicaciones que puede tener un hidrogel. La *fracción volumen del polímero en estado hinchado* permite deducir la cantidad de fluido que es capaz de embeber el material; el *peso molecular promedio entre dos puntos de entrecruzamiento vecinos* posibilita la determinación del grado de entrecruzamiento del polímero. Por otro lado, la distancia entre dos puntos de entrecruzamiento adyacentes, provee una medición promedio del espacio que se encuentra disponible para permitir la difusión de ciertas moléculas. La determinación de estos parámetros está vinculada a aspectos meramente teóricos, como son la teoría de la elasticidad de la goma y la teoría del equilibrio de hinchamiento.¹³

El grado de entrecruzamiento puede afectar notoriamente la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles. Al incrementar la magnitud de este parámetro de entrecruzamiento, se favorece una estructura más robusta, y por ende el hidrogel tenderá a hincharse menos que un material con menor nivel de entrecruzamiento.¹³

Por su parte, los hidrogeles sensibles ante estímulos de temperatura, manifiestan una transición en su estado de hinchamiento. A temperaturas suficientemente bajas, el hidrogel permanece hinchado, favorecido por la formación de enlaces hidrógeno entre los segmentos hidrofílicos en la cadena polimérica y las moléculas de agua. Sin embargo, conforme se incrementa la temperatura por encima de la LCST, dominan las

asociaciones entre los segmentos hidrofóbicos de las cadenas poliméricas, produciendo un encogimiento del material (Figura 2). Naturalmente, el incremento de componentes hidrofóbicos en el hidrogel, conduce a una reducción en la temperatura de transición.¹⁴ En términos termodinámicos, la transición de fase en un hidrogel tiene que ver con la energía libre de asociación.¹⁵

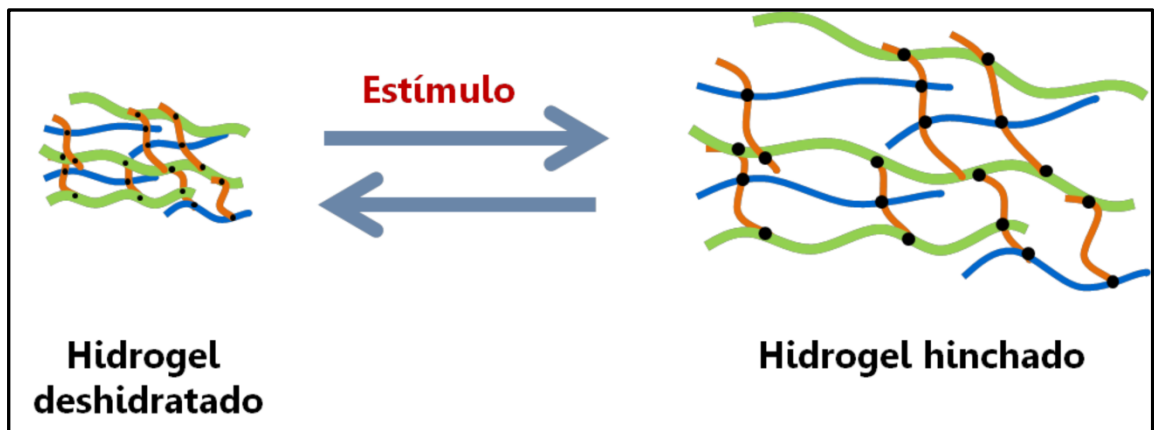


Figura 2. Representación esquemática del efecto de un estímulo externo en un hidrogel y su respuesta de hinchamiento/contracción.

La biocompatibilidad y las excelentes propiedades mecánicas que ofrecen estos materiales, proporcionan una amplia gama de potenciales aplicaciones para los hidrogeles, tales como membranas para biosensores, dispositivos de liberación de fármacos, andamios extracelulares, etc.^{13,14,16} Sin embargo, la aplicación de hidrogeles en el ámbito la ingeniería de tejidos se ha visto mermada por presentar insuficiencia de vascularización. Como propuesta ante esta problemática, la comunidad científica ha planteado el desarrollo de sistemas macroporosos, conservando las propiedades que aportan las redes tridimensionales.

Ante esta perspectiva, los criogeles son matrices gelificadas que se producen a partir de soluciones que contienen los compuestos precursores a temperaturas ligeramente por debajo del punto de cristalización del solvente utilizado (Figura 3). De esta manera, se forman dos fases: una masa de solvente congelada y una micro-fase líquida concentrada con el precursor gelificante. Esto da pie a que la concentración del precursor formador del gel se incremente notoriamente en la zona de entrecruzamiento, mientras que la fase congelada actúa como un agente formador de poros. Naturalmente, este proceso conduce a un incremento en el tamaño de los poros

del gel, variando desde cientos a unos cuantos micrómetros, el cual está en dependencia principalmente la concentración inicial del precursor y del tratamiento de congelamiento que se aplique. Estas características, permiten situar a los criogel como materiales prometedores para inmovilización celular y de moléculas así como para matrices cromatográficas.^{17,18}

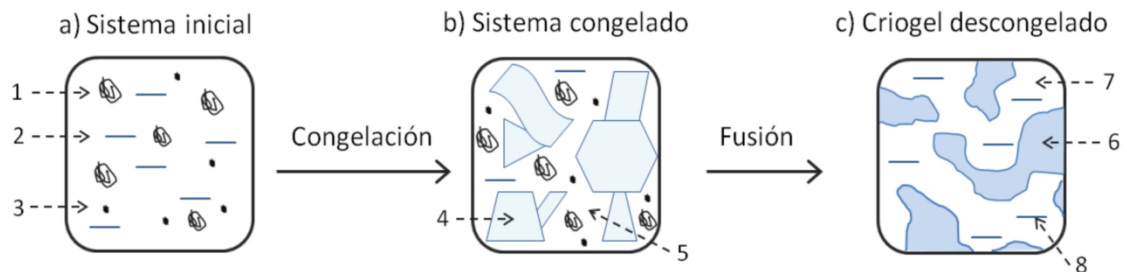


Figura 3. Esquema del mecanismo de criogelificación para sistemas poliméricos en presencia de un disolvente de punto de congelación asequible (agua, dioxano, dimetilsulfóxido, etc.): 1, macromoléculas en solución; 2, solvente; 3, solutos de bajo peso molecular; 4, policristales de solvente congelado; 5, micro-fase líquida sin congelar; 6, estructura polimérica de un criogel; 7, macroporos; 8, solvente.¹⁷

2.1.3. Nanopartículas

Un sistema polimérico puede existir en un estado termodinámicamente estable, el cual se caracteriza por un mínimo de energía libre de Gibbs, así como en un estado coloidalmente estable, en el cual no se produce agregación macroscópica de una fase termodinámicamente metaestable. Este último, hace referencia a partículas que pueden permanecer en ese estado por un largo período de tiempo, en dependencia de la afinidad del polímero con el medio.⁸

Para alcanzar la estabilidad de dispersiones acuosas, se han reportado dos categorías, estabilización electrostática o estérica. La primera se basa en la repulsión de la doble capa eléctrica de las partículas; puede lograrse con el uso de iniciadores iónicos y surfactantes iónicos, o copolimerizando con monómeros que posean grupos capaces de disociarse en agua.⁸

En este sentido, el estudio de sistemas nanoestructurados ha crecido exponencialmente en la última década, generando importantes contribuciones en distintas áreas, como química, física, biomedicina y la ciencia analítica, debido a la versatilidad en sus propiedades y aplicaciones.¹⁹ Las nanopartículas son partículas coloidales con diámetros aproximados a $1-1000 \times 10^{-9}$ m. Existen algunos parámetros que los caracterizan de los sistemas macro, tales como la relación superficie-volumen, al igual que sus propiedades eléctricas, ópticas y térmicas.²⁰

Por su parte, una de las características que mayor impacto han mostrado los nanosistemas, es la capacidad de confinamiento de ciertas sustancias. En este sentido, el área biomédica ha contemplado explorar alternativas que permitan mejorar substancialmente la eficacia de los fármacos, debido a que el uso de las técnicas convencionales actuales para su administración, conlleva a una distribución no-específica de los compuestos activos biológicos. De ahí, la ciencia de los nanomateriales ha desempeñado un rol importante en la búsqueda de solventar esta problemática, generando sistemas que permitan la distribución controlada de fármacos hacia un tejido, células o niveles subcelulares específicos. Las nanopartículas poseen tamaños de 7-70 veces más pequeñas que las redes celulares, y por tanto pueden administrarse vía intravenosa sin peligro de embolización. A continuación se describen varios sistemas nanoestructurados (Figura 4) que han sido desarrollados con estas finalidades.²¹

- a) **Nanoesferas**. Poseen estructura tipo monolito, en el cual el fármaco es dispersado dentro de la matriz polimérica o adsorbida superficialmente.

- b) **Nanocápsulas**. Exhiben una estructura tipo vesicular, formada por un núcleo líquido (lipofílico o acuoso) conteniendo el fármaco, rodeado por una membrana polimérica.

De esta manera, el uso de sistemas nanoestructurados conduce a solventar algunas situaciones no deseable por parte de la administración convencional de fármacos: a) baja biodisponibilidad del fármaco en el objetivo, b) efectos colaterales tóxicos en los tejidos sanos por parte del fármaco y c) degradación del fármaco en el cuerpo antes de llegar al objetivo.²⁰

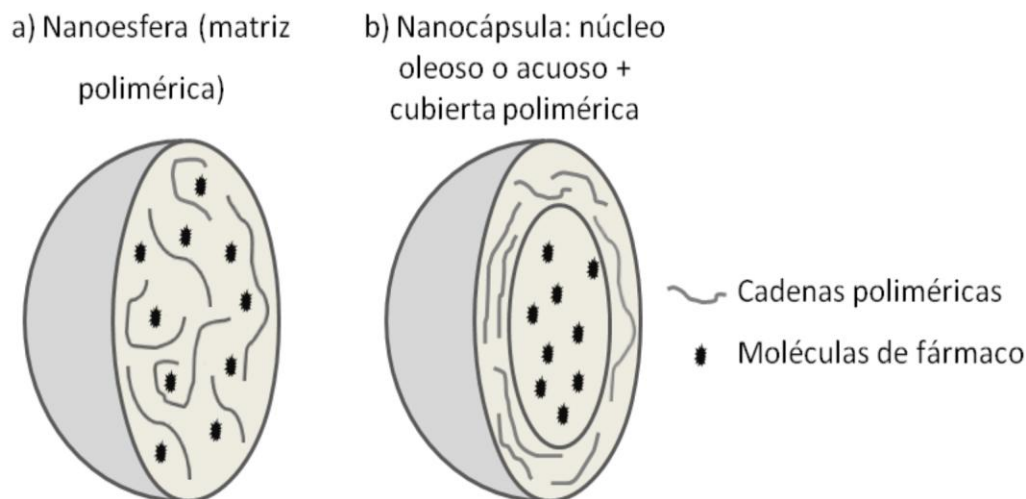


Figura 4. Morfología de sistemas nanoestructurados ²¹

En estos sistemas, la matriz polimérica puede ser de origen natural o sintético, siendo preferible conseguir sistemas que primordialmente sean biodegradables, biocompatibles y no tóxicos.²² De ahí, la importancia de una búsqueda del uso de distintos métodos que permitan obtener nanopartículas con características muy específicas. En este sentido, la quitosana es uno de los polímeros naturales más promisorios para aplicarse en el área biomédica, debido a las cualidades que posee. Diversos estudios han reportado evidencias de no producir toxicidad al sufrir degradación enzimática (la quitosana es degradada por enzimas presentes en saliva y fluidos gástricos: lisozima y lipasa),²³ además de presentar propiedades antivirales, antimicrobiales, antitumorales y de mucoadhesión.^{22,24}

Este conjunto de características han despertado el interés en el diseño de nanopartículas a partir de este polisacárido, para lo cual diversos métodos de preparación han sido desarrollados. Sin embargo, solo algunas metodologías citadas en la literatura cumplen con los requisitos mínimos para que el producto obtenido pueda ser considerado en aplicaciones farmacéuticas debido a los requisitos estrictos en las normativas especializadas. A continuación se describen algunas métodos que se han utilizado para la obtención de nanopartículas basadas en quitosana.²²

- a) Gelificación ionotrópica. Está técnica consiste en el entrecruzamiento iónico de la quitosana con contraiones multivalentes, utilizando comúnmente el tripolifosfato de sodio (TPP). Puede llevarse a cabo en sistema acuoso. Las

nanopartículas pueden obtenerse al adicionar una solución ácida diluida de quitosana a una solución de TPP, o viceversa con agitación constante.^{25,26} Se ha encontrado que el tamaño de las nanopartículas es fuertemente dependiente de la concentración de quitosana y TPP utilizadas.²⁷

- b) Coacervación compleja. Se mezclan dos polielectrolitos de carga opuesta, formando un complejo, separándose en dos fases: una rica en el polímero, y otra diluida. El complejo forma una película insoluble que cubre las partículas.²⁸
- c) Microemulsión. Las nanopartículas son preparadas en un núcleo acuoso o gotas micelares formadas en una microemulsión inversa agua-aceite. La microemulsión es formada por dispersión de una solución acuosa de quitosana en la fase oleosa continua, compuesta por solvente orgánico y surfactante con agitación continua, evitando turbidez. Posteriormente, se adiciona un agente entrecruzante con agitación y se evapora el solvente orgánico.²⁹

La eficiencia de los fármacos puede mejorarse si las partículas son capaces de responder ante un estímulo de temperatura o pH en los sitios patológicos, ya que esto propiciaría una administración a sitios específicos y por tiempos determinados. Las nanopartículas sensibles a la temperatura pueden manifestar cambios en el proceso de disolución, degradación, hinchamiento, cambios en el balance hidrofílico-hidrofóbico, alteración de forma y cambios conformacionales.^{20,21,30}

Para nanosistemas termosensibles, es deseable modular la LCST del material para lograr aplicarse en un objetivo específico. De esta manera, para sistemas de liberación de fármacos es preferible que el nanomaterial exhiba liberación mínima bajo la temperatura fisiológica (37 °C), mientras que para sistemas de liberación controlada, se requiere que exista una variación gradual de temperatura. Para satisfacer estas condiciones se requiere que las macromoléculas termosensibles posean una LCST ligeramente por encima de la temperatura fisiológica del cuerpo humano (38-45°C). Lo anterior inducirá una contracción del volumen por encima de esta temperatura, y esto conducirá a la liberación del fármaco activada por el incremento de temperatura.³¹

2.2. Poli (*N*-vinilcaprolactama)

La *N*-vinilcaprolactama (VCL) es un monómero con carácter anfifílico que pertenece al grupo de las *N*-vinil amidas, el cual posee un anillo lactama (de siete átomos de carbono) hidrofílico, conectado al grupo vinilo hidrofóbico. La rigidez del doble enlace carbonilo del grupo funcional amida en el anillo, favorece una conformación más probable tipo *silla*.^{32,33}

La polimerización de la VCL no ha sido estudiada tan ampliamente como otros monómeros similares (*N*-vinilpirrolidona, *N*-isopropilacrilamida). La síntesis de PVCL se ha llevado a cabo por el mecanismo de polimerización radicalica en cadena, generalmente por la técnica de solución o en masa. Los primeros reportes de síntesis de este polímero fueron realizados en 1968 por Solomon y col.³⁴ La síntesis fue realizada en ausencia de solvente, utilizando diferentes iniciadores. De acuerdo con este estudio, el compuesto más efectivo para iniciar la polimerización de este monómero resultó ser el 2,2'-azobisisobutirnitrito (AIBN).

El polímero obtenido es no-iónico, soluble en agua ($T < LCST$), biocompatible y responde ante estímulos de variación de temperatura. La PVCL (Figura 5) tiene una estructura sindiotáctica; dos moléculas de VCL en la conformación *silla* crean celdas cristalinas por empaquetamiento de esta estructura. Probablemente, estas asociaciones estructurales están presentes también en solución. La reacción de dobles enlaces de asociados diferentes es controlada por su posición cercana al radical terminal de la cadena polimérica debido a presencia de impedimentos estéricos.^{32,35}

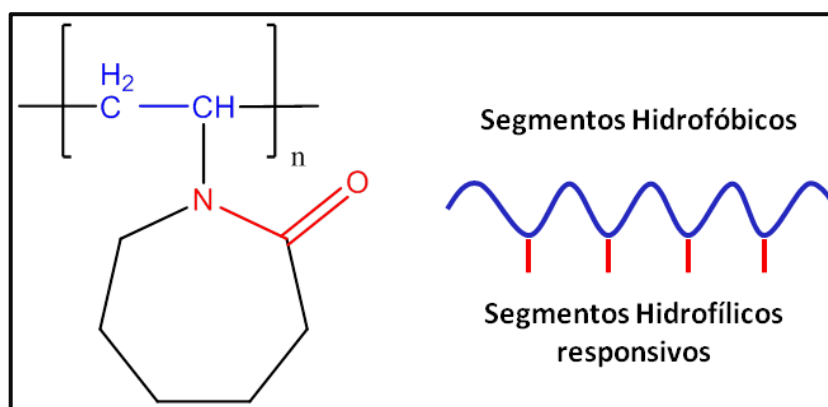


Figura 5. Estructura química de la poli(*N*-vinilcaprolactama).

2.2.1. Polimerización Radicálica

La polimerización radicálica es una reacción en cadena que involucra tres procesos: iniciación, propagación y terminación. La reacción es iniciada por especies reactivas R^* (radicales libres) producidas a partir de la disociación de un compuesto denominado iniciador. Los radicales libres reaccionan con una molécula de monómero por apertura del enlace π para formar un nuevo radical; este proceso es repetido con muchas más moléculas de monómero propagando continuamente el centro reactivo (propagación). El crecimiento de la cadena polimérica es terminado en algún punto por destrucción del centro reactivo, ya sea por acoplamiento o desproporción (Figura 6).^{4,36}

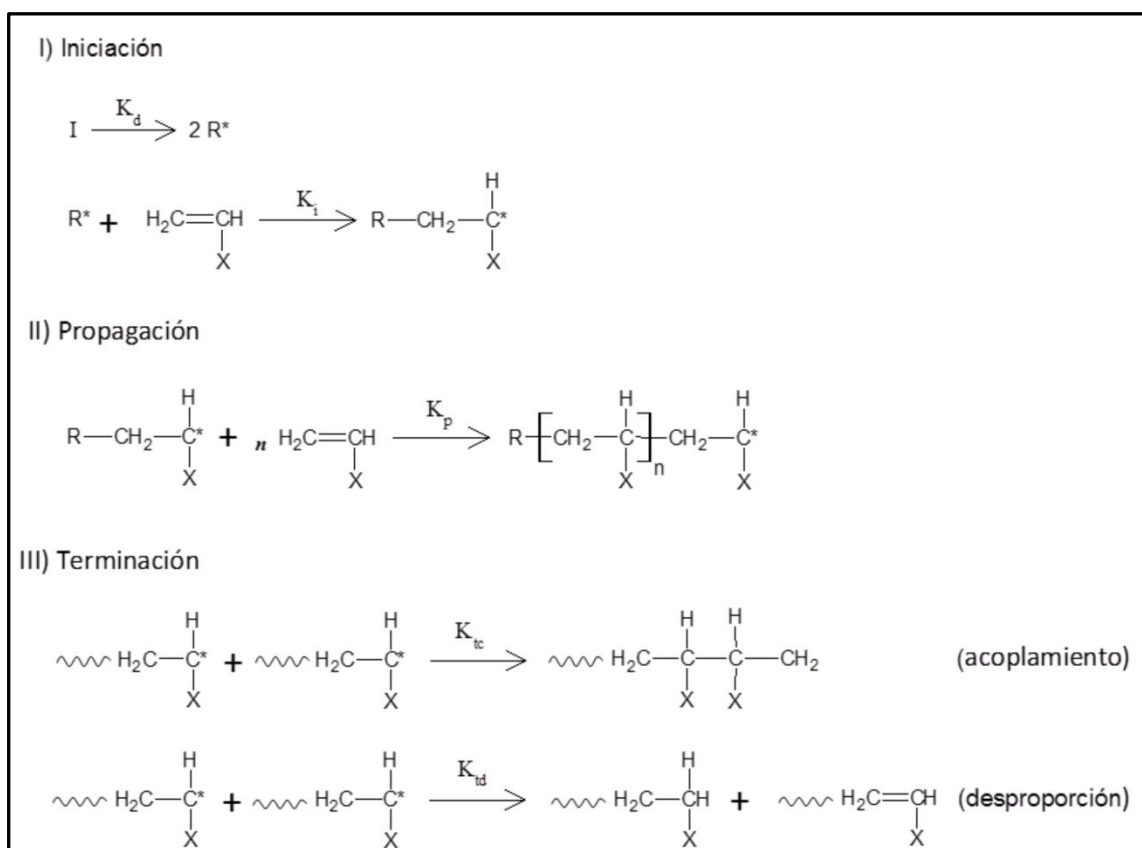


Figura 6. Proceso de polimerización radical en cadena: iniciación, propagación y terminación (acoplamiento y/o desproporción).

Una de las características principales de este tipo de polimerización es que el polímero crece de manera inmediata adquiriendo gran masa molecular a los pocos minutos de iniciada la reacción. Así, el tiempo de polimerización únicamente tiene

efecto en el rendimiento del producto obtenido.⁴ Los mecanismos de terminación involucrados en reacciones de polimerización radicalica convencional, suelen conducir a polímeros altamente polidispersos, como es el caso de la PVCL, que comúnmente presenta índices de polidispersidad ($PDI = \bar{M}_w/\bar{M}_n$) mayores a 2.0.

Las dimensiones de cadena de las macromoléculas producidas por la polimerización por adición de radicales libres convencional puede ser controlada fácilmente ajustando algunos parámetros de reacción como la temperatura de reacción, la concentración de iniciador o la presencia de agentes de transferencia de cadena (solventes, reactivos).

Adicional a esto, en décadas recientes se han propuesto diversas técnicas para obtener de forma controlada un tamaño específico de las cadenas poliméricas y mayor homogeneidad en su distribución. La polimerización radicalica controlada (CRP, por sus siglas en inglés) incluye estrategias que consisten en polimerización mediada por nitróxido (NMP), polimerización radicalica por transferencia de átomo (ATRP), polimerización por transferencia de cadena reversible de adición-fragmentación (RAFT), diseño macromolecular vía intercambio de xantato (MADIX), entre otras. La CRP (también conocida como polimerización radicalica viviente o polimerización radicalica por desactivación reversible) se basa en establecer un equilibrio dinámico rápido entre una cantidad pequeña de radicales libres en crecimiento y una gran cantidad de especies “durmientes”.^{37,38}

Existen reportes recientes de síntesis de PVCL utilizando CRP. Ponce-Vargas y col. (2013) reportaron la polimerización de VCL a partir de reacciones RAFT, utilizando tritio carbonatos como agentes de transferencia de cadena y ACVA como iniciador. Este grupo reporta que la PVCL no presenta un comportamiento típico RAFT, resultando en dispersiones similares a las obtenidas bajo polimerización radicalica convencional.³⁹ Beija y col. (2011) obtuvieron PVCL con $PDI < 1.3$, combinando MADIX/RAFT.⁴⁰

2.2.2. Comportamiento Termosensible de la PVCL en Agua

La solubilidad de los polímeros anfífilicos en agua (a temperatura ambiente) es consecuencia de la interacción entre segmentos polares de las macromoléculas y las

moléculas de agua (hidratación hidrofóbica). El proceso de disolución de solutos no-polares involucra la formación de “icebergs” microscópicos, es decir, la estructuración de moléculas de agua ordenadas alrededor de las moléculas del soluto no-polar. La extensión de estos “icebergs” incrementa con el tamaño de la molécula de soluto. Naturalmente, el incremento en la temperatura constituye la “fusión” de los “icebergs”, lo cual conduce al aumento en las interacciones polímero-polímero y la correspondiente transición ovillo-glóbulo.⁴¹⁻⁴⁵

La transición solución-precipitación de las macromoléculas de PVCL en agua al calentarse, es controlada principalmente por dos tipos de interacciones. La primera tiene que ver con el enlazamiento hidrógeno de las moléculas de agua de la primera capa con los grupos C=O de la PVCL. Su energía depende tanto de las capas de agua que se encuentran unidas a la primera, así como de la solución acuosa. La segunda interacción está relacionada con la fuerza de dispersión entre los anillos de la conformación en “silla”. Esto conduce a un encogimiento intramolecular de los ovillos manifestándose la agregación y precipitación del polímero en fases separadas.³²

El incremento de contenido de agua en la solución genera desestabilización en el complejo polímero-agua, al ocasionar disturbios del estado conformacional de las moléculas débilmente asociadas o moléculas con grupos OH libres en la proximidad a la cadena polimérica.³²

Las moléculas de polímero solubles en agua se componen por grupos polares capaces de enlazarse por puentes de hidrógeno con moléculas de agua y moléculas hidrocarbonadas no polares, las cuales interactúan con el agua debido a fuerzas de Van der Waals. De esta manera, la hidratación del polímero ocurre por vía hidrofílica e hidrofóbica.⁹

La entalpía de mezclado y la entropía son negativas, debido probablemente a la hidratación hidrofóbica del polímero. Cuando el sistema se aproxima a la curva binodal, al calentarse, las macromoléculas colapsan sostenidamente formando un núcleo hidrofóbico intramolecular. Se cree que la separación de fase es causada por una interacción hidrofóbica intermolecular por parte de las macromoléculas colapsadas.⁴⁶

Uno de los fenómenos de mayor interés en el comportamiento de los sistemas poliméricos en soluciones acuosas es el estudio de la transición ovillo extendido-glóbulo (coil-globule). La transición de las macromoléculas es observada en solución diluida cuando la calidad del solvente llega a ser más pobre debido al incremento de la atracción entre las unidades monoméricas. El colapso de los ovillos macromoleculares normalmente ocurre como consecuencia de variaciones ligeras de parámetros externos, entre ellos la temperatura.⁴⁷

La contracción de los ovillos poliméricos por encima de la temperatura crítica es explicada por el incremento en las interacciones hidrofóbicas de los grupos no-polares del polímero con un incremento de la temperatura. De esta manera, es de gran interés tener la posibilidad de controlar la LCST de los polímeros termosensibles.

2.2.3. Influencia de la Longitud de Cadena en la LCST

Los polímeros solubles en agua, que responden ante estímulos de temperatura, pueden presentar tres clases de comportamiento LCST de acuerdo con su comportamiento de miscibilidad crítica. La clase I sigue el comportamiento de miscibilidad clásica de Flory-Huggins, es decir, al incrementar la longitud de cadena del polímero, la posición del punto crítico cambia hacia concentraciones más bajas (condición- θ). La clase II mantiene su punto crítico independiente de la longitud de cadena del polímero. La clase III se caracteriza por tener una concentración límite crítica igual a cero para bajas concentraciones, misma que se comporta de acuerdo a la teoría de Flory-Huggins para una cadena polimérica de peso molecular infinito (temperatura θ). Además, a altas concentraciones, se aprecian dos concentraciones críticas diferentes de cero, las cuales son independientes de la longitud de la cadena.^{9,48}

La PVCL es un polímero que manifiesta sensibilidad térmica al producir separación de fase en temperaturas cercanas a 37 °C. Su transición de fase es dependiente de la concentración y de la longitud de cadena, por lo cual su comportamiento corresponde a los sistemas del Tipo I. Este polímero posee un número reducido de cambios de

conformación en comparación con otros sistemas de su tipo, debido a los constreñimientos topológicos del anillo caprolactama.^{49,50}

El grupo de Santos y colaboradores^{51,52} ha reportado estudios cinéticos de la polimerización de la VCL en solución, en los cuales se ha manifestado la dependencia de la LCST de la PVCL con el \bar{M}_n de las cadenas macromoleculares. A medida que se incrementa el tamaño de las cadenas de PVCL, se observa una disminución en la temperatura de separación de fase de las disoluciones. Este comportamiento es más pronunciado para $\bar{M}_n < 34$ kDa. Sin embargo en polímeros con $\bar{M}_n > 47$ kDa, existe una aparente independencia de la LCST con este parámetro.

2.2.4. Caracterización Químico-Física

Una buena parte de las propiedades que adquiere un polímero, tales como solubilidad, estabilidad química y térmica, entre otras, son cruciales para determinar el uso del polímero en aplicaciones específicas. Por ejemplo, la biocompatibilidad y no-toxicidad son características esenciales para que un material polimérico pueda utilizarse en el área biomédica. Las propiedades de un polímero pueden controlarse tomando en cuenta ciertas variables, como la naturaleza de los reactivos utilizados, conformación y arquitectura molecular, entre otras. Esto conlleva al uso de técnicas que permitan la determinación de estas características particulares en los polímeros.^{36,53}

Como se sabe, las reacciones de polimerización generalmente producen cadenas poliméricas con distinto número de unidades monoméricas enlazadas entre sí. Esto conduce a tener una mezcla de macromoléculas de diferente tamaño molecular (debido a variaciones estadísticas en el proceso de polimerización), y por tanto el peso molecular de los polímeros es expresado con valores promedio. El peso molecular de un material polimérico tiene gran influencia en sus propiedades físicas y aplicaciones. Por ejemplo, gran parte de las propiedades mecánicas que adquieren estos materiales varían considerablemente con este parámetro (por debajo de un valor crítico).^{36,53}

Existen varias formas de describir los pesos moleculares de un polímero: el peso molecular promedio en número (\bar{M}_n), peso molecular promedio en peso (\bar{M}_w), peso

molecular promedio viscosimétrico (\bar{M}_v), y el peso molecular promedio Z (\bar{M}_z). Adicionalmente, la distribución de tamaños ($PDI = \bar{M}_w/\bar{M}_n$) de las cadenas también juega un rol importante en las propiedades de una macromolécula.^{36,53}

La Cromatografía de Permeación en Gel (GPC) o cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) es una técnica ampliamente utilizada para determinar estos parámetros moleculares. Este método consiste en eluir una solución diluida del polímero a través de una columna cromatográfica compuesta de un gel poroso. Mientras la solución del polímero fluye, las moléculas mayores pasan a través de los poros y las moléculas más pequeñas son retenidas en el gel, ocasionando que éstas requieran más tiempo para pasar por la columna. De esta manera, es posible relacionar el peso molecular del polímero con el tiempo de elución de la solución polimérica.^{36,53}

Por otro lado, las técnicas espectroscópicas, como el Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y Raman, son herramientas que permiten conocer la estructura molecular de un polímero. El FTIR permite la identificación de grupos funcionales y la forma en que se encuentran unidos a la estructura principal del polímero, además de que es posible conocer su huella dactilar molecular. Por su parte, la espectroscopía Raman es una herramienta que provee información estructural por detección de dispersión inelástica de los fotones de las moléculas, la cual se relaciona con la energía de vibración de las mismas.^{53,54}

La resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-NMR}$) es una potente técnica analítica que permite la elucidación de la estructura química de las moléculas. Las señales de $^1\text{H-NMR}$, pueden ser asignadas a átomos específicos a lo largo de la cadena principal del polímero, así como de cadenas laterales que puedan estar presentes. Esta herramienta, a través de la integración de las señales, permite cuantificar el número relativo de hidrógenos responsables de un pico NMR característico, con respecto de otro.⁵³

La medición de las propiedades físicas de un polímero en función de la temperatura o del tiempo es de vital importancia para su caracterización. El análisis termogravimétrico (TGA) y la calorimetría de barrido diferencial (DSC) son técnicas comúnmente empleadas para conocer la composición de los materiales y transiciones

de fase, respectivamente. La DSC permite determinar la ocurrencia de transiciones térmicas en un material polimérico, tales como temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m), y temperatura de degradación (T_d). En adición a esto, si se emplean herramientas de alta sensibilidad como micro-calorímetros (micro-DSC) es posible elucidar transiciones de fase en solución o procesos de gelificación a partir de identificación de procesos endotérmicos y exotérmicos, o cambios en la capacidad calorífica y entalpías.

El TGA permite monitorear el cambio de peso de un polímero en función de la temperatura de la muestra, mediante un programa de calentamiento. Esta variación de peso permite identificar los procesos de la pirolisis de un material, tales como deshidratación, oxidación, despolimerización, desorción, entre otras.⁵³ Esta técnica permite evaluar cuantitativamente la composición de un material compuesto, si las etapas de la degradación térmica se corresponden con procesos relacionados con la evolución de alguno de los componentes del sistema polimérico complejo (por ejemplo deshidratación, descarboxilación, pérdida de alcohol metílico o etílico, pérdida de anhídrido carbónico, etc.).

2.2.5. Citotoxicidad

Se ha reportado que la PVCL presenta alta resistencia a la hidrólisis, y no produce aminas tóxicas de bajo peso molecular durante la hidrólisis. Por otro lado, en ensayos de citotoxicidad realizados a cultivos celulares Caco-2, han probado que a concentraciones por debajo de 5 mg mL^{-1} este polímero no es tóxico.⁵⁵

2.2.6. Aplicaciones

El comportamiento termosensible de la PVCL en soluciones acuosas, y la temperatura de transición de fase cercana a las condiciones fisiológicas que presenta, lo sitúan como un material promisorio para aplicaciones en el sector biomédico. De esta manera, materiales que contienen PVCL, tales como micelas, nanopartículas o criogel, han sido estudiados para inmovilización celular,⁵⁶ ingeniería de tejidos,^{57,58} separación de proteínas⁵⁹ y liberación de fármacos anti-cáncer.⁶⁰⁻⁶²

2.3. Quitosana

Los polisacáridos forman parte del grupo de polímeros naturales, al igual que las proteínas y los ácidos nucleicos, y por tanto están ampliamente distribuidos en diversos recursos naturales. Sus estructuras moleculares y sus propiedades varían en un amplio intervalo. Su principal función en los seres vivos que los contienen es como materiales estructurales y como proveedores de agua y energía. Los polisacáridos han atraído la atención por su actividad biológica inherente y sus propiedades fisicoquímicas.⁶³

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (después de la celulosa), distribuido principalmente en recursos animales, aunque también se ha logrado aislar a partir de algunos hongos y algas. Es el componente orgánico más abundante en el exoesqueleto de los crustáceos (contiene 20-50%). Su rol en la naturaleza es similar al de la celulosa, actúa como materiales de soporte estructural y defensa en los organismos vivos.⁶⁴

Por su parte, la quitosana es obtenida comúnmente a partir de la desacetilación extensiva de la quitina, aunque es posible encontrarla en composiciones considerables en algunos hongos (*Mucor rouxii* y *Choanephora cucurbitarum*). En general, la Cs posee bajo contenido de unidades acetiladas, teniendo la capacidad de ser soluble en disoluciones acuosas débilmente ácidas. Este polisacárido lineal está compuesto principalmente de dos unidades estructurales enlazadas por uniones covalentes $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Figura 7): 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa (unidad desacetilada) y 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa (unidades acetiladas).^{64,65}

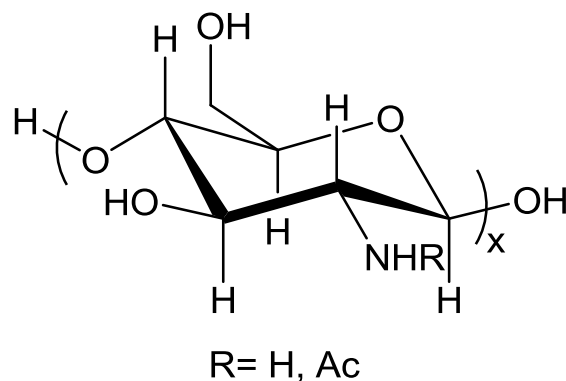


Figura 7. Representación esquemática de la quitosana.

Los métodos de preparación de quitosana de la quitina es llevada a cabo a partir de la hidrólisis de grupos acetamidos, y aunque suelen variar, generalmente implican el calentamiento de soluciones concentradas de NaOH (40-50%) por encima de 100 °C, utilizando atmósfera inerte. Comúnmente, este tratamiento es repetido varias veces para obtener mayor grado de desacetilación, sin embargo, el exceso de este procedimiento puede traer consigo la degradación del producto.

2.3.1. Propiedades Químico-Físicas

Al obtenerse de un polímero natural, es normal encontrar variabilidad en el tamaño de la cadena de quitosana. A continuación se citan algunos parámetros fundamentales que tienen influencia directa en las propiedades que presenta la quitosana.

Se han desarrollado diversas metodologías para determinar el grado de *N*-acetilación de la quitosana, basadas en espectroscopía FTIR,⁶⁶ ¹H-NMR,⁶⁷ conductimetría, análisis térmico,⁶⁸ entre otras. El peso molecular de la quitosana es posible determinarlo por viscosimetría, dispersión de luz, cromatografía de permeación en gel.

- a) **Grado de *N*-acetilación.** Este parámetro junto con la masa molecular son los que más influencia tienen en la identidad química y física de la quitosana, ya que varían de acuerdo al tipo de materia prima del cual es extraído y el método de preparación desarrollado. El grado de acetilación lo podemos definir como la fracción (F_A) o el porcentaje de unidades glicosídicas *N*-acetiladas (DA) en la cadena de quitosana (Cs). La importancia de llevar a cabo un proceso de desacetilación radica en obtener un material que presente solubilidad en condiciones ácidas débiles. Existen algunos factores que pueden afectar el grado de desacetilación obtenido, como son la concentración de álcali utilizada, los tratamientos previos, tamaños de la partícula, la cristalinidad del material, porosidad de la quitina. Es posible obtener Cs altamente desacetiladas por distintas vías: heterógena y homogénea.

- b) **Polidispersión en la composición de la quitosana.** El método heterogéneo de desacetilación de la Cs consiste en utilizar una solución de NaOH altamente

concentrada por encima de 100°C, durante varias horas; esto se puede llevar en varios pasos sucesivos y se ha alcanzado valores de 75-85% de desacetilación. Es importante mencionar que según estudios realizados, se ha demostrado que trabajar a muy altas temperaturas o bien, someter a mucho tiempo de lavados e incluso repetirlos varias veces, no conduce a la obtención de una desacetilación completa, por el contrario favorece la degradación de la cadena polimérica y por tanto disminución en su peso molecular. Este método no permite llegar a las zonas cristalinas de la cadena de Cs, únicamente la reacción ocurre en las zonas amorfas, y por tanto se obtienen materiales con mayor dispersión de los grupos amino a lo largo de la cadena de Cs, encontrando preferentemente y con una alta frecuencia de bloques de unidades *N*-acetiladas a lo largo de la cadena de Cs. En el caso del método homogéneo, consiste en llevar a cabo repeticiones sucesivas de un tratamiento que implica pre-hinchamiento, congelado-descongelado, permitiendo llegar a las zonas cristalinas de la cadena de quitosana, y así obtener una distribución más aleatoria de ambas unidades estructurales a lo largo de la cadena de Cs. En este caso, el pretratamiento que se le da la muestra conduce a la destrucción de la estructura nativa cristalina de α -quitina.

- c) **Masa molecular y su polidispersión.** Estos parámetros influyen directamente en las propiedades físicas, químicas y biológicas de la Cs, y por ende es importante la elección adecuada del material que se desea utilizar para determinadas aplicaciones. Debido a que la quitosana es un material que proviene de fuentes naturales, estos parámetros varían de acuerdo con el recurso del cual fue extraído.

La Cs es soluble debido a la presencia del grupo amino libre en los anillos glucosídicos desacetilados, lo que origina que pueda ser soluble en solución ácida diluida, vía protonación de esos grupos y la formación correspondiente de sales de Cs. Este polímero es soluble en soluciones acuosas diluidas de ácidos como el clorhídrico, el bromhídrico, el iodhídrico, el nítrico y el perclórico; al aumentar la concentración de éstos, se precipita la Cs. Es insoluble en ácido sulfúrico diluido, mejora al incrementar su concentración, aunque conduce a un proceso de sulfatación y degradación de la cadena. La disolución en agua por las siguientes vías:

- a) Cambiando morfología y peso molecular de la Cs.
- b) Obteniendo Cs microcristalino
- c) Tratamiento alcalino homogéneo de desacetilación de la quitina.
- d) Tratamiento de Cs con solución de ácido acético/metanol/piridina, resultando en una Cs con 50% de desacetilación.
- e) Tratamiento con anhídrido acético y ácido acético, también obtuvieron 50% de desacetilación.

2.3.2. Modificación Química

La quitosana es una molécula versátil, que tiene grupos altamente propensos para modificación química. El grupo hidroxilo primario (C-6) y secundario (C-3), así como el grupo amino (C-2) presente en la unidad desacetilada han sido sometidos a modificaciones químicas. En muchos casos, esto se ha logrado sin afectar el grado de polimerización del material nativo. Comúnmente la modificación química de un polisacárido, se realiza con la finalidad de mejorar ciertas propiedades, entre las cuales destacan la solubilidad (favoreciendo el carácter hidrofílico), tendencia a la formación de geles, modificación de la viscosidad, o bien afinidad hacia ciertas especies químicas (pigmentos, metales, etc.).⁶⁹ A continuación se citan algunas reacciones típicas para modificar químicamente la Cs.⁷⁰

- a) **N-acilación.** Esta modificación puede ocurrir en los grupos amino libres de la quitosana y en los grupos hidroxilos (reacción más lenta) con la adición de anhídridos o haluros de acilo. Generalmente, esta reacción se lleva a cabo en soluciones que implican ácido acético y/o metanol; obteniendo 50% de acetilación, se obtiene quitina alcalina (soluble en agua).
- b) **N-ftaloilación.** La reacción de anhídrido ftálico con quitosana, permite protegerlos los grupos amino libres presentes en este polímero, y favorece su solubilidad en solventes orgánicos. Esta modificación química, implica la mezcla de una solución acuosa de quitina alcalina y un solvente orgánico, conduciendo a la formación de un gel. La adición de anhídrido ftálico con el gel obtenido, produce el derivado *N*-acilado; al ser deshidratado se genera el derivado imida.

- c) **Formación de bases Schiff.** Este proceso generalmente, se realiza añadiendo un aldehído a una solución de Cs en ácido acético/metanol. El grupo imino que se forma es estable en medios neutros y alcalinos, aunque hidroliza en medios ácidos y regenera la amina libre. Una alternativa para generar entrecruzamiento de cadenas de Cs, es con el uso de glutaraldehído, genipina u otros compuestos. El producto que se obtiene es un precursor para la *N*-alquilación de la Cs, ya que los grupos imino pueden reducirse a *N*-alquilo si se utilizan reductores como el borohidruro de sodio.
- d) **Sales cuaternarias.** La formación de estas sales a partir de los grupos amino de la Cs han llamado la atención. Permite aumentar la solubilidad del producto y pueden lograrse por medio alcalino, usando yoduro de metilo. Una metilación fuerte genera O-metilación, y esto provoca una reducción de solubilidad de la muestra.
- e) **Sulfatación.** Este proceso se lleva a cabo en el C(6) de la molécula de la Cs; utilizando una mezcla de ácido sulfúrico con ácido sulfónico a temperatura ambiente es posible obtener un 95% de sulfatación de Cs. Este derivado es altamente soluble.
- f) **Fosforilación.** Puede llevarse a cabo con ácido metilsulfónico a 0°C; el material que se obtiene es una Cs fosfatada que precipita en éter. Este material es soluble en agua.

2.3.3. Copolimerización por Injerto

La copolimerización por injerto consiste en una reacción de acoplamiento entre una cadena principal que contiene una unidad monomérica con cadenas injertadas que comprende la secuencia de un segundo monómero. Existe una gran variedad de métodos desarrollados para obtener este tipo de copolímeros, en los cuales han sido utilizados sistemas de preparación en condiciones homogéneas y heterogéneas. La clasificación de estos métodos de preparación, mayormente aceptado involucra las reacciones por *grafting through*, *grafting onto* y *grafting from*.^{36,71}

- a) **Grafting through.** Este método involucra la polimerización de un macromonómero. Consiste en llevar a cabo directamente la polimerización radicalica de dos especies monoméricas distintas. Este tipo de reacciones tiende a producir un material polimérico cilíndrico -tipo *brushes*- con densidad de injerto muy elevada, debido a que se produce una cadena lateral por cada segmento del monómero de cadena principal.^{36,71}

- b) **Grafting from.** Este método se basa en iniciar la polimerización de un monómero directamente con la presencia de un polímero ya formado. De tal suerte, que las condiciones de reacción favorecen la formación de cadenas laterales de este polímero en propagación, enlazadas a la cadena principal del polímero.^{71,72}

- c) **Grafting onto.** Esta técnica de copolimerización implica una reacción de acoplamiento entre los grupos funcionales colgantes (X) de la cadena principal de un polímero y los grupos terminales funcionales (Y) del material a injertar.⁷¹

Entre los métodos de modificación química de la Cs, destaca la copolimerización *grafting onto*, debido a que permite la formación de derivados por enlaces covalentes con la molécula injertada en la cadena principal de la quitosana. Esta técnica, puede proveer de ciertas propiedades al producto final, tales como mejoramiento de adsorción, crear un efecto bacteriostático, entre otras.⁷³

Una de las principales ventajas de esta técnica es que ambos polímeros, tanto la cadena principal como la cadena lateral injertada, pueden ser preparados de manera independiente, y así controlar la arquitectura molecular del copolímero.⁷¹

En contraparte, el inconveniente que presenta esta técnica de preparación, es que la densidad de injerto algunas veces está limitada por razones termodinámicas (el enlazamiento de las cadenas injertadas al polímero, con alta densidad de injerto, llega a ser entrópicamente desfavorable, debido al cambio de conformación de ovillo aleatorio a una forma más estrecha) y cinéticas (la difusión de cadenas sin reaccionar hacia los sitios reactivos disminuye debido al incremento del impedimento estérico).⁷¹

2.3.4. Caracterización de Quitosana Modificada

La espectroscopía FTIR es una herramienta práctica y rápida para identificar posibles modificaciones en la estructura molecular de la quitosana. Por ejemplo, el desplazamiento de bandas características de los grupos amino de la quitosana, en 1652 cm^{-1} (C=O) y en 1597 cm^{-1} (-NH), hacia números de onda inferiores (1631 y 1525 cm^{-1} , respectivamente) evidencian la modificación química.⁷⁴

La espectroscopía $^1\text{H-NMR}$ es una técnica de caracterización que ofrece un alto grado de certidumbre en la elucidación estructural de los polímeros. El espectro de protón de la quitosana está plenamente identificado^{67,70} y por tanto, constituye una herramienta imprescindible para identificar, e incluso cuantificar, la presencia de átomos adicionales a la molécula de la quitosana.

El análisis termogravimétrico permite comparar la estabilidad térmica de la quitosana modificada con la especie nativa. Por ejemplo, mediante esta técnica es posible determinar la cantidad en peso de un material injertado con respecto de la quitosana. Así también, existe evidencia de que la estabilidad térmica de la Cs modificada químicamente disminuye significativamente, como consecuencia del decremento en la cristalinidad del polímero.⁷⁴⁻⁷⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

La mayoría de los reactivos y solventes utilizados para la realización de este trabajo fueron utilizados tal y como se recibieron, con excepción de del Ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) (ACVA, recristalizado con etanol) y la quitosana. Para todos los experimentos se utilizó agua pura Tipo 2 con una conductancia $\leq 0.2\mu\text{S}/\text{cm}$.

La quitosana utilizada para este trabajo fue adquirida de IDEBIO S.L., España. Para llevar a cabo la purificación de la quitosana, se preparó una disolución de la materia prima (0.5% p/p) en ácido acético 0.5 M a temperatura ambiente por 24h. El material fue separado a través de papel filtro (11 μm); posteriormente, la disolución fue precipitada con NaOH 10% p/p hasta alcanzar pH~8. Enseguida, el material fue enfriado y purificado con lavados sucesivos de agua hasta obtener conductancia similar a la del agua. La fase acuosa residual del lavado fue removida por medio de centrifugación. El producto húmedo fue congelado, secado por liofilizado y almacenado en ambiente seco. La quitosana purificada presentó $\bar{M}_n = 715 \text{ kDa}$ y PDI= 1.4 (determinado por SEC). El grado de *N*-acetilación (DA= 0.15) fue determinado por ¹H-NMR (Apéndice I) y por valoración conductimétrica (Apéndice II).

3.2 Reacciones

3.2.1 Síntesis de Poli(*N*-vinilcaprolactama)

PVCL-COOH se sintetizó por polimerización radicalica controlada en solución. Primero, *N*-vinilcaprolactama (NVCL), ácido tioglicólico (CTA, agente de transferencia de cadena) y el disolvente se agregaron en un frasco de reacción sellado. El oxígeno

presente en el reactor, se removió mediante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento con vacío. El iniciador térmico, ACVA, se agregó cuidadosamente al matraz de reacción. La reacción permaneció bajo atmósfera de nitrógeno a 60°C con agitación constante. Las condiciones de polimerización (tiempo de reacción, concentración del monómero y relación molar entre los reactantes) se ajustaron para obtener diferentes tamaños moleculares.

Después del tiempo deseado, la mezcla de reacción se sumergió en baño frío y la polimerización se detuvo. El producto se purificó por medio de diálisis usando membranas de celulosa (peso molecular 3.5 kDa) durante 24 h frente a etanol, 12 h frente a una mezcla agua:etanol (1:1) y 36 h frente a agua para remover los residuos sin reaccionar. El producto se liofilizó y almacenó a temperatura ambiente en un lugar seco. El rendimiento de la reacción se determinó gravimétricamente.

3.2.2 Síntesis de Quitosana-graft-poli(*N*-vinilcaprolactama)

La reacción de copolimerización por injerto se llevó a cabo por amidación de los grupos amino de la quitosana con PVCL-COOH usando DMTMM como activador de grupos carboxilos. Para realizar esta reacción, una mezcla de quitosana (110 mM) en ácido clorhídrico 0.5% p/p, se mezcló con diferentes cantidades de PVCL-COOH y DMTMM (10 veces en exceso molar estequiométrico). La reacción permaneció a temperatura ambiente durante 3 días con agitación constante.

Se prepararon dos series de copolímeros Cs-*g*-PVCL, variando los siguientes parámetros: a) la longitud de la cadena de PVCL injertada y b) el espaciamiento entre las cadenas de PVCL injertadas en la cadena de la Cs. La primera se obtuvo injertando muestras de PVCL con diferente grado de polimerización promedio en número (\bar{X}_n) (30, 92, 126 y 190) en la Cs. Para analizar el efecto del último caso, la muestra PVCL-26 se injertó en la Cs variando la relación estequiométrica con respecto a los grupos amino de la quitosana. Las síntesis se realizaron en condiciones similares. La mezcla de reacción se precipitó y se lavó con exceso de acetona. Después, el material se purificó por extracción soxhlet con acetona por 48 h. El producto se disolvió en agua y se liofilizó, almacenándose a temperatura ambiente en un lugar seco.

3.2.3 Obtención de Nanopartículas del Copolímero

La obtención de nanopartículas (NP) a partir de series del copolímero Cs-g-PVCL se llevó a cabo mediante el entrecruzamiento ionotrópico con tripolifosfato de sodio (TPP).

- a) Nanopartículas (blanco). Primero, el copolímero (1 mg mL^{-1}) se disolvió en agua. La disolución se homogeneizó con Ultra Turrax (IKA T25) a 7200 rpm por 5 min, utilizando baño frío. Consecutivamente, para fijar las nanopartículas, se adicionó gota a gota la disolución de TPP (20 % p/p con respecto al copolímero) de forma continua sobre la solución del copolímero, bajo agitación magnética vigorosa y aplicando sonicación (Sonics Vibra-Cell, 38% de amplitud) simultáneamente.
- b) Nanopartículas cargadas con dexametasona. El copolímero se disolvió en agua en concentraciones variables de 1.5 y 1 mg mL^{-1} . El fármaco (20% p/p con respecto al copolímero) se disolvió en acetona y posteriormente se añadió a la solución del copolímero. Se utilizó una relación v/v de acetona:agua de 0.02:1 y 0.04:1. El protocolo de preparación de las nanopartículas cargadas es el mismo que el descrito anteriormente.

En todos los casos se utilizó una relación (v/v) de las disoluciones Cs:TPP de 10:1. La purificación de las muestras se realizó mediante diálisis (membranas de 3.5 kDa) frente a agua durante 24h. Finalmente, las muestras se liofilizaron.

3.2.4 Obtención de Criogeles del Copolímero

La reacción de gelificación se llevó a cabo a partir del copolímero de injerto Cs-g-PV-26.C. Primero, el copolímero fue disuelto en solución acuosa de ácido acético al 1% p/p (50 mg mL^{-1}) para protonar los grupos aminos libres de la quitosana. La disolución permaneció a temperatura ambiente con agitación constante durante 3 horas. Se adicionaron $12 \mu\text{L}$ de glutaraldehído (50% v/v) a la solución del copolímero justo antes del proceso de formación del criogel.

El criogel se preparó en forma de micro-esferas, al adicionar gota a gota la solución del copolímero en un recipiente conteniendo nitrógeno líquido. Las esferas se colocaron en una caja petri de vidrio y permanecieron 3 minutos por encima del recipiente conteniendo nitrógeno líquido. Las esferas se dejaron reaccionar a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 h.

Una vez criogelificadas, las microesferas se lavaron cambiando el agua cada 8 horas hasta obtener conductividad cercana a la del agua milli-Q. Las esferas fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

3.2.5 Obtención de Criogeles de Glicol Quitosana-PVCL

La reacción de entrecruzamiento entre glicol quitosana (GQ) y VCL se llevó a cabo utilizando genipina (entrecruzante de origen natural) y *N,N'*-metilenbisacrilamida (MBA) como agentes entrecruzantes. La polimerización de *N*-vinil caprolactama se llevó a cabo *in situ* durante la reacción de entrecruzamiento, utilizando persulfato de amonio (PSA) como iniciador.

Se utilizó una mezcla de IPA/agua (1:4) para llevar a cabo la reacción de síntesis del criogel. Primero, se prepararon dos soluciones: (a) GQ en agua ($2.4\text{ \%p/V}_{\text{total}}$) y (b) *N*-vinil caprolactama en IPA ($14\text{ \%p/V}_{\text{total}}$). Posteriormente, se adicionó MBA (0.8 \%p/v), NaHCO_3 (0.6 mg mL^{-1}), la solución (b) y otra solución previamente preparada de genipina en IPA (9.2 mg mL^{-1}) a la solución (a). La mezcla de reacción permaneció 40 min en atmósfera de argón. A continuación se añadieron PSA ($0.25\text{ \%p/V}_{\text{total}}$) y TEMED ($0.25\text{ \%p/V}_{\text{total}}$) a la mezcla de reacción. La muestra presentó aspecto lechoso y pH ~ 9 . El producto se colocó en jeringas de plástico de 3 mL y permaneció a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 70 h.

Después, el material se lavó con una mezcla IPA/agua al 20% v/v, a temperatura ambiente, hasta alcanzar conductividad cercana a la del agua utilizada ($\sim 0.2\text{ }\mu\text{S/cm}$). Posterior a esto, se llevó a cabo una serie de 4-5 lavados cortos con agua, para remover residuos de IPA. Finalmente, el criogel se cortó en forma tabletas con bisturí, las cuales se congelaron y liofilizaron.

3.3. Técnicas de caracterización de los materiales obtenidos

3.3.1 Espectroscopía NMR de ^1H

Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro Mercury-400 (400 MHz) y en un Varian System-500 (500 MHz). Las muestras de quitosana (20 mg mL^{-1} en solución DCI/ D_2O) se analizaron a 70°C , mientras que para la PVCL-COOH y los copolímeros de injerto (20 mg mL^{-1} en D_2O) se registraron a 25°C . El corrimiento químico del protón del agua residual se usó como referencia. Los resultados se analizaron con el software MestreNova (Santiago de Compostela).

3.3.2 Espectroscopía FT-IR

Los espectros FT-IR se efectuaron en modo de reflexión totalmente atenuada (ATR-FTIR) en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer Spectrum One. Las muestras se analizaron a temperatura ambiente por 16 escaneos, con una resolución de 4 cm^{-1} .

3.3.3 Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de los materiales analizados se obtuvieron en un espectrómetro Raman Reflex Renishaw InVia. El sistema utiliza un microscopio óptico. La dispersión Raman es excitada usando un láser diodo en longitud de onda de 785 nm y potencia de excitación de 320 mW . El haz de láser es enfocado en la muestra con un objetivo de microscopio X50. Las mediciones Raman se llevaron a cabo durante 10 s , utilizando 3 acumulaciones.

3.3.4 Análisis Termogravimétrico

El análisis TG se llevó a cabo en un TGA Q500 (TA instruments). Las muestras se analizaron en celdas de paladio, en un rango de RT - 600°C , con velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ por el método dinámico de alta-resolución, utilizando flujo de nitrógeno de 10 mL min^{-1} .

3.3.5 Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)

La determinación de la distribución de pesos moleculares (el peso molecular promedio en número, \bar{M}_n , y el índice de polidispersidad, PDI) para las muestras de PVCL-COOH se llevaron a cabo por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) en un instrumento Perkin-Elmer equipado con bomba isocrática LC-250 y un detector de índice refractivo serie 200. Un set de columnas de Styragel HR3 y HR5 Waters condicionadas a 70°C se usaron para eluir muestras de 3 mg mL⁻¹. La fase móvil utilizada fue *N,N*-dimetilformamida con 0.1% LiBr a un flujo de 0.7 mL min⁻¹. Para la calibración, se utilizó estándar de poliestireno con peso molecular entre 1.2 y 480 kDa. Las mediciones por SEC para la muestra de quitosana se realizaron en un Shimadzu 20A. Un set de columnas Agilent PL Aquagel-OH (30, 40 y 50) conectadas en serie (300 x 7.5 mm y tamaño de partículas de 8 µm) y condicionadas a 28°C, se utilizó para eluir 2 mg mL⁻¹. La calibración del SEC se realizó con estándar de polisacárido pululan (pesos moleculares entre 0.18 y 708 kDa, Polymer Laboratories), utilizando 50 µL de inyección de muestra.

3.3.6 Espectrometría de Masas

La muestra PVCL-04 se analizó por espectrometría de masas de matriz-asistida por ionización láser de desorción con un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). Las mediciones se realizaron en un espectrómetro Voyager DE-PRO mass (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con un láser pulsado de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm, amplitud de pulso de 3 ns y frecuencia de 3 Hz) y un dispositivo de extracción de iones (*delayed extraction ion source*). Los iones generados por desorción láser fueron introducidos en un analizador de tiempo de vuelo (con patrón de vuelo de 1.3 m) con un voltaje de aceleración de 25 kV, 94% grid voltaje, 0.075% ion guide wire voltaje, y un tiempo de demora de 400 ns en el modo de ion lineal positivo.

3.3.7. Turbidimetría (UV-vis)

Las mediciones de LCST se determinaron en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 3 BIO-Varian equipado con un dispositivo de control de temperatura Peltier. El análisis se

desarrolló usando un programa de escaneo de temperatura. Se aplicaron ciclos de calentamiento y enfriamiento con velocidad del escaneo de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ en el rango de 25 a 60°C . La absorbancia se midió a $\lambda = 450\text{ nm}$. Las muestras de PVCL-COOH se analizaron en soluciones acuosas a 1, 0.5 y 0.2% p/p y las soluciones de copolímero de injerto se analizaron a 1.5, 1 y 0.5% p/p. La LCST se definió como la temperatura incipiente de separación de fase del sistema durante la rampa de calentamiento de las soluciones poliméricas acuosas.

3.3.8. Micro-Calorimetría de Barrido Diferencial (micro-DSC)

Las mediciones calorimétricas se llevaron a cabo en un instrumento micro-DSC-IIIa (Setaram, Francia). El comportamiento termosensible de las muestras en solución (10% p/p en agua) durante tres ciclos de calentamiento-enfriamiento se analizó de 10- 75°C , con velocidad de escaneo de $0.6^{\circ}\text{C min}^{-1}$. En todas las muestras se utilizó aproximadamente 650 μL de solución, depositadas en celdas estándar *Hastelloy*. Como referencia se utilizó agua. La masa de las muestras y referencia se pesaron para minimizar diferencias en capacidad calorífica entre ellas. Las muestras se equilibraron en $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 min antes de cada escaneo.

3.3.9. Dispersión de luz dinámica(DLS)

Las mediciones de dispersión de luz dinámica y potencial Zeta se obtuvieron simultáneamente en un Möbiuz (Wyatt Technologies, serial number 214-MOB). El sistema Möbiuz utiliza un diodo de estado sólido bombeado (DPSS, por sus siglas en inglés) con láser en modo longitudinal simple, operando a 532 nm y un ángulo de detección de 163.5. Se ajustó la velocidad de la rampa de temperatura de las muestras en $0.6^{\circ}\text{C min}^{-1}$, con un rango de 3°C entre 25- 52°C . Cada punto de temperatura se demoró en estabilizar aproximadamente 20 min, antes de cada medición, para equilibrar la temperatura de la muestra. Todas las muestras de PVCL y Cs-g-PVCL se disolvieron en agua milli-Q a una concentración de 2 mg mL^{-1} y filtradas por 0.2 μm . Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo de 45 μL con un ensamblaje de electrodo. Los datos colectados y el análisis se analizaron con el software DYNAMICS 7.3.1.15 (Wyatt Technology Corporation).

3.3.10. Morfología

La morfología de las Nanopartículas se analizaron en un microscopio electrónico de barrido diferencial ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés) (EVO LS10 SEM, Zeiss). Las muestras purificadas por diálisis se colocaron en un portaobjetos y se analizaron con un detector de electrones secundarios.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se incluyen las publicaciones desarrolladas de acuerdo con el trabajo de investigación llevado a cabo.

4.5 Effect of the Molecular Architecture on the Thermosensitive Properties of Chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam)

Daniel Fernández-Quiroz,^a Álvaro González-Gómez,^b Jaime Lizardi-Mendoza,^c Blanca Vázquez-Lasa,^b Francisco M. Goycoolea,^{c, d} Julio San Román,^b Waldo M. Argüelles-Monal^{*,a}

^a CIAD – Guaymas, Carret. al Varadero Nacional km 6.6, Guaymas, Sonora 85480, Mexico

^b ICTP-CSIC c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid and CIBER, Health Institute Carlos III. C/ Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain

^c CIAD – Hermosillo, Carret. a la Victoria km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, Mexico

^d Westfälische Wilhelms Universität Münster; IBBP, Schlossgarten 3, D-48149 Münster, Germany

Key words: poly(*N*-vinylcaprolactam), grafted copolymer, thermoresponsive, chitosan.

* Corresponding author: Tel +52 (622) 2252829, fax: +52 622 225 2820. e-mail adress: waldo@ciad.mx

Abstract

A series of thermoresponsive copolymers based on chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam) were synthesized by amidation reaction using 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride as coupling reagent. The effect of molecular architecture on the thermoresponsive properties of the graft copolymers solutions was studied by varying the chain length of the grafted poly(*N*-vinylcaprolactam), PVCL, (in the range from 4 to 26 kDa) and the spacing between grafted chains onto the chitosan backbone. The most interesting characteristic of these copolymers is their solubility in water at temperatures below their lower critical solution temperature (LCST). These solutions presented a LCST between 36 and 44 °C, which decreases with the spacing and length of grafted PVCL chains onto the chitosan backbone, in contrast with the limited decrease of the LCST of PVCL above a critical \bar{M}_n value around 18 kDa. This behavior offers tangible possibilities for the preparation and application of sensitive bioactive formulations and “smart” drug delivery systems.

1. Introduction

Smart polymers have the ability to undergo reversible changes, either physical or chemical, in their properties due to external stimuli as the temperature, pH, ionic strength, light, etc. Temperature-responsive polymers may exhibit different reversible mechanisms, such as shape changes and phase transitions. These type of materials have attracted high scientific interest and possess great potential of application on diverse areas, such as bioseparation, controlled drug delivery, tissue engineering, and other applications in biomedical fields.^{1,7}

Water-soluble polymer molecules consist of both polar and non-polar hydrocarbon moieties, which interact with water molecules via hydrogen bonding or Van der Waals forces respectively. Thus, temperature-responsive polymers can exhibit a lower critical solution temperature (LCST) in aqueous media as a consequence of the overall changes in the hydrophilic-hydrophobic balance.⁹ In this sense, poly(*N*-vinylcaprolactam) (PVCL) is one of the well-known thermoresponsive polymers, which is non-ionic, biocompatible, water-soluble and undergoes a phase separation about 37 °C. PVCL has relatively high resistance to hydrolysis and it does not produce toxic low-molecular-weight amines during hydrolysis. Moreover, cytotoxicity assays performed with PVCL samples (molecular weights above 300 kDa) reveal that they were well

tolerated in the analyzed cell cultures at concentrations below 10.0 mg mL⁻¹.⁵⁵ This polymer exhibits a “classical” Flory–Huggins thermoresponsive phase behavior in water (Type I systems) and therefore, the value of its LCST is strongly dependent on molecular weight and concentration.^{40,48} The LCST of PVCL is also affected by the molecular dispersity or the nature of end groups.^{49,50}

PVCL prepared by conventional free radical polymerization is generally polydisperse ($\bar{M}_w/\bar{M}_n > 2.0$).³¹ Recently, low polydisperse PVCL has been obtained by controlled radical polymerization using different chain transfer agents. Some techniques, such as reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT),^{39,52} atom transfer radical polymerization (ATRP) and macromolecular design via the interchange of xanthate (MADIX)^{40,78} have been applied for the preparation of PVCL of predictable molar mass with decreasing dispersity of the macromolecular chains.

Chitosan (Cs) is a linear aminopolysaccharide obtained by extensive deacetylation of chitin. It is mainly composed of two kinds of structural units: 2-amino-2-deoxy-D-glucose and N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucose linked by a $\beta(1\rightarrow4)$ bond (Scheme 1B). Its biodegradability, biocompatibility and low toxicity make it a promising material for biomedical applications. It could be chemically modified, via its amino (C2), or primary (C6) and secondary (C3) hydroxyl groups, to achieve molecular structures for different purposes⁶⁴

In general, the graft copolymers can be obtained by several methods of synthesis, such as “grafting from”, “grafting through” and “grafting onto”, which involve a series of the side chains covalently bonded to a linear backbone. The grafting onto is a versatile technique that consists in a coupling reaction between end-functional groups of the grafted chains onto pendant functional groups of the backbone chain.⁷¹ In this regard, the preparation of chitosan-graft-PVCL copolymers is documented.^{79–83} These reports account for the conjugation of the amine groups of chitosan with COOH-end PVCL using the pair EDC/NHS as coupling agent without considering the molecular weight of the grafted PVCL. The obtained products showed viability for biomedical applications due to their thermal behavior, biocompatibility and no-toxicity.

Recently, comparative studies between 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM) and EDC/NHS have revealed that the former one promotes favorable characteristics for coupling of the carboxylic groups and water-soluble amine-polysaccharides. These studies proved that the use of DMTMM entails some benefits such as one-step amide bonding reactions, capacity for being used in a wide range of pH, compatibility with several bioconjugation systems and ease of removal of the reaction residues.^{84,85}

The aim of the present research was to obtain a set of chitosan-graft-PVCL copolymers with controlled molecular architecture by varying grafted PVCL chain length as well as the degree of grafting. To this end, COOH-end PVCL homopolymer samples with different molecular weight were synthesized by means of controlled radical polymerization employing well-known transfer agents (e.g., solvent, thioacetic derivative), followed by their grafting onto the chitosan backbone using DMTMM. The structure of the graft copolymers was characterized and the effect of the molecular architecture on the thermo-responsive behavior of the aqueous solutions evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan (Cs) was purchased from IDEBIO S.L., Spain. *N*-vinylcaprolactam (VCL) (Aldrich, 98%), isopropanol (IPA) (Scharlau, 98%) *N,N*-dimethylformamide (Scharlau, 99.5%), thioglycolic acid (TG) (Sigma-Aldrich, 98%), 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM) (Sigma-Aldrich, 96%); acetone analytical grade (Scharlau) were used as received. 4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) (Aldrich, 98%) was purified by recrystallization with ethanol. Throughout all experiments Type 2 pure water with conductivity lower than 0.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was employed.

2.2. Purification of chitosan

Prior to use, chitosan was dissolved in 0.5 M acetic acid solution (0.5 wt%) at room temperature for 1 day. After, the solution was filtered through filter paper (11 μm), precipitated by dropwise addition of 10 wt% sodium hydroxide until pH 8, and carefully washed with water until the conductivity of the mixture was similar to water. The

residual aqueous phase was separated by centrifugation, and the purified chitosan was freeze-dried. The purified chitosan had a $\bar{M}_n = 715$ kDa and PDI = 1.4, as determined by SEC (for details refer to Section 2.10). The degree of *N*-acetylation (DA = 0.15) was determined by ^1H NMR according to the procedure described by Vårum et al.⁶⁷

2.3. Synthesis of PVCL with carboxyl end group

PVCL-COOH was synthesized by controlled radical polymerization in solution. First, a mixture of VCL, TG as a chain transfer agent (CTA), and solvent were added to a sealed flask. The oxygen was removed using three cycles of freeze-vacuum-thaw. Then, the initiator, ACVA, was carefully added to the reaction mixture. The reaction was carried out under nitrogen atmosphere at 60 °C. The conditions of the polymerization varied so as to obtain different molecular sizes as described in Table 1. After a desired time, the reaction mixture was immersed in an ice bath and the polymerization stopped. The product was purified by dialysis using a cellulose membrane with a molecular weight cut-off 3.5 kDa, during 24 h against ethanol, 12 h against water:ethanol mixture (1:1) and 36 h against water to remove the unreacted residues. The product was freeze-dried, recovered and stored at room temperature. The yield of the polymerization reaction was calculated gravimetrically.

Table 1. Conditions of reaction and parameters of controlled polymerization of *N*-vinylcaprolactam with COOH-end group in solution and characteristics of the polymers.

Sample	Solvent	Time (h)	$^{\circ}[\text{VCL}]_i$: $[\text{TG}]_i$: $[\text{ACVA}]_i$	Yield (%)	\bar{M}_n (kDa)	\bar{X}_n	PDI
PVCL-04 ^a	DMF	24	100:2:3	48	4.2	30	1.2
PVCL-13 ^b	DMF	24	100:0:1.5	80	12.7	92	1.5
PVCL-18 ^b	IPA	4	100:0:0.03	51	17.6	126	1.8
PVCL-26 ^b	IPA/water (2:1)	3.5	100:0:0.03	42	26.4	190	2.0
PVCL-47 ^b	IPA/water (1:2)	3.5	100:0:0.03	30	46.6	335	2.2

^a Solution polymerization at 60 °C with $[\text{VCL}]_i = 0.5$ M; the molecular weight and polydispersity index was obtained by MALDI-TOFF.

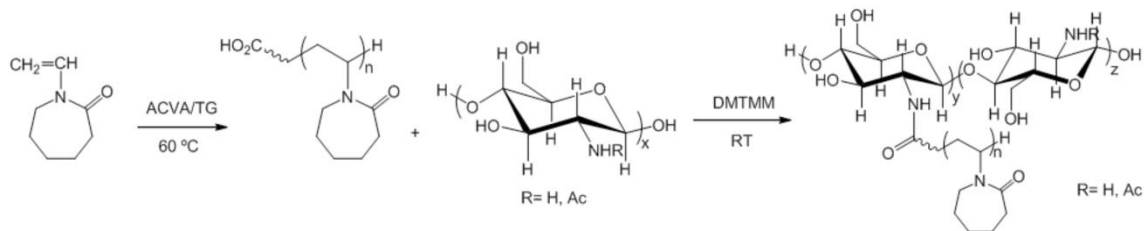
^b Solution polymerization at 60 °C with $[\text{VCL}]_i = 1$ M; the molecular weight and polydispersity index was obtained by SEC-HPLC.

^c VCL: *N*-vinylcaprolactam; TG: thioglycolic acid; ACVA: 4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid).

2.4. Synthesis of chitosan-graft-PVCL copolymers

The graft reaction (Figure 8) was carried out by the amidation of Cs amine groups with PVCL-COOH using DMTMM as activator of carboxylic groups. With this purpose, chitosan solution (110 mM) in 0.5 wt% aqueous HCl was mixed with different amounts of PVCL-COOH and DMTMM (10-fold molar stoichiometric excess), as shown in Table 2. The reaction was stirred at room temperature for 3 days.

Figure 8. Synthesis of Cs-*g*-PVCL copolymer by two steps: a) polymerization of *N*-vinylcaprolactam with carboxyl end group; and b) graft copolymerization onto chitosan with PVCL-COOH. R= -H (85%), -COCH₃ (15%).



Two series of chitosan-*g*-PVCL copolymers were prepared varying the following parameters: (a) length of grafted PVCL chain and (b) spacing between grafted PVCL chains onto chitosan. The former was obtained by grafting samples of PVCL with different number-average degree of polymerization (30, 92, 126 and 190) (see Table 1) onto the chitosan backbone. For the latter, the sample PVCL-26 was grafted onto chitosan varying the stoichiometric ratio with respect to chitosan amine groups. All syntheses were carried out under similar conditions as shown in Table 2. The reaction mixture was precipitated in acetone excess. Finally, the product was purified by Soxhlet extraction with acetone for 48 h. The purified product was dissolved in water and freeze-dried. The conversion (%) of grafted reaction (which indicates the yield of the conjugation) was determined gravimetrically using Eq. (1). The degree of grafting (DG%, which provides the graft copolymer composition from the ratio synthetic polymer/natural polymer) was determined by gravimetry and TGA using Eq. (2).

$$\text{Conversion (\%)} = \frac{W_{GC}}{W_{CS} + W_{PVCL}} * 100 \quad (1)$$

$$\%DG = \frac{W_{GC} - W_{CS}}{W_{CS}} * 100 \quad (2)$$

where W_{GC} , W_{Cs} , W_{PVCL} are the weights of grafted copolymer, chitosan and PVCL-COOH, respectively.

Table 2. Conditions of reaction and graft parameters of the series of Cs-g-PVCL copolymers

Samples ^a	PVCL/Cs feed mass ratio ($\times 10^{-2}$) ^b	Conversion (%) ^c	DG% ^c	DG% ^d
Cs-g-PVCL-04	2	41	12	10
Cs-g-PVCL-13	2	37	12	16
Cs-g-PVCL-18	2	39	16	17
Cs-g-PVCL-26.A	2	40	18	19
Cs-g-PVCL-26.B	1.4	44	13	14
Cs-g-PVCL-26.C	0.8	57	11	13
Cs-g-PVCL-26.D	0.4	74	7	11

^a The graft copolymerization was carried out in 0.5 wt% HCl aqueous solution (0.02 M) at room temperature for 3 days; DMTMM was added at ten-fold molar stoichiometric excess in all cases.

^b PVCL/Cs feed mass ratio employed during the grafting reaction.

^c The values of these graft parameters were obtained gravimetrically.

^d Degree of grafting was measured by TGA.

2.5. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR)

The spectra were recorded on a Varian Mercury-400 (400 MHz) and on a Varian System-500 (500 MHz) spectrophotometer. Chitosan (20 mg mL⁻¹ in DCI/D₂O solution) was recorded at 70 °C, while PVCL-COOH and graft copolymers samples (20 mg mL⁻¹ in D₂O) were recorded at 25 °C. The proton chemical shift of residual water was used as reference. The results were analyzed with MestreNova software (Santiago de Compostela).

2.6. Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra were performed in the attenuated total reflection mode (ATR-FTIR) on a Perkin Elmer Spectrum One FTIR spectrometer. Samples were analyzed at room temperature by 16 scans, using a resolution of 4 cm⁻¹.

2.7. Raman spectroscopy

Raman spectra of the samples were recorded on a Renishaw InVia Reflex Raman spectrometer. An optical microscope was coupled to the system. The Raman scattering was excited using a diode laser at a wavelength of 785 nm and an excitation power of 320 mW. The laser beam was focused on the sample with 50x microscope objective. Raman measurements were carried out for 10s and three accumulations were required.

2.8. UV-visible spectroscopy

The LCST was determined using in a Cary 3 BIO-Varian UV-visible spectrophotometer equipped with a Peltier temperature control device. The analysis was performed using a scanning temperature program. Heating was at 1 °C min⁻¹, from 25 to 60 °C. The absorbance was measured at $\lambda = 450$ nm. Aqueous solutions of PVCL-COOH samples were analyzed at 1, 0.5 and 0.2 wt%. For copolymers, 1.5, 1 and 0.5 wt% aqueous solutions were used. In all cases the solutions had a pH 6.0–6.5. LCST was defined as the incipient temperature of the phase transition of the system during the heating ramp of the aqueous polymer solutions. Heating and cooling cycles were applied.

2.9. Thermogravimetric analysis

TGA was performed on a TGA Q500 (TA instruments). The samples were analyzed in palladium pans in a range of RT to 600 °C by dynamic high-resolution method at 10 °C min⁻¹, under 10 mL min⁻¹ nitrogen flow.

2.10. Size exclusion chromatography (SEC-HPLC)

Determination of molecular weight and its distribution (number-average molecular weight, \bar{M}_n , and polydispersity index, PDI) for PVCL-COOH homopolymer samples were carried out in a Perkin Elmer apparatus equipped with an isocratic pump LC-250 and a refractive index detector series 200. A set of Styragel HR3 and HR5 Waters columns conditioned at 70 °C was used to elute 3 mg mL⁻¹ samples. The mobile phase was *N,N*-dimethylformamide (DMF) with 0.1% of LiBr at a flow of 0.7 mL min⁻¹. Polystyrene standards with molecular weight between 1.2 and 480 kDa were used for calibration.

The measurements by SEC for chitosan were carried out in a Shimadzu 20A. A set of Agilent PL Aquagel-OH (30, 40 and 50) columns connected in series (300 x 7.5 mm and particle size of 8 μm) and conditioned at 28 °C was used to elute 2 mg mL⁻¹ samples. Aqueous acetic acid solution (pH 3) was used as the mobile phase at a flow of 1 mL min⁻¹. Calibration of SEC was carried out with pullulan polysaccharide standards (molecular weight between 0.18 and 708 kDa, Polymer Laboratories) with sample injection volumes of 50 μL .

2.11. Mass spectrometry

The sample PVCL-04 was analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Measurements were performed on a Voyager DE-PRO mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a pulsed nitrogen laser ($\lambda = 337$ nm, pulse width 3 ns, and frequency 3 Hz) and a delayed extraction ion source. Ions generated by laser desorption were introduced into a time of flight analyzer (1.3 m flight path) with an acceleration voltage of 25 kV, 94% grid voltage, 0.075% ion guide wire voltage, and a delay time of 400 ns in the linear positive ion mode.

2.12. Calorimetric measurements

The samples were analyzed in a micro-DSC-IIIa (Setaram, France). The thermoreversible behavior of the solutions (10 wt% in water) during three heating-cooling cycles was analyzed between 10 and 75 °C with a scanning rate of 0.6 °C min⁻¹. Standard Hastelloy vessels were used with 650 μL sample volume approximately. Water was used as reference. The same mass of sample and reference were weighed to minimize the differences in heat capacities between them. The samples were equilibrated at 10 and 75 °C for 60 min before each scan.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of PVCL-COOH

The functionalized PVCL homopolymers were obtained by controlled radical polymerization in solution. The chain dimension of macromolecules produced by a free radical addition polymerization can be controlled easily adjusting the reaction temperature, the concentration of initiator or the presence of chain transfer agents (solvents, reactants). In addition, if a free radical initiator bearing a given functional group is used, the obtained macromolecules will exhibit the functional group at the end of the polymeric chain. This is the case of the application of ACVA as a free radical initiator, which will give macromolecules with a carboxylic end group. This compound was employed to obtain a series of PVCL-COOH homopolymers of varying number-average of monomeric units (\bar{X}_n) by controlled radical polymerization.³⁹ To this end, different solvents, or mixture of solvents, were used to control the molecular weight of the functionalized macromolecules.

The results of \bar{M}_n , PDI, and \bar{X}_n are shown in the Table 1. Particularly, the \bar{M}_n and PDI of the PVCL-04, was determined by SEC-HPLC and confirmed by MALDI-TOFF. Thus, as it is shown in Scheme 1 considering the transfer effect of IPA, PVCL of \bar{M}_n of 17.6, 26.4 and 46.6 kDa were obtained using pure IPA (PVCL-18), or a mixture of IPA:water (ratio 2:1 for PVCL-26 and ratio 1:2 for PVCL-47), respectively. According to the data in Table 1, as it was expected, the increasing concentration of IPA, gives a clear decreasing of the average molecular weight of the obtained polymer, with a polydispersity index corresponding to a classical free radical mechanism. It has been observed that the free radical polymerization of VCL in IPA deviates from the classical first order kinetics, indicating the existence of chain-transfer to solvent, with a relatively small constant.⁸⁶ Under these conditions, it has been demonstrated that IPA controls the molecular weight of the growing VCL macroradical. Hydrogen bonding of the monomer with the solvent seems to cause the presence of free and solvated monomer species differing in the polarization of the double bond.⁸⁶ As far as the IPA/water mixed systems is concerned, the PVCL growing chains are phase separated during the polymerization reaction, giving rise to samples with higher molecular weights.

In order to obtain PVCL of lower molecular weight, a good solvent of both monomer and corresponding polymer was employed, i.e. N,N-dimethylformamide (DMF), and a second alternative was the addition of small amounts of thioglycolic acid, as a chain transfer agent. The presence of this transfer agent effectively controlled the molecular size as it is shown in Table 1, giving a polydispersity index that approaches to the unity for the PVCL-04 homopolymer, and confirming that, in fact, the transfer agent controls the termination step of the free radical polymerization process.

Table 1 also shows the effect of the concentration of the initiator in the reaction. As it was expected, samples with moderate molecular weights were obtained with increasing concentration of ACVA, thus confirming that this parameter plays an important role in the control of molecular size. The results of yields are also shown in the Table 1. In general, the applied strategy of syntheses gives acceptable results in terms of yield and molecular dispersity, which are consistent with previous reports.^{39,51,52,87}

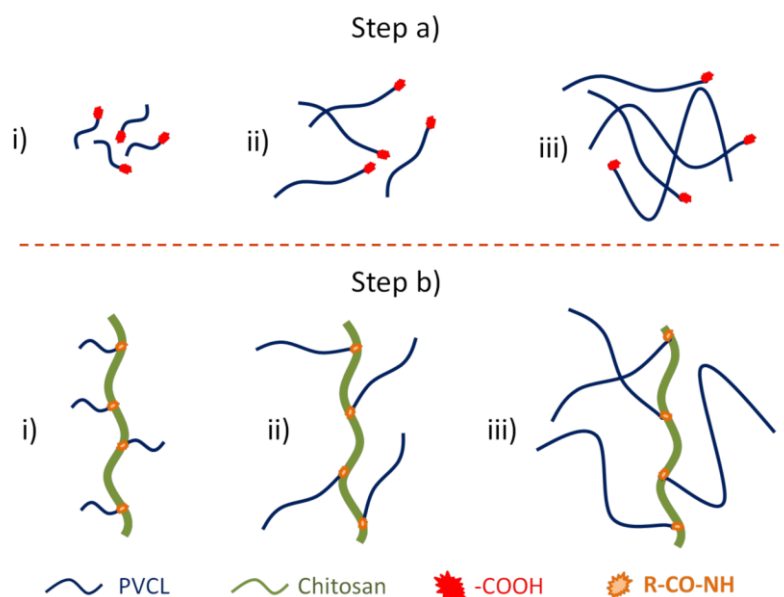
3.2. Synthesis of chitosan-graft-PVCL copolymer

The syntheses of the graft copolymers (Figure 9) were performed by amidation reaction between carboxyl groups of PVCL-COOH and the amine moieties of chitosan, using DMTMM as coupling activator of the carboxylic acid group. This agent selectively promotes the formation of the amide bond in aqueous solution. The mechanism of this reaction is thought to be initiated by addition of a carboxylate anion to DMTMM to give an activated ester, which undergoes attack by an amine to give the corresponding amide.^{88,89} This activator has successfully been used for the chemical modification of polymers, but, to the best of our knowledge, this is the first time that it is used for coupling poly(*N*-vinylcaprolactam) onto chitosan. Blank experiments were carried out under the same conditions but in absence of PVCL. The viscosity of the solution of the obtained product was measured

In several studies, the grafting reaction between chitosan and PVCL has been performed using acetic acid (1 wt% aq.) as solvent.^{79–83} According to experiments carried out in our laboratory, the carboxylic group of the acetic acid would compete with the carboxylic acid end groups of the PVCL in the amidation reaction, and hence could

limit the efficiency of the graft copolymerization. In order to circumvent this caveat, the reaction was carried out in aqueous dilute HCl.

Figure 9. Steps in the general approach of the synthesis of the Cs-g-PVCL copolymer. (a) Synthesis of PVCL-COOH of different chain length; and (b) Graft of the PVCL-COOH onto the chitosan chains.



The molecular architecture of the graft copolymers was studied by analysis of two variables, namely, the grafted chain length and the spacing between grafted PVCL chains. Functionalized PVCL-COOH homopolymers of distinct molecular weight (4.2, 12.7, 17.6 and 26.4 kDa) were grafted onto the chitosan backbone in order to tailor the thermosensitive behavior of the final materials. On the other hand, the Cs-g-PVCL-26 system was selected for the further preparation of graft copolymers with different spacing between grafted PVCL chains.

Interestingly, all the Cs-g-PVCL copolymers were easily soluble in water at neutral pH and at room temperature (concentrations up to 10 wt%). On the one hand, this important finding corroborates the presence of the PVCL chains in the graft copolymer due to the fact that chitosan per se requires an acidic pH to be dissolved in aqueous solutions. It should be remembered that due to its polyelectrolyte character, chitosan gives highly viscous solutions in water at acidic pH. On the other hand, from a thermodynamic point of view, this fact suggests a significant improvement of the

copolymer solvation via hydrogen bonding between PVCL-nitrogen unshared electron pair and water molecules. A better polymer-solvent interaction induces higher entropy of mixing giving rise to the dissolution of the macromolecule. In other words, the favorable change in the hydrophilic-hydrophobic balance promoted by a considerable number of grafted PVCL chains is at the origin of the water solubility of Cs-g-PVCL at neutral pH. This property could be of considerable interest for biomedical applications, where it is important to keep a pH near to the physiological one.

Table 2 contains the results of the graft parameters obtained gravimetrically for each series of copolymers. The conversion values were around 40%, independently of the grafted chain length. In the Cs-g-PVCL-26 system, an increase of the conversion as the amount of PVCL added to the reaction decreases was observed. As far as DG% is concerned, values of this parameter indicate that the PVCL was grafted onto the chitosan backbone in the range 7-19 wt%. The degree of grafting proportionally increased with the chain length of the grafted PVCL and with the initial PVCL/Cs mass ratio, as expected.

3.3. *Physical-chemical characterization*

The effective formation of amide bonding between PVCL-COOH and chitosan was confirmed by FTIR, Raman and ^1H NMR spectroscopic analysis. All the graft copolymers showed similar patterns in their spectra recorded by the different techniques, regardless of the chain length of the grafted PVCL and of the initial PVCL/Cs mass ratio used in the reaction. Then, PVCL-26 and Cs-g-PVCL-26 samples were taken as representative examples of the PVCL-COOH homopolymer and graft copolymer families respectively, hereinafter.

FTIR spectra of the Cs, PVCL-26 and Cs-g-PVCL-26.A are shown in Fig. 10. It could be appreciated that Cs shows bands centered at 1653 cm^{-1} (amide I, due to the C=O stretching vibration for aliphatic primary amides), 1578 cm^{-1} (amide II, due to the –N-H deformation vibration), 1417 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$, bending), 1375 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$, symmetrical deformation vibration), 1320 cm^{-1} (amide III, due to C-N stretching vibration), 1152 cm^{-1} (C-O-C, asymmetric strength vibration), 1075 and 1030 cm^{-1} (vibration of the pyranose structure). Meanwhile, the characteristic bands of the PVCL-COOH homopolymer are

located at 1630 cm^{-1} (amide I band), 1480 cm^{-1} (C-N stretching), 1442 cm^{-1} (C-H deformational band), 840 cm^{-1} (C-N stretching) and 716 cm^{-1} (out-of-plane N-H deformation vibration).⁹⁰

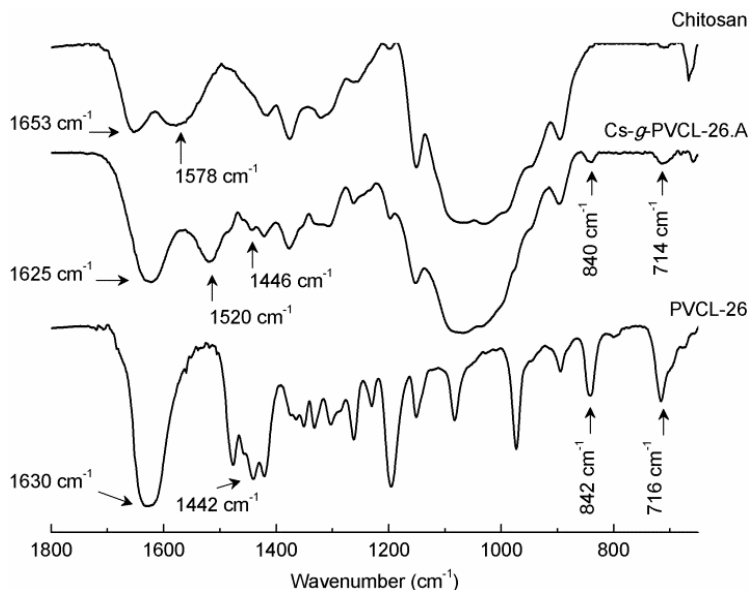


Figure 10. FTIR spectra in the region $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ of PVCL-26, chitosan and Cs-*g*-PVCL-26.A.

All these characteristic bands of Cs and PVCL were also observed in the spectra of the graft copolymers, albeit with some modifications. A detailed analysis of the FTIR spectrum allows identifying a shift to lower wavenumber of several bands in the Cs-*g*-PVCL-26.A copolymer with respect to those of the Cs (Fig. 10). In particular, the amide I and II bands located at 1625 and 1520 cm^{-1} in the Cs-*g*-PVCL-26.A spectrum are indicative of the formation of new amide bonds between the terminal carboxylic group of PVCL and the amine moieties of chitosan.⁹⁰

The bands in the range $900\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ of the infrared spectra are of weak intensity typical for amide groups. As far as Raman spectra is concerned, secondary aliphatic amides usually present a strong polarized band at this region due to the symmetrical C-N-C stretching vibration. Raman spectra of PVCL-26, chitosan and Cs-*g*-PVCL-26.A are shown in Fig. 11. On the one hand, PVCL-26 displays the characteristic bands at 845 cm^{-1} (C-N stretching), 800 cm^{-1} (N-H wagging vibration) and 700 cm^{-1} (out-of-plane N-H deformation vibration). These bands appear in the Raman spectrum of the graft copolymer. On the other hand, in the Raman spectra of chitosan and Cs-*g*-PVCL-26.A

there is a band at 893 cm^{-1} due to *D*-glucopyranose ring stretching. Thus, the Raman spectra are concurrent with the formation of amide bonds.⁹¹

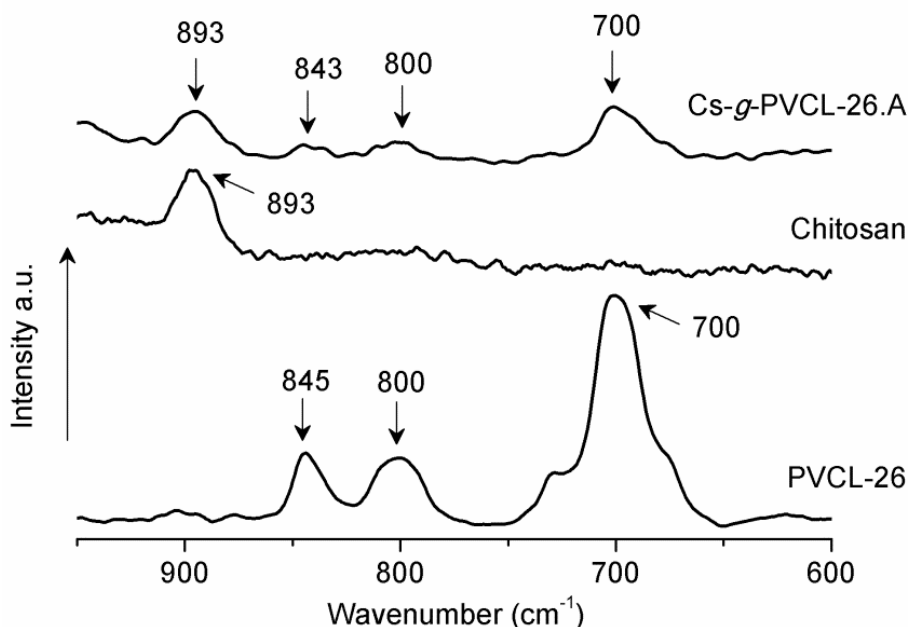


Figure 11. Raman spectra in the region $1000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ of PVCL-26, chitosan and Cs-*g*-PVCL-26.A.

The ^1H NMR spectra of Cs, PVCL-26 and Cs-*g*-PVCL-26.A are shown in the Fig. 12. Chitosan spectrum exhibits peaks corresponding to the protons of *N*-acetyl unit at 1.92 ppm; the resonances due to *N*-glucosamine residue are observed at 3.18 ppm (1H, at H-2) and at 4.85 (1H, due to the H-1); a multiplet between 3.50 and 4.00 ppm is attributed to H-2/H-6 of the chitosan backbone. PVCL-26 spectrum exhibits a multiplet between 1.20 - 1.81 ppm (assigned to 6H of $-\text{CH}_2-$ of the caprolactam ring and 2H of $-\text{CH}_2-$ of the polymer backbone), a multiplet between 2.22-2.61 ppm (2H, $-\text{COCH}_2-$), a broad singlet at 3.20 ppm (2H, $-\text{NCH}_2-$) and at 4.65 ppm (1H, $-\text{NCH}-$). Notice that there is also a signal at 10.20 ppm demonstrative of carboxylic terminal group of PCVL-COOH. The latter is absent from the copolymer spectrum confirming the grafting reaction. Moreover, the ^1H NMR spectrum of graft copolymers showed the characteristic signals of both, chitosan and PVCL-COOH as mentioned above. The intensity of the signals associated to PVCL protons in the ^1H NMR spectra on both series of copolymer samples (see ESI, Fig. 18 and 19), follows the same trend as those of DG% obtained gravimetrically, that is, they increased with the length of grafted PVCL chain and decreased with the spacing between grafted PVCL chains.

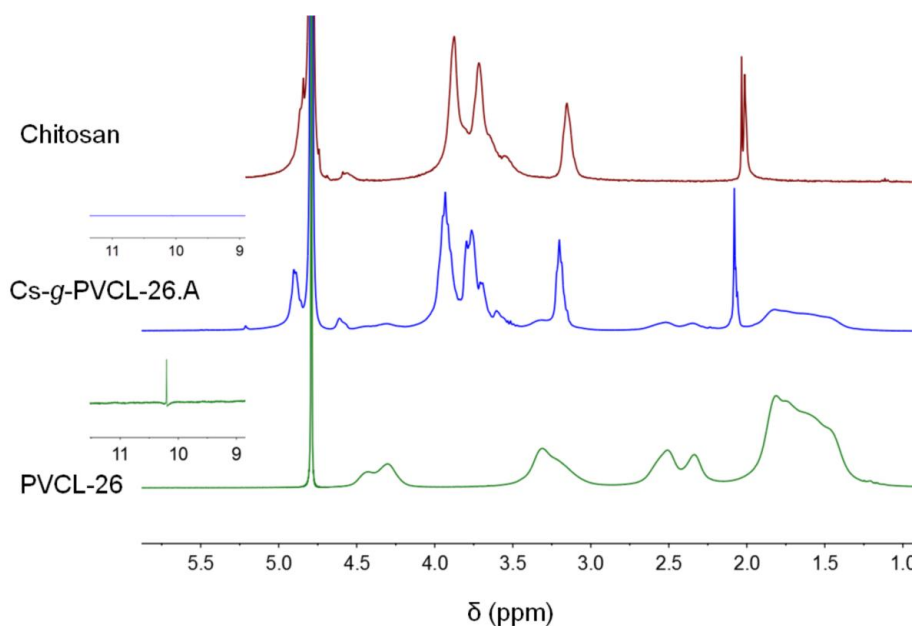


Figure 12. ^1H NMR spectra of chitosan (dissolved in DCl at 70 °C), PVCL-26 and Cs-*g*-PVCL-26.A (dissolved in D₂O at 30 °C).

Thermogravimetric (TG) and differential thermogravimetric (DTG) curves for Cs, PVCL-26 and Cs-*g*-PVCL-26.A are shown in Fig. 13. The thermogram of the Cs exhibits three different steps. The former occurs below 130 °C, which is associated with the loss of water by evaporation (6%). The second thermal step takes place with maximum decomposition rate at 313 °C. It has been associated with the dehydration of the saccharide rings, depolymerization and decomposition of molecular units of the chitosan chain.⁹² On the other side, PVCL homopolymer is thermally degraded in almost one step between 320 and 460 °C with a maximum rate at 406 °C (98%). It has been suggested that this sharp weight loss is due to the thermal depolymerization of the PVCL.⁹³ Other PVCL-COOH samples showed the same degradation pattern irrespective of its chain length, and are omitted from the figure.

In the case of the Cs-*g*-PVCL-26.A copolymer, three different steps of degradation were observed in the TG analysis. The first weight loss, below 130 °C, is not degradation itself and is associated with the loss of water (10%). The degradation step in the range 160-290 °C, with maximum rate at 236 °C has been ascribed to the deacetylation moieties of chitosan. The maximum degradation rate in this thermal step appears 60 °C lower than that of pristine chitosan. The decrease of the thermal stability is typical for chemically modified chitosan.^{75,76} This can be attributed to the decrease of

cooperative H-bonding along the chitosan backbone as a result of the PVCL grafting onto the glucosamine moieties of the chitosan. Hence, the thermal stability of the copolymer is strongly influenced by the degree of grafting.⁷⁷ The last thermal degradation of the copolymer is in the range 370-470 °C, with a maximum degradation rate at 410 °C and corresponds to the pyrolysis of the grafted PVCL chains. The mass loss in this range is dependent on the grafted chain length and the spacing between grafted PVCL chains, which oscillates between 10 and 19 wt%.

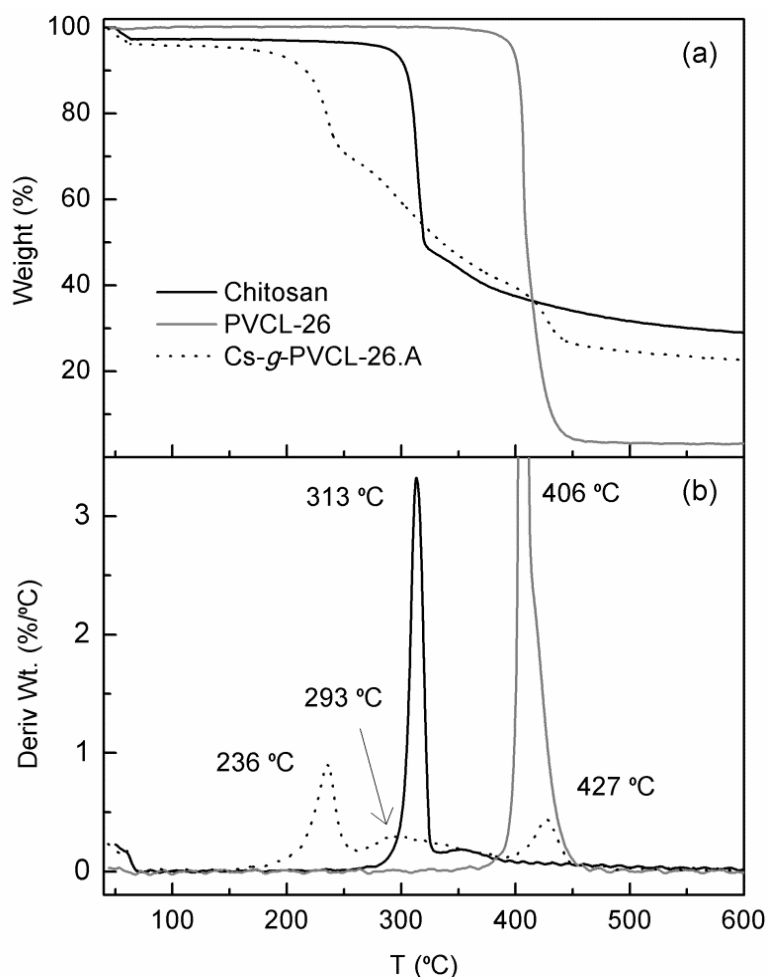


Figure 13. Thermogravimetric (a) and differential termogravimetric (b) curves of PVCL-26, chitosan and a Cs-g-PVCL-26.A copolymer.

The DG% was determined assuming that the PVCL decomposes above 320 °C and that all the studied Cs-g-PVCL systems presented a second step of degradation in the range 370-470 °C. The results are in agreement with those determined gravimetrically for all prepared copolymers, given values between 7-19 wt% (Table 2).

3.4. Turbidimetric measurements

Despite the apparent similarities among various temperature-responsive water-soluble polymers, three types of LCST behavior can be distinguished according to their critical miscibility behaviors. Type I follows the classical Flory-Huggins miscibility behavior; that is, by increasing the chain length of the polymer, the position of the critical point shifts toward lower concentration (θ -condition). Type II has the critical points independent of the polymer chain length. Type III is characterized by one zero limiting critical concentration and two off-zero limiting critical concentrations.⁴⁸ According to previous studies, PVCL solutions present Type I classical Flory-Huggins behavior, as the LCST is chain-length dependent.^{40,48,51} In this sense, the thermoresponsive behavior of PVCL varies with the polymer molecular weight and its concentration. Thus, for studying the effect of these two parameters on the thermal properties of the PVCL solutions, samples with different molecular weight at various concentrations, were investigated using turbidimetry. This technique allows observing the incipient phase separation.

Fig. 14a shows the curves of heating scan for PVCL-26 solutions in water at concentrations up to 1 wt%. It could be observed that the LCST slightly decreases as the polymer concentration increases. The transition is well defined up to 0.2 wt% but, it becomes more diffuse below of this concentration (data not shown). Thus, hereinafter all experiments were carried out with 1 wt% aqueous polymer solutions. The correlation between LCST and solution concentration for PVCL-26 is shown inside Fig. 14a. The variation of LCST with decreasing concentration is narrower, between 38 and 36 °C. Similar results were obtained for the other polymers studied in this work.

The results of the turbidimetric behavior of aqueous solution of PVCL-COOH samples with different molecular weight ($\bar{M}_n = 4.2, 12.7, 17.6, 26.4$ and 46.6 kDa) are presented in Fig. 14b. It could be appreciated that as the molar mass increases, the LCST of the polymeric solutions decreases. A detailed analysis of the transition profile of these samples allows distinguishing that the effect of the chain length of the PVCL on the LCST values is slightly more drastic below 17.6 kDa. Thus, as the molar mass is greater, the transition is sharper and the absorbance achieved is bigger. The inset in Fig. 14b shows the dependence of the LCST with the number-average molecular weight. It can be drawn from this curve that the molecular weight of 17.6 kDa ($\bar{X}_n \cong$

126) is a critical molecular size above which the reduction of LCST with \bar{M}_n shows almost no variation. This phenomenon can be attributed to the fact that increasing the PVCL chain length, the polymer-polymer interactions become more and more cooperative. As a result, longer hydrophobic segments appear thus favoring polymer-polymer long-range interactions giving rise to phase separation phenomena at lower temperatures. The typical abrupt change in the turbidimetric traces as function of temperature is also an evidence of the cooperative nature of the phase transition phenomenon. Therefore, we can conclude that molecular weight of PVCL can be considered an efficient tool to modulate the LCST of this polymer. In general, the values of LCST of our homopolymers agree well with others previously reported.⁴⁸

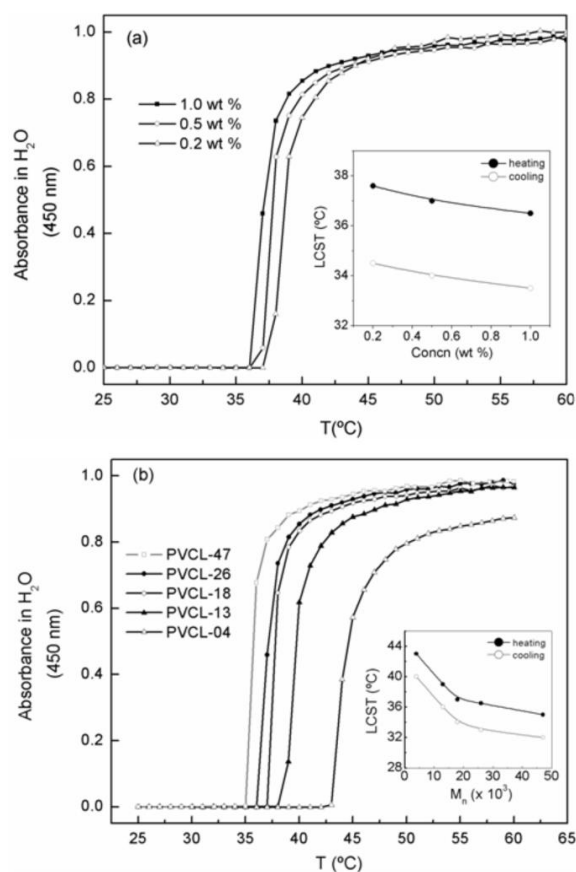


Figure 14. Variation of the absorbance of aqueous solutions of PVCL-COOH for different: (a) concentration (PVCL-26 at 0.2, 0.5 and 1 wt%); (b) number-average molecular weight (PVCL-COOH samples with \bar{M}_n 4, 13, 18, 26 and 47 kDa at 1 wt%). Heating rate: 1 °C min⁻¹, $\lambda = 450$ nm. The insets in panels (a) and (b) show the dependence of LCST values on polymer concentration and \bar{M}_n of homopolymer, respectively.

In order to corroborate the reversible behavior in the thermal properties of the PVCL homopolymers in solution, cooling cycles were carried out in all samples. The transition profiles of the PVCL-COOH samples were similar in both heating and cooling cycles, giving LCST values close to each other ($\Delta T \sim 3 \text{ }^\circ\text{C}$) (data are shown inside Fig. 14b), indicating a process with moderate hysteresis, regardless of the polymer chain length and the concentration of the dissolution. This behavior has been reported on PVCL systems, and does not seem to be a consequence of the thermal lag inherent to the heating/cooling rate.³² For poly(N-isopropyl acrylamide), hysteresis has been explained in terms of intrachain contraction due to dehydration, which facilitates the formation of the hydrogen bonding between C=O groups and H-N groups at temperatures higher than the LCST, remaining some of them during the cooling process, even when the temperature is below the LCST, and the chain dissociation only occurred when the temperature is much lower than the LCST.⁹⁴ However, for PVCL macromolecules, such hydrogen bonding is not possible due to the presence of secondary amide groups. Moreover, PVCL has a reduced number of conformational changes due to topological constraints of the caprolactam rings as compared with poly(N-isopropyl acrylamide). These two facts could be the cause of its moderate hysteresis.³² This behavior of PVCL can be considered an advantage of this thermoresponsive polymer for biomedical applications.

The Fig 15a shows the curves of heating scans for Cs-g-PVCL-18 aqueous solutions at different concentrations (1.5, 1 and 0.5 wt%). Similarly to the thermal behavior of the homopolymer, as the concentration increases, the LCST of the Cs-g-PVCL-18 solution slightly decreases. The dependence of the LCST on the copolymer concentration is plotted inside Fig. 15a, showing an almost linear decrement of the LCST as the concentration of the polymer solution decreases, with LCST values between 38 and 40 $^\circ\text{C}$. This behavior is also noticeable for the samples with different molar mass (results not shown).

The turbidimetric curves (heating scans) of the aqueous solutions of the copolymer (1.5 wt%), grafted with samples of PVCL with different \bar{M}_n are showed in Fig. 15b. The transition profile of the graft copolymer dissolutions approaches that of the corresponding homopolymer, except for the Cs-g-PVCL-04 sample, for which the transition profile presents a more diffuse pattern. A detailed analysis of these profiles

allows observing a sharper transition as the length of the grafted PVCL chain grows. This phenomenon is in agreement with the thermal transition of the corresponding PVCL homopolymer solutions. It can be observed how the LCST of the solutions slightly decreases as the grafted PVCL chain length increases.

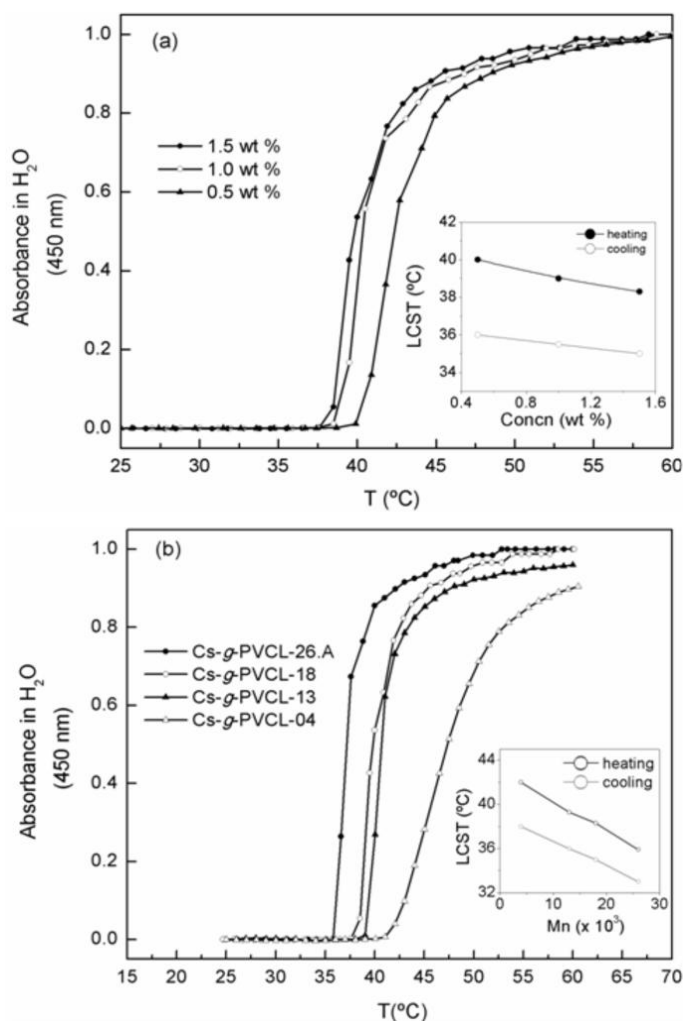


Figure 15. Variation of the absorbance of aqueous solutions of Cs-g-PVCL copolymers for different: (a) concentration (Cs-g-PVCL-18 at 0.5, 1.0 and 1.5 wt%); (b) number-average molecular weight of grafted PVCL chains (Cs-g-PVCL samples with \bar{M}_n 4, 13, 18, 26 and 47 kDa at 1.5 wt%). Heating rate: 1 °C min⁻¹, λ = 450 nm. The insets in panels (a) and (b) show the dependence of LCST values on polymer concentration and \bar{M}_n of grafted PVCL chains, respectively.

Fig. 15b exhibits a linear decrement of LCST as the grafted chain length increases, a similar behavior to that observed for homopolymer solutions. In this case, the LCST

values are in the range 36–42 °C, which are similar as those obtained for the corresponding PVCL homopolymer solutions. This finding makes it clear that the thermoresponsive behavior of PVCL is kept after its grafting onto the chitosan chain, regardless of PVCL molecular weight, affording the chitosan graft copolymers with this thermoresponsive property. A detailed examination of the turbidimetric traces of copolymer solutions (Fig. 15b), allows appreciating that as the PVCL chains are longer, the phase transition is sharper. This phenomenon is in agreement with the thermal behavior observed for the corresponding PVCL homopolymer solutions.

The dependence of the LCST on the length of grafted PVCL chains reflects the cooperativeness of the phase transition of the copolymer solutions. Nevertheless, contrary to what was observed for the PVCL solutions, here a critical chain length is not detected, at least within the analyzed PVCL molecular weight interval. This is a direct consequence of the limited cooperativeness between PVCL chains due to the larger distances imposed by their chemical binding to the chitosan chain ($\bar{X}_n \cong 4300$).

With the aim to confirm this phenomenon, complementary experiments were carried out to elucidate the effect of the spacing between grafted PVCL chains on the nature of the phase transition temperature. Fig. 16 shows the thermal behavior of solutions of Cs-g-PVCL-26 samples with different distances between grafted PVCL chains along the chitosan backbone. It could be noticed that when the spacing between grafted chains is shorter, the transition is sharper. As the grafted PVCL chains become closer, the LCST of the graft copolymer decreases, reaching –for the sample with the lowest distance between grafted chains– the LCST of the corresponding homopolymer, PVCL-26. These results fully agree with the cooperative nature of the phase transition of Cs-g-PVCL solutions, where larger adjacent hydrophobic interactions are rapidly developed when the dehydration of PVCL units takes place as the temperature increases.

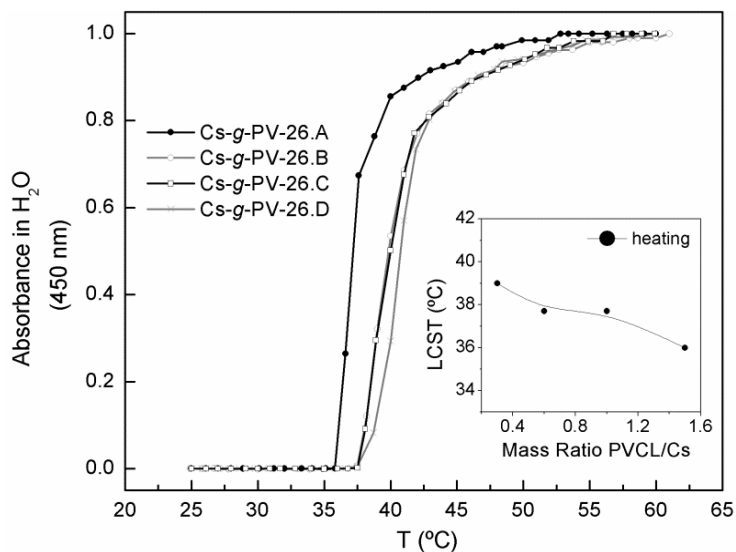


Figure 16. Variation of the absorbance of 1.5 wt% aqueous solutions of Cs-g-PV-26.A, Cs-g-PV-26.B and Cs-g-PV-26.C and Cs-g-PV-26.D copolymers (heating rate: 1 °C min⁻¹, $\lambda = 450$ nm). The inset shows the dependence of LCST values on PVCL/Cs mass ratio.

3.5. Calorimetric measurements

A microcalorimetric study was performed in order to investigate the effect of the spacing between grafted PVCL chains along the chitosan backbone on the thermal transition of the dissolutions of the Cs-g-PVCL-26 system (Fig. 17). In all analyzed samples, it could be noticed that the phase transition is manifested by endothermic peaks between 30 and 34 °C, with different calorimetric enthalpies associated. Comparable exothermic peaks were obtained for each copolymer sample during cooling (curves not shown), making clear that the phase transition is fully reversible.

It could be noticed that as the grafted PVCL chains are closer, the temperature of the phase transition is shifted to lower temperatures and the value of the associated enthalpy change becomes greater. It could be also observed that the sharpness of the calorimetric traces increases with the closeness between grafted PVCL chains. It is obvious that as the spacing between grafted chains is smaller, the phase transition is more cooperative, thus facilitating the hydrophobic intercatenary interactions between PVCL chain segments during the dehydration process at the critical temperature. From a thermodynamic point of view, the phase transition produces a loss of conformational

entropy due to the aggregation of PVCL chain segments. This phenomenon must be counterbalanced by the translational-entropy gain when water molecules are expelled out from the excluded volume of PVCL macromolecules during phase separation. Thus, the larger the hydrophobic portions are, the greater the entropy gain is, which explains why the cooperative hydrophobic interactions are favored when the PVCL chains are closer in space.

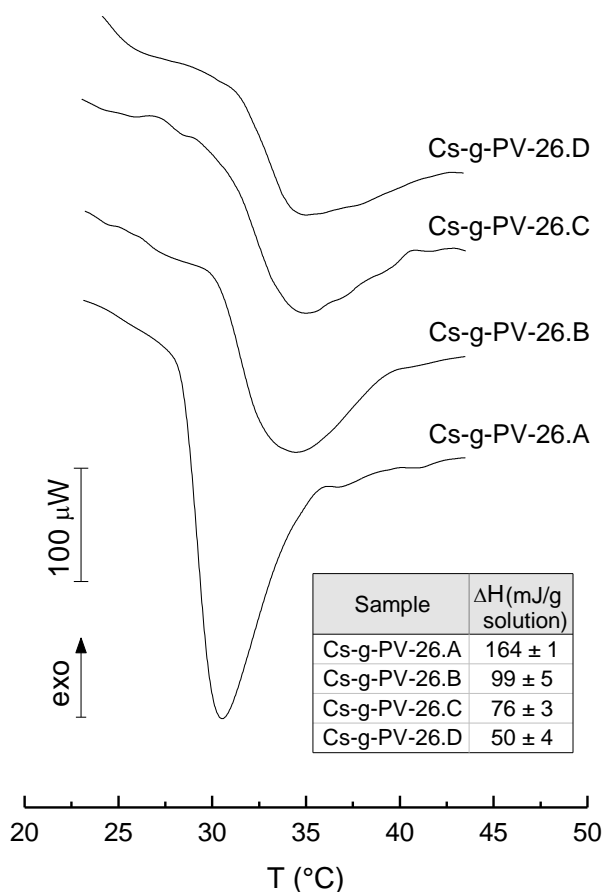


Figure 17. Heating DSC scans of 10 wt% aqueous solutions of Cs-g-PV-26.A, Cs-g-PV-26.B, Cs-g-PV-26.C and Cs-g-PV-26.D samples (heating rate: $0.6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, reference: water).

4. Conclusions

Poly(*N*-vinylcaprolactam) with a functional carboxylic group at the end of the macromolecules was prepared using a classical free radical mechanism with 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) in IPA/water mixture, providing different PVCL chain length according to the transfer effect of the IPA in the propagation step. Also the presence of

thioglycolic acid provided polymeric systems with relatively low molecular weight and low polydispersity index, which demonstrates the control of the polymer dimensions by the transfer agent. Functionalized PVCL polymers were grafted onto chitosan through the activation of the terminal carboxylic group by an active catalytic agent for amidation reaction.

Cs-*g*-PVCL copolymers were prepared with variable grafted chain length. The obtained products were water-soluble at low temperature but they phase separate upon increasing temperature and re-dissolve upon cooling. The thermal behavior of the copolymer was dependent on the grafted chain length and the spacing between grafted PVCL. In general, the LCST of graft copolymer solutions was close to the transition of the corresponding homopolymer. According with the employed methodology, it is possible to obtain graft efficiency higher than 37% regardless of the length of grafted PVCL chains of the spacing between them.

These thermosensitive systems offer very interesting properties for the development of “smart” drug controlled delivery systems as well as active supports for tissue engineering and regenerative medicine.

Acknowledgements

D. F-Q acknowledges CONACyT for his scholarship for PhD studies (325951) and to the Institute of Polymer Science and Technology (ICTP) of the Spanish National Research Council (CSIC) in Madrid, Spain, especially the Biomaterials Group for funding this research. Authors thank CIBER-BBN for financial support.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY DATA

Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam)

Daniel Fernández-Quiroz, Álvaro González-Gómez, Jaime Lizardi-Mendoza, Blanca Vázquez-Lasa, Francisco M. Goycoolea, Julio San Román, Waldo M. Argüelles-Monal*

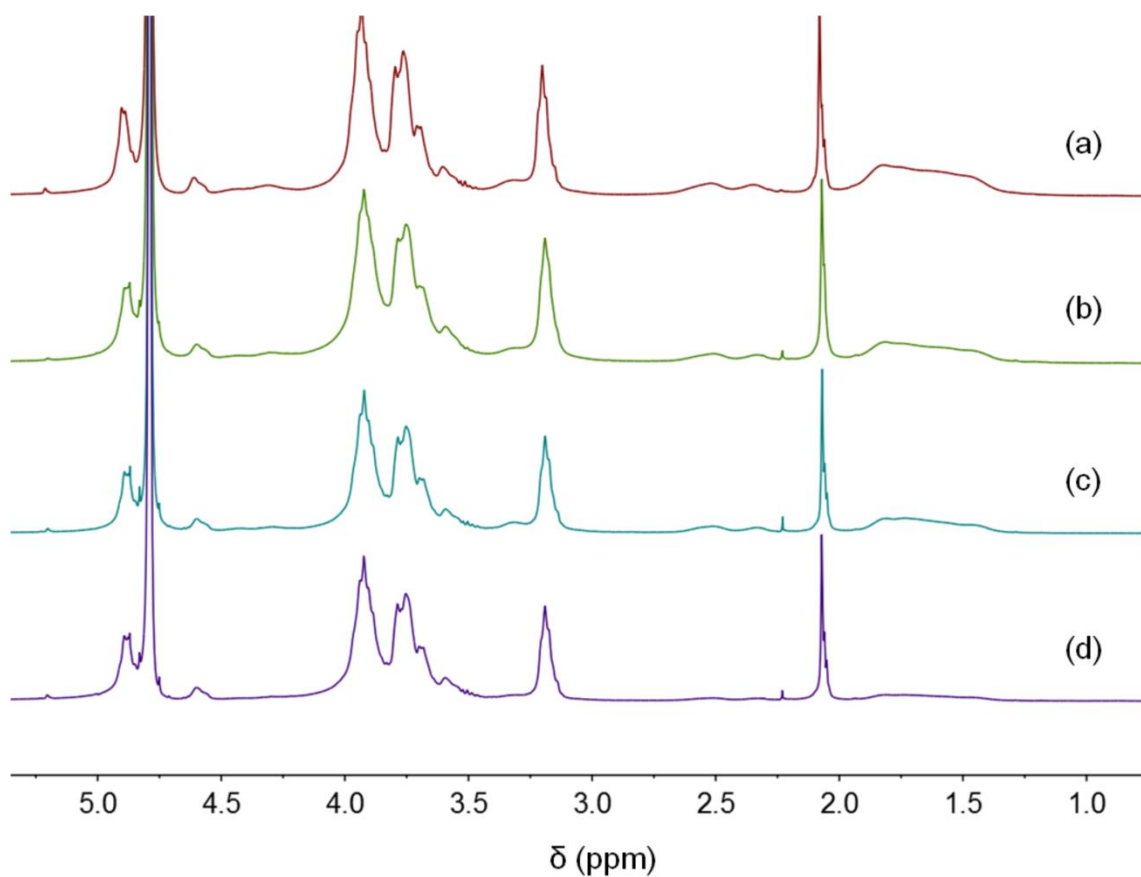


Figure 18. ^1H NMR (500 MHz) spectra of (a) Cs-*g*-PVCL-26.A, (b) Cs-*g*-PVCL-18, (c) Cs-*g*-PVCL-13 and (d) Cs-*g*-PVCL-04 (D_2O at 25 °C).

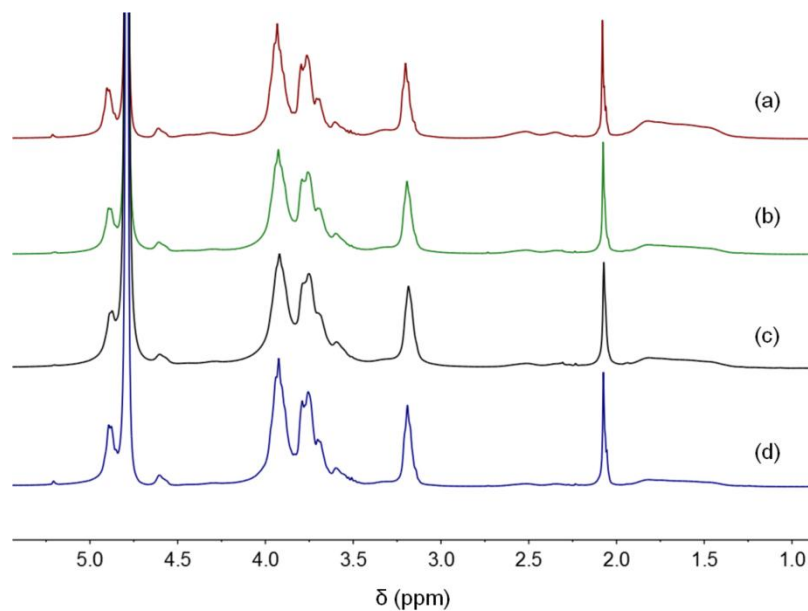


Figure 19. ¹H NMR (500 MHz) spectra of (a) Cs-*g*-PVCL-26.A, (b) Cs-*g*-PVCL-26.B, (c) Cs-*g*-PVCL-26.C and (d) Cs-*g*-PVCL-26.D (D₂O at 25 °C).

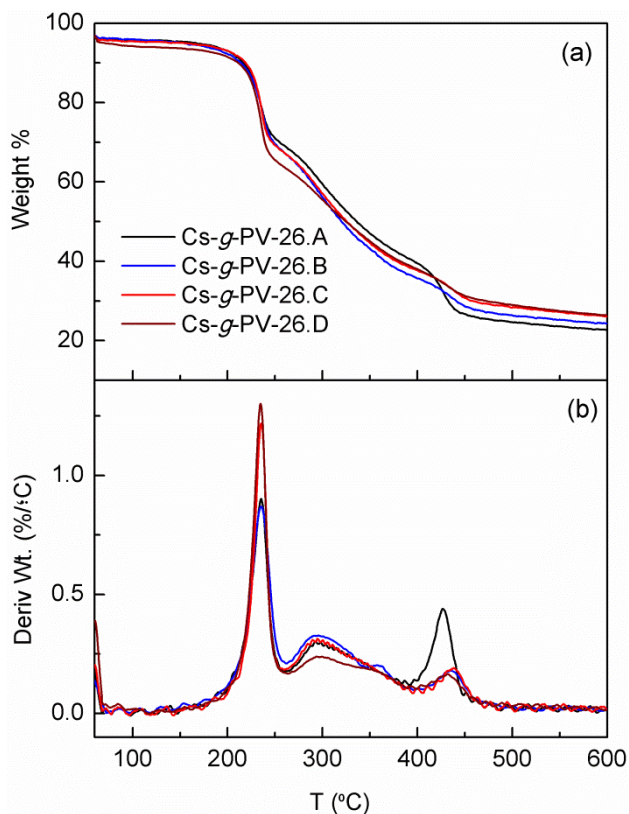


Figure 20. Thermogravimetric (a) and differential thermogravimetric (b) curves of Cs-*g*-PVCL-26.A, Cs-*g*-PVCL-26.B, Cs-*g*-PVCL-26.C and Cs-*g*-PVCL-26.D, identified by colors as shown in the figure.

4.2 Conformational Study on Thermal Transition of Chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam) in Aqueous Solutions

Daniel Fernández-Quiroz,¹ Álvaro González-Gómez,² Jaime Lizardi-Mendoza,³ Blanca Vázquez-Lasa,² Francisco M. Goycoolea,^{3,4} Julio San Román,² Waldo M. Argüelles-Monal^{*,1}

¹CIAD – Guaymas, Carret. al Varadero Nacional km 6.6, Guaymas, Sonora 85480, Mexico. ²ICTP-CSIC c/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid and CIBER, Health Institute Carlos III. C/ Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain. ³CIAD – Hermosillo, Carret. a la Victoria km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, Mexico. ⁴Westfälische Wilhelms Universität Münster; IBBP; Schlossgarten 3; D-48149, Münster, Germany.

Key words: Chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam); Conformational transition; Dynamic light scattering; ζ -potential; Ionic strength; pH effect.

* Corresponding author: Tel +52 (622) 2252829, fax: +52 622 225 2820. e-mail adress: waldo@ciad.mx

ABSTRACT

Conformational changes of the thermal transitions of a series of the chitosan-*graft*-poly(*N*-vinylcaprolactam) copolymers in aqueous solution were studied by varying of the length of the grafted PVCL chains, as well as the ionic strength and the pH of the solution. The conformational properties of the copolymer were monitored by means of dynamic light scattering and ζ -potential measurements. Obtained results point-out that hydrophobic hydration plays a crucial role on the solubility of this copolymer at neutral and slightly alkaline solutions. The evolution of the size of macromolecular aggregates indicates that in the coil state there is a monomodal distribution, passing through a bimodal distribution in the pre-transition region, just before the phase separation. The role of the charge of the copolymers on the cooperative transition is also analyzed. The phase transition of these amphiphilic copolymers shows a strong dependence on the ionic strength of the solution.

INTRODUCTION

Thermosensitive water-soluble polymers are a kind of smart polymers capable of undergoing a phase transition in aqueous solutions in response to variation of the temperature. The amphiphilic structure of these materials contributes to exhibit abrupt changes in the conformational state of these macromolecules in solution upon heating, such as coil-to-globule transition, micellization, liquid-liquid phase separation, gelation and others.^{7,46,72} The thermal transition is usually accompanied by the modification in the hydrophilic-hydrophobic balance between polymer chains.

The solution of the amphiphilic polymers in water, at room temperature, mostly occurs as a consequence of the interaction between polar segments of the macromolecule and water molecules (hydrophilic hydration). In the process of solution of non-polar solutes in aqueous medium water forms frozen patches or microscopic icebergs around such solute molecules, the extent of the iceberg increasing with the size of the solute molecule the iceberg. This structuring of water molecules remains surrounding non-polar segments of the polymer (hydrophobic hydration).^{9,42,44} Naturally, the extension of the icebergs structures decrease when the temperature increases, which lead to an increment of polymer-polymer interactions and the successive coil-to-globule transition. This phase separation involves enthalpy and entropy changes.^{42,44,45}

Poly(*N*-vinylcaprolactam) is a well-known thermosensitive and biocompatible water-soluble polymer, which presents a coil-to-globule transition in aqueous solutions at temperatures between 30 and 40 °C. The LCST of this nonionic polymer in water, is strongly dependent on molecular weight and concentration (“classical” Flory–Huggins thermoresponsive phase behavior).^{48,95,96} In the vicinity of the transition, PVCL macromolecules can adopt a specific more or less dense conformation involving hydrophobic micellar cores.

The solubility of PVCL in water could be strongly affected by some parameters, such as ionic strength or pH of the medium. Some studies have showed that the addition of salts to the PVCL aqueous solutions can affect the thermosensitive properties of the polymer.^{46,47,49} The addition of NaCl to PVCL solutions leads to a decrease in the transition temperature, which is more noticeable at higher salt concentrations (0.2-1 M). The addition of salts enhances the hydrophobic interactions, and therefore a decrement of particle size is observed.^{47,97}

Recently⁹⁸, we have reported the synthesis of a series of chitosan-*graft*-poly(*N*-vinylcaprolactam) copolymers with controlled macromolecular architecture. These materials exhibit a cloud point temperature in aqueous solution near to the physiological range (36-44 °C), and their thermosensitive properties depend on the spacing and length of grafted PVCL chains onto the chitosan backbone.

The aim of the present work is to study the conformational changes of Cs-*g*-PVCL aqueous solutions by varying the length of grafted PVCL chains, the ionic strength and pH of the medium as a function of temperature. The conformational transitions were followed by dynamic light scattering technique and measurements of ζ -potential.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

N-vinylcaprolactam (VCL) (Aldrich, 98%), isopropanol (IPA) (Scharlau, 98%), *N,N*-dimethylformamide (Scharlau, 99.5%), thioglycolic acid (TG) (Sigma-Aldrich, 98%), 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM) (Sigma-Aldrich, 96%); acetone analytical grade (Scharlau) and sodium chloride (Sigma-Aldrich)

were used as received. 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) (Aldrich, 98%) was purified by recrystallization with ethanol. Throughout all experiments Type 2 pure water with conductivity lower than 0.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was employed.

Chitosan (Cs, IDEBIO S.L., Spain) was purified as described previously⁹⁸: chitosan was dissolved in 0.5 M acetic acid solution (0.5 wt%) at room temperature. After, the solution was filtered through filter paper (11 μm), precipitated by dropwise addition of 10 wt% sodium hydroxide until pH= 8, and carefully washed with water until the conductivity of the mixture was similar to that of pure water. At the end, chitosan was freeze-dried. The purified chitosan had a $\bar{M}_n = 715$ kDa ($\bar{X}_n \cong 4300$) and PDI= 1.4, as determined by SEC. The degree of *N*-acetylation (DA= 0.15) was determined by ¹H NMR according to the procedure described by Vårum et al.⁶⁷

Synthesis of PVCL with carboxyl end group

PVCL with carboxyl-end group (PVCL-COOH) was synthesized by controlled radical polymerization in solution, according to a procedure previously described.⁹⁸ First, a mixture of VCL, TG as a chain transfer agent, and solvent were added to a sealed flask. The oxygen was removed using three cycles of freeze-vacuum-thaw. Then, the initiator, ACVA, was carefully added to the reaction mixture. The reaction was carried out under nitrogen atmosphere at 60 °C. After a desired time, the polymerization was stopped and the product was purified by dialysis (cellulose membrane with a molecular weight cut-off 3.5 kDa). The product was freeze-dried and stored at room temperature..

Synthesis of chitosan-graft-PVCL copolymers

Chitosan-graft-PVCL copolymers were prepared as previously described⁹⁸. The reaction was carried out by the amidation of Cs amine groups with PVCL-COOH using DMTMM as activator of carboxylic groups. The chitosan solution was mixed with PVCL-COOH of different chain length ($\bar{M}_n = 04, 13$ and 26 kDa). The reaction was stirred at room temperature for 3 days. At the end, the mixture was precipitated in acetone excess and purified by Soxhlet extraction with acetone for 48 h. The purified product was dissolved in water and freeze-dried.

Preparation of Solutions

The polymers were dissolved in water (2 mg mL^{-1}) at room temperature. PVCL-26 and Cs-*g*-PVCL-26 solutions were analyzed at different pH and NaCl concentration. The pH of the solutions was varied between 3 and 8 by addition of dilute HCl or NaOH solutions. For ionic strength measurements, NaCl concentration were varied over the range 0.1 - 0.3 M and this was added to the polymer solution (pH= 6). Before measurements, all samples were kept at $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h to ensure that the solutions were homogeneous.

Dynamic light scattering (DLS)

DLS and ζ -potential measurements were simultaneously performed on a Möbiu ζ equipment (Wyatt Technologies), under controlled temperature. The Möbiu ζ system uses a 45 mW single longitudinal-mode laser operating at a wavelength of 532 nm. The measurements were made at a scattering angle $\theta = 163.5^{\circ}$. The sample was subjected to a temperature heating program of $0.25 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. At each temperature the sample was allowed to stand for equilibration during 40 minutes before measurements.

PVCL and Cs-*g*-PVCL solutions were filtered by $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ just before of the measurements. Then, the samples were loaded in a $45 \text{ }\mu\text{L}$ quartz cuvette with electrode assembly. Data collection and analysis were carried out with the DYNAMICS 7.3.1.15 software (Wyatt Technology Corporation).

RESULTS AND DISCUSSION

Behavior of polymers in water

In a previous report,⁹⁸ a set of poly(N-vinylcaprolactam) with a functional carboxylic group end group was prepared using a controlled radical polymerization. In this study, three homopolymers of different chain length and low polydispersion index were synthesized. Their characteristics are summarized in Table 3.

In the present paper, these homopolymers were analyzed in aqueous solutions. Figure 21 shows the (a) hydrodynamic diameter (D_H) and (b) ζ -potential of PVCL-COOH macromolecules as a function of temperature. These measurements were carried out in water at pH 6. At $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, below the cloud point temperature, the D_H of the

polymers ranged between 5 and 13 nm, which increases as the length of PVCL-COOH chains rise. Presumably, these values correspond to single PVCL macromolecules in the random-coil state. It could be noticed that they keep almost constant in the pre-transition region.

Table 3. Characteristics of the PVCL-COOH homopolymers.

Polymers	\bar{M}_n (kDa)	\bar{X}_n	PDI
PVCL-04	4.2	30	1.2
PVCL-13	12.7	92	1.5
PVCL-26	26.4	190	2.0

A drastic increment on the hydrodynamic size was observed at temperatures above the cloud point. These samples show a phase transition temperature between 34 and 37 °C that decreases as the length of PVCL chains increases. The reversible behavior in the conformational change of the PVCL chains in solution was confirmed by cooling cycles in all samples (results not shown).

The phase transition profile is similar for all homopolymer solutions, in which the hydrodynamic radius dramatically increases up to a maximum value (up to two order of magnitude), and later a stabilization of the molecular aggregates is observed. However, PVCL-04 sample shows a more diffuse pattern, in correspondence with its low degree of polymerization.

The ζ -potential of these samples was measured simultaneously with their hydrodynamic radius (Figure 21b). At 25 °C, it can be appreciated that PVCL-COOH exhibits almost no charge, while in the coil state. At temperatures close to the phase transition, a relevant increment in the negative charge is observed simultaneously with the rise in D_H . As a consequence of the coil-to-globule transition, macromolecular aggregates display a hydrophobic core with COOH groups facing to the water. This behavior confirms the re-arrangement in the conformational state of the PVCL chains.

A series of chitosan-*g*-PVCL copolymers was prepared via the “grafting onto” procedure varying the length of grafted PVCL chain. With this purpose, functionalized PVCL-COOH polymers were grafted onto chitosan through the activation of the terminal

carboxylic group by an coupling activator for amidation reaction.⁹⁸ These copolymers are referred hereinafter as Cs-*g*-PVCL-04, Cs-*g*-PVCL-13 and Cs-*g*-PVCL-26.

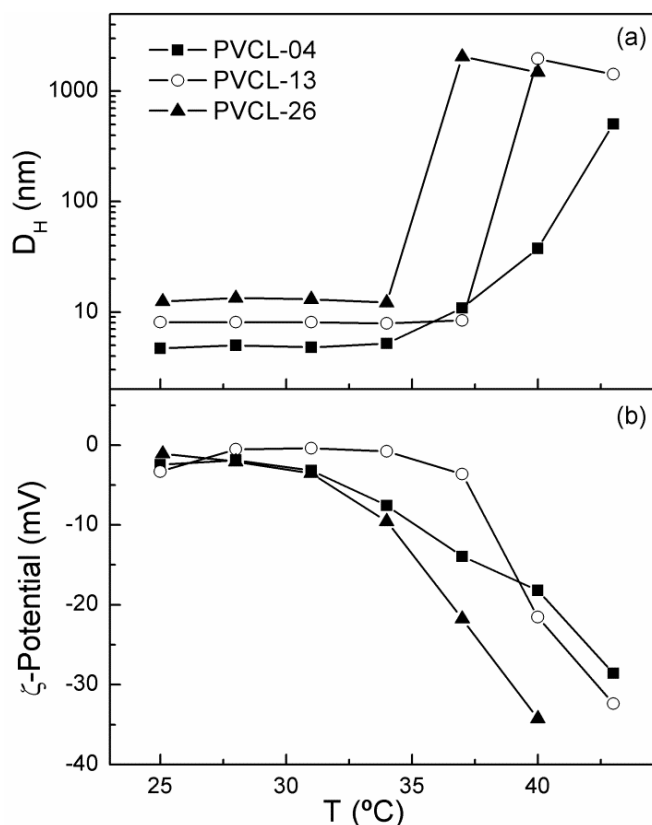


Figure 21. Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of PVCL-COOH for different number-average molecular weight: \bar{M}_n 4, 13, and 26 kDa at 2 mg mL^{-1} (pH 6). Heating rate: $0.6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Figure 22 shows the effect of the temperature on the D_H and ζ -potential for this series of Cs-*g*-PVCL samples in aqueous solutions at pH 6. At 25 °C, it could be appreciated that the D_H of the copolymer samples are bigger than their corresponding PVCL-COOH homopolymers (compare Figure 22(a) with Figure 1). This value is around 100-200 nm, which reflects the tendency of the Cs-*g*-PVCL copolymers to self-association in water via formation of intermolecular aggregates.⁹⁹ This is a well-known behavior for chitosan, which macromolecular chains tend to form aggregates in aqueous medium. Several studies have demonstrated that the formation of these aggregates is triggered by hydrogen bonding and hydrophobic interactions between chitosan chains^{100–104}. Furthermore, at ambient temperature, the hydrodynamic radius is also influenced by the length of the grafted PVCL chains. The hydration of nonpolar

groups of PVCL grafted chains is well-known to induce an ordering of water around these groups, in accordance with the “iceberg” model.^{42,105} This phenomenon underlie the solubility of chitosan-*grafted*-PVCL in water at neutral pH as already noted,⁹⁸ giving rise an additional expansion of the macromolecule in aqueous solution at 25 °C ($D_{H \text{ Cs-g-PVCL-04}} \approx D_{H \text{ Cs-g-PVCL-13}} < D_{H \text{ Cs-g-PVCL-26}}$).

In contrast with the behavior of the corresponding PVCL homopolymers, it could be appreciated a monotonic increment on the hydrodynamic diameter of the copolymers as the temperature increases in the zone before the transition. In the pre-transition region, a large amount of nonpolar groups of PVCL begins to associate, and a reduction in the hydration of the PVCL hydrophobic groups should take place via hydrophobic clustering.¹⁰⁵ It has been demonstrated that due to the initial formation of clusters of hydrophobic residues, an important amount of PVCL segments are not accessible to water molecules.⁴⁶ In other words, a portion of the “icebergs” forming the hydrophobic hydration around grafted PVCL chains begins to “melt”, with the resulting loss of overall solubility of the copolymer macromolecules and the pre-formation of the first aggregates. This process results in a twice increment of the hydrodynamic sizes.

As soon as the coil-to-globule transition is reached, an abrupt increment in the size of the particles is observed (D_H values up to 10000 nm). During this stage, the hydrophobic hydration around PVCL moieties –so called “icebergs” – disappear completely. It has been calculated that the hydration number per monomeric unit of PVCL decreased from 3.56 in the coil state (at 28 °C) to 1.78 (at 43 °C).¹⁰⁵ The conformational transition takes place in a very narrow temperature interval, indicating a highly cooperative change.^{46,98,105} This cooperativity has been associated with the strong interactions of water molecules involved in the hydration shell of macromolecule, leading to the appearance of a more extended hydrophobic polymer core in the concentrated phase.⁴⁶

The transition temperature of the chitosan-*g*-PVCL copolymers diminishes as the length of the grafted PVCL chains increases. The same behavior was observed previously, and the transition temperatures coincide very well with the cloud point temperatures estimated for these polymers.⁹⁸

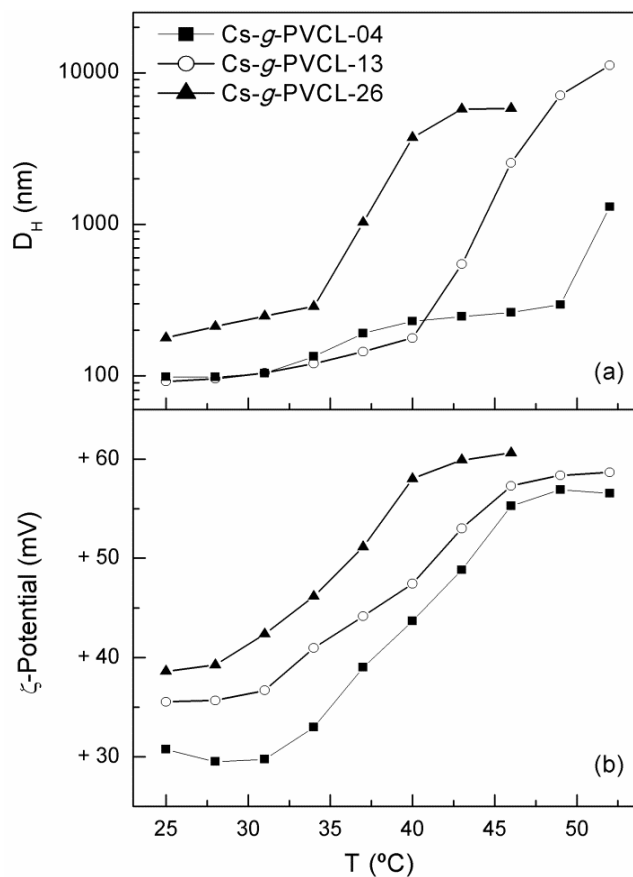


Figure 22. Dependence of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential of Cs-*g*-PVCL on temperature of aqueous solutions of Cs-*g*-PVCL for different number-average molecular weight of PVCL grafted chains. Cs-*g*-PVCL samples with \bar{M}_n 04, 13 and 26 kDa at 2 mg mL⁻¹ (pH 6). Heating rate: 0.6 °C min⁻¹.

Figure 22 (b) shows the dependence of ζ -potential of the graft copolymers as a function of temperature. At room temperature, the values of this parameter are positive for the three samples due to the presence of amino groups of chitosan. In water medium at pH 6, they are protonated to some extent. It is interesting to note the effect of the length of the grafted PVCL chains onto the protonation of amide groups under these conditions: the longer the grafted chains, the bigger the positive charge of the macromolecules. It could be speculated that bigger hydrodynamic volumes due to better hydration of longer grafted PVCL chains could facilitate the hydrolysis of amine groups.

An increment on ζ -potential is observed associated with the coil-to-globule transition, from approximately +(30-40)mV up to +(55-60) mV. By a similar way that occurs in

PVCL homopolymers, the coil-to-globule transition leads to the folding and aggregation of grafted PVCL chains in an intramolecular hydrophobic core, yielding the polar amine groups facing to the aqueous medium.

In order to shed light on the conformational changes taking place during heating, an analysis of the evolution of the D_H distribution of PVCL-13 and Cs-*g*-PVCL-13 between 25 and 52 °C was carried out (Figure 23). From this Figure it can readily be noticed that for both samples, as the temperature increases, the size distribution of the hydrodynamic diameter shifts gradually to overall larger values. At 25 °C both samples show monomodal size distribution, gradually evolving to a bimodal distribution in the pre-transition region. Indeed, it is very interesting to note that as the temperature increases in the vicinity of the coil-to-globule transition, the observed overall growth in size (see Figures 21a and 22a) actually occurs by the gradual increase of the population of particles of sizes around 100 and 1000 nm (for PVCL-13 and Cs-*g*-PVCL-13, respectively), which peaks seem to increase at the expense of the population of lower hydrodynamic diameter group. This observation seems to be in accordance with thermodynamic studies showing that the pass through the pre-transition region is in fact a non-cooperative process.⁴⁶ In the post-transition stage the system tends to consolidate entirely into a monomodal distribution of large average size aggregates due to the hydrophobic association of globules.

Effect of pH

The solution properties of polyelectrolytes are noticeably dependent of the pH of the medium. The presence of charges along the polyelectrolyte chain involves intramolecular and intermolecular interactions, and therefore the structural and physical-chemical properties can be disrupted by a variation of pH of the solution.¹² For this reason, the effect of this parameter is vital for understanding the properties of this copolymer in solution.

Figure 24(a) shows the temperature dependence of the apparent D_H for solutions of PVCL-26 homopolymer at different pH values. At room temperature, the average hydrodynamic size of the polymer is evidently independent of pH of the solution. At this point, the size distribution of the hydrodynamic diameter displays a monomodal peak

around 13 nm for the three pH values, indicating the presence of single PVCL chains perfectly hydrated (results not shown).

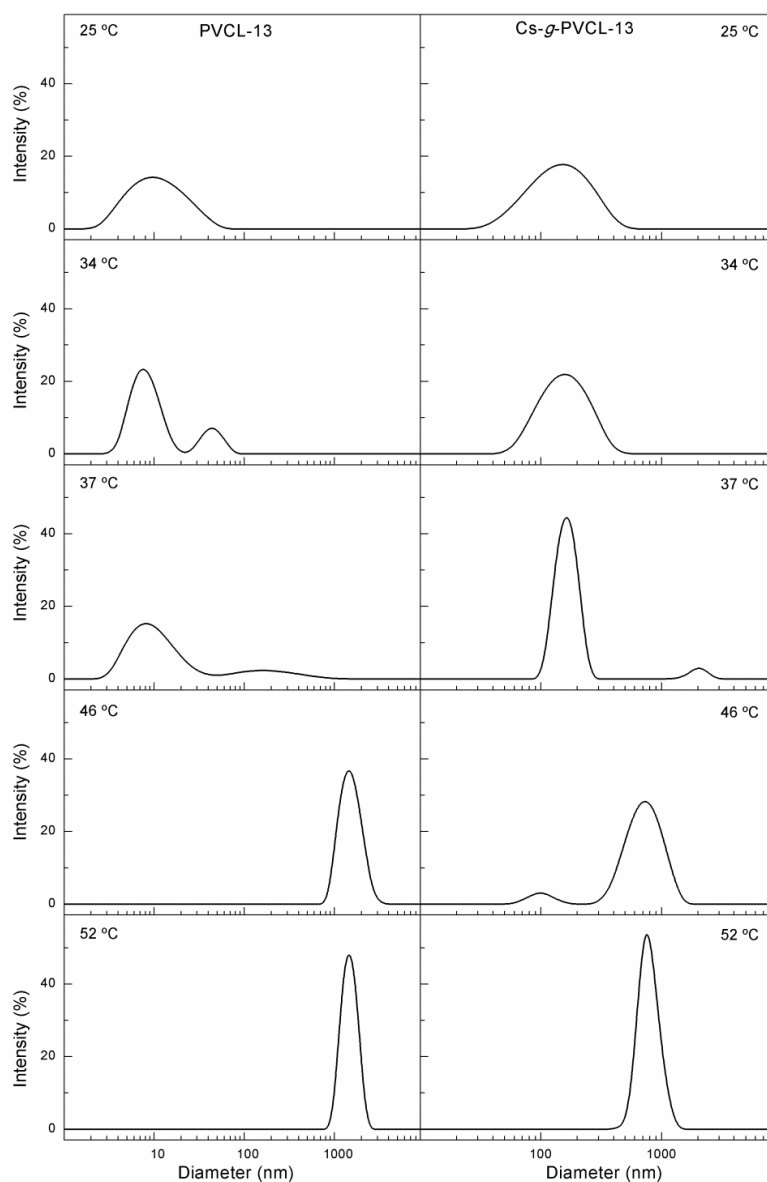


Figure 23. Evolution of the hydrodynamic diameter distribution during heating for PVCL-13 and Cs-*g*-PVCL-13. Concentration: 2 mg mL⁻¹ in water (pH 6).

The ζ -potential dependence on the temperature of the homopolymer at different pH is shown in Figure 24(b). The macromolecular PVCL coils possess COOH-end groups, which could be ionic dissociated at pH above their pK_a , giving negative charged groups. For this reason, at 20 °C, the ζ -potential of PVCL-26 tends to exhibit small negative values (up to -5 mV) as the pH increases.

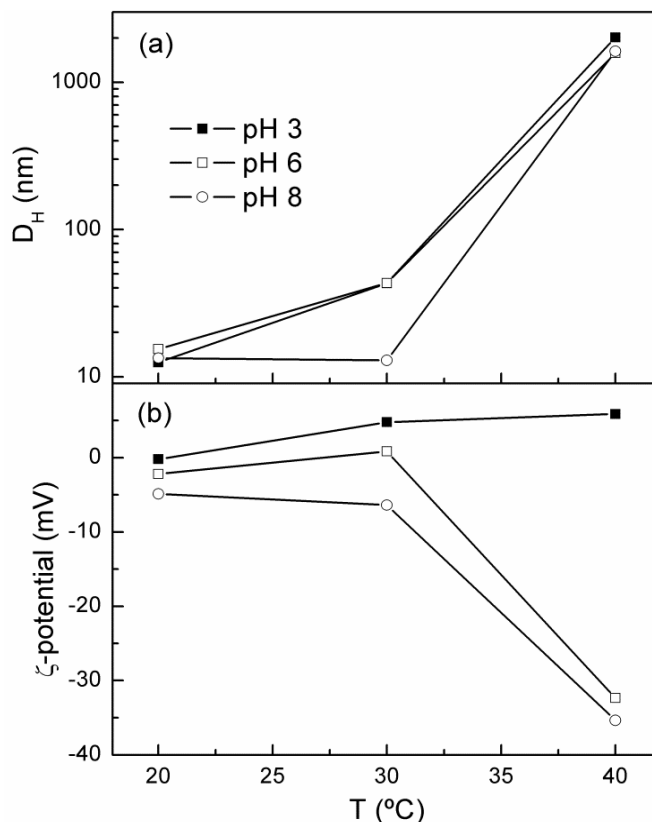


Figure 24. Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of PVCL-26 at 2 mg mL^{-1} at different pH as shown in the figure. Heating rate: $0.6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

At temperatures above $30 \text{ }^\circ\text{C}$, the hydrodynamic size of the PVCL macromolecules shows a strong increment (more than two orders of magnitude). This conformational transition occurs regardless of the pH of the solution. As it could be expected, the phase transition is accompanied by an increment in the absolute value of the ζ -potential at pH 6 and 8. Nevertheless, it should be noted that at pH 3, where the dissociation of carboxylic groups is depressed, PVCL remains almost uncharged as the temperature rises.

On the other side, the behavior of Cs-*g*-PVCL-26 solutions at three different pH values was also examined. Figure 25(b) shows the variation of the ζ -potential of aqueous solutions of Cs-*g*-PVCL-26 with temperature varying the pH of the medium. It can be seen that at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ the ζ -potential values are positive for all analyzed systems. In this case, the positive charge of the copolymer is favored at lower pH values. The protonation of amine groups of chitosan increases as the pH becomes more acidic.

Under these conditions, the D_H of the molecular aggregates of the copolymer becomes slightly smaller when the pH of the polymeric solution decreases. In other words, at room temperature, the macromolecular coils are more compacted when the polymer chain is more charged.

A similar phenomenon has been observed by Makhaeva et al.⁴⁷ In their words, “the mechanism of the inter- or intramacromolecular aggregation is the competition between the attraction of the associating groups, on the one hand, and the repulsion of the chains due to Coulomb interactions of charged groups (...) preventing the association for large macromolecular clusters, on the other”. In this case, there is a small increase of the gain in energy related with the aggregation of the macromolecule, giving rise to a slight more compact copolymer coil.

All analyzed systems showed thermoresponsive behavior, whose transition temperature is between 33-35.5 °C in dependence of the pH of the solution. At temperatures closed to the transition temperature, the hydrodynamic size of macromolecules increases due to the hydrophobic association between grafted PVCL chains. The shape of the curve become sharper as the medium is less alkaline. At temperatures above the phase separation, the size of macromolecules aggregates is greater as the medium is more acidic.

It is very important to remark that the copolymer remains soluble in aqueous medium even at pH 8, where chitosan is not. This behavior confirms that the solubility of this copolymer at low temperatures is related to the hydrophobic hydration of the non-polar grafted PVCL chains keeping the overall copolymer in random coil conformation even at pH 8 ($D_H \approx 200$ nm).

Concerning the temperature dependence of the copolymer by varying the pH, it can be seen that in all cases the ζ -potential traces follow a similar profile: there is a progressive increment of this parameter as the temperature rises with a common tendency to asymptotically reach ζ -potential values around +65 mV. No watershed seems to be associated with the coil-to-globule transition.

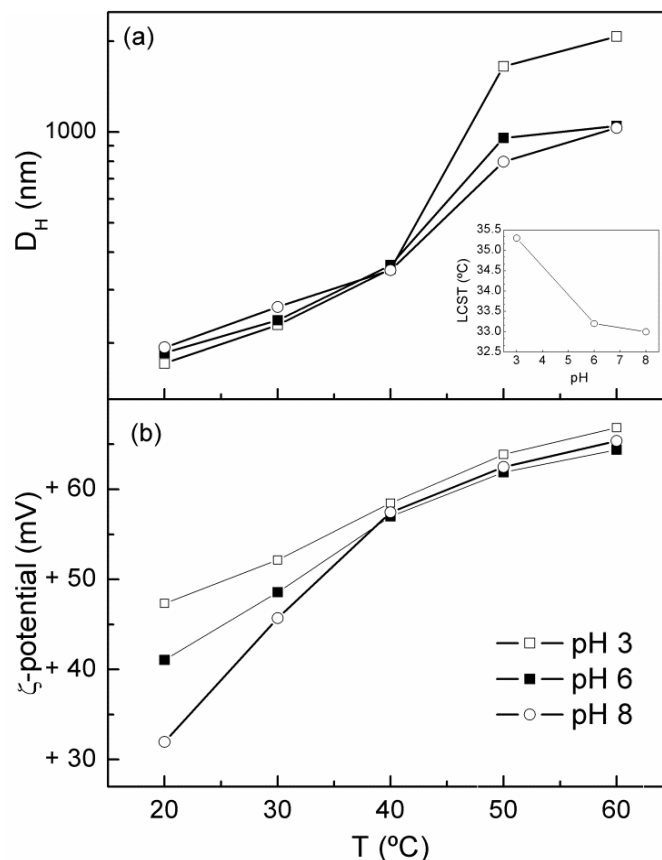


Figure 25. Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of Cs-g-PVCL-26 at 2 mg mL^{-1} at different pH as shown in the figure. Heating rate: $0.6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Effect of ionic strength

The effect of the ionic strength on the D_H and ζ -potential of the PVCL-COOH solutions are shown in Figure 26. At $20 \text{ }^\circ\text{C}$, the D_H of the single particles is almost not affected by the addition of NaCl, within the tested concentration range (up to 0.3 M NaCl). However, at $30 \text{ }^\circ\text{C}$, in the vicinity of the transition, it could be observed a slightly more pronounced effect of the ionic strength on the hydrodynamic diameter: the higher the NaCl concentration, the smaller the homopolymer size. It has been previously observed that the addition of NaCl could lead to a decrease in the size of PVCL macromolecular coils.⁹

At temperatures above $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a drastic increase of the hydrodynamic size of the particles is detected, whose transition temperature is apparently not affected by the ionic strength of the solution. In the post-transition temperature region, the addition of

NaCl produces hydrophobic aggregates significantly larger than those obtained in water. This effect reveals the role of the ionic strength on the enhancement of hydrophobic interactions.^{47,106}

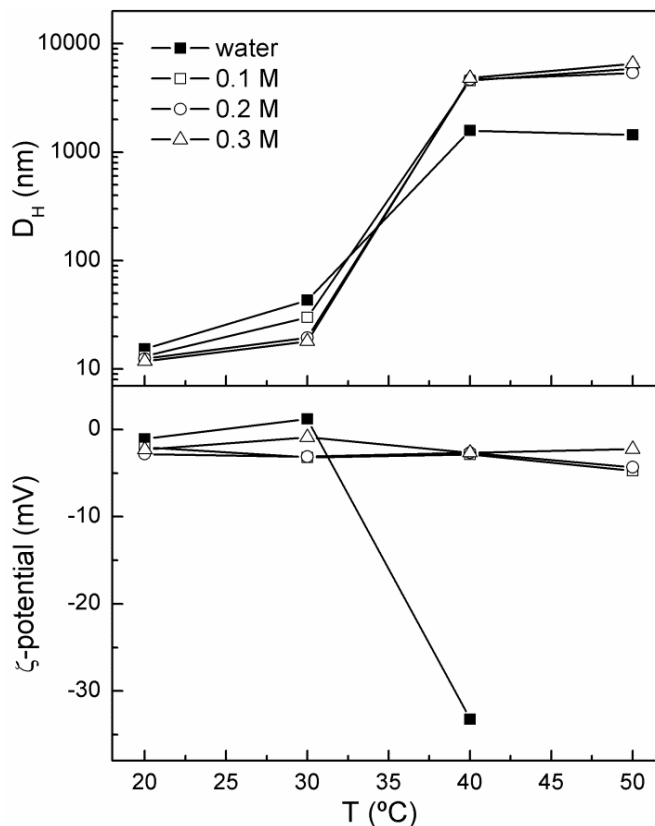


Figure 26. Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of PVCL-26 at 2 mg mL^{-1} at different ionic strength as shown in the figure. Heating rate: $0.6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

The addition of NaCl to the homopolymer solutions keeps ζ -potential values almost neutral within the tested NaCl concentration range (Figure 26b). As it has been indicated before, this effect favors the intermolecular hydrophobic interactions between polymer chains producing larger globular aggregates.

As far as the influence of the ionic strength on the copolymer solutions is concerned, the picture is very similar to that of the homopolymer solutions. The effect of the electrostatic screening on the hydrodynamic sizes of the copolymer coils is here more noticeable (Figure 27a). The increment of the size of hydrophobic globular aggregates could be observed as well, as the very small electrostatic charge.

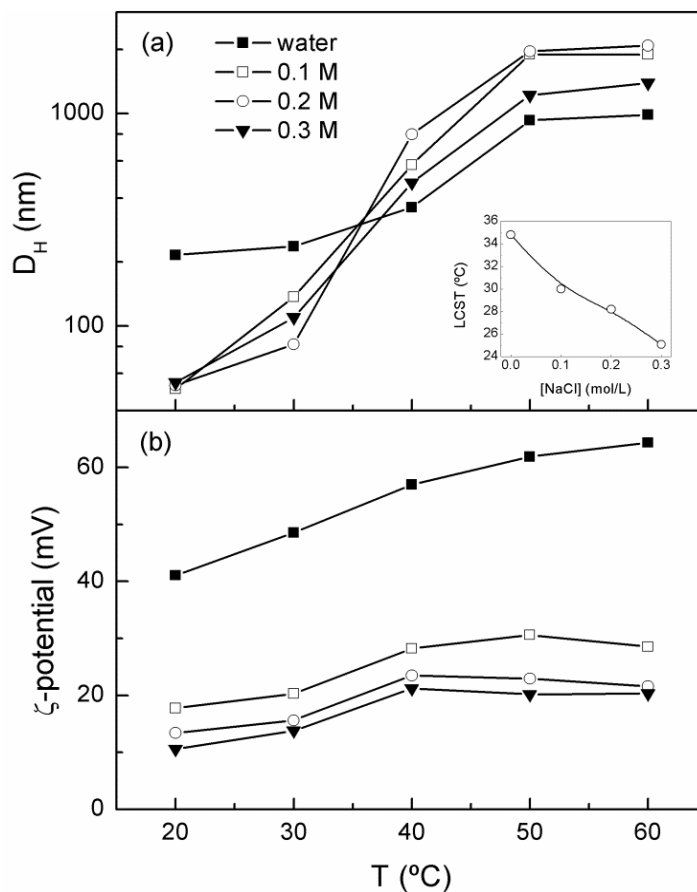


Figure 27. Variation of the (a) hydrodynamic diameter, D_H , and (b) ζ -potential with temperature of aqueous solutions of Cs-g-PVCL-26 at 2 mg mL^{-1} at different ionic strength as shown in the figure. Heating rate: $0.6 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

ACKNOWLEDGEMENTS

D. F-Q acknowledges CONACyT for his scholarship for PhD studies (325951) and to the Institute of Polymer Science and Technology (ICTP) of the Spanish National Research Council (CSIC) in Madrid, Spain, especially the Biomaterials Group. Authors thank CIBER-BBN for financial support.

4.3 Preparación y Caracterización de Nanopartículas de Quitosana-*g*-poli(*N*-vinil Caprolactama)

En nuestra investigación previa, una serie de copolímeros termosensibles de *Cs-graft-PVCL* se sintetizaron con distinta arquitectura molecular, siendo solubles en agua pura por debajo de su LCST. El comportamiento térmico de estos materiales mostró dependencia con la longitud de cadenas de PVCL injertadas y el espaciamiento entre éstas a lo largo de la cadena principal de quitosana. En este sentido, se empleó una metodología para la formación de nanopartículas de este copolímero a partir de gelificación ionotrópica con tripolifosfato pentasódico (TPP). Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en diversas investigaciones para la preparación de nanopartículas de quitosana^{25,26} y algunos derivados.^{27,77,78,104}

La Tabla 4 muestra las características de las nanopartículas desarrolladas a partir de la metodología empleada. Como se puede observar, la concentración de TPP influye en el tamaño de los sistemas de nanopartículas obtenidos con el copolímero *Cs-g-PVCL-26.C*.

Table 4. Características de la formación de nanopartículas del copolímero *Cs-g-PVCL* a partir gelificación ionotrópica.

Copolímero	Conc TPP (% p/p)	Relación Acet:agua	D _H ^a (nm)	PDI ^a	Pot-ζ ^a (mV)	Rendimiento de encapsulación (%) ^b
<i>Cs-g-PVCL-26.C</i>	20	0:1	134	0.20	+34	-
<i>Cs-g-PVCL-26.C</i>	15	0:1	193	0.25	+32	-
<i>Cs-g-PVCL-26.C</i>	10	0:1	334	0.37	+32	-
<i>Cs-g-PVCL-13.A</i>	20	0:1	135	0.17	+33	-
<i>Cs-g-PVCL-13.C</i>	20	0:1	117	0.18	+35	-
<i>Cs-g-PVCL-13.C</i>	20	0.042:1	127	0.2	+33	20
<i>Cs-g-PVCL-13.C</i>	20	0.02:1	176	0.27	+25	2

Concentración de copolímero: 1 mg mL⁻¹;

^a D_H, PDI y potencial-ζ se obtuvieron a 25 °C por dispersión de luz dinámica (DLS).

^b Obtenido por espectroscopía UV-vis.

El diámetro de las nanopartículas muestra un notable incremento conforme disminuye la concentración de TPP (diámetro hidrodinámico en un intervalo de 134-334 nm). Por su parte, las nanopartículas obtenidas con 20% p/p de TPP mostraron el índice de polidispersidad (PDI) más bajo (0.2) entre los sistemas estudiados. En todos los casos, la estabilidad de las partículas es evidente debido a valores relativamente altos de carga molecular (potencial- $\zeta \sim +32$). La carga positiva se debe a la presencia de una cantidad considerable de grupos amino expuestos hacia el exterior de los sistemas preparados. Todos los sistemas estudiados presentaron morfología esférica (resultados no mostrados).

De esta manera, las nanopartículas Cs-g-PVCL-26.C (preparadas con 20 % p/p TPP) dispersas en agua se caracterizaron por turbidimetría (espectroscopía UV-vis) y dispersión de luz dinámica (DLS) para conocer el comportamiento térmico. La Figura 28(a) muestra la variación de la absorbancia con la temperatura, para el copolímero Cs-g-PVCL-26.C, y sus nanopartículas. Es posible percibir un incremento en la LCST de las nanopartículas dispersas en medio acuoso en relación al copolímero correspondiente. La Figura 28(b) muestra el efecto de la temperatura en el D_H de la nanopartículas. La temperatura de transición es similar a la observada por turbidimetría.

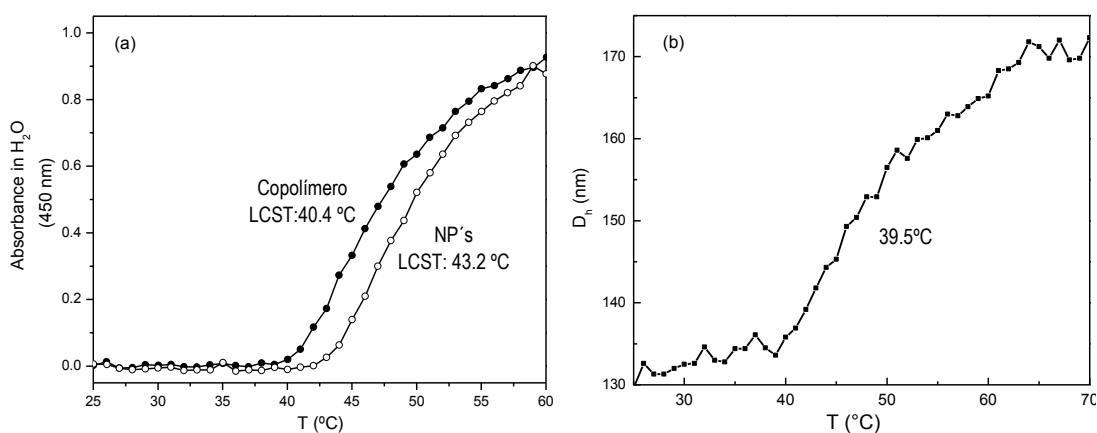


Figura 28. Curvas de transición de fase para el sistema Cs-g-PVCL-26.C: a) variación de la absorbancia del copolímero y las nanopartículas (0.1 wt% en agua, velocidad de calentamiento: 1°C min⁻¹, $\lambda=450$ nm) con la temperatura; y b) dependencia del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas con la temperatura.

La influencia de la arquitectura molecular en las características de las nanopartículas, se investigó con los copolímeros Cs-*g*-PVCL-26 y Cs-*g*-PVCL-13. De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 1, el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas es independiente de la longitud de las cadenas (26 kDa y 13 kDa) de PVCL injertadas en la Cs. La Figura 29 muestra la micrografía (SEM) correspondiente a la muestra Cs-*g*-PVCL-26.C, en la cual se percibe morfología esférica con tamaños en un intervalo de 170-260 nm. Por otro lado, el efecto del espaciamiento entre las cadenas de PVCL en el copolímero de injerto se estudió en el nanosistema Cs-*g*-PVCL-13. Un ligero decremento en el D_H (desde 135 a 117 nm) se observó al incrementar el espacio entre cadenas de PVCL (relación molar PVCL/Cs desde 2 a 0.8).⁹⁵ En el caso de la encapsulación con el fármaco modelo se realizó en las nanopartículas Cs-*g*-PVCL-13.C. El rendimiento de encapsulación de dexametasona mejora notablemente con el aumento de la cantidad de acetona empleada (Tabla 4).

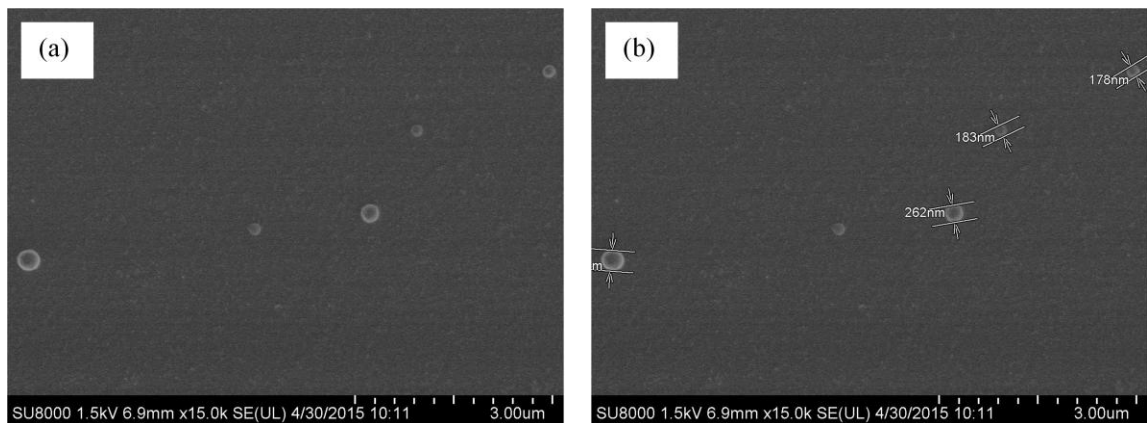


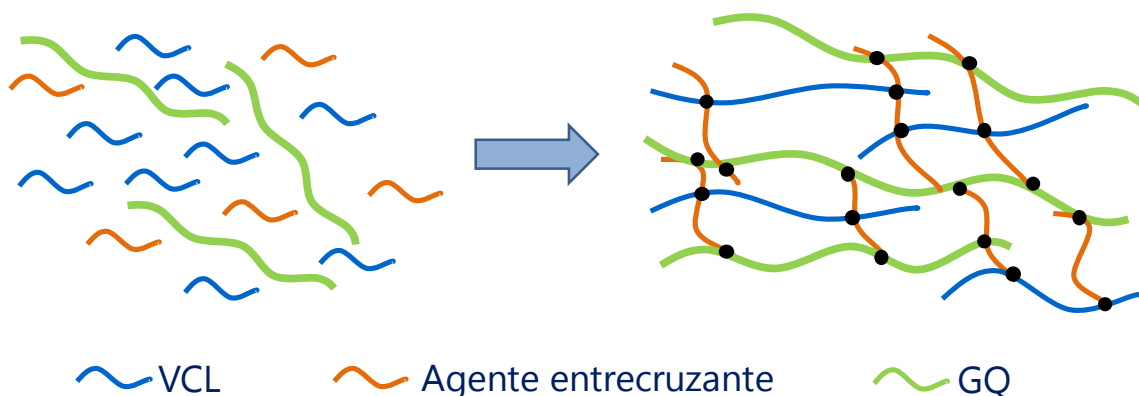
Figura 29. Micrografías de nanopartículas obtenidas a partir de Cs-*g*-PVCL-26.C (20% p/p de TPP) por SEM.

Es evidente la capacidad de formación de nanopartículas por parte de los copolímeros Cs-*g*-PVCL, de acuerdo con la metodología empleada. El comportamiento termosensible exhibido por las nanoestructuras, la morfología esférica mostrada y el rendimiento aceptable de encapsulación del fármaco, sugieren como posibilidad, el uso de estos sistemas como liberadores controlados de fármacos en el campo biomédico.

4.4 Síntesis y Caracterización de Criogel Termosensibles a partir de Derivados de Quitosana

Los criogel sensibles a estímulos de temperatura muestran una transición de fase reversible (exhibiendo una LCST), tipo hinchamiento-contracción, debido a un cambio en el balance hidrofílico/hidrofóbico en la estructura hidratada del material. La formación de estos materiales requieren de agentes entrecruzantes que contribuyan a la generación de una estructura reticulada (Figura 30). En este trabajo, se sintetizaron criogel a partir de glicol quitosana/*N*-vinil caprolactama y quitosana-*g*-poli(*N*-vinil caprolactama)) utilizando genipina (origen natural), MBA y glutaraldehído (sintéticos) como agentes entrecruzantes.

Figura 30. Esquema representativo de la formación de criogel a partir de glicol-quitosana y *N*-vinil caprolactama; entrecruzamiento con genipina y MBA.



El criogel obtenido a partir de glicol quitosana (GQ-PVCL), entrecruzado con genipina/MBA, presentó estructura macroporosa con cavidades apreciables a simple vista (Figura 31 (a) y (b)). Por otro lado, los criogel del copolímero Cs-*g*-PVCL-26.C se obtuvieron en forma de micro-esferas al adicionar glutaraldehído como agente entrecruzante (Imagen no mostrada). Las micrografías para los criogel GQ-PVCL y Cs-*g*-PVCL-26.C son presentadas en la Figura 31 (c), (d), y (e), (f) respectivamente. En ambas muestras se observa una estructura macroporosa reticulada. El tamaño del poro en la muestra glicol-quitosana/PVCL es ~50-100 μm ; poros más pequeños (~20-30 nm) se encontraron en el criogel Cs-*g*-PVCL-26.C. Así también, se percibe mayor homogeneidad en el tamaño y forma de los poros del criogel obtenido a partir del copolímero. Este efecto puede atribuirse a la presencia de una arquitectura molecular

controlada en el copolímero.⁹⁵ Por el contrario, la irregularidad en la morfología del criogel de glicol-quitosana/PVCL se debe a que la polimerización de *N*-vinil caprolactama ocurrió de forma no-controlada.

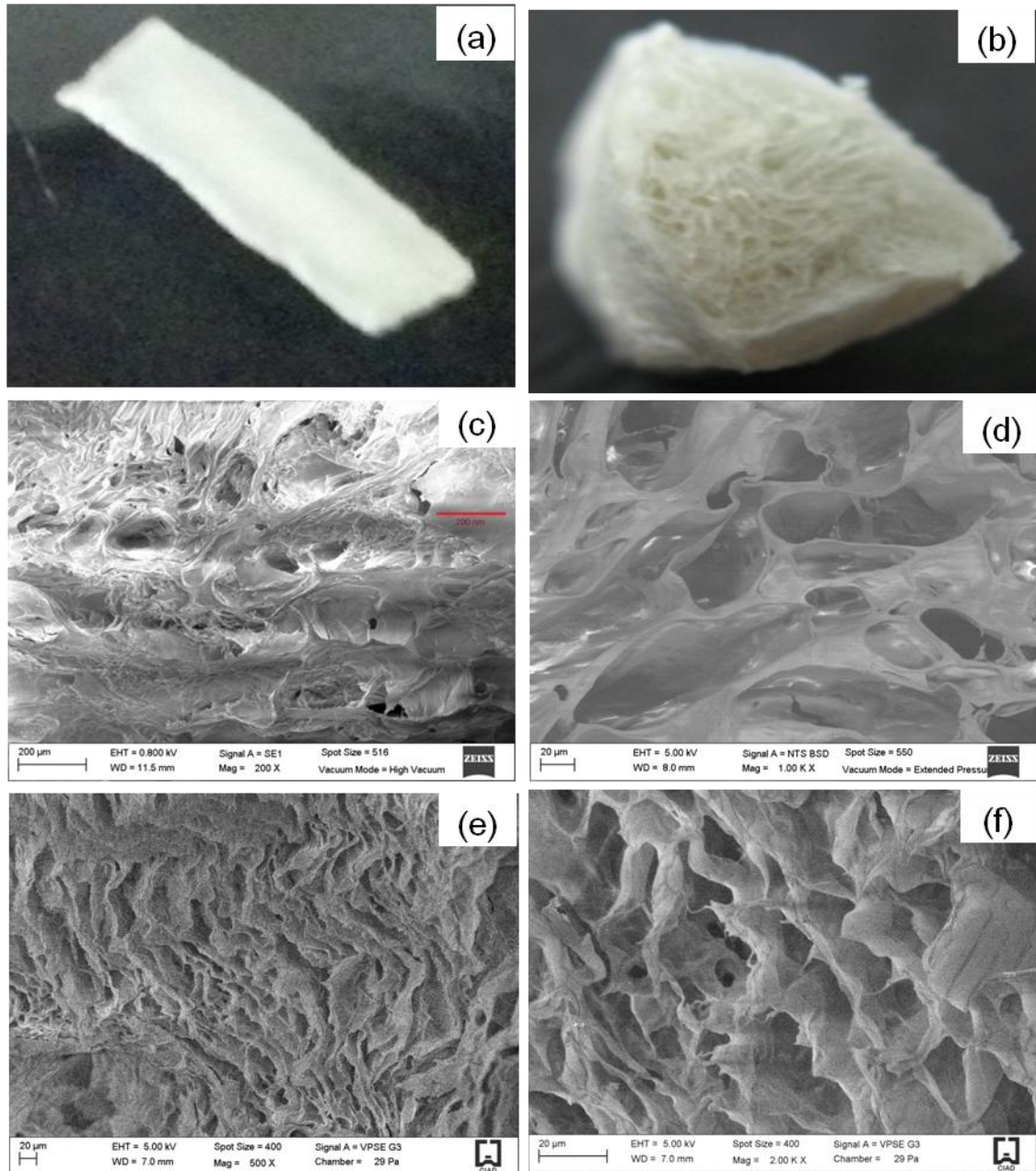


Figura 31. Imágenes de criogel de glicol-quitosana/PVCL entrecruzados químicamente con genipina/MBA: (a) estado hidratado sin segmentar; (b) estado deshidratado en forma de tableta; (c) y (d) micrografías obtenidas por ESEM; y del criogel Cs-g-PVCL-26.C (e) y (f) micrografías obtenidas por ESEM.

La Figura 32 muestra la variación en el grado de hinchamiento en equilibrio, W , con la temperatura para los criogel (a) glicol-quitosana/PVCL/genipina; y (b) Cs-g-PVCL-26.C/glutaraldehído. Las muestras permanecieron en equilibrio durante 12h a $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$, determinándose el respectivo hinchamiento. Posteriormente, la temperatura se incrementó gradualmente hasta alcanzar los valores deseados (cada punto señalado en curva representa una medición de hinchamiento de equilibrio), permaneciendo en equilibrio por 3 h en cada caso. El grado de hinchamiento, W , se determinó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$W = \frac{M_t}{M_o} - 1 \quad (3)$$

donde M_t y M_o son la masa del criogel hinchado y la masa del criogel seco, respectivamente.

Por otro lado, la transición de fase se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación desarrollada por el modelo de Navarro y col:¹⁰⁵

$$y = y_f - \frac{(y_f - y_i)}{A + e^{\frac{x-c}{\alpha}}} \quad (4)$$

donde y_i y y_f son los valores de la variable antes y después de la transición, respectivamente; c es el valor crítico del estímulo y α es un coeficiente que describe el comportamiento de la pendiente del proceso durante la transición e identifica la continuidad y discontinuidad del proceso.

La cantidad de agua retenida a bajas temperaturas es mayor (más del doble) para el criogel de glicol-quitosana/PVCL, debido a la presencia de un retículo más poroso (observado por SEM, Figura 31). El incremento de temperatura en el sistema conduce a que las moléculas de agua asociadas alrededor de los grupos hidrofóbicos de la PVCL sean expulsados. Esto conduce a la contracción del criogel debido a que se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas reticuladas de PVCL en la quitosana. La transición de fase para el criogel de glicol-quitosana/PVCL ($32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) se encontró ligeramente menor que el criogel de Cs-g-PVCL-26.C ($34.1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Como se sabe, la temperatura de transición de fase de la PVCL depende fuertemente de la

longitud de las cadenas. Por tanto, este efecto probablemente se debe a que la formación de cadenas de PVCL en el primer caso posee mayor grado de polimerización que el criogel sintetizado a partir del copolímero. Este resultado corrobora el crecimiento no-controlado de las cadenas de PVCL a lo largo de la cadena de quitosana, conduciendo a la obtención de una estructura reticulada con poros de mayor tamaño.

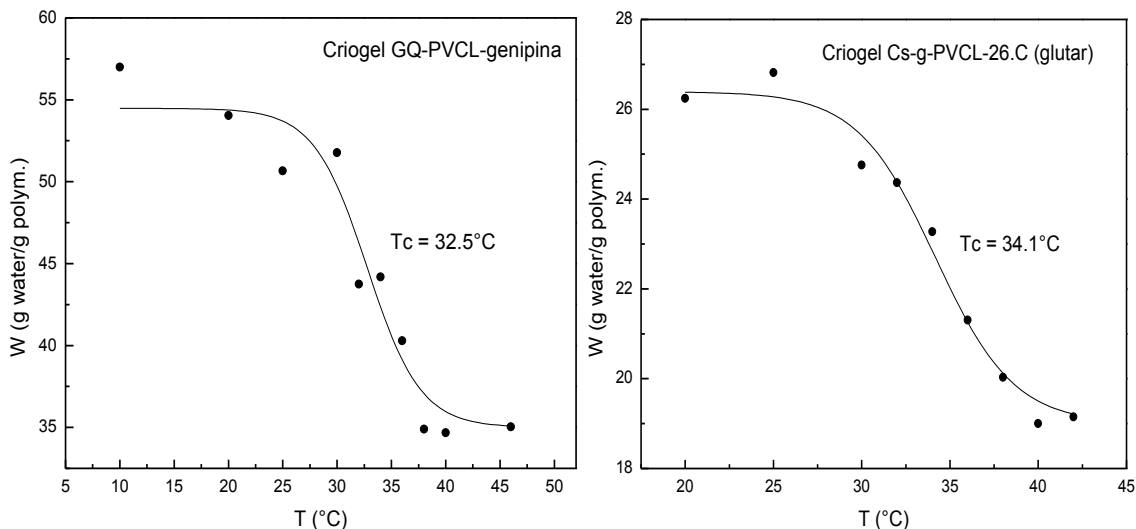


Figura 32. Valores del equilibrio de hinchamiento, W , para el criogel: (a) glicol-quitosana/PVCL; y (b) Cs-g-PVCL-26.C, en agua (pH 6) en función de la temperatura. Las muestras permanecieron a 10 °C por 12 h para alcanzar equilibrio. La curva corresponde a los resultados del modelo de la ecuación (4).

Por encima del estado contraído ($T > LCST$), estos sistemas entrecruzados mantienen una cantidad considerable de agua en su interior. En este sentido, el criogel con arquitectura molecular controlada expulsó proporcionalmente menor cantidad de agua (~20% del agua retenida en estado hinchado) que la muestra de glicol-quitosana/PVCL (~50% del agua retenida en estado hinchado).

La Figura 33 muestra tres ciclos del proceso de hinchamiento-contracción, estimulado por cambios de temperatura entre 10 y 45 °C (por debajo y por encima de la LCST observada) por períodos de 2 h en cada medición, para el criogel glicol-quitosana/PVCL en agua. Este estudio sustenta la naturaleza reversible en el comportamiento termosensible del biomaterial analizado. En la temperatura por debajo

de la transición (10 °C), se observa un estado hinchado en el criogel, embebiendo gran cantidad de agua ($W > 44$). Posterior a la temperatura de transición de fase (45 °C), el sistema permanece en estado contraído, expulsando una cantidad considerable de moléculas de agua desde el interior del retículo ($W < 36$).

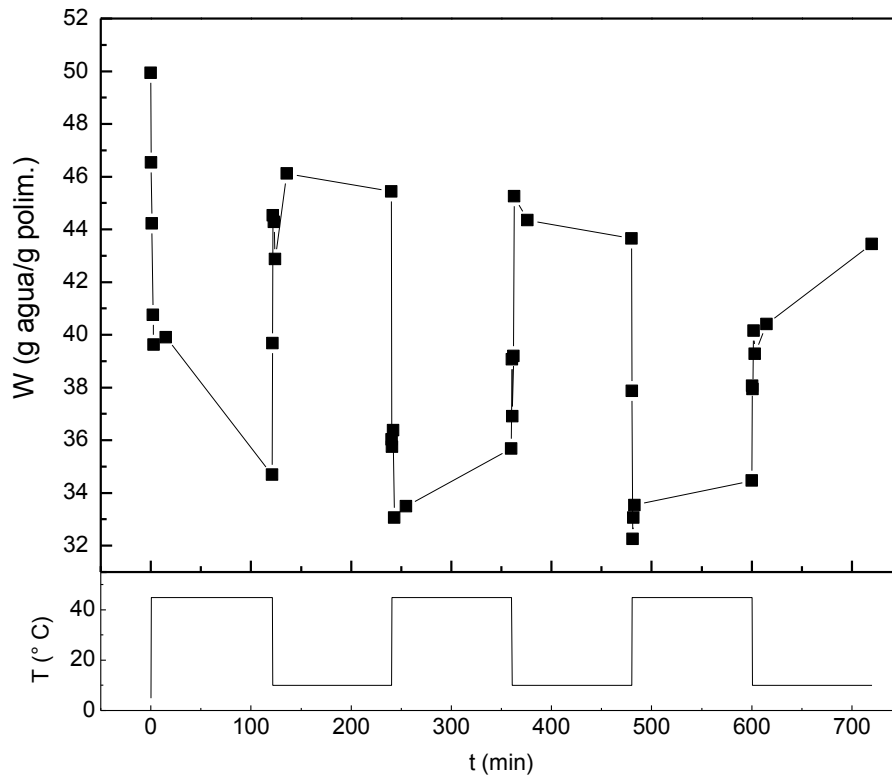


Figura 33. Variación de hinchamiento en agua pura (pH 6) para el criogel Glicol-quitosana/PVCL/genipina a cambios periódicos escalonados entre 5 y 45 °C.

CONCLUSIONES

Una serie de copolímeros de injerto basados en el sistema quitosana-*graft*-poli(*N*-vinilcaprolactama) y sus respectivos materiales funcionales (nanopartículas y criogeles). La característica más importante de los copolímeros obtenidos es su solubilidad en agua, incluso a valores de pH ligeramente alcalino (pH 8), a temperaturas por debajo de la LCST.

La modificación de la arquitectura molecular permite controlar las propiedades termosensibles de los copolímeros en disoluciones acuosas. El comportamiento térmico de los copolímeros fue dependiente de la longitud de cadena injertada y el espaciamiento entre las cadenas de PVCL injertadas, obteniéndose temperaturas de transición entre 36-44 °C. De manera general, la LCST de las soluciones de estos materiales fue cercana a las transiciones observadas en los homopolímeros correspondientes. El grado de injerto para estos copolímeros osciló de 7-19 % p/p, en dependencia de su arquitectura molecular.

Paralelamente, se investigó la influencia del pH y la fuerza iónica en las propiedades de estos copolímeros en disolución acuosa. Así, se encontró una fuerte dependencia del tamaño hidrodinámico y el potencial- ζ de los ovillos macromoleculares del copolímero con respecto a estos parámetros químico-físicos. La temperatura de transición ovillo-glóbulo decrece a medida que se incrementa la fuerza iónica y el pH de la disolución.

Para evaluar las posibles aplicaciones de estos materiales anfifílicos, se desarrollaron sistemas nanoestructurados de Cs-*g*-PVCL por gelificación ionotrópica con tripolifosfato. Las características morfológicas, estabilidad, así como el rendimiento de incorporación de fármaco obtenido postulan a estos materiales como posibles acarreadores de liberación controlada de fármacos. Las nanopartículas del copolímero

presentan características morfológicas y de estabilidad adecuadas, así como una buena eficiencia de incorporación de un fármaco modelo.

Por otro lado, el desarrollo de criogeles a partir del sistema quitosana/poli(*N*-vinil caprolactama), con una estructura macroporosa, tamaños de poro entre 20 y 100 nm conservan las propiedades de termosensibilidad del copolímero.

Sobre esta base, es posible sugerir que los copolímeros obtenidos de quitosana-graft-poli(*N*-vinil caprolactama) tienen propiedades ventajosas para la preparación de materiales avanzados y su aplicación en formulaciones bioactivas termosensibles, sistemas inteligentes de liberación de fármacos, así como andamiajes porosos para la ingeniería de tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Aguilar, M. R.; San Román, J. Introduction to Smart Polymers and Their Applications. In *Smart Polymers and their Applications*; Aguilar, M. R., San Román, J., Eds.; Elsevier Ltd: Cambridge, 2014; pp 1–11.
- (2) Gil, E. S.; Hudson, S. M. Stimuli-Responsive Polymers and Their Bioconjugates. **2004**, *29*, 1173–1222.
- (3) Pasparakis, G.; Vamvakaki, M. Multiresponsive Polymers: Nano-Sized Assemblies, Stimuli-Sensitive Gels and Smart Surfaces. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (6), 1234.
- (4) Galego Fernández, N.; Martínez Sánchez, R.; Peniche-Covas, C.; Prieto González, S.; Rieumont Briones, J. *Química-Física de Los Polímeros*, 1987.
- (5) Galaev, I.; Mattiasson, B. “Smart” Polymers and What They Could Do in Biotechnology and Medicine. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17* (8), 335–340.
- (6) Hoffman, A. S. Stimuli-Responsive Polymers: Biomedical Applications and Challenges for Clinical Translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, *65*, 10–16.
- (7) Hoogenboom, R. Temperature-Responsive Polymers: Properties, Synthesis and Applications. In *Smart Polymers and their Applications*; Aguilar, M. R., San Román, J., Eds.; Elsevier Ltd: Cambridge, 2014; pp 15–44.
- (8) Aseyev, V. O.; Tenhu, H.; Winnik, F. M. Temperature Dependence of the Colloidal Stability of Neutral Amphiphilic Polymers in Water. *Adv Polym Sci* **2006**, *196*, 1–85.
- (9) Tager, A. A.; Safronov, A. P.; Sharina, S. V.; Galaev, I. Y. Thermodynamic Study of poly(N-Vinyl Caprolactam) Hydration at Temperatures close to Lower Critical Solution Temperature. *Colloid Polym. Sci.* **1993**, *271* (9), 868–872.
- (10) Moelbert, S.; De Los Rios, P. Hydrophobic Interaction Model for Upper and Lower Critical Solution Temperatures. *Macromolecules* **2003**, *36* (15), 5845–5853.

- (11) Laukkanen, A.; Wiedmer, S. K.; Varjo, S.; Riekkola, M.-L.; Tenhu, H. Stability and Thermosensitive Properties of Various Poly (N -Vinylcaprolactam) Microgels. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280* (1), 65–70.
- (12) Dimitrov, I.; Trzebicka, B.; Müller, A. H. E.; Dworak, A.; Tsvetanov, C. B. Thermosensitive Water-Soluble Copolymers with Doubly Responsive Reversibly Interacting Entities. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (11), 1275–1343.
- (13) Peppas, N. Hydrogels in Pharmaceutical Formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50* (1), 27–46.
- (14) Samal, S. K.; Dash, M.; Dubruel, P.; Van Vlierbergue, S. Smart Polymer Hydrogels: Properties, Synthesis and Applications. In *Smart Polymers and their Applications*; Aguilar, M. R., San Román, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2014; pp 237–270.
- (15) Bromberg, L.; Ron, E. S. Temperature-Responsive Gels and Thermogelling Polymer Matrices for Protein and Peptide Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *31* (3), 197–221.
- (16) Ross-Murphy Simon B. Thermoreversible and Irreversible Physical Gels from Biopolymers. In *Polymer Gels*; 2003.
- (17) Lozinsky, V. I.; Galaev, I. Y.; Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Jungvid, H.; Mattiasson, B. Polymeric Cryogels as Promising Materials of Biotechnological Interest. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (10), 445–451.
- (18) Henderson, T. M. a.; Ladewig, K.; Haylock, D. N.; McLean, K. M.; O'Connor, A. J. Cryogels for Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (21), 2682.
- (19) Mann, S. Life as a Nanoscale Phenomenon. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 5306–5320.
- (20) Otto, D. P.; Villiers, M. Physicochemical Principles of Nanosized Drug Delivery Systems. In *Nanotechnology in Drug Delivery*; de Villiers, M. M., Aramwit, P., Kwon, G. S., Eds.; Springer: New York, NY, 2009; pp 3–33.
- (21) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. In *Polymers in Drug Delivery*; Uchegbu, I., Schatzlein, A. G., Eds.; CRC Press: U.S.A., 2006; pp 101–110.
- (22) Peniche, H.; Peniche, C. Chitosan Nanoparticles: A Contribution to Nanomedicine. *Polym. Int.* **2011**, *60* (6), 883–889.
- (23) Pantaleone, D.; Yalpani, M.; Scollar, M. Unusual Susceptibility of Chitosan to Enzymic Hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **1992**, *237*, 325–332.
- (24) Chirkov, S. N. The Antiviral Activity of Chitosan. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2002**, *38* (1), 5–13.

- (25) Calvo, P.; Remuñan-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63* (1), 125–132.
- (26) Csaba, N.; Köping-höggård, M.; Alonso, M. J. Ionically Crosslinked Chitosan / Tripolyphosphate Nanoparticles for Oligonucleotide and Plasmid DNA Delivery. **2009**, *382*, 205–214.
- (27) Fernández-Gutiérrez, M.; Bossio, O.; Gómez-Mascaraque, L. G.; Vázquez-Lasa, B.; Román, J. S. Bioactive Chitosan Nanoparticles Loaded with Retinyl Palmitate: A Simple Route Using Ionotropic Gelation. *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216* (12), 1321–1332.
- (28) Peniche, H.; Reyes-Ortega, F.; Aguilar, M. R.; Rodríguez, G.; Abradelo, C.; García-Fernández, L.; Peniche, C.; San Román, J. Thermosensitive Macroporous Cryogels Functionalized with Bioactive Chitosan/bemiparin Nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13* (11), 1556–1567.
- (29) Mitra, S.; Gaur, U.; Ghosh, P. C.; Maitra, a. N. Tumour Targeted Delivery of Encapsulated Dextran-Doxorubicin Conjugate Using Chitosan Nanoparticles as Carrier. In *Journal of Controlled Release*; 2001; Vol. 74, pp 317–323.
- (30) Shao, P.; Wang, B.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, Y. The Application of Thermosensitive Nanocarriers in Controlled Drug Delivery. *J. Nanomater.* **2011**, *2011*, 1–12.
- (31) Liu, J.; Debuigne, A.; Detrembleur, C.; Jérôme, C. Poly(N-Vinylcaprolactam): A Thermoresponsive Macromolecule with Promising Future in Biomedical Field. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 1941–1968.
- (32) Kirsh, Y. E.; Yanul, N.; Kalninsh, K. Structural Transformations and Water Associate Interactions in Poly-N-Vinylcaprolactam–water System. *European Polymer Journal*, 1999, *35*, 305–316.
- (33) Boyko, V. B. N-Vinylcaprolactam Based Bulk and Microgels: Synthesis, Structural Formation and Characterization by Dynamic Light Scattering, Dresden University of Technology, 2004.
- (34) Solomon, O. F.; Corciovei, M.; Boghin, C. Radical Bulk Polymerization of N-Vinylcaprolactam. *J. Appl. Polym. Sci.* **1968**, *12* (8), 1843–1851.
- (35) Kirsh, Y. E.; Soos, T. A.; Karaputadze, T. M. Poly-N-Vinylamides, Complexation and Conformational Changes in Aqueous Solution. *Eur. Polym. J.* **1983**, *19* (7), 639–645.
- (36) Odian, G. *Principles of Polymerization*, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, U.S.A., 2004.

- (37) Hawker, C. "Living" Free Radical Polymerization: A Unique Technique for the Preparation of Controlled Macromolecular Architectures. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30* (9), 373–382.
- (38) Nakabayashi, K.; Mori, H. Recent Progress in Controlled Radical Polymerization of N-Vinyl Monomers. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (10), 2808–2838.
- (39) Ponce-Vargas, S. M.; Cortez-Lemus, N. A.; Licea-Claverie, A. Preparation of Poly(N -Vinylcaprolactam) (NVCL) and Statistical Copolymers of NVCL with Variable Cloud Point Temperature by Using A Trithiocarbonate RAFT Agent. *Macromol. Symp.* **2013**, *325-326*, 56–70.
- (40) Beija, M.; Marty, J.; Destarac, M. Thermoresponsive poly(N-Vinyl Caprolactam)-Coated Gold Nanoparticles: Sharp Reversible Response and Easy Tunability. *Chem. Commun. (Camb).* **2011**, *47* (10), 2826–2828.
- (41) Tager, a. a.; Safronov, a. P.; Berezyuk, E. a.; Galaev, I. Y. Lower Critical Solution Temperature and Hydrophobic Hydration in Aqueous Polymer Solutions. *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272* (10), 1234–1239.
- (42) Shinoda, K.; Fujihira, M. The Analysis of the Solubility of Hydrocarbons in Water. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1968, *41*, 2612–2615.
- (43) Shinoda, K. "Iceberg" Formation and Solubility. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81* (13), 1300–1302.
- (44) Costas, M.; Patterson, D. Heat Capacities of Water + Organic-Solvent Mixtures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1*, 1985, *81*, 2381.
- (45) Frank, H. S.; Evans, M. W. Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507.
- (46) Dubovik, A. S.; Makhaeva, E. E.; Grinberg, V. Y.; Khokhlov, A. R. Energetics of Cooperative Transitions of N-Vinylcaprolactam Polymers in Aqueous Solutions. *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206* (9), 915–928.
- (47) Makhaeva, E. .; Tenhu, H.; Khokhlov, A. . Behaviour of poly(N-Vinylcaprolactam) Macromolecules in the Presence of Organic Compounds in Aqueous Solution. *Polymer (Guildf).* **2000**, *41* (26), 9139–9145.
- (48) Meeussen, F.; Nies, E.; Berghmans, H.; Verbrugghe, S.; Goethals, E.; Du Prez, F. Phase Behaviour of poly(N-Vinyl Caprolactam) in Water. *Polymer*, 2000, *41*, 8597–8602.
- (49) Maeda, Y.; Nakamura, T.; Ikeda, I. Hydration and Phase Behavior of Poly(N -Vinylcaprolactam) and Poly(N -Vinylpyrrolidone) in Water. *Macromolecules* **2002**, *35* (1), 217–222.

- (50) Sun, S.; Wu, P. Infrared Spectroscopic Insight into Hydration Behavior of poly(N-Vinylcaprolactam) in Water. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (40), 11609–11618.
- (51) Medeiros, S. F.; Barboza, J. C. S.; Ré, M. I.; Giudici, R.; Santos, A. M. Solution Polymerization of N -Vinylcaprolactam in 1,4-Dioxane. Kinetic Dependence on Temperature, Monomer, and Initiator Concentrations. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *118* (1), 229–240.
- (52) Medeiros, S. F.; Barboza, J. C. S.; Giudici, R.; Santos, A. M. Thermally-Sensitive and Biocompatible Poly(N -Vinylcaprolactam): A Kinetic Study of Free Radical Polymerization in Ethanol. *J. Macromol. Sci. Part A* **2013**, *50* (7), 763–773.
- (53) Wang, W. Polymer Characterization Techniques. In *Polymers in Drug Delivery*; Uchegbu, I. F., Schatzlein, A. G., Eds.; CRC Press: U.S.A., 2006.
- (54) Gauglitz, G.; Vo-Dinh, T. *Handbook of Spectroscopy*; Gauglitz, G., Vo-Dinh, T., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2003.
- (55) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers poly(N-Isopropylacrylamide), poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3055–3064.
- (56) Markvicheva, E. a.; Kuptsova, S. V.; Mareeva, T. Y.; Vikrov, A. a.; Dvina, T. N.; Strukova, S. M.; Belokon, Y. N.; Kochetkov, K. a.; Baranova, E. N.; Zubov, V. P.; Pncelet, D.; Parmar, V. S.; Kumar, R.; Rumsh Lev D. Immobilized Enzymes and Cells in Poly (N-Vinyl Caprolactam) -Based Hydrogels. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *88*, 145–157.
- (57) Srivastava, A.; Kumar, A. Synthesis and Characterization of a Temperature-Responsive Biocompatible poly(N-Vinylcaprolactam) Cryogel: A Step towards Designing a Novel Cell Scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2009**, *20* (10), 1393–1415.
- (58) Srivastava, A.; Kumar, A. Thermoresponsive poly(N-Vinylcaprolactam) Cryogels: Synthesis and Its Biophysical Evaluation for Tissue Engineering Applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21* (11), 2937–2945.
- (59) Ling, Y. Q.; Nie, H. L.; Brandford-White, C.; Williams, G. R.; Zhu, L. M. Metal Chelate Affinity Precipitation: Purification of BSA Using poly(N-Vinylcaprolactam-Co-Methacrylic Acid) Copolymers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *94*, 281–287.
- (60) Imaz, A.; Forcada, J. N -Vinylcaprolactam-Based Microgels: Synthesis and Characterization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46* (7), 2510–2524.
- (61) Ramos, J.; Imaz, A.; Forcada, J. Temperature-Sensitive Nanogels: poly(N-Vinylcaprolactam) versus poly(N-Isopropylacrylamide). *Polym. Chem.* **2012**, *3* (4), 852.

- (62) Imaz, A.; Forcada, J. N-Vinylcaprolactam-Based Microgels for Biomedical Applications. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2010**, *48* (5), 1173–1181.
- (63) Kurita, K. Controlled Functionalization of the Polysaccharide Chitin. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26* (9), 1921–1971.
- (64) Peniche, C.; Goycoolea, F. M.; Argüelles-Monal, W. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In *Monomers, polymers and composites from renewable resources*; Belgacem, M. N., Gandini, A., Eds.; Elsevier B.V., 2008; Vol. 1, pp 517–542.
- (65) Melito, H. S.; Daubert, C. R. Rheological Innovations for Characterizing Food Material Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, *2*, 153–179.
- (66) Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. .; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer (Guildf)*. **2001**, *42* (8), 3569–3580.
- (67) Vårum, K. M.; Anthonsen, M. W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. Determination of the Degree of N-Acetylation and the Distribution of N-Acetyl Groups in Partially N-Deacetylated Chitins (chitosans) by High-Field N.m.r. Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211* (1), 17–23.
- (68) Alonso, J. G.; Peniche-Covas, C.; Nieto, J. M. Determination of the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by Thermal Analysis. *J. Therm. Anal.* **1983**, *28* (1), 189–193.
- (69) Sabaa, M. W. Chitosan-G-Copolymers: Synthesis, Properties, and Applications. In *Polysaccharide Based Graft Copolymers*; Kalia, S., Sabaa, M. W., Eds.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Heidelberg, 2013; p 363.
- (70) Pastor de Abram, A. *Quitina Y Quitosano: Obtencion, Caracterizacion Y Aplicaciones*; Pastor de Abram, A., Ed.; Pontificia Universidad Católica del Perú: Perú, 2004.
- (71) Zhang, M.; Müller, A. H. E. Cylindrical Polymer Brushes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2005**, *43* (16), 3461–3481.
- (72) Recillas, M.; Silva, L. L.; Peniche, C.; Goycoolea, F. M.; Rinaudo, M.; Argüelles-Monal, W. M. Thermoresponsive Behavior of Chitosan-G-N-Isopropylacrylamide Copolymer Solutions. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1633–1641.
- (73) Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Reis, R. L.; Mano, J. F. Graft Copolymerized Chitosan—present Status and Applications. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62* (2), 142–158.
- (74) Duan, W.; Chen, C.; Jiang, L.; Li, G. H. Preparation and Characterization of the Graft Copolymer of Chitosan with Poly[rosin-(2-Acryloyloxy)ethyl Ester]. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73* (4), 582–586.

- (75) Argüelles-Monal, W.; Gárciga, M.; Peniche-Covas, C. Study of the Stoichiometric Polyelectrolyte Complex between Chitosan and Carboxymethyl Cellulose. *Polym. Bull.* **1990**, *23* (3), 307–313.
- (76) Peniche, C.; Argüelles-Monal, W.; Davidenko, N.; Sastre, R.; Gallardo, A.; San Román, J. Self-Curing Membranes of chitosan/PAA IPNs Obtained by Radical Polymerization: Preparation, Characterization and Interpolymer Complexation. *Biomaterials* **1999**, *20* (20), 1869–1878.
- (77) Poon, L.; Wilson, L. D.; Headley, J. V. Chitosan-Glutaraldehyde Copolymers and Their Sorption Properties. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *109*, 92–101.
- (78) Wan, D.; Zhou, Q.; Pu, H.; Yang, G. Controlled Radical Polymerization of N-Vinylcaprolactam Mediated by Xanthate or Dithiocarbamate. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3756–3765.
- (79) Prabakaran, M.; Grailer, J. J.; Steeber, D. a; Gong, S. Stimuli-Responsive Chitosan-Graft-poly(N-Vinylcaprolactam) as a Promising Material for Controlled Hydrophobic Drug Delivery. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8* (9), 843–851.
- (80) Rejinold, N. S.; Thomas, R. G.; Muthiah, M.; Chennazhi, K. P.; Park, I.-K.; Jeong, Y. Y.; Manzoor, K.; Jayakumar, R. Radio Frequency Triggered Curcumin Delivery from Thermo and pH Responsive Nanoparticles Containing Gold Nanoparticles and Its in Vivo Localization Studies in an Orthotopic Breast Tumor Model. *RSC Adv.* **2014**, *4* (74), 39408–39427.
- (81) Rejinold, N. S.; Chennazhi, K. P.; Nair, S. V.; Tamura, H.; Jayakumar, R. Biodegradable and Thermo-Sensitive Chitosan-G-poly(N-Vinylcaprolactam) Nanoparticles as a 5-Fluorouracil Carrier. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (2), 776–786.
- (82) Rejinold, N. S.; Muthunarayanan, M.; Divyarani, V. V.; Sreerexha, P. R.; Chennazhi, K. P.; Nair, S. V.; Tamura, H.; Jayakumar, R. Curcumin-Loaded Biocompatible Thermoresponsive Polymeric Nanoparticles for Cancer Drug Delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *360* (1), 39–51.
- (83) Rejinold, N. S.; Thomas, R. G.; Muthiah, M.; Chennazhi, K. P.; Manzoor, K.; Park, I.-K.; Jeong, Y. Y.; Jayakumar, R. Anti-Cancer, Pharmacokinetics and Tumor Localization Studies of pH-, RF- and Thermo-Responsive Nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 249–262.
- (84) D'Este, M.; Eglin, D.; Alini, M. A Systematic Analysis of DMTMM vs EDC/NHS for Ligation of Amines to Hyaluronan in Water. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *108*, 239–246.
- (85) Reyes-Ortega, F.; Parra-Ruiz, F. J.; Averick, S. E.; Rodríguez, G.; Aguilar, M. R.; Matyjaszewski, K.; San Román, J. Smart Heparin-Based Bioconjugates Synthesized by a Combination of ATRP and Click Chemistry. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (9), 2800.

- (86) Kudyshkin, V. O.; Abdurakhmanova, T. R.; Bozorov, N. I.; Voropaeva, N. L.; Ruban, I. N. Radical Polymerization of N-Vinylcaprolactam in Isopropanol. *Russ. J. Appl. Chem.* **2002**, *75* (9), 1465–1467.
- (87) Tan, G.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, S. Synthesis and Characterization of Injectable Photocrosslinking Poly (ethylene Glycol) Diacrylate Based Hydrogels. *Polym. Bull.* **2008**, *61* (1), 91–98.
- (88) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Morita, J.; Terao, K.; Iwasaki, F.; Tani, S. 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-Triazin-2-Yl)-4-Methylmorpholinium Chloride: An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. *Tetrahedron* **1999**, *55* (46), 13159–13170.
- (89) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, K.; Tani, S. Formation of Carboxamides by Direct Condensation of Carboxylic Acids and Amines in Alcohols Using a New Alcohol- and Water-Soluble Condensing Agent: DMT-MM. *Tetrahedron* **2001**, *57* (8), 1551–1558.
- (90) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, 3rd ed.; Wiley, J. & S., Ed.; Chichester, England, 2001.
- (91) Zając, A.; Hanuza, J.; Wandas, M.; Dymińska, L. Determination of N-Acetylation Degree in Chitosan Using Raman Spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *134*, 114–120.
- (92) Peniche-Covas, C.; Argüelles-Monal, W.; San Román, J. A Kinetic Study of the Thermal Degradation of Chitosan and a Mercaptan Derivative of Chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* **1993**, *39* (1), 21–28.
- (93) Kozanoğlu, S.; Özdemir, T.; Usanmaz, A. Polymerization of N-Vinylcaprolactam and Characterization of Poly(N-Vinylcaprolactam). *J. Macromol. Sci. Part A* **2011**, *48* (6), 467–477.
- (94) Cheng, H.; Shen, L.; Wu, C. LLS and FTIR Studies on the Hysteresis in Association and Dissociation of Poly(N- Isopropylacrylamide) Chains in Water. *Macromolecules* **2006**, *39* (6), 2325–2329.
- (95) Kirsh, Y. E. Water-Soluble Poly (n-Vinylamidess): Microstructure, Solvation, Conformational State and Complex Formation in Aqueous Solutions. *Progress in Polymer Science*, 1993, *18*, 519–542.
- (96) Laukkanen, A.; Valtola, L.; Winnik, F. M.; Tenhu, H. Formation of Colloidally Stable Phase Separated Poly(N -Vinylcaprolactam) in Water: A Study by Dynamic Light Scattering, Microcalorimetry, and Pressure Perturbation Calorimetry. *Macromolecules* **2004**, *37* (6), 2268–2274.
- (97) Mikheeva, L. M.; Grinberg, N. V.; Mashkevich, A. Y.; Grinberg, V. Y.; Thanh, L. T. M.; Makhaeva, E. E.; Khokhlov, A. R. Microcalorimetric Study of Thermal Cooperative Transitions in Poly(N -Vinylcaprolactam) Hydrogels. *Macromolecules* **1997**, *30* (9), 2693–2699.

- (98) Fernández-Quiroz, D.; González-Gómez, Á.; Lizardi-Mendoza, J.; Vázquez-Lasa, B.; Goycoolea, F.; San Román, J.; Argüelles-Monal, W. Effect of the Molecular Architecture on the Thermosensitive Properties of Chitosan-G-Poly(N-Vinylcaprolactam). *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 92–101.
- (99) Verbrugghe, S.; Laukkanen, A.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Du, F. E. Light Scattering and Microcalorimetry Studies on Aqueous Solutions of Thermo-Responsive PVCL- G -PEO Copolymers. **2003**, *44*, 6807–6814.
- (100) Philippova, O. E.; Korchagina, E. V.; Volkov, E. V.; Smirnov, V. A.; Khokhlov, A. R.; Rinaudo, M. Aggregation of Some Water-Soluble Derivatives of Chitin in Aqueous Solutions : Role of the Degree of Acetylation and Effect of Hydrogen Bond Breaker. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (1), 687–694.
- (101) Korchagina, E. V.; Philippova, O. E. Multichain Aggregates in Dilute Solutions of Associating Polyelectrolyte Keeping a Constant Size at the Increase in the Chain Length of Individual Macromolecules. **2010**, 3457–3466.
- (102) Novoa-carballal, R.; Riguera, R.; Fernandez-megia, E. Chitosan Hydrophobic Domains Are Favoured at Low Degree of Acetylation and Molecular Weight. *Polymer (Guildf)*. **2013**, *54* (8), 2081–2087.
- (103) Buhler, E.; Rinaudo, M. Structural and Dynamical Properties of Semirigid Polyelectrolyte Solutions: A Light-Scattering Study. **2000**, 2098–2106.
- (104) Pa, J.; Yu, T. L. Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions. **2001**, 985–991.
- (105) Vorob'ev, M. M.; Burova, T. V.; Grinberg, N. V.; Dubovik, A. S.; Faleev, N. G.; Lozinsky, V. I. Hydration Characterization of N-Vinylcaprolactam Polymers by Absorption Millimeter-Wave Measurements. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, *288* (14-15), 1457–1463.
- (106) Makhaeva, E. E.; Tenhu, H.; Khokhlov, A. R. Behavior of Poly(N -Vinylcaprolactam- Co -Methacrylic Acid) Macromolecules in Aqueous Solution: Interplay between Coulombic and Hydrophobic Interaction. *Macromolecules* **2002**, *35* (5), 1870–1876.
- (107) De la Fuente, M.; Seijo, B.; Alonso, M. J. Bioadhesive Hyaluronan-Chitosan Nanoparticles Can Transport Genes across the Ocular Mucosa and Transfect Ocular Tissue. *Gene Ther.* **2008**, *15* (9), 668–676.
- (108) Navarro-Verdugo, A. L.; Goycoolea, F. M.; Romero-Meléndez, G.; Higuera-Ciapara, I.; Argüelles-Monal, W. A Modified Boltzmann Sigmoidal Model for the Phase Transition of Smart Gels. *Soft Matter* **2011**, *7* (12), 5847.