



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

**DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-
FÍSICA DE DERIVADOS DE QUITOSANA BASADOS EN
“CLICK CHEMISTRY”**

Por:

Marcelino Montiel Herrera

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

Enero, 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Marcelino Montiel Herrera, 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. Francisco M. Goycoolea Valencia

Asesor



Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Asesor



Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota

Asesora

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

Inicialmente, agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por condonar los pagos de mis colegiaturas correspondientes al posgrado de Doctorado en Ciencias durante el periodo 2011-2014, y por el estímulo becario que recibí durante mis estudios de posgrado. Asimismo agradezco el financiamiento económico que brindó, en conjunto al Fondo de Infraestructura, CONACYT, México (Apoyo 226082) a los proyectos del Laboratorio de Polímeros Naturales del CIAD Guaymas para la realización de este trabajo doctoral.

Agradezco al CONACYT el financiamiento brindado a través de una beca doctoral (número de apoyo 213903) que recibí de 1 de Febrero de 2005 a 31 de Enero de 2008, como apoyo para mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas, adscrito al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dicho apoyo fue resultado de la convocatoria 290228, en la que participé con el número de becario 41593.

Agradezco muy especialmente al Dr. Waldo M. Argüelles Monal, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado bajo su dirección y enseñanza, aún sin que pudiera yo contar con el financiamiento becario del CONACYT. Gracias a esa oportunidad que él me brindó, hoy puedo lograr consolidar un paso más para mi desarrollo académico y personal.

Agradezco a los doctores Jaime Lizardi Mendoza, Francisco M. Goycoolea y Maricarmen Recillas Mota, por su enseñanza y apoyo académico durante mis estudios doctorales.

Agradezco a la M. en C. Luisa Silva por su enseñanza y apoyo técnico brindado durante mis estudios doctorales. Luisa colaboró de manera cotidiana en la preparación de la instrumentación general para la elaboración de los experimentos realizados en este trabajo.

Agradezco a la M. en C. Karla Robinson Martínez por el apoyo técnico brindado durante mis estudios doctorales. Karla colaboró con la realización de los espectros de infrarrojo para cada derivado de quitosana que sintetice.

Agradezco al Dr. Neil E. Jacobsen (Universidad de Arizona) por su enseñanza y el apoyo técnico brindado para realizar y analizar los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

Agradezco a la Lic. Elsa Evelia López Álvarez y Dra. Lorena O. Noriega Orozco por el apoyo instrumental que me brindó para realizar estudios de criogelificación y microscopia durante mis estudios de doctorado.

Agradezco muy gustosamente a la Lic. Verónica Araiza Sánchez por el apoyo técnico que me brindó durante mis estudios de doctorado. Verónica siempre me apoyó de manera muy efectiva, eficiente y rápida, en todos los asuntos relacionados con los trámites académicos que necesité durante mi posgrado.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Gloria Yepiz-Plascencia por su apoyo académico, técnico y administrativo durante mis estudios de posgrado en el CIAD.

Agradezco atentamente al servicio bibliotecario de las Unidades Guaymas y Hermosillo, que durante el periodo 2011-2014, me apoyaron con la búsqueda, localización y entrega de artículos académicos que constantemente solicité durante mis estudios doctorales. Ellos son: Lic. Lizeth Verónica López Acedo, M. en C. Alfonso Martínez Borraz, Q. B. Fernando Alejo Leyva Livshin, pQ. B. Luis Francisco Conde Ortíz y Gerardo Reyna Cáñez.

Por último quisiera agradecer a todo el Departamento Administrativo y Académico de la Coordinación de Aseguramiento de Calidad y Aprovechamiento Sustentable de Recursos Naturales (CIAD – Unidad Guaymas), Lic. Brenda Annette Guzmán Robles, Lic. Fabiola Peraza Liera, Dr. Waldo M. Argüelles Monal, Dra. Jaqueline García Hernández y Dra. Maricarmen T. Recillas Mota, por

el apoyo que me ofrecieron, dentro de sus capacidades, para resolver mis trámites, necesidades e inquietudes académicas.

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi madre Ana Angélica Herrera León, por apoyarme durante todo mi desarrollo académico y profesional.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
I. Introducción.....	1
II. Polímeros Naturales y Sintéticos	4
III. Quitosana	6
3.1. Química de la Quitosana	7
3.2. Propiedades Químico-Físicas de la Quitosana	9
3.3. Propiedades Mecano-Dinámicas de la Quitosana	11
3.4. Geles de Quitosana	12
IV. Maleimidias y Furanos.....	14
V. Click Chemistry	16
5.1. Cicloadición de Huisgen	18
5.2. Cicloadición de Diels-Alder	18
VI. Hipótesis.....	20
VII. Objetivo General.....	21
VIII. Objetivos Particulares	22
IX. Materiales y Métodos.....	23
9.1. Reactivos	23
9.1.1. Quitosana	23
9.1.2. Síntesis de Furfuril Propargil Éter (FPE)	24
9.1.3. Síntesis de Bismaleimida (BM)	24

CONTENIDO (continuación)

	Página
9.2. Reacciones	25
9.2.1. Quitosana: cicloadición de Huisgen	25
9.2.1.1. N-ftaloimidación	25
9.2.1.2. Bromación	25
9.2.1.3. Azidación	26
9.2.1.4. Des-N-ftaloimidación.....	26
9.2.1.5. Click: 6-azida-6-desoxi-quitosana + FPE	26
9.2.1.6. Quitosana-Click + BM.....	27
9.2.2. Quitosana: cicloadición de Diels-Alder	27
9.2.2.1. N-(furfural) quitosana.....	27
9.2.2.2. N-(furfural) quitosana + BM.....	28
9.3. Caracterización químico-física y propiedades mecánicas ..	28
9.3.1. FT-IR	29
9.3.2. RMN de ¹ H y ¹³ C	29
9.3.3. Reología dinámica de alta resolución (RDAR).....	29
9.3.3.1. RDAR: Sistemas compuestos por QClick-BM.....	30
9.3.3.2. RDAR: Sistemas compuestos por FC-BM.....	30
9.3.4. Microesferas de FC-BM.....	31
9.3.4.1. Morfología	32
9.3.4.2. Hinchamiento	32
9.3.4.3. Liberación de AM por microesferas de FC-BM.....	33
X. Resultados y Discusiones.....	34
10.1. Furan-Chitosan Hydrogels Based on Click Chemistry	34
10.2. N-(furfural) Chitosan Hydrogels Based on Diels-Alder Cycloadditions and Application as Microspheres for Controlled Drug Release	53
XI. Conclusiones	72
XII. Bibliografía	73

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Arreglo estructural de los polímeros.....	5
2	Proyección de Haworth de la quitina y la quitosana.....	6
3	Biosíntesis de la quitina y quitosana a partir de una hexosa.....	8
4	Formación de la maleimida a través del anhídrido maleico y el amoniaco	14
5	Síntesis de la bismaleimida.....	15
6	Estructura molecular del furfural.....	15
7	Reacción de Cicloadición 1,3 de Huisgen.....	18
8	Reacción de Cicloadición de Diels-Alder.....	19
9	Synthetic scheme for the preparation of 6-azide-6-deoxy chitosan.....	42
10	FT-IR spectra of chitosan derivatives.....	43
11	Solid state ¹³ C-NMR spectrum of N-phthaloyl chitosan.....	45
12	¹ H-NMR spectra of chitosan and derivatives.....	46
13	Synthetic scheme for the preparation of the clicked-chitosan derivatives.....	47
14	FT-IR spectrum of furfuryl propargyl ether.....	48
15	FT-IR and ¹ H-NMR of the furan-chitosan derivative obtained through click chemistry.....	49
16	Photographs of the gelation and evolution of viscoelastic moduli....	50
17	Synthetic scheme for the preparation of N-(furfural) chitosan and DA cycloaddition.....	61
18	FT-IR and ¹ H-NMR spectra of N-(furfural) chitosan (8.3% degree of substitution).....	62

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
19	Evolution of viscoelastic moduli with time and frequency for N-(furfural) chitosan	65
20	Evolution of viscoelastic moduli with time and frequency for the system of FC-BM.....	66
21	ESEM Micrographs of hydrogel microspheres.....	68
22	Plot showing the dependence of the release of methylene blue (<i>W</i>).....	70
S1	Supplementary material.....	52
S2	Supplementary material.....	71
	Schematic Abstract	54

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tipos de reacciones químicas comúnmente usadas para la modificación de la quitosana.....	9
2	Reacciones que cumplen con las características de la click chemistry.....	17

RESUMEN

La modificación química de los polímeros a través de click chemistry ha incrementado drásticamente durante los últimos 10 años. Estas modificaciones se hacen para incorporar nuevas propiedades químico-físicas en los materiales y así, potencialmente generar nuevas oportunidades de desarrollo tecnológico. En este trabajo, la quitosana se modificó por medio de varias reacciones químicas, para obtener derivados de quitosana (DQ) con propiedades de tipo Diels-Alder. La síntesis de los DQ se confirmó por análisis de FT-IR y RMN de ^1H y ^{13}C . Además, los espectros de ^1H -RMN indicaron varios grados de sustitución en los DQ. El sistema DQ-BM compuesto por DQ y bismaleimida (BM), produjo hidrogeles irreversibles por medio de cicloadiciones de Diels-Alder en temperaturas superiores a 65°C . Los estudios reológicos indicaron que los hidrogeles DQ-BM con mayor grado de sustitución química, eran más fuertes que los hidrogeles con menor grado de sustitución. Con el sistema FC-BM compuesto por N-furfural quitosana (FC) y BM, se lograron obtener microesferas de $\sim 130\ \mu\text{m}$ en diámetro, medidas con un microscopio óptico. Además, los estudios con microscopía electrónica de barrido diferencial de presión variable, mostraron una topología compacta que presenta pequeñas irregularidades en la superficie de las microesferas. En contacto con el agua, las microesferas incrementaron gradualmente su volumen de manera reversible e independiente de la temperatura en 30%. Finalmente, se probó la capacidad de las microesferas para liberar azul de metileno con la finalidad de ser aplicadas para la liberación de sustancias de manera controlada. Se encontró que las microesferas cargan y liberan el colorante de manera gradual durante 600 min. En conclusión, este trabajo muestra que materiales renovables como la quitosana y los derivados furánicos (furfural), pueden utilizarse en conjunto con la Click Chemistry, para diseñar y producir nuevos biomateriales con aplicaciones tecnológicas.

Palabras Clave: Quitosana, Aminación reductiva, Click Chemistry, Huisgen, Diels-Alder, Furanos, Maleimidias.

ABSTRACT

The modification of polymers by click chemistry has increased abruptly over the past 10 years. These modifications are intended to give new physical and chemical properties to materials for novel technological applications. In this study, chitosan was chemically modified by several chemical steps to obtain furan-chitosan derivatives (CD) through click chemistry with the properties of the furan-maleimide chemistry. The synthesis of the CD was confirmed by FT-IR and NMR spectroscopies. Additionally, NMR analysis of the CD showed distinct degrees of chemical substitution. The cross-linkable system (CD-BM) composed of CD and bismaleimide (BM) produced non-reversible hydrogel networks by Diels-Alder cycloadditions at temperatures higher than 65°C. Moreover, mixtures of CD-BM were prepared to analyze their rheological properties. The system CD-BM with higher degrees of substitution, generated stronger hydrogel networks than those with a lower degree of substitution. Furthermore, a system FC-BM composed of furan-chitosan (FC) and BM was able to produce hydrogel microspheres. Environmental scanning electron microscopy revealed the surface of the microspheres to be non-porous with small protuberances. In water, the FC-BM microspheres swelled, increasing their volume by 30%. Finally, these microspheres loaded with methylene blue were able to release the dye gradually, obeying second-order kinetics for times less than 600 minutes. This behavior suggested that diffusion is governed by the relaxation of polymer chains in the swelled state, thus facilitating drug release outside the microspheres. In sum, this study presents proof-of-principle that renewable resources such as furfural and modified-chitosan, together with click chemistry, can be used to design and produce novel materials.

Key words: Chitosan, Reductive Amination, Click Chemistry, Huisgen, Diels-Alder, Furans, Maleimides.

I. INTRODUCCIÓN

Las moléculas de alto peso molecular como los polímeros naturales (e. g., polisacáridos, polinucleótidos y polipéptidos) y los polímeros sintéticos (e. g., polietilenos, poliacrilatos y polivinilos, etc.) están organizadas por decenas, cientos o varios miles de monómeros unidos de manera covalente entre sí. Por ejemplo, la celulosa está constituida esencialmente por un gran número de monómeros de glucosa unidos por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$.

La quitina es el segundo polímero natural más abundante en la naturaleza, y a diferencia de la celulosa, está formada por monómeros de glucosa que tienen unidos grupos acetamidas en la posición 2 del anillo piranoso. La desacetilación exhaustiva de este polisacárido genera quitosana, la cual presenta grupos aminos libres y que en conjunto con sus grupos hidroxilos, pueden ser blancos de varias reacciones químicas que se utilizan para generar nuevos polímeros con propiedades diferentes a las nativas. Por ejemplo, la unión covalente de moléculas lipofílicas a la estructura de un biopolímero, puede generar cambios en el comportamiento químico-físico del material, como modificar sus propiedades mecánicas, su solubilidad, las formas de interactuar con un solvente dado, su temperatura de transición vítrea, etc.

En la actualidad, intencionalmente se busca modificar a un material para hacerlo responsivo ante estímulos externos específicos. Es decir, que responda de manera selectiva ante un estímulo dado. Por ejemplo, el termoplástico carbonato de alil diglicol es transparente en la luz visible, y se opaca cuando se estimula con luz ultravioleta. Sin embargo, la síntesis para lograr las modificaciones en los polímeros, generalmente requiere de procesos en varias etapas, que pueden ser muy costosos, poco viables o generan bajos rendimientos.

En el 2001, el grupo del Prof. Barry Sharpless introdujo el concepto de “**Click Chemistry**” para señalar aquellas reacciones sencillas que se generan en condiciones suaves (25-37°C; pH 4-12) y en un sólo paso; insensibles al solvente, oxígeno y agua; accesibles a un amplio espectro de reactantes que producen una alta regioselectividad en sus productos, y que son mucho más rápidas que las reacciones que ocurren sin catalizadores. Dos de esas reacciones son conocidas como “*cicloadición de Huisgen*” y “*cicloadición de Diels-Alder*”. En este sentido, la Click Chemistry es una alternativa para el diseño y la modificación de las propiedades químicas, físicas y mecánicas de los polímeros naturales a través de reacciones de síntesis orgánica. Como ejemplo, la celulosa y la quitosana se han modificado por la cicloadición de Huisgen para demostrar que la Click Chemistry brinda alternativas muy interesantes para la síntesis de nuevos materiales.

En la actualidad, existe una tendencia a generar materiales con mayor durabilidad y resistencia, de dimensiones más pequeñas y más versátiles, en donde la participación de la Click Chemistry es muy activa. Por ejemplo, se han descrito dispositivos nanoelectrónicos basados en materiales orgánicos para la industria de los electrodomésticos, la automotriz y la computacional; biomateriales estructurados para la ingeniería de tejidos; bionanomateriales para la entrega de fármacos y polinucleótidos en sistemas biológicos, y para dispositivos intradérmicos.

La ciencia de los materiales ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos años, generando una gran diversidad de materiales para el desarrollo de nuevas tecnologías. En la actualidad, se deberían de emplear cada vez más los materiales que provengan de los desechos agroindustriales para generar nuevos biomateriales. Por ejemplo, la industria azucarera podría producir a partir del gabazo y de otros productos secundarios de la producción, derivados furánicos de un alto valor comercial para la industria eléctrica y aeroespacial, debido a las propiedades termoquímicas reversibles de estos materiales.

En este conjunto de ideas, este trabajo busca generar derivados de quitosana a partir de derivados furánicos y reacciones de tipo Click Chemistry, para estudiar sus propiedades químico-físicas y mecano-dinámicas adquiridas por la incorporación de nuevas moléculas en sus cadenas poliméricas.

II. POLÍMEROS NATURALES Y SINTÉTICOS

Los monómeros son moléculas de un peso molecular bajo y definido. Cuando estos se agrupan por medio de enlaces covalentes, pueden dar origen a oligómeros (que se contabilizan entre 2-10 unidades) y polímeros (que involucran entre decenas, cientos, miles e incluso millones de unidades) (Galego et al., 1987).

La literatura especializada ha propuesto el ordenamiento de los polímeros, según la síntesis que los genera, como polímeros policondensados y poliadicionados. Sin embargo, también se les clasifica como polímeros sintéticos y naturales (biopolímeros) y los categorizan según la composición de los monómeros y de las estructuras moleculares que tienden a formar. Por ejemplo, los *homopolímeros* están constituidos por el mismo monómero en cadenas lineales, ramificadas, estrelladas o entrecruzadas; y los *copolímeros*, están formados por dos monómeros distintos distribuidos en cadenas aleatorias, en bloques, injertadas o alternadas (Figura 1) (Galego et al., 1987). Por ejemplo, son biopolímeros esencialmente todas aquellas moléculas de alto peso molecular de origen animal y vegetal, como los polisacáridos (e. g., celulosa, amilosa, quitina, etc.), polipéptidos (e. g., miosina, queratina, globulinas, etc.) y polinucleótidos (e. g., ácidos nucleicos y desoxirribonucleicos). Por otro lado, son polímeros sintéticos todas las macromoléculas sintetizadas por medios de reacciones de polimerización que dan origen a plásticos, pinturas, resinas epóxicas y materiales vidriosos, entre otros.

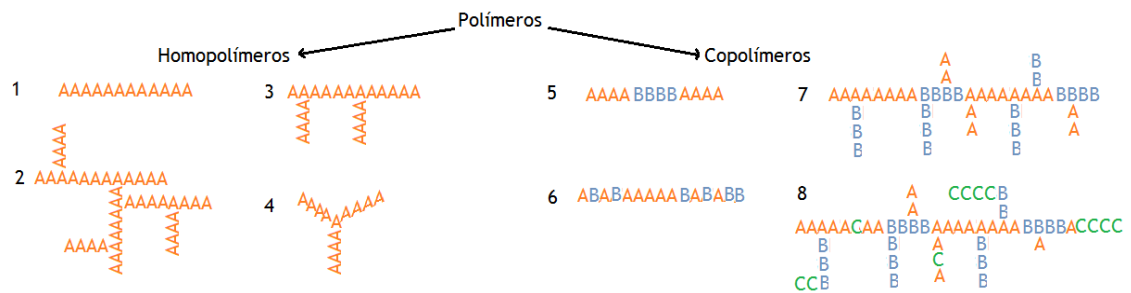


Figura 1. Arreglo estructural de los polímeros. A, B y C, representan monómeros distintos. Observe que los homopolímeros se pueden estructurar como cadenas lineales (1), cadenas entrecruzadas (2), cadenas ramificadas (3) y cadenas estrelladas (4). Los monómeros en los copolímeros se distribuyen en bloques (5), cadenas aleatorias (6), cadenas injertadas y alternadas (7). Cuando los polímeros se conforman por más de tres monómeros se denominan **terpolímeros** y en consecuencia, los arreglos de estos pueden ser muy variados (8).

III. QUITOSANA

Conjuntamente la quitina ($C_{16}H_{26}O_{10}N_2$)_n y su versión desacetilada (>50% de grupos aminos libres en su estructura) la quitosana ($C_{12}H_{22}O_8N_2$)_n, conforman el grupo de aminopolisacáridos más abundante e importante en la naturaleza. Inicialmente, estos polisacáridos aminados se identificaron en algunos hongos, en exoesqueletos de invertebrados, en varias bacterias, algas y líquenes (Pastor de Abram, 2004; Peniche et al., 2008).

Químicamente se denominan a la quitina como la poli[β-(1-4)-N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos] y a la quitosana como la poli[β-(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos] (Figura 2) (Peniche et al., 2008).

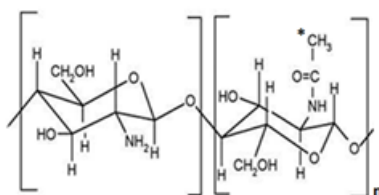


Figura 2. Proyección de Haworth de la quitina y la quitosana. En todas las unidades del aminopolisacárido presentan una amina en la posición dos del anillo glucopiranos. Nótese que el polímero “quitina” tendría amidado un acetato en dicha posición (indicado por el asterisco) y en la “quitosana”, estaría desacetilado en más del 50% de sus grupos aminos. n, representa una cantidad finita de monómeros unidos por enlaces β(1-4) glucosídicos, y potencialmente proyecta un panorama finito de diversos pesos moleculares para estos polímeros.

La quitina se biosintetiza a partir de la glucosa en ocho etapas (Figura 3) y la quitosana se puede producir por varios métodos de desacetilación extensiva de la quitina, que en general se realiza en medios alcalinos concentrados (40-50% de NaOH o KOH) y temperaturas de 60-110°C (Peniche et al., 2008); aunque también se ha descrito para su desacetilación el uso de quitinasas y de irradiación por microondas (Pastor de Abram, 2004). Estos biopolímeros son biodegradables, biocompatibles y de baja toxicidad (Peniche et al., 2008; Gao et al., 2009). Además se pueden modificar químicamente para que adquieran nuevas propiedades químico-físicas y funcionales (e. g., solubilidad y liberación de fármacos) por transferencia o adición de radicales nucleofílicos en todos los

grupos funcionales de sus anillos piranosos (Chen et al., 2009; Gao et al., 2009). Por ejemplo, algunos derivados de la quitosana modificados químicamente con distintas moléculas, presentan una transición de fase como respuesta a un cambio en la temperatura, al pH o la fuerza iónica (Dimitrov et al., 2010; Li et al., 2010; Recillas et al., 2009). Cabe mencionar, que actualmente estos derivados de la quitosana son de interés para la industria biomédica y alimentaria. Por ejemplo, recientemente se reportó la 6-N,N,N-trimetiltriazoil quitosana (Gao et al., 2009), que fue diseñada para aplicaciones biomédicas. En general, existen más derivados de quitosana en la literatura que adolecen de estar poco estudiados, de particular interés, en sus propiedades reológicas.

3.1. Química de la Quitosana

La quitosana puede modificarse químicamente a través de varios tipos de reacciones químicas (Tabla 1) gracias a los hidroxilos presentes en las posiciones 3 y 6, así como de la amina primaria unida al carbono 2 de cada anillo piranoso que conforman el polímero (Rinaudo, 2006).

En la literatura se pueden encontrar modificaciones por polimerización y copolimerización con monómeros como 4-metilpirrolidona, acrilamida, ácido acrílico, ácido metacrílico, anilina, acrilato de metilo, metacrilato de metilo, metoxi-polietilenglicol-p-nitrofenilcarbonato y otros derivados de fosfonometilación (Pastor de Abram, 2004).

En general, las modificaciones que se realizan en la estructura de la quitosana, dado que es un polímero biocompatible, buscan generar materiales con finalidades específicas, como derivados de quitosana sensibles al pH, portadores de polinucleótidos o fármacos, y estabilizadores en la industria cosmética, entre otros (Crescenzi et al., 2007; Gao et al., 2009). En este sentido, recientemente Zampano y colaboradores (2010) han modificado la estructura de la quitosana a través de Click Chemistry para desarrollar derivados de quitosana capaces de formar hidrogeles que responden con cambios en sus propiedades físicas ante distintos entornos de potencial de hidrógeno.

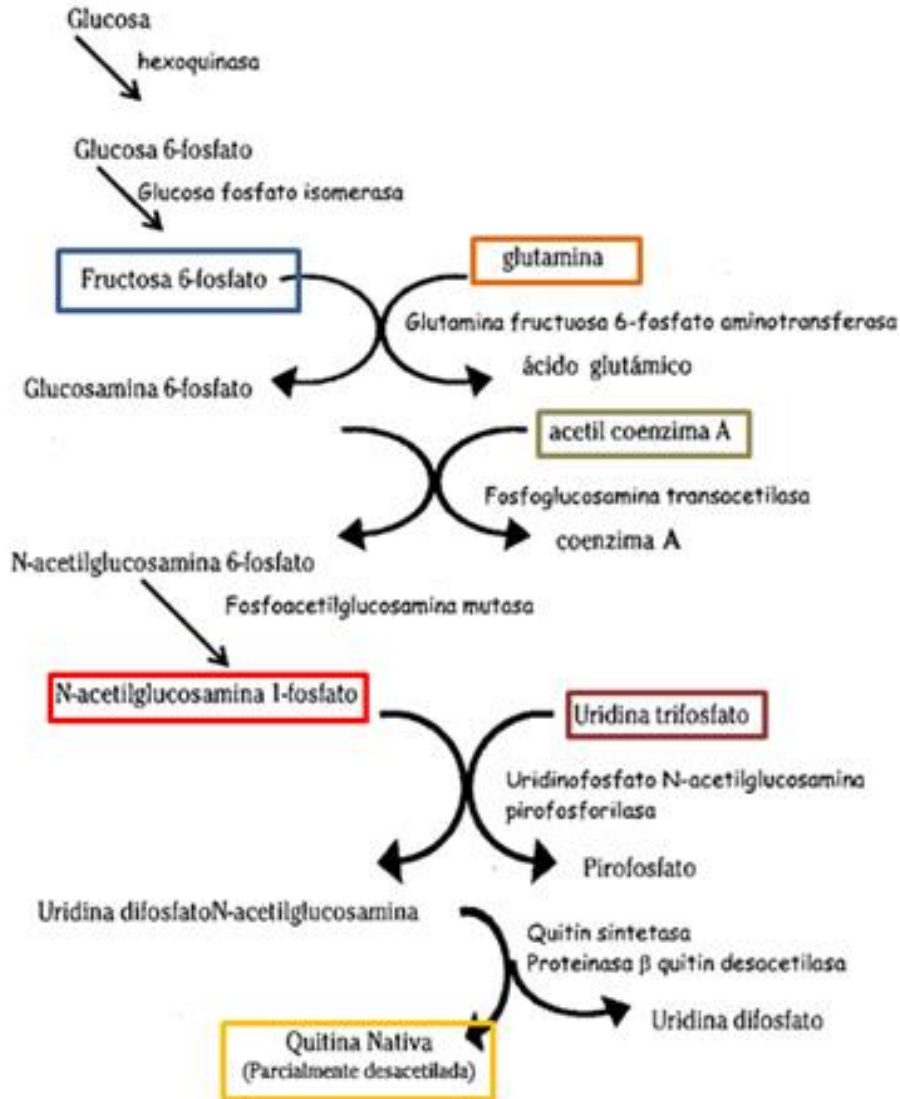


Figura 3. Biosíntesis de la quitina y quitosana a partir de una hexosa. Las flechas indican el curso de la síntesis. Obsérvese que muchos metabolitos en la biosíntesis del polisacárido son sustratos de varios procesos metabólicos esenciales de la fisiología celular (e. g., coenzima A, glutamina, uridina trifosfato). Modificada de Pastor de Abram, 2004.

La modificación química de la quitosana es una herramienta que ha venido creciendo exponencialmente a través del tiempo, que busca generar nuevos derivados para el desarrollo de nuevas aplicaciones para distintas industrias como la biomédica, cosmética y farmacéutica.

Tabla 1. Tipos de reacciones comúnmente usadas para la modificación de la quitosana.

Tipo de reacción	Medio de reacción	Usos del Producto
Desacetilación	NaOH 40-50%/60-110°C	Varios
N, O-Alquilación	Óxido de etileno, propileno, butileno	Cosmética
N-Acilación	CICOR/Piridina/CHCl ₃	Varios
O-Acilación	(CH ₃ -CH ₂ -CO) ₂ O/HClO ₄	Varios
Carboximetilación	HO ₂ C-CHO/NaBH	Varios
Formación de Bases de Schiff	Aldehído/CH ₃ OH/CH ₃ -COOH	Inmovilización de enzimas
Formación de sales cuaternarias	CH ₃ I/NaI	Varios
Fosforilación	P ₂ O ₅ / CH ₃ HSO ₃	Varios
Ftoilación	Anhídrido ftálico/Dimetilacetamida	Protección de los grupos aminos
Polimerización y Copolimerización	Monómeros vinílicos	Varios
Sulfatación	H ₂ SO ₄ /HSO ₃ Cl/ 0°C	Varios
Tosilación (p-toluensulfonilo)	Cl-Tosilo/CHCl ₃ /NaOH	Síntesis orgánica

ND, no determinados; R, radical alifático o aromático (Pastor de Abram, 2004).

3.2. Propiedades Químico-Físicas de la Quitosana

La quitosana es un polímero amorfo que se puede obtener de los exoesqueletos de crustáceos e insectos. A través de estudios de rayos X, se han identificado 3 haloformas de quitosana que dependen de la especie de la que es extraída (ver Rinaudo, 2006). Comercialmente la quitosana se puede adquirir en partículas pequeñas de alto y bajo peso molecular. De ahí, ésta se puede utilizar para hacer estudios de sus propiedades químico-físicas, previa purificación de la misma a través de procesos de filtración. Por ejemplo, para solubilizar quitosana, es necesario hincharla en agua por 1-2 h y después acidificar el medio hasta que el pH <6. Comúnmente se utilizan soluciones de ácido acético al 1-3% (0.1-0.33 M) o en exceso de ácido clorhídrico (1 M) (Rinaudo, 2006). De esta manera, en

medio ácido, los grupos aminos de la quitosana pueden protonarse e iniciar el proceso lento de solubilizarse.

La espectroscopia de infrarrojo (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) son dos herramientas comúnmente utilizadas e indispensables para la caracterización química de los polímeros, y por ende de la quitosana. Estas técnicas se basan en analizar las energías asociadas a los átomos o grupos funcionales que conforman las moléculas. Por ejemplo, el IR aprovecha las vibraciones que se generan entre los enlaces químicos en una molécula (Morrison & Boyd, 1998). Esto provoca que sus enlaces se alarguen, contraigan, roten, etc. Los enlaces al bombardearlos con luz infrarroja, absorben energía infrarroja en longitudes de onda específicas asociadas a grupos funcionales (regiones dactiloscópicas). Por ejemplo en la quitosana, los alcoholes (-OH) dan origen a bandas de absorción a $3200-3600\text{ cm}^{-1}$, las cetonas (-C=O) a 1710 cm^{-1} , las aminas primarias (-NH₂) a $1550-1650\text{ cm}^{-1}$, y los metilos (-CH₃) a 1450 y 1375 cm^{-1} (Morrison & Boyd, 1998; Brugnerotto et al., 2001). De manera complementaria, la espectroscopia de RMN de protón y carbono-13, se aprovecha de que los núcleos atómicos en la macromolécula presentan un spin, que pueden generar momentos magnéticos, los cuales se pueden alinear a favor o en contra de un campo magnético externo lo suficientemente grande. Esta alineación produce que se absorba radiación electromagnética en el intervalo de las radiofrecuencias (60 MHz), la cual se ve afectada por el entorno de los átomos vecinos (adyacentes). Gracias a este fenómeno se pueden determinar las localizaciones de los átomos en una molécula y por ende, determinar su composición y estructura química. Por ejemplo, en la quitosana, se observan desplazamientos químicos (ppm) en 100-105 para C1, 55-58 para C2, 70-73 para C3, 79-83 para C4, 75-77 para C5, 60-62 para C6, 170-180 para carbonilos y 19-25 para metilos (CH₃) de los grupos acetatos unidos a los grupos aminos (Brugnerotto et al., 2001). Asimismo, en estudios de RMN de protón la quitosana solubilizada presenta desplazamientos químicos (ppm) para H-1 a 4.5-4.79, H-2 a 3.1-3.70, H-3 a H-6 a 3.58-3.80, y de 1.95 para los protones de los grupos metilos (Brugnerotto et al., 2001).

Otras propiedades químico-físicas importantes de estudiar en la quitosana (que no han sido objeto de estudio en este trabajo) son el peso molecular promedio, el grado de acetilación, la longitud de persistencia y su capacidad para acomplejarse con otros polímeros y atrapar metales.

3.3. Propiedades Mecano-Dinámicas de la Quitosana

Los estudios reológicos son fundamentales para comprender las propiedades viscoelásticas de las sustancias poliméricas diluidas y concentradas. Sobre todo para comprender las propiedades dinámicas relacionadas con las características estructurales de los materiales implicados. Es decir, se puede estudiar si el polímero se ha disuelto, está disperso, si se ha generado una red macromolecular, y también si presentan transiciones de fase sol/gel promovidas por la temperatura (Lapasin & Pricl, 1995).

El análisis reológico implica el estudio de la independencia de la amplitud de oscilación con el flujo oscilatorio del material, es decir, el límite del régimen lineal y no lineal viscoelástico. Si la deformación oscilatoria incrementa, el sistema responde de manera independiente de la amplitud de la oscilación, expresado en términos del módulo complejo G^* (es decir, módulo de almacenamiento G' y módulo de pérdida G'') y la fase delta (δ). A cierto punto limitante, G^* disminuye y δ incrementa justo en el límite del régimen viscoelástico lineal. En este sentido, un incremento en la amplitud de la deformación oscilatoria produce un mayor efecto en G' , alejándose del comportamiento lineal más pronto que G'' (Lapasin & Pricl, 1995). En soluciones poliméricas diluidas, G' es proporcional al cuadrado de la frecuencia de oscilación y G'' a la frecuencia de oscilación. Sin embargo, al aumentar la concentración polimérica en una solución, en la zona terminal de bajas frecuencias, G' incrementa más rápido que G'' (Lapasin & Pricl, 1995; Ross-Murphy, 2003). De tal suerte, que al incrementar la frecuencia de oscilación se logra observar un punto de intersección entre G' y G'' , donde $G' = G''$, lográndose después un máximo que se estabiliza. El significado de $G' = G''$, es un re-arreglo macromolecular del tejido polimérico que

se caracteriza por la predominancia de las propiedades elásticas (G') y la independencia de G' y G'' respecto a la frecuencia de oscilación a una concentración y temperatura dada (Lapasin & Pricl, 1995; Ross-Murphy, 2003). En este sentido, se puede comprender que en una solución polimérica, el comportamiento Newtoniano sugiere el libre movimiento de las cadenas del polímero en la solución, sin que las perturbaciones entre sus posibles interacciones de corto y largo alcance modifiquen los módulos viscoelásticos. Sin embargo, al incrementar la deformación unitaria en el sistema las cadenas poliméricas se enredan restringidas por la proximidad de otras cadenas de polímero (Payet et al., 2010), generando una variación en los módulos viscoelásticos en la solución, de tal suerte que se puede observar un incremento en G' respecto a G'' , indicando el principio del proceso de gelificación.

En relación con las propiedades reológicas de la quitosana, éstas se han estudiado en soluciones diluidas y concentradas. En general estas soluciones muestran que $G'' > G'$ cuando se comparan en el tiempo a una frecuencia y temperatura dada, indicando un comportamiento viscoso en las soluciones de quitosana. Además G' se presenta con más ruido y con valores altos de $\tan \delta$ (Félix et al., 2005; Goycoolea, comunicación personal, 2014). Cabe mencionar, que las soluciones de quitosana per se son incapaces de formar geles.

3.4. Geles de Quitosana

Los geles son materiales complejos constituidos esencialmente por solvente (>99%) y polímeros. Están organizados en redes tridimensionales que se caracterizan por su comportamiento mecánico viscoelástico, es decir, se comportan al mismo tiempo como sólidos elásticos y líquidos viscosos (Ross-Murphy, 2003). Estos materiales se han clasificado dependiendo del tipo de interacción que existe entre las cadenas poliméricas que los componen. Por ejemplo, los geles físicos forman complejos macromoleculares por medio de interacciones físicas, como por fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno, entre otras. Los geles químicos se

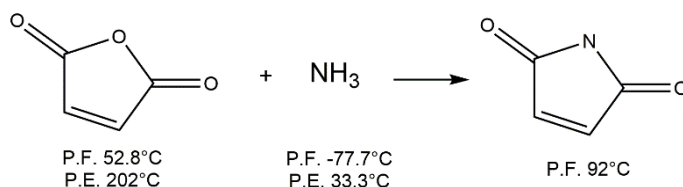
caracterizan por formar enlaces covalentes para entrecruzar cadenas poliméricas entre sí y de esta manera generar redes macromoleculares capaces de contener grandes cantidades de solvente (Ross-Murphy, 2003). Una característica única en estos materiales es su capacidad de incrementar (hincharse) varias veces su tamaño sin disolverse en un buen solvente (Ross-Murphy, 2003). Adicionalmente, los geles pueden clasificarse desde el punto de vista de sus propiedades reológicas en geles débiles y fuertes.

Varios polímeros sintéticos y naturales tienen la capacidad de entrecruzarse para formar geles. Por ejemplo, poliacrilamidas, carrageninas, gelatinas, poliacrilatos y agarosas, entre otros. Sin embargo, la quitosana por sí sola no es capaz de formar redes tridimensionales bien estructuradas en solución y solamente se comporta como un material viscoso. Generalmente los geles de quitosana se preparan utilizando agentes entrecruzantes (e. g., glutaraldehído) con sus grupos aminos libres. Sin embargo, el glutaraldehído es tóxico y esto limita su uso para algunas industrias (e. g., la biomédica). Estas circunstancias han llevado a desarrollar alternativas para producir geles de quitosana. Por ejemplo, se han generado derivados de quitosana-aldehído capaces de gelificar a concentraciones del 6-7%, mostrando el típico incremento en G' al incrementar la fuerza de corte hasta alcanzar el punto de ruptura de la red tridimensional del gel (Azevedo et al., 2012). Azevedo y colaboradores (2012) también mostraron que a mayor concentración de quitosana-aldehído (i. e., 7%) mayor fuerza mostraba el gel, correspondiendo al incremento en G' . También se han descrito propiedades viscoelásticas en hidrogeles formados por complejos polielectrolitos entre quitosana y carrageninas. Shumilina & Shchipunov (2002) describieron que a una concentración constante de quitosana y diferentes concentraciones y tipos de carrageninas, se generan materiales con propiedades mecánicas suaves, al compararlos con las propiedades mecánicas de los materiales sólidos.

En la actualidad se siguen generando nuevos derivados biocompatibles de quitosana que sean capaces de formar hidrogeles con diferentes fines tecnológicos e industriales.

IV. MALEIMIDAS Y FURANOS

Las maleimidias son compuestos heterocíclicos monoinsaturados de cuatro átomos de carbono con orbitales híbridos sp^2 , de los cuales dos son carbonilos y están adyacentes a un átomo de nitrógeno. Su síntesis se genera a partir del anhídrido málico y el amoniaco, formando una imida de nombre 2,5-pirrolendiona. En la [Figura 4](#) se muestra la reacción típica para generar maleimida, así como su estructura química.



[Figura 4](#). Formación de la maleimida a través del anhídrido málico y el amoniaco. P.F. punto de fusión; P.E. punto de ebullición.

Las maleimidias generalmente se utilizan para formar resinas epóxicas cuando se unen en los extremos de cadenas orgánicas para generar bismaleimidias (BM). Estas últimas (también denominadas como 1,6-bismaleimidohexanos) son derivados formados de la unión de dos anillos furánicos (maleimidias) en sus extremos unidos por derivados de la 1,6-hexametilendiamina ([Figura 5](#)) (Gandini et al., 2008).

La literatura indica que las maleimidias y BM reaccionan con furanos a través de cicloadiciones de Diels-Alder y retro-Diels-Alder (ver más adelante). Los furanos son compuestos heterocíclicos constituidos por cuatro átomos de carbono con orbitales híbridos sp^2 y un átomo de oxígeno. Estos son derivados de pentosas y hexosas, que pueden ser obtenidos de muchos recursos renovables como algunos azúcares, hemicelulosas y polisacáridos (Gandini & Belgacem, 2006). El furfural o furan-2-carbaldehído ([Figura 6](#)) es un ejemplo representativo de la familia. Este furano tiene un P.F. -37°C y P.E. 162°C , una masa molecular de 96 g/mol y una densidad de 1.16 g/mL.

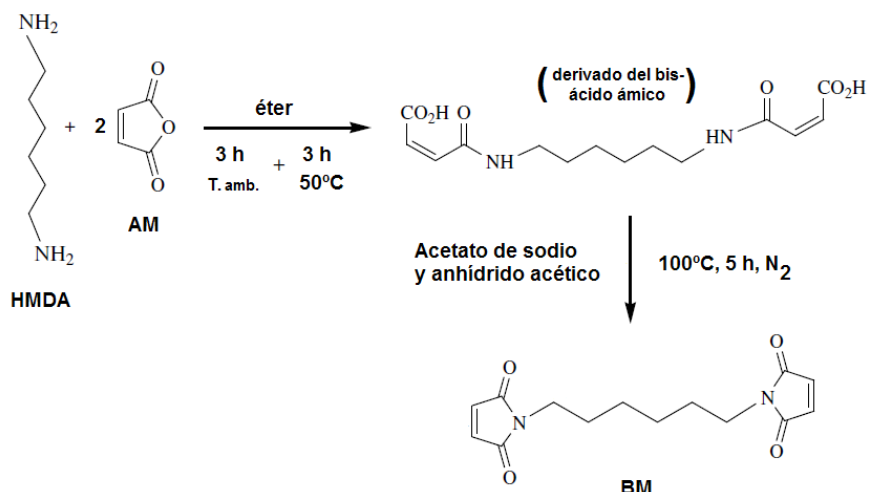


Figura 5. Síntesis de la bismaleimida. HMDA, 1,6-hexametilendiamina; AM, ácido maleico anhídrido; BM, bismaleimida; T. amb., temperatura ambiente. Para ver el procedimiento de la síntesis de la bismaleimida, vea Materiales y Metodologías.

Las propiedades térmicas, químicas y mecánicas de las BM son ampliamente utilizadas para el procesamiento y generación de materiales compuestos para diversos usos en áreas como la electrónica (Hsiao et al., 1999; Liu & Wang, 2004). Gracias a las propiedades térmicas de las melaimidas, se han generado diversas estrategias para la generación de nuevos materiales entrecruzados, que son térmicamente reversibles en un rango amplio de temperaturas (60-110°C) (Gandini et al., 2008). Por ejemplo, a través de BM se han entrecruzado pectinas modificadas con anillos furánicos para generar hidrogeles inteligentes sensibles a la temperatura, los cuales a 5°C se encuentran en estado gel y a 85°C, en solución (Acuña, 2009).

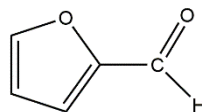


Figura 6. Estructura molecular del furfural. Nótese que el anillo furano presenta un dieno conjugado, susceptible para reacciones de cicloadición de Diels-Alder, entre otras.

En este orden de ideas, la gran diversidad de estrategias que se pueden lograr para modificar materiales con anillos furánicos y maleimidias, brindan la posibilidad de generar materiales con diferentes propiedades térmicas y mecánicas.

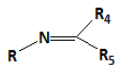
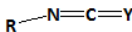
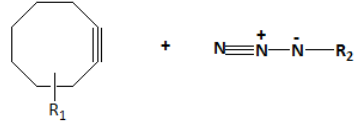
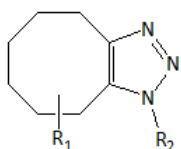
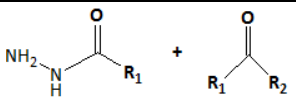
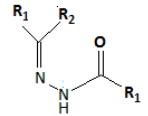
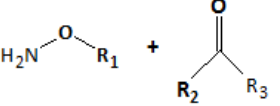
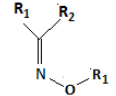
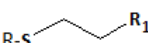
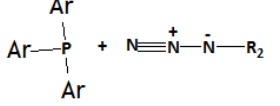
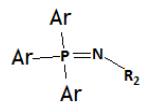
V. CLICK CHEMISTRY

Click Chemistry es un concepto que engloba al menos ocho tipos de reacciones químicas (Lahann, 2009; Petersen & Palmese, 2009). Este término lo introdujo el grupo del profesor K. Barry Sharpless (Premio Nobel de Química, 2001) con la intención de hacer más sencillos los diseños y las preparaciones de compuestos para la industria farmacéutica (Lahann, 2009). En la actualidad, la Click Chemistry se ha utilizado para el diseño y la obtención de nuevos materiales en la industria biotecnológica, polimérica y de la ciencia de los materiales (Lahann, 2009).

La Click Chemistry en general, hace referencia a todas aquellas reacciones químicas sencillas que se generan en un sólo paso (Tabla 2); son más rápidas (10^7 veces) que las reacciones que requieren catalizadores; se llevan a cabo en condiciones suaves de temperatura (25-37°C) en un intervalo amplio de potencial de hidrógeno (pH 4-12); son insensibles al solvente (puede ser agua), a la concentración de oxígeno y a la estereoquímica de los reactantes; y generan productos regioselectivos (Lahann, 2009).

A continuación se describirán dos tipos de reacciones tipo Click Chemistry que se utilizarán para el desarrollo de este trabajo.

Tabla 2. Reacciones que cumplen con las características de la Click Chemistry*.

Tipo de Reacción*	Reactivos	Productos
<p style="text-align: center;">Aza-Witting</p>	$\text{R}-\text{N}=\text{P}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3) + \text{X}=\text{C}(\text{R}_4)(\text{R}_5)$ <p style="text-align: center;">Fosfazenos</p>	
	$\text{R}-\text{N}=\text{P}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3) + \text{X}=\text{C}=\text{Y}$ <p style="text-align: center;">Fosfazenos</p>	<p style="text-align: center;">donde X = O, S Y = CR₂, NR</p> 
<p style="text-align: center;">Cicloadición promovida por tensión de enlace</p>	 <p style="text-align: center;">Alquino en tensión Azida</p>	
<p style="text-align: center;">Copulación: Hidrazonas</p>	 <p style="text-align: center;">Hidrazida Carbonilo</p>	
<p style="text-align: center;">Oximas</p>	 <p style="text-align: center;">Alcoxiamina Carbonilo</p>	
<p style="text-align: center;">Tiol-enos</p>	$\text{R}-\text{SH} + \text{CH}_2=\text{CH}-\text{R}_1$ <p style="text-align: center;">Tiol Alqueno</p>	
<p style="text-align: center;">Staudinger</p>	 <p style="text-align: center;">Fosfina Azida</p>	

*Otras dos reacciones tipo click chemistry, las reacciones de cicloadición de Huisgen y Diels-Alder (Lahann, 2009), no se incluyen en esta tabla porque se describen más adelante en el texto.

5.1. Cicloadición de Huisgen

El grupo del Prof. Sharpless postuló la utilización de la cicloadición de Huisgen como Click Chemistry (Figura 7). En esta reacción exérgica, una azida y un alquilo terminal reaccionan para generar dos isómeros heterocíclicos de cinco miembros conocidos como azocompuestos. Los productos de esta cicloadición dipolar 1,3 se pueden estereo-dirigir al introducir sales de cobre o de rubidio en el medio de reacción para sintetizar principalmente uno de los dos isómeros conformacionales: el 1,4 o 1,5-heterociclo sustituido 1,2,3-triazol, respectivamente (Hein et al., 2008).

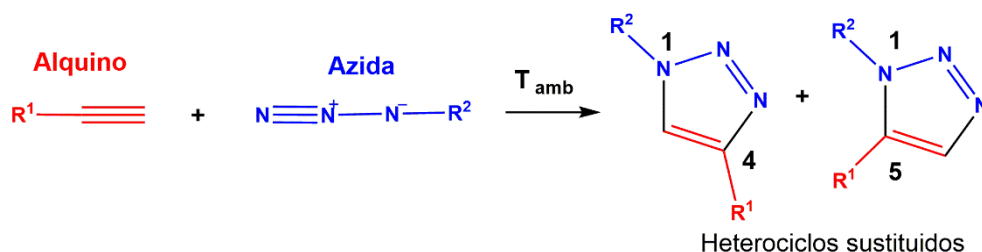


Figura 7. Reacción de Cicloadición 1,3 de Huisgen. R^1 y R^2 , pueden ser cualquier radical sustituido en la azida y en el alquilo terminal. T_{amb} = Temperatura ambiente. Las cargas en los nitrógenos representa la resonancia electrónica de las transiciones entre orbitales híbridos sp y sp^2 .

Hoy en día, la Click Chemistry se utiliza ampliamente para modificar polímeros naturales, ya que es una vía sencilla para el diseño de nuevas estructuras y propiedades para los polisacáridos como las celulosas y quitosanas (Liebert et al., 2006; Gandini et al., 2003), entre otros. Dichas modificaciones han generado materiales que se pueden utilizar por la industria cosmética, biomédica y alimentaria.

5.2. Cicloadición de Diels-Alder

La cicloadición de Diels-Alder es considerada como una reacción tipo Click que se produce de la reacción entre un dienófilo y un dieno conjugado (Figura 8) (Gandini et al., 2008; Such et al., 2012). El producto de la adición [4+2] es un ciclohexeno sustituido ampliamente estudiado (Adzima et al., 2008). Este tipo de

reacción puede ser reversible, ya que por arriba de 60-200°C el producto puede descomponerse de nueva cuenta en sus reactivos. Esto depende esencialmente de las características termodegradables de los reactivos. Es decir, si no presentan degradación térmica alrededor de dichas temperaturas (Gandini & Belgacem, 2007; Peterson & Palmese, 2009; Such et al., 2012).

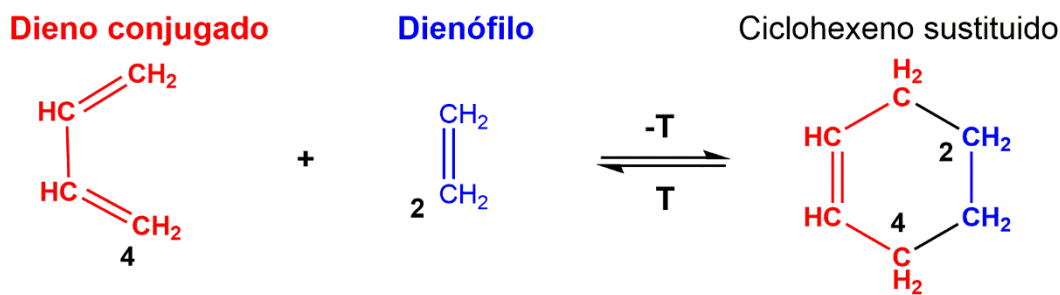


Figura 8. Reacción de Cicloadición de Diels-Alder. Los números 2 y 4 señalan a los carbonos involucrados en la formación del ciclohexeno. T, temperatura.

Tomando en cuenta toda la información descrita hasta aquí, se decidió diseñar y sintetizar derivados de quitosana a través de la síntesis orgánica, con el objetivo de generar un material nuevo basado en quitosana y Click Chemistry, para estudiar sus propiedades químico-físicas y mecano-dinámicas, de acuerdo a la siguiente hipótesis:

VI. HIPÓTESIS

La modificación química de la quitosana basada en Click Chemistry (cicloadiciones de Huisgen y Diels-Alder), generará un polímero con propiedades ajustables.

VII.OBJETIVO GENERAL

Diseñar y sintetizar derivados de quitosana basados en reacciones de Click Chemistry (cicloadiciones de Huisgen y Diels-Alder), para caracterizar sus propiedades químico-físicas y mecano-dinámicas.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

8.1. Preparar por medio de síntesis orgánica, 6-azida-6-deoxi-quitosana, furfuril propargil éter y derivados de quitosana basados en Click Chemistry con grupos furánicos.

8.2. Caracterizar las propiedades químico-físicas y mecano-dinámicas de los derivados de quitosana y del furfuril propargil éter a través de:

- Espectroscopias de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C
- Reología Dinámica de Alta Resolución
- Análisis morfológico de los materiales con microscopías de luz y electrónica de barrido diferencial ambiental de presión variable
- Mediciones de hinchamiento
- Mediciones de liberación del azul de metileno

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Reactivos

Para este trabajo se utilizó quitosana de bajo peso molecular (Fluka). El resto de los reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich y algunos reactivos se sintetizaron en el laboratorio a partir de ellos. Los materiales se utilizaron sin purificar, salvo donde se indica. Para todos los experimentos se usó agua grado Milli-Q con una conductancia $\leq 2 \mu\text{S}/\text{cm}$.

9.1.1. Quitosana

La quitosana presentó un peso molecular viscosimétrico promedio de 1.3×10^5 , estimado a 25°C de una solución 0.3 M de ácido acético/0.2 M de acetato de sodio. Además, por resonancia magnética nuclear de protón, se determinó en la quitosana un grado de N-acetilación de 0.23 (Rinaudo, 2006).

Solamente para el trabajo de la N-(furfural) quitosana (QF), la quitosana se purificó como se describe a continuación. Una solución de quitosana (10 g/L) en ácido acético 0.3 M, se pasó por filtros de vidrio poroso (inicialmente por poros de 100-160 μm , después por 16-40 μm y finalmente por 10-16 μm) y después por membranas de nylon (con poros de 3, 1.2, y 0.8, μm). La solución de quitosana filtrada, se precipitó adicionando gota a gota una solución 3 M de hidróxido de amonio hasta pH 9. El precipitado se lavó cuidadosamente con agua desionizada centrifugándolo varias veces a 4000 rpm/40 min hasta que el agua residual presentó $G \leq 5 \mu\text{S}$. Después, gradualmente la quitosana se deshidrató con etanol al 50, 75 y 100% v/v. Por último la quitosana purificada se secó al vacío a temperatura ambiente.

9.1.2. Síntesis del Furfuril Propargil Éter (FPE).

La síntesis del furfuril propargil éter (FPE) se realizó de la siguiente manera (Martín-Matute et al., 2003): se preparó una suspensión de NaH (720 mg, 17.9 mmol; 60% aceite mineral) en 20 mL de DMF a 0°C y agitación por 15 min. A esta suspensión, se le agregaron gota a gota, 1.4 mL de alcohol furfurílico (1.58 g; 16.1 mmol) con una bureta y se agitó 10 min (se observó una coloración gris mineral). Finalmente se agregaron 2.5 mL de 3-bromopropino (2.7 g; 17.9 mmol), tornándose el color antes descrito a un color café barro, y se dejó consumir la reacción 4 h a 23°C bajo una campana de flujo laminar. Después se agregaron 50 mL de agua destilada y se agitó. El FPE se extrajo con dietil éter en un embudo de separación (3 veces), recuperando una sustancia de color amarillo claro. El FPE se colocó en una cama de sulfato de magnesio heptahidratado y se agitó rigurosamente 5 min. Se filtró el FPE y se evaporó el solvente a 37°C. Se obtuvo finalmente una sustancia líquida de color rojizo oscuro (color vino) y apariencia aceitosa. El sintetizado (FPE: 1.04 g; 47% rendimiento) se sometió a análisis de infrarrojo.

9.1.3. Síntesis de la Bismaleimida (BM)

La síntesis de 1,6-bismaleimidohexano o bismaleimida (BM) se preparó en dos etapas (Gandini et al., 2008). Inicialmente se hicieron reaccionar gota a gota dos equivalentes de anhídrido maleico en dietil éter con un equivalente de 1,6-hexametilendiamina durante agitación (1-3 h) a 25°C. Después la solución se calentó lentamente a 50°C y se mantuvo en reflujo 3 h hasta producir un sólido blanco. El material se filtró, lavó con dietil éter y se secó. La segunda etapa consistió en ciclar el ácido ámico durante reflujo a 100°C por 5 h en atmósfera de N₂ en una solución de ácido acético anhídrido y acetato de sodio anhídrido. El producto se vertió en agua fría y el precipitado se filtró, lavó y secó sobre sulfato de sodio, para después remover el solvente. El producto final, 1,6-bismaleimidohexano, se purificó en una columna de cromatografía en SiO₂

utilizando como eluyente una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo 1:2 (v:v).

9.2. Reacciones

A continuación se describen todas las reacciones utilizadas para sintetizar los derivados de quitosana y moléculas de bajo peso molecular necesarias para realizar este trabajo.

9.2.1. Quitosana: cicloadición de Huisgen

Las síntesis de los derivados de quitosana que se utilizaron para la cicloadición de Huisgen se realizaron en varias etapas como se describe a continuación.

9.2.1.1. N-ftaloimidación. La modificación de la quitosana con anhídrido ftálico se realizó de la siguiente manera (Kurita et al., 2001). En una solución al 95% v/v de N,N-dimetilformamida anhidra en agua desionizada, se solubilizaron 11.45 g (77.6 mmol) de anhídrido ftálico. A esta solución se le agregaron 5 g (25.8 mmol) de quitosana de bajo peso molecular para formar una mezcla. Bajo atmósfera de argón, la mezcla se calentó a 130°C por 8 h en agitación constante en un matraz bola (250 mL) de dos bocas (esmeriladas, 24/40") equipado con un condensador vertical. Para regular la temperatura se utilizó un recipiente de vidrio con aceite vegetal colocado sobre un termoagitador magnético; y el agua que se utilizó en el condensador se mantuvo a 25°C en reflujo constante. Pasadas las 8 h, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente para verterla en agua con hielo y generar un precipitado, que se colectó por filtración y lavó con metanol (200 mL) durante 30 min dos veces. El precipitado se secó al vacío y se pesó. Una muestra de la quitosana modificada se estudió con espectroscopia de infrarrojo para verificar la N-ftaloimidación en las bandas 1770 y 1710 cm^{-1} del espectro de absorción (Nishimura et al., 1991).

9.2.1.2. Bromación de la N-(ftaloil) quitosana. La adición de bromo en el carbono 6 de la quitosana se llevó a cabo en un sólo paso (Zampano et al., 2010) de la

siguiente manera. A un matraz bola de 250 mL se le agregaron 2 g (10.3 mmol) de N-(ftaloil) quitosana, 4.75 g (13.74 mmol) de 1,1,1,1-tetrabromometano (CBr₄), 3.76 g (14.33 mmol) de trifenilfosfina (PPh₃) y 100 mL de N,N-dimetilformamida anhidra (DMF). La mezcla se calentó a 80°C y se agitó durante 24 h.

9.2.1.3. Azidación (N₃-) de la 6-bromo-6-desoxi-N-(ftaloil) quitosana. La sustitución del bromo por azida en la 6-bromo-6-desoxi-N-(ftaloil) quitosana se llevó a cabo con la siguiente preparación (Zampano et al., 2010). Directamente al matraz donde se llevó a cabo la reacción de la bromación de la N-(ftaloil) quitosana, se agregaron 3.73 g (57.34 mmol) de azida de sodio (NaN₃) y se dejó agitando 24 h a temperatura ambiente. El producto se precipitó con etanol frío (4°C, 500 mL) y después con tolueno frío (4°C, 500 mL), para filtrarlo y lavarlo con tolueno (300 mL), etanol (600 mL) y por último con éter dietílico (500 mL). Finalmente se secó al vacío, se registró su peso (1.74 g; 87% rendiendo) y se analizó su huella espectral de infrarrojo.

9.2.1.4. Des N-ftaloimidación de la 6-azida-6-desoxi-N-(ftaloil) quitosana. Con extremo cuidado se preparó bajo campana de flujo laminar, una dispersión al 1% peso/volumen (3.6 g) de la 6-azida-6-desoxi-N-(ftaloil) quitosana en monohidrato de hidracina acuosa (H₂NNH₂:H₂O = 1:1), se agitó 4 h a 80°C. Después la dispersión se centrifugó (4000 rpm, 12 min) y se lavó varias veces con agua desionizada hasta que el agua de lavado presentara un pH neutro. Finalmente el producto desftaloimidado (1.5 g; 41% rendimiento), se lavó con etanol, acetona y se dejó secar al vacío. Una muestra se analizó con FT-IR (KBr, cm⁻¹).

9.2.1.5. Click chemistry: 6-azida-6-desoxi quitosana + FPE = (QClick). La cicloadición de Huisgen se realizó a 25°C con agitación en un vial de 20 mL, con 1.6% de 6-azida-6-desoxi quitosana disuelta en acético al 2% mezclada con furfural propargil éter (10 mg, 7 x 10⁻⁵ mmol), ascorbato de sodio preparado en el momento (40 mg, 1.5 x 10⁻⁴ mmol, disueltos en 0.1 mL de agua) y sulfato de cobre II pentahidratado (51 mg, 1.5 x 10⁻⁴ mmol, disueltos en 0.1 mL de agua) (este último se colocó al final de la mezcla dado la rapidez de la reacción). La

mezcla se agitó durante 15 min, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h para después precipitarla en una mezcla fría de etanol/agua 1:1 (v/v). Finalmente, el material obtenido (QClick) de cada reacción se lavó dos veces con etanol/agua 1:1, después etanol y por último con acetona. Cada material se secó en el vacío y posteriormente se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . En el caso de la QClick en agua, el material se precipitó y lavó con acetona, para después secar al vacío y caracterizarlo con FT-IR (KBr, cm^{-1}).

9.2.1.6. Quitosana Click (QClick) + Bismaleimida (BM). Este tipo de reacción, también denominada dentro de la click chemistry, consistió en presentar al derivado de quitosana con un dieno conjugado en su estructura polimérica (sintetizado en 9.2.1.5.) con la BM. La cicloadición 4+2 o cicloadición de Diels-Alder se realizó mezclando una solución de QClick al 1.6% en acético al 2% con BM al 0.5% en DMSO, en una relación 2:1 (p/p). La solución se agitó y desgasificó al vacío para reducir al máximo las burbujas de aire contenidas en la solución (producto de la agitación, el calor de mezcla y la viscosidad). Las características de esta solución (QClick y BM) se utilizaron durante todos los experimentos realizados a 75°C .

9.2.2. Quitosana: cicloadición de Diels-Alder

Para llevar a cabo la cicloadición de Diels-Alder, se sintetizaron dos reactivos. Uno de ellos a base de quitosana, con grupos furfurales unidos covalentemente en los grupos aminos del carbono 2 del anillo piranosos. El segundo, una molécula de bajo peso molecular con dos grupos maleimida en los extremos de su estructura, denominada BM. Al reaccionar dichos reactivos, pueden generar un ciclohexeno 4+2 sustituido.

9.2.2.1. Síntesis de N-(furfural) quitosana (FC). La síntesis de la FC se realizó por aminación reductiva de la siguiente manera. A una solución de quitosana (previamente purificada) al 2% en una solución de ácido acético al 2%, se le agregó 0.26 mmol (15 mg) o 1.3 mmol (25 mg) de furfural y se agitó 2 h. Pasado

el tiempo, se adicionó una solución acuosa recién preparada al 10 mM NaBH₃CN a 167 µL/min con una bomba peristáltica (Miniplus 3 Gilson, France) y se agitó 2-4 h. La reacción generó pequeñas burbujas durante el proceso. Finalmente, la FC se precipitó con 3 M NH₄OH hasta pH 9, se lavó varias veces con agua hasta que el sobrenadante presentó una conductancia <5 µS/cm, después con etanol al 50% y por último con etanol al 100% para dejar secándola a temperatura ambiente bajo vacío. El producto seco se purificó por extracción Soxhlet con éter etílico durante 48 h, para finalmente secarlo al vacío. Con este procedimiento se obtuvieron dos grados de N-sustitución en la quitosana, 8.3 y 23.8% según los análisis de ¹H-RMN (ver sección 10.2) con un rendimiento de 94%.

9.2.2.2. N-(furfural) quitosana (FC) + Bismaleimida (BM). La cicloadición de Diels-Alder se realizó mezclando una solución de FC al 2.5% en acético al 2% con BM al 1% en DMSO, en una relación 2:1 (p/p). La solución se agitó y desgasificó al vacío por >1 h para reducir al máximo las burbujas de aire contenidas en la solución (producto de la agitación, el calor de mezcla y la viscosidad). Las características de esta solución (FC y BM) se utilizaron durante todos los experimentos salvo donde se indiquen otra formulación. Los experimentos se realizaron entre 65-75°C en todos los experimentos, salvo donde se indique otro protocolo.

9.3. Caracterización Químico-Física y Propiedades Mecánicas

En este trabajo se utilizaron técnicas de espectroscopias de infrarrojo, luz visible y resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica de barrido diferencial ambiental para estudiar las características físicas y espectroscópicas de los materiales sintetizados; y también se realizaron experimentos de reología dinámica de alta resolución para estudiar las propiedades mecánicas de las soluciones preparadas con los materiales sintetizados.

9.3.1. Espectroscopia de Infrarrojo – Transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro de infrarrojo de los derivados de quitosana y del propargil furfuril éter, se realizó en un espectrómetro Nicolet Protege (System 460 E.S.P) FT-IR Spectrometer (Madison WI, USA) en pastilla de KBr. Se corrieron al menos 64 barridos acumulados con una resolución de 2 cm⁻¹.

9.3.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono-13 (¹H-RMN y ¹³C-RMN)

Los espectros de alta resolución en estado líquido ¹H-RMN para los derivados de quitosana y el FPE se realizaron en un espectrómetro Varian Inova-600 Plus (599.7 MHz) equipado con una sonda criogénica de triple resonancia (HCN). Todas las muestras se disolvieron en óxido de deuterio/HCl 0.5 N. Todos los experimentos se realizaron a 25°C.

Espectros de ¹³C-RMN de alta resolución en estado sólido se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AVIII-400 operado sobre un campo magnético a 9.3 T, con una sonda de polarización cruzada/rotación de ángulo mágico 3.2 mm PH MAS DVT 400S1 BL3.2. El tiempo de contacto de campo a 34 kHz fue de 1 ms. El desacoplamiento 1H se fijó a 100 kHz. Los experimentos se realizaron a 25°C. La rotación de ángulo mágico fue a 16 kHz y se realizaron 4096 escaneos cada 3 s en un ancho del espectro a 220 ppm.

9.3.3. Reología Dinámica de Alta Resolución

Las propiedades reológicas de los sistemas compuestos por derivados de quitosana y bismaleimida, se estudiaron con un reómetro de alta resolución de deformación controlada (AR-G2, TA Instruments, New Castle, DE). Para los experimentos se utilizaron geometrías de acero inoxidable plato-plato (4 cm) o plato-plato serruchado (4 cm) con una separación (gap) de 500-1000 μm entre el plato inferior y el superior, según se indica para cada sistema. El equipo estaba configurado con un sistema Peltier para controlar la temperatura. Antes de

colocar las muestras en el reómetro, se agitaron, sonicaron por 5 min y desgasificaron (~1 h) para remover las burbujas del sistema. Después se colocó la muestra en el plato inferior del reómetro y se cubrió la periferia del mismo con aceite de silicón de baja viscosidad para minimizar su evaporación.

9.3.3.1. Reología Dinámica de Alta Resolución: Sistemas Compuestos por QClick-BM. Las propiedades reológicas del sistema QClick-BM, compuesto por 1.6% QClick disuelta en 2% ácido acético acuoso y 0.5% BM disuelta en DMSO, en una proporción 2:1 (p:p), se estudió con una geometría de acero inoxidable plato-plato serruchado (4 cm) de acero inoxidable con una separación (gap) de 500-1000 μm entre el plato inferior y el superior. Para estudiar en la muestra el comportamiento de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') respecto a la frecuencia ($\omega = 0.1-100 \text{ rad s}^{-1}$), inicialmente se le aplicó un espectro mecánico a 25°C. Después, la muestra se calentó rápidamente hasta 75°C para medir el comportamiento de G' y G'' a tres frecuencias (1 - 10 rad s^{-1}) durante 5 h. Al terminar, se aplicó de nuevo un espectro mecánico de las mismas características para evaluar los cambios generados por el incremento de la temperatura en el sistema. El experimento se realizó con una deformación limitante de 5% para asegurarse que ambos módulos se encontraban dentro del comportamiento del régimen viscoelástico lineal. Dicho régimen de estudio se comprobó previamente aplicando a la muestra barridos de deformación a una frecuencia fija, $\omega = 10 \text{ rad s}^{-1}$.

9.3.3.2. Reología Dinámica de Alta Resolución: Sistemas Compuestos por FC-BM. Dado que se obtuvieron dos grados de sustitución de N-furfural quitosana, 8.3 y 23.8% (según los análisis de $^1\text{H-RMN}$), se prepararon soluciones de FC con distinto grado de sustitución para cada sistema. En la sección 10.2 se especifican los grados de sustitución de N-furfural quitosana y la concentración de bismaleimida empleada para cada análisis reométrico.

Las propiedades reológicas del sistema FC-BM, compuesto por 2.5% FC disuelta en 2% ácido acético acuoso y 0.5-1.5% BM disuelta en DMSO, en una proporción

2:1 (p:p), se estudió con una geometría de acero inoxidable plato-plato (4 cm) con una separación (gap) 1000 μm entre el plato inferior y el superior. Para estudiar en la muestra el comportamiento de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') respecto a la frecuencia ($\omega = 0.1\text{-}100 \text{ rad s}^{-1}$), inicialmente se le aplicó un espectro mecánico a 25°C. Después, la muestra se calentó rápidamente hasta 85°C para medir el comportamiento de G' y G'' a tres frecuencias (1 - 10 rad s^{-1}) durante 5 h. Al terminar, se aplicó de nuevo un espectro mecánico de las mismas características para evaluar los cambios generados por el incremento de la temperatura en el sistema. El experimento se realizó con una deformación limitante de 1% para asegurarse que ambos módulos se encontraban dentro del comportamiento del régimen viscoelástico lineal. Dicho régimen de estudio se comprobó previamente aplicando a la muestra barridos de deformación a una frecuencia fija, $\omega = 10 \text{ rad s}^{-1}$ a 85°C.

9.3.4. Microesferas de FC-BM

Para la obtención de microesferas de FC, se usó una mezcla al 2.5% FC (grado de sustitución 8.3%) (150 mg disueltos en 6 mL de ácido acético al 2%) y 1% BM en DMSO (2:1 p/p) contenida en un vial, la cual se homogenizó por agitación y se desgasificó al vacío para reducir al mínimo la presencia de burbujas en la superficie de la solución. Después con una jeringa de 5 mL, la mezcla se agregó gota a gota en aceite vegetal a 65°C que estaba en continuo movimiento, con agitador de hélice. Al caer al aceite, cada gota de mezcla se convirtió en varias microesferas como consecuencia de la fuerza centrífuga. Las microesferas se mantuvieron en agitación por 5-6 h, después se dejaron sedimentar 1 h. Las microesferas de FC se lavaron con hexano cuidadosamente, después con una solución al 2% Contrex (Decon Labs, Inc. King of Prussia, PA, USA) en agua para dejarlas secando a temperatura ambiente. El diámetro de las microesferas de FC se midió con una regla calibrada a una magnificación de 25X (0.4 AN) en un microscopio óptico invertido (AmScope) y el software ToupView 3.7 AmScope. El diámetro de 43 microesferas se describe como la media \pm error estándar.

9.3.4.1. **Morfología.** La morfología de las microesferas se estudió con un microscopio electrónico de barrido diferencial ambiental de presión variable (EVO LS10 SEM, Zeiss). Las muestras se montaron en un portaobjetos y se estudiaron con un detector de electrones secundarios al alto vacío. Se tomaron imágenes a diferentes ampliaciones como se indica en cada imagen.

9.3.4.2. **Hinchamiento.** El hinchamiento (W) se determinó por el incremento de volumen en las microesferas al sumergirlas en agua desionizada ($G < 2\mu\text{S/cm}$). Microesferas secas ($n = 43$) se colocaron en un portaobjetos modificado con una red de nylon montado en un microscopio óptico invertido (AmScope). Apoyándose con el software ToupView 3.7 (AmScope) y una magnificación 25X (0.4 AN) se registró el incremento del volumen de las microesferas a 25°C al sumergirlos en agua desionizada por ≥ 30 min. Asimismo, para evaluar el efecto de la temperatura en el proceso de liberación del colorante, a cinco microesferas se les registró el cambio de volumen generado al sumergirlas en agua a 5 o 55°C por 30 min. El hinchamiento (%) se determinó tomando en cuenta el cambio en el volumen de la microesfera seca respecto al volumen de la microesfera hinchada en el equilibrio (≥ 30 min), de la siguiente manera:

De acuerdo al volumen de una microesfera,

$$V_e = \frac{4}{3\pi} r^3 \quad (1)$$

de donde V_e , es el volumen de la microesfera; r , es el radio de la microesfera; $\frac{4}{3\pi}$, es una constante.

Por lo tanto,

$$W(\%) = \frac{V_{e, t=\infty} - V_{e, t=0}}{V_{e, t=0}} (100) \quad (2)$$

de donde $V_{e, t = \infty}$, es el volumen de la microesfera en el equilibrio (30 min); $V_{e, t = 0}$, es el volumen de la microesfera al inicio o tiempo cero. Los datos se describen en porcentaje como media \pm error estándar.

9.3.4.3. Liberación de azul de metileno por microesferas de FC-BM. Para los estudios de liberación de una sustancia modelo por las microesferas se realizó lo siguiente. A microesferas secas, se les agregó 1 mL de azul de metileno ($4.5 \mu\text{M}$; peso molecular 319.85 g/mol) para que absorbieran el colorante durante un día. Transcurrido el tiempo, las microesferas se lavaron con agua desionizada rápidamente para remover exceso del colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para estudiar el proceso de liberación del colorante de las microesferas, se colocaron 30 microesferas en una celda de cuarzo y se les agregaron 5 mL de agua desionizada. A diferentes tiempos, se tomó un registro de la absorción a 665 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (Unicam UV500). Durante cada registro, se agitó suavemente la celda de cuarzo para homogenizar el sistema. Todas las lecturas se hicieron a temperatura ambiente. Los resultados se compararon con una curva de calibración previa a cada experimento. Los datos se describen como media \pm error estándar.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Furan-chitosan hydrogels based on click chemistry

Marcelino Montiel-Herrera¹, Alessandro Gandini², Francisco M. Goycoolea^{3,5}, Neil E. Jacobsen⁴, Jaime Lizardi-Mendoza⁵, Maricarmen Recillas-Mota¹, Waldo M. Argüelles-Monal^{1*}

¹Laboratorio de Polímeros Naturales, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera al Varadero Nacional km 6.6, Col. Las Playitas, Guaymas, Sonora, México. CP. 85480. ²Materials Engineering Department, Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, 13566-590, São Carlos, Brazil. ³Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Hindenburgplatz 55, 48143 Münster, Germany. ⁴Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arizona, 1306 E. University Blvd, Tucson, AZ. 85721 USA. ⁵Biopolímeros (CTAOA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera a La Victoria, Ejido La Victoria km 0.6, CP 83000 Hermosillo, Sonora, México.

Key words: Chitosan, furan, Click Chemistry, Diels-Alder, hydrogels, maleimide.

*Corresponding Author Address: Laboratorio de Polímeros Naturales, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera al Varadero Nacional km 6.6, Col. Las Playitas, Guaymas, Sonora, México. CP. 85480. Tel +52 (622) 225 2829 Fax +52 (622) 225 2820 e-mail: waldo@ciad.mx

Abstract

The modification of polymers by click chemistry has increased abruptly over the past years. In this study, furan groups were attached onto chitosan chain via reaction of 6-azide-6-deoxy chitosan and furfuryl propargyl ether. With this purpose, 6-azide-6-deoxy chitosan was synthesized by bromination and the subsequent nucleophilic substitution with sodium azide on the C6 hydroxyl groups of a previously amino-protected N-phthaloyl chitosan. Then 6-azide-6-deoxy chitosan was reacted with furfuryl propargyl ether by the Cu(I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reaction, resulting in a O-substituted furan chitosan derivative with a degree of substitution 10%. The structure of all derivatives was analyzed and confirmed by means of infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopies. Clicked-chitosan with furan side groups was cross-linked with a bismaleimide to produce a polymer network via Diels-Alder reaction at 75°C. The system presented a sol-gel transition with some syneresis. The gelation process was monitored by the evolution of the viscoelastic properties of the reaction mixture. Thus generated chitosan-furan-maleimide polymer network exhibited the typical pattern of a soft polymer hydrogel, in which both moduli were almost frequency-independent with values lower than 10 Pa. These weak mechanical properties are interpreted as a consequence of the polymer degradation, which took place during the N-phthaloyl deprotection procedure.

Introduction

The search for novel properties in polymers is of great interest for the development of new technologies. Nowadays, click chemistry is used to generate new physical and chemical properties in polymers. The concept “click chemistry” involves at least eight chemical reactions described in the literature that fit accurately within its criteria (Lahann, 2009). That is, simple experimental conditions, stereospecificity, high yields, rapidity, insensitive to oxygen or water, high thermodynamic driving force, simple product recovery and absence of toxic byproducts (Kolb & Sharpless, 2003; Crescenzi et al., 2007; Hein et al., 2008).

One of those eight reactions, the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, involves an azide that reacts with a terminal alkyne to give 1, 4- or 1, 5-regioisomers whose stereoselectivity could be directed using copper or ruthenium salts, respectively (Himo et al., 2005; Boren et al., 2008). Another reaction is known as Diels-Alder cycloaddition. The latter comprises a conjugated diene and a substituted alkene (dienophile) that gives a substituted cyclohexene. For example, furan and maleimide compounds are known candidates of this type of reaction. These substances usually cycloadd around 60°C giving two stereoisomers that might reverse above 100°C (Gandini, 2008; Gandini et al., 2008).

Recently, clicking polymers makes possible the generation of more materials with new properties for their use in biological, medical, pharmaceutical and other technological applications (Lahann, 2009; Hein et al., 2008; Qin et al., 2010). For example, polymer derivatives have been developed for controlled drug release (Crescenzi et al., 2007; Yuan et al., 2011) and bionic hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering (Yu et al., 2013).

Hydrogels (typically Flory III gels) are macromolecular networks that swell rather than dissolve in a good solvent (Ross-Murphy, 2003). They show diverse viscoelastic behaviors due to complex arrangements and interactions between polymer chains. Some of these characteristics are very useful because hydrogels can serve as cellular scaffolds for tissue engineering (Lee & Mooney, 2001), as well for gene and drug delivery systems and many other applications (Gao et al., 2009; Khodaverdi et al., 2013). The rheological characterization of these novel chemically-modified polymers is scarce. Nonetheless, the study of those properties may help to design better materials for specific purposes.

Chitosan is a biocompatible polymer that can form highly viscous solutions in acidic media and macromolecular aggregates but does not form real macromolecular networks. However, chemical changes in its structure can give hydrogels under proper conditions. Generally, these modifications occur on amine moiety on carbon 2 and also on hydroxyl groups on carbons 3 and 6 of chitosan's

pyranose ring (Pastor de Abram, 2004). These structural changes may alter chitosan properties like its solubility in acidic solutions and organic solvents (Nishimura et al., 1991; Kurita et al., 2002). To avoid these drawbacks the amine groups of chitosan could be protected from unwanted reactions using phthalic anhydride, whose derivative serves for further chemical modifications (Nishimura et al., 1991; Kurita et al., 2002; Bertoldo et al., 2011). However, phthaloyl protection–deprotection procedure may degrade chitosan chains (Makuska & Gorochovceva, 2006; Oliveira et al., 2012). Nonetheless, so far these types of modifications are required to obtain desired materials (Ifuku et al., 2012; Yalpani & Laurance, 1984). For instance, chitosan derivatives synthesized by click chemistry have shown tunable thermosensitive characteristics (Li et al., 2010), photochromic behaviors (Bertoldo et al., 2011) pH-sensitivity macromolecular networks (Zampano et al., 2010) and highly soluble chemoselective properties (Ifuku et al., 2012).

In this sense, this work was aimed to develop a chemically-modified furan-chitosan derivative via click chemistry that share the capability of furan-maleimide compounds to produce macromolecular networks based on Diels-Alder cycloadditions.

Experimental

Materials

Chitosan was supplied by Fluka (degree of N-acetylation: 0.23 calculated from ¹H-NMR and viscosity-average molecular weight: 1.3 x 10⁵, estimated at 25°C in 0.3 M acetic acid/0.2 M sodium acetate) (Rinaudo et al., 1993). Milli-Q grade water with conductivity values less than 2 μS/cm was used through all procedures. All other reagents were purchased from Sigma Aldrich unless otherwise indicated.

Synthesis of N-phthaloyl chitosan

Amine groups of chitosan were structurally protected with phthalic anhydride as described by Kurita et al. (2002). Briefly, 5 g (25.77 mmol) of chitosan was mixed with 11.49 g (77.59 mmol) phthalic anhydride in 95 mL DMF/5 mL water. The mixture was stirred 8 h at 130°C. Then, precipitated in ice-water (1 L) collected by filtration, washed twice with methanol (300 mL), and finally dried under vacuum at room temperature. The final product was collected and weighed (7.14 g).

Synthesis of 6-bromine-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan

The hydroxyl group at carbon 6 on N-phthaloyl chitosan was substituted by bromine as follows (Zampano et al., 2010): N-phthaloyl chitosan (2 g, 10.3 mmol), carbon tetrabromomethane (4.75 g, 13.74 mmol) and triphenylphosphine (3.76 g, 14.33 mmol) were mixed in DMF (100 mL), and stirred 24 h at 80°C. The mix containing all adducts was immediately used for the incorporation of azide groups on the recently synthesized 6-bromine-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan as shown below.

Synthesis of 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan

Sodium azide (3.73 g, 57.34 mmol) was added to the mixture containing the 6-bromine-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan [25], and stirred 24 h at room temperature. Thereafter, the product was precipitated on ethanol (4°C, 500 mL) and toluene (4°C, 500 mL), filtrated and then washed sequentially with toluene (300 mL), ethanol (600 mL) and diethyl ether (500 mL). The final product (1.74 g; 87% yield) was dried under vacuum.

Synthesis of furfuryl propargyl ether

Furfuryl propargyl ether (FPE) was synthesized as described by Martín-Matute et al. 2003 [27]. First, a suspension of NaH (720 mg; 17.9 mmol; 60% in mineral oil) was prepared in 20 mL DMF stirring during 15 min at 0°C. Then, 1.58 g (16.1 mmol) of furfuryl alcohol was added drop-wise and stirred for 10 min. The reaction

product presented a gray-mineral color. Thereafter, 2.7 g (17.9 mmol; 80 % in toluene) of propargyl bromide was added to the mixture, generating a brown color in the reaction medium. The process was held 4 h at 23°C, and then 50 mL of water were added and stirred for several minutes. FPE was washed three times with diethyl ether, stirred roughly on a bed of MgSO₄•7H₂O and the rest of the solvent was evaporated at 37°C. Finally, FPE (1.04 g, 47% yield) was filtered and dried under vacuum for further analysis.

Amine deprotection of 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan

A 1% w/v dispersion of (3.6 g) 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan in aqueous hydrazine monohydrate (H₂NNH₂:H₂O = 1:1) was gently stirred 4 h at 80°C. Then, the dispersion was centrifuged (4000 rpm, 12 min) and washed with water until neutral pH. The product, 6-azide-6-deoxy chitosan (1.5 g; 41% yield) was sequentially washed with ethanol, acetone, and finally dried under vacuum.

Huisgen reaction between 6-azide-6-deoxy chitosan and furfuryl propargyl ether

CuSO₄•5H₂O (51 mg, 1.5 x 10⁻⁴ mmol, dissolved in 0.1 mL water) and freshly prepared sodium ascorbate (40 mg, 1.5 x 10⁻⁴ mmol, dissolved in 0.1 mL water) were added to a mixture of 6-azide-6-deoxy chitosan (1.6%) in acetic acid (2%) and FPE (10 mg, 7 x 10⁻⁵ mmol). The mix was stirred 15 min or periodically each every 3 h up to 72 h at 25 or 75°C. Then, the clicked-chitosan generated through this process was precipitated in ethanol/water 1:1 (v/v) and washed in acetone. Finally, the product was dried under vacuum.

Synthesis of bismaleimide

Bismaleimide (BM) was prepared in a two-step process with 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine and maleic anhydride as described by Gandini et al. (2008) with few modifications. The first step consisted of the drop-wise addition of two equivalents of maleic anhydride (previously dissolved in diethyl ether) to one

equivalent of 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine. This mixture was agitated for 3 h in a magnetic stirring device at 25°C. Then, this solution was refluxed for 3 h at 50°C to give a white solid material, which was filtered, washed with diethyl ether and dried. The second step consisted of the cyclization of the amic acid end-groups by stirring anhydrous sodium acetate and acetic anhydride refluxed for 5 h at 100°C with a mild stream of N₂. The mixture obtained was poured onto cold water, and the precipitate was filtered, washed with water and dried over sodium sulfate before removing the solvent. The final product, BM, was purified in a SiO₂ chromatographic column using a mixture of petroleum ether and ethyl acetate 1:2 (v:v) as the eluent. BM solutions were prepared in DMSO at a final concentration of 0.5%.

Diels-Alder reaction

Clicked chitosan was cross-linked with bismaleimide as follows: a mixture of 1.6 wt.% clicked-chitosan (CC) dissolved in 2% acetic acid and 0.5 wt.% BM dissolved in DMSO, in a ratio of 2:1 (w:w) was submitted to five cycles of vacuum/normal pressure to remove air bubbles. In order the reaction to proceed, this mixture was held on a heating chamber at 75°C. Simultaneously, the same fresh mixture was placed in the rheometer as described below.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Infrared spectra were recorded on a Nicolet Protege (System 460 E.S.P) FT-IR spectrometer (Madison WI, USA) in pellet form with KBr, by the accumulation of 64 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

Nuclear Magnetic Resonance (¹H/¹³C-NMR)

High-resolution liquid ¹H-NMR spectroscopy was carried out on a Varian Inova-600 Plus (599.7 MHz) equipped with a triple-resonance (HCN) cryogenic probe. All spectra were recorded at 25°C. Separately, chitosan and each chitosan derivative were solubilized in HCl/deuterium oxide solution (0.5 N) and tested.

^{13}C -NMR solid-state spectrometry was performed as follows: cross polarization ^{13}C MAS NMR spectra were collected on a Bruker AVIII-400 spectrometer operating at a magnetic field of 9.3 T. The spectrometer was fitted with a 3.2mm PH MAS DVT 400S1 BL3.2 probe. The contact time was 1 ms with the field of 34 kHz. The ^1H decoupling power was set at a field of 100 kHz. The sample temperature was maintained at 25°C. The spin rate was 16k Hz for CP-MAS. The number of scans for CP-MAS spectra was set at 4096 with repetition delay 3s and spectrum width 220 ppm.

Dynamic Rheology Studies

Oscillatory viscoelastic measurements were performed using a highly sensitive stress controlled Rheometer AR-G2 (TA Instruments, New Castle, DE) equipped with stainless steel crosshatched plate geometry (diameter 40 mm, gap 1000 μm) and a Peltier system for temperature control. Before loading the sample of study, it was handled as follows: a fresh mixture of 1.6% clicked-chitosan (CC) dissolved in 2% acetic acid and 0.5% BM dissolved in DMSO, in a ratio of 2:1 (w:w), was stirred and sonicated gently for 5 min. Then, it was submitted to three cycles of vacuum/normal pressure to remove air bubbles. After loading the sample on the rheometer, a thin layer of low viscosity silicone oil was added around its periphery to prevent evaporation. First a mechanical spectrum was recorded at 25°C to attain the variation of the storage (elastic) modulus (G') and loss (viscous) modulus (G'') with frequency ($\omega = 0.1\text{-}100 \text{ rad s}^{-1}$). Then the sample was rapidly heated to 75°C and measurements of G' and G'' were made at three frequencies between 1 and 10 rad s^{-1} during 5 h. Finally, another mechanical spectrum was recorded at 75°C to study the changes displayed by G' and G'' . A strain of 5% was used, thus ensuring that measurements of both moduli were performed within the linear viscoelastic region, as previously confirmed by strain sweep experiments ($\omega = 10 \text{ rad s}^{-1}$).

Results and discussion

Figure 9 shows a schematic representation of the procedure employed in this study to produce a chitosan derivative (e) with azide groups in its polymer chains. To obtain a clickable chitosan derivative, the amine groups in chitosan were protected by conventional procedures to avoid unwanted reactions through its amine moieties. With this purpose the reactive amine of chitosan reacts with phthalic anhydride (reaction 1 in Figure 9). This reaction proceeds by the release of water and the formation of N-phthaloyl chitosan, b. The main drawback of this method is the loss of solubility of the polymer in acidic media, but it could be dissolved in aprotic common solvents such as DMF, DMA and DMSO (Nishimura et al., 1991). This procedure was selected because this protection could be undone by a simple reaction using hydrazine monohydrate (Bertoldo et al., 2011; Oliveira et al., 2012; Ifuku et al., 2011).

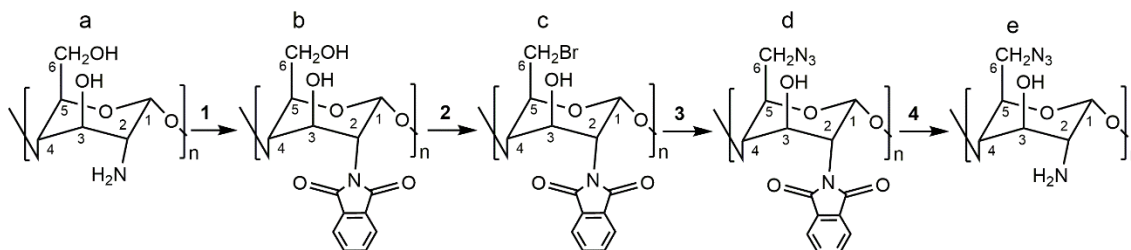


Figure 9. Synthetic scheme for the preparation of 6-azide-6-deoxy chitosan: Chitosan (a); N-phthaloyl chitosan (b); 6-bromine-6-deoxy-N-phthaloyl chitosan (c); 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl chitosan (d); 6-azide-6-deoxy chitosan (e).

The FT-IR spectrum of b showed two strong bands at 1773 and 1712 cm^{-1} (Figure 10b), which are characteristic of the in-phase and out-of-phase C=O stretching of phthalimide carbonyl groups, and a strong band at 720 cm^{-1} due to the aromatic =C-H out-of-plane deformation vibrations of four adjacent hydrogen atoms (in ortho-substituted aromatics) (Nishimura et al., 1991; Kurita et al., 2002; Bertoldo et al., 2011). Meanwhile, the ^{13}C -NMR spectrum of b (Figure 11), displays the peaks at 169 ppm (carbon of the carbonyl imide groups), and those at 123, 131 and 134-135 ppm, which correspond to the carbons of the aromatic ring. In addition, in Figure 12d it could be observed the signal with chemical shift at 7.8 ppm for ^1H -NMR, due to the protons of the aromatic ring (Kurita et al., 2002;

Zampano et al., 2010). All these peaks were absent in the NMR spectrum of chitosan. It should be noted that IR spectrum of **b** does not display any band at 1263 and 1288 cm^{-1} (Figure 10b), which would have indicated O-phthaloylation at C6. Moreover, the presence of a single signal at 7.8 ppm in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Figure 12d) may also confirm that reaction 1 (Figure 9) only took place on the amine group at C2 (Zampano et al., 2010).

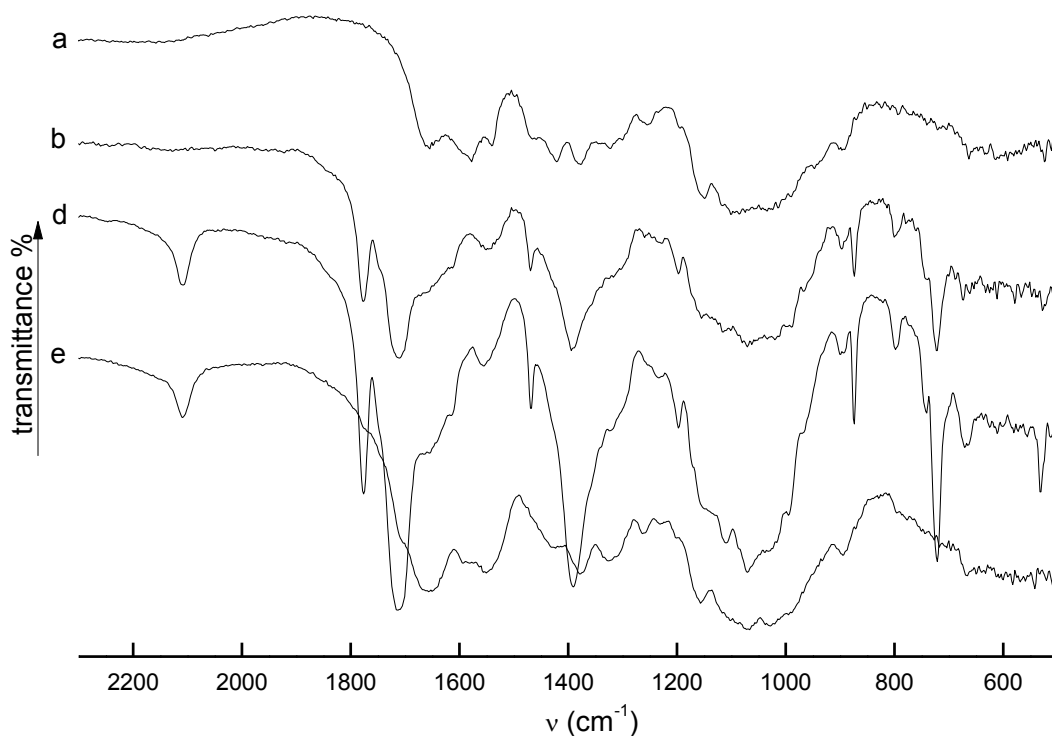


Figure 10. FT-IR spectra of chitosan derivatives: chitosan (**a**), N-phthaloyl chitosan (**b**), 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan (**d**), and 6-azide-6-deoxy chitosan (**e**).

Once synthesized N-phthaloyl chitosan, azide groups were inserted on carbon 6 in two steps. First, hydroxyl groups on carbon 6 were substituted by bromine atoms (reaction 2 in Fig. 9) that sequentially were substituted by azides through nucleophilic substitution (reaction 3 in Fig. 9). As expected, the insertion of azide groups in 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl chitosan, **d**, was confirmed by FT-IR (Figure 10) with the appearance of the typical band at 2106 cm^{-1} (asymmetric stretching vibration of the $\text{N}=\text{N}=\text{N}$ group).

As mentioned above, the addition of phthalimide groups onto the amine groups of chitosan generates a poor soluble material in acidic solutions. Therefore, removal of these protecting groups is not always straightforward. Hydrazine was used to remove phthalimide groups, recovering the free amine groups on chitosan chain (reaction 4 in Figure 9). This reaction restores the solubility of chitosan in aqueous acidic media, but considerable polymer degradation takes also place, which is a serious drawback for producing a polymer network with appropriate mechanical properties (Makuska & Gorochovceva, 2006; Oliveira et al., 2012).

The characterization of 6-azide-6-deoxy chitosan (**e**) was also accomplished (Figures 10 and 12). By one hand, the FT-IR spectrum (Figure 10) showed the expected characteristic band for azides at $\sim 2100\text{ cm}^{-1}$, but no signal is observed at 1773 and 1712 cm^{-1} (carbonyl phthalimide groups), nor at 720 cm^{-1} (ortho-substituted aromatic ring). By the other hand, $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Figure 12) does also confirm the structure of **e**, since all characteristic peaks of N-phthaloyl groups at 7.8 ppm (protons from aromatic ring of phthaloyl moiety) are present in **d** but absent in **e** (Figure 12).

Several strategies have been used to click azide-chitosan derivatives with crosslinkers in order to form macromolecular networks in water-based and organic solvents (Crescenzi et al., 2007; Yuan et al., 2011; Makuska & Gorochovceva, 2006). With this purpose, it was synthesized furfuryl propargyl ether (Figure 13, **FPE**), a facile-synthesis molecule that might link to azide residues of 6-azide-6-deoxy chitosan but also, it has a furan ring able to click maleimide groups (Gandini et al., 2008). Hence, in the presence of maleimide compounds, this crosslinker could react with clicked-chitosan derivatives via Diels-Alder reaction.

The synthesis of furfural propargyl ether was confirmed by FT-IR (Figure 14). What is important in this case is to note two strong bands at 1153 and 1075 cm^{-1} , due to the asymmetric and symmetric C-O-C stretching vibration, respectively. It should be also noticed the characteristic bands of monosubstituted alkyne groups

at 2120 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{C}$ stretching vibration), 3290 cm^{-1} (C-H stretching vibration) and 745 cm^{-1} (C-H in-plane deformation vibration). Additionally, it can be also observed three medium intensity bands at 1503 , 1443 and 1355 cm^{-1} due to the $\text{C}=\text{C}$ furan ring stretching vibration, another one at 600 cm^{-1} (a typical signal from furan ring deformation vibration) and the out-of-plane deformation vibrations of the C-H groups in substituted furans at 917 cm^{-1} . Complementary, ^{13}C - and ^1H -NMR spectra display all the characteristic signals of FPE (Supplementary material, Figure S1), which coincided with those reported by Martín-Matute et al. (2003).

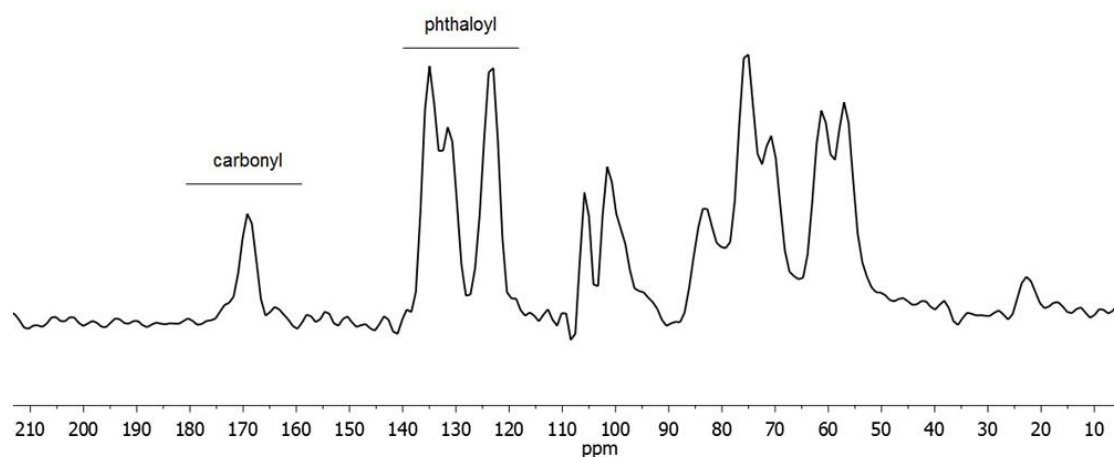


Figure 11. Solid state ^{13}C -NMR spectrum of N-phthaloyl chitosan.

The Huisgen reaction between azides and alkyne groups even in solvent-free media is a well-known click chemistry reaction and it usually takes place under mild conditions (Wang et al., 2012). In this case, this reaction was employed to attach furan groups onto chitosan chain via reaction of 6-azide-6-deoxy chitosan and furfuryl propargyl ether (Figure 13). With this purpose, aqueous acidic solutions of 6-azide-6-deoxy chitosan were prepared and mixed with furfuryl propargyl ether dissolved in DMSO, in a ratio 2:1 (w:w). The stoichiometric amount of furfuryl propargyl ether was selected in order to obtain an O-substituted furan-chitosan derivative with degree of substitution circa 10-15%. For the reaction to proceed, Cu(I) catalyst was generated in situ by adding CuSO_4 and sodium ascorbate as reducing agent because of oxidative instability of Cu(I) sources that could result in formation of Cu(II) . As soon as they were added to the

reaction mixture, it was observed a change of color, from blue to green, as a result of the redox process, meaning that the Huisgen cycloaddition occurred instantaneously.

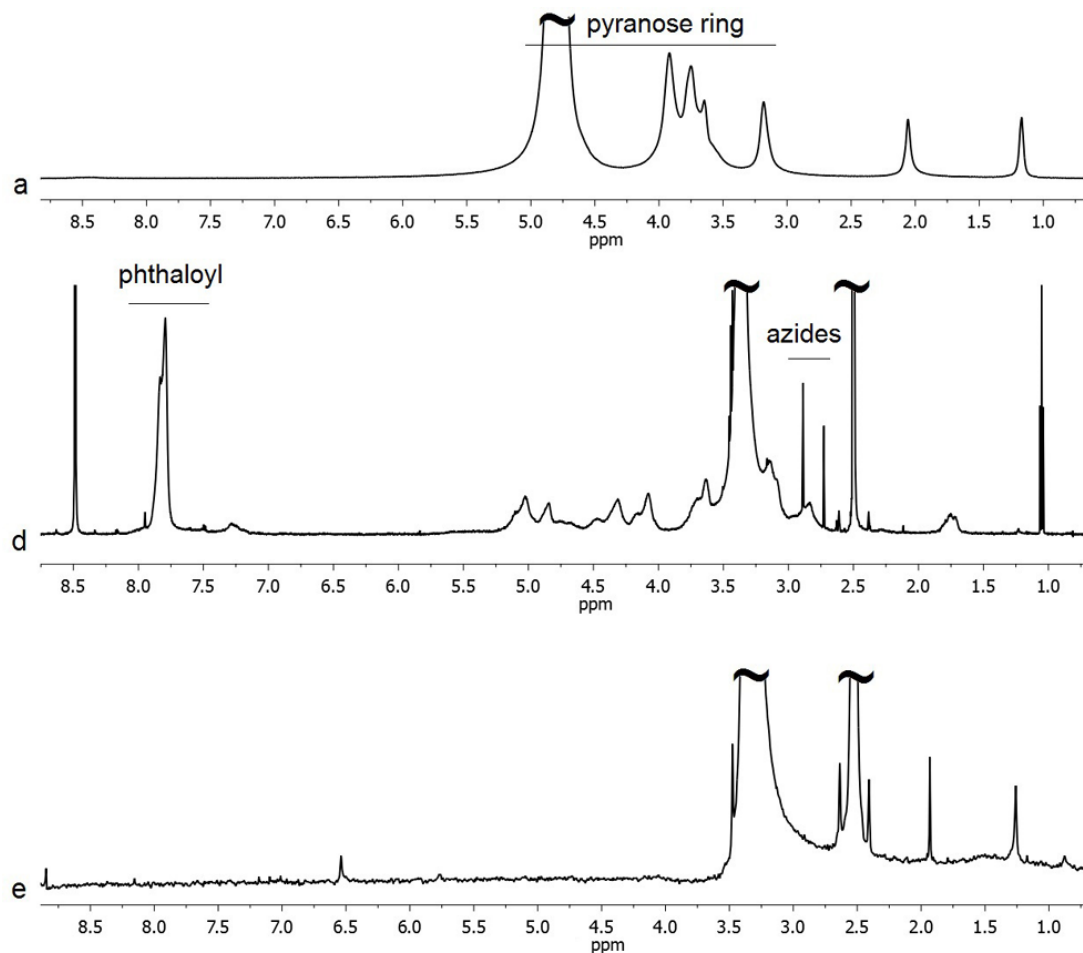


Figure 12. ¹H-NMR spectra of chitosan and derivatives. Chitosan (**a**), 6-azide-6-deoxy-N-phthaloyl-chitosan (**d**), and 6-azide-6-deoxy chitosan (**e**).

This process was confirmed by the FT-IR spectrum of the clicked-chitosan derivative as shown in [Figure 15a](#). From the analysis of the spectrum, it could be noticed the loss of the band associated to azide groups at 2110 cm⁻¹, and the appearance of new bands at 1775 and 1715 cm⁻¹, related to ether ketone five-membered rings, and bands at 1387 cm⁻¹, distinctive of ring stretching on triazol-like compounds. All these distinctive characteristics on the FT-IR spectrum of clicked-chitosan indicated the total consumption of the azide groups and their successful substitution with the FPE via Huisgen click-reaction. Complementary,

the structure of clicked-chitosan derivative was corroborated by $^1\text{H-NMR}$ analysis (Figure 15b). In this spectrum it could be found a signal at 8.11 ppm, which has been assigned to the proton in triazol-like compounds (Gao et al., 2009), as well as all the signals expected for the protons of the furan ring from furfuryl propargyl ether as shown in Figure 15b.

Based on the ratio of the $^1\text{H-NMR}$ signal integrals of the protons of triazol-like compounds linked to chitosan and the signal integrals of C2 protons of chitosan, it was possible to estimate a 10% degree of substitution. This new furan-chitosan derivative will be referred from now on as clicked-chitosan.

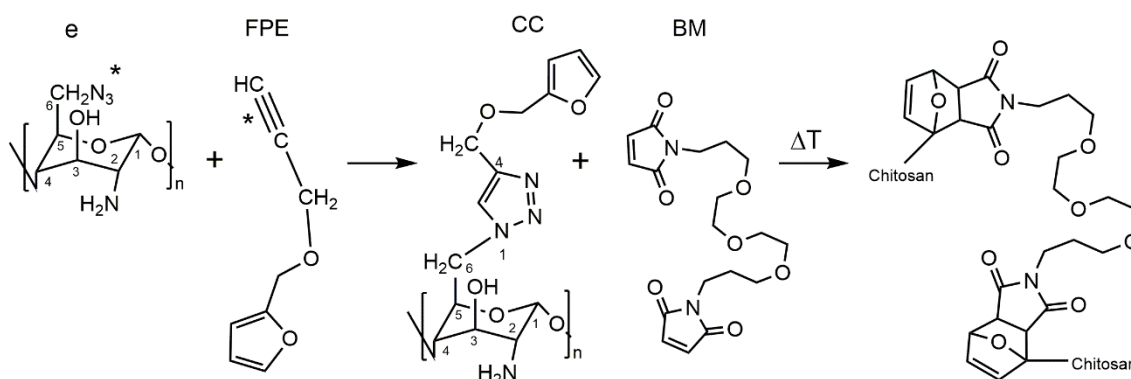


Figure 13. Synthetic scheme for the preparation of the clicked-chitosan (**CC**) derivative by Huisgen cycloaddition reaction and its crosslinking with bismaleimide (**BM**) by Diels-Alder cycloadditions. Asterisks indicate azide and alkyne groups. 6-azide-6-deoxy chitosan (**e**); furfuryl propargyl ether (**FPE**).

Diels-Alder cycloadditions occur between a conjugated diene and a substituted alkene. Diels-Alder “click” reaction is a powerful synthetic procedure, which has been used in polymer chemistry to produce various macromolecular architectures, bioconjugates and hybrid materials. It should be mentioned that furan and many of its derivatives are ideally suited dienic reagents for the Diels-Alder reaction, while maleimides are important dienophile compounds that are susceptible to additions across the double bond via Diels-Alder reactions. Thus, clicked-chitosan with its furan side groups could react with maleimide compounds to form this type of macromolecular arrangements. In this case, a bismaleimide was used as a crosslinking reagent to produce a polymer network via Diels-Alder reaction. As a consequence, the mixture presented a sol-gel transition with some

syneresis (Figure 16a). An important aspect of the Diels-Alder reaction is that adducts can be readily reverted to their precursors by heating, a process known as the retro-Diels-Alder reaction (Gandini, 2005). Furan and maleimide groups react through Diels-Alder cycloadditions around 60°C and this reaction could reverse ~100°C under certain conditions (Gandini, 2008). Interestingly, this system did not reverse to its initial state within the tested temperature interval. Indeed, the chitosan-furan-maleimide hydrogel network remained stable at temperatures between -20 to 85°C, even for long periods of time at room temperature (2 months). This result indicated that under those conditions, the hydrogel network was thermally nonreversible.

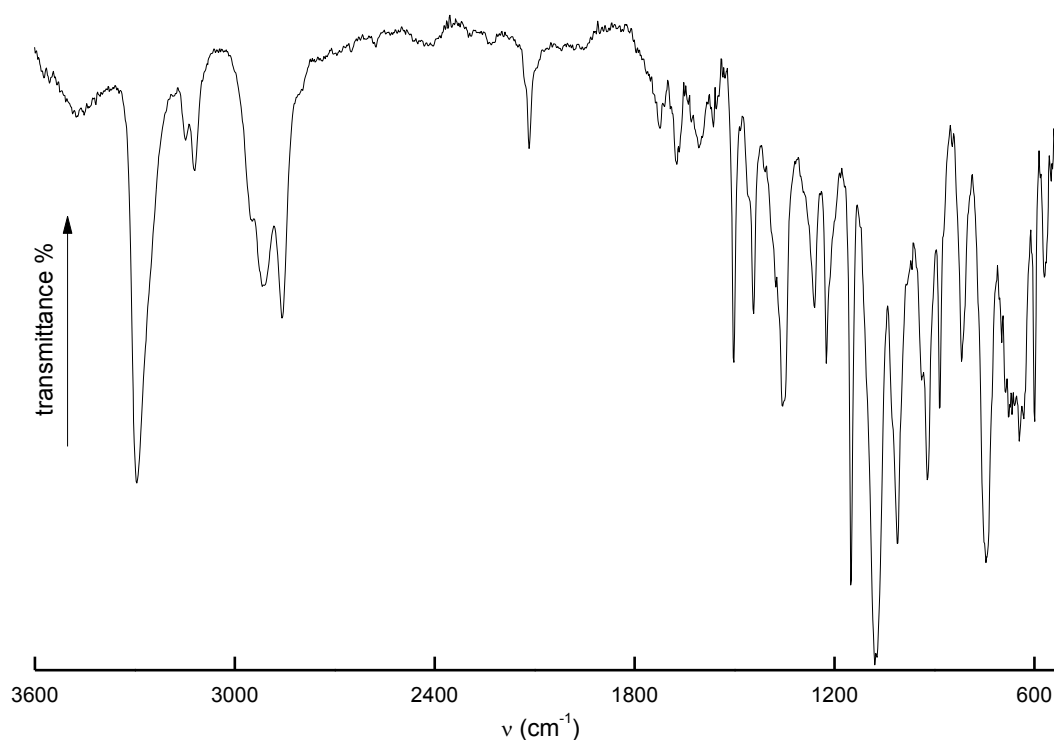


Figure 14. FT-IR spectrum of furfuryl propargyl ether.

The cross-linking process between clicked-chitosan and bismaleimide via Diels-Alder reaction was monitored by the evolution of its viscoelastic properties. Before the reaction mixture was heated a mechanical spectrum at 25°C was recorded (Figure 16c). As expected, the initial mixture of clicked-chitosan and bismaleimide

behaved as a typical viscoelastic fluid, showing dependence between the storage and loss moduli (G' and G'' , respectively) with frequency (Ross-Murphy, 2003).

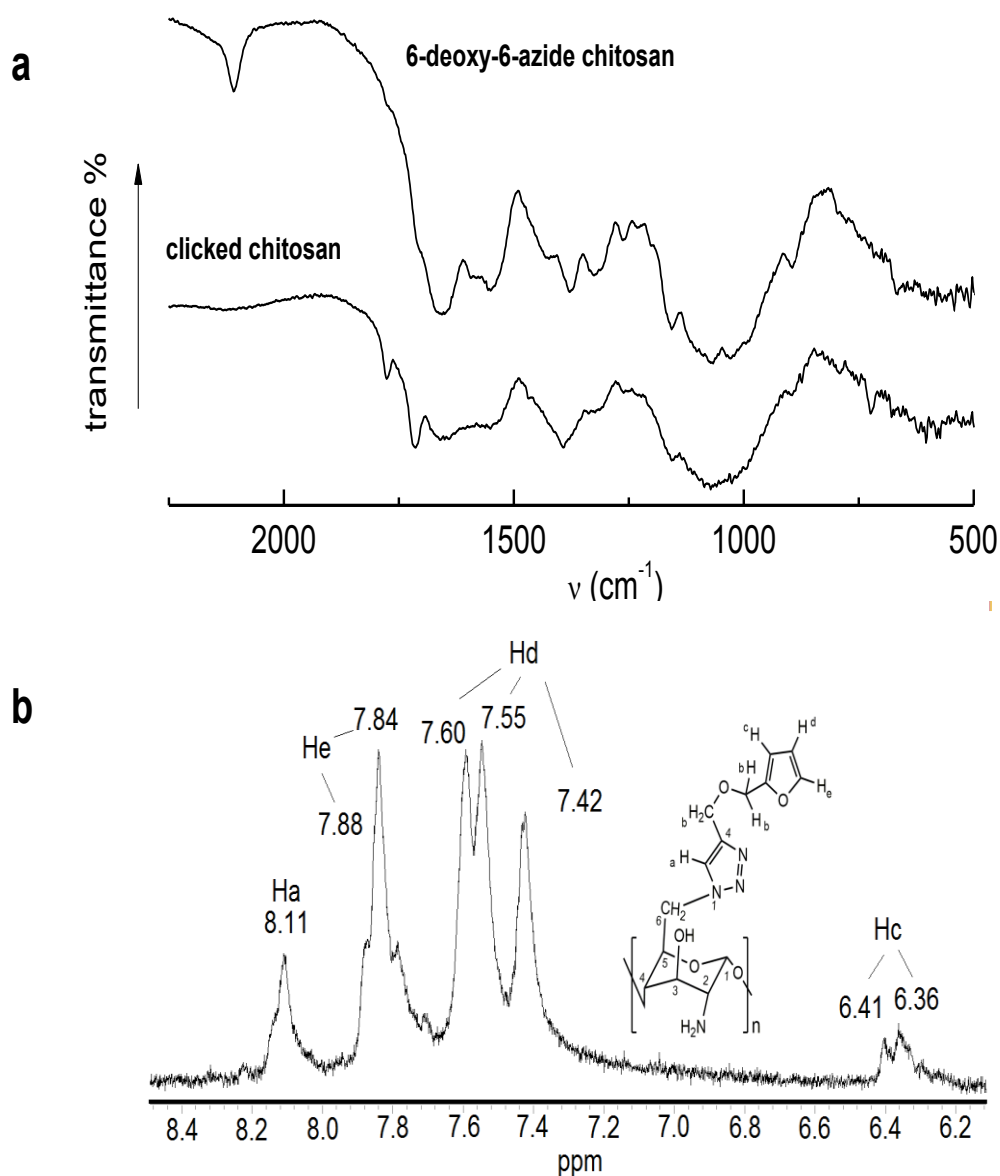


Figure 15. FT-IR (**a**) and ^1H -NMR (**b**) of the furan-chitosan derivative obtained through click chemistry. In **b**: letters indicate the chemical shifts of protons from triazol- and furan-ring compounds added to chitosan by Huisgen cycloadditions.

After this test, the temperature in the rheometer was quickly raised to 75°C to allow the reaction to proceed (**Figure 16b**). It could be observed a monotonic increase of both, storage and loss moduli, over time, confirming that the cross-linking process was taking place. After 20 minutes reaction, the storage modulus

surpassed the loss modulus. At longer times (after 200 minutes reaction), G' and G'' show almost no variation over time, suggesting that the Diels-Alder reaction had been completed.

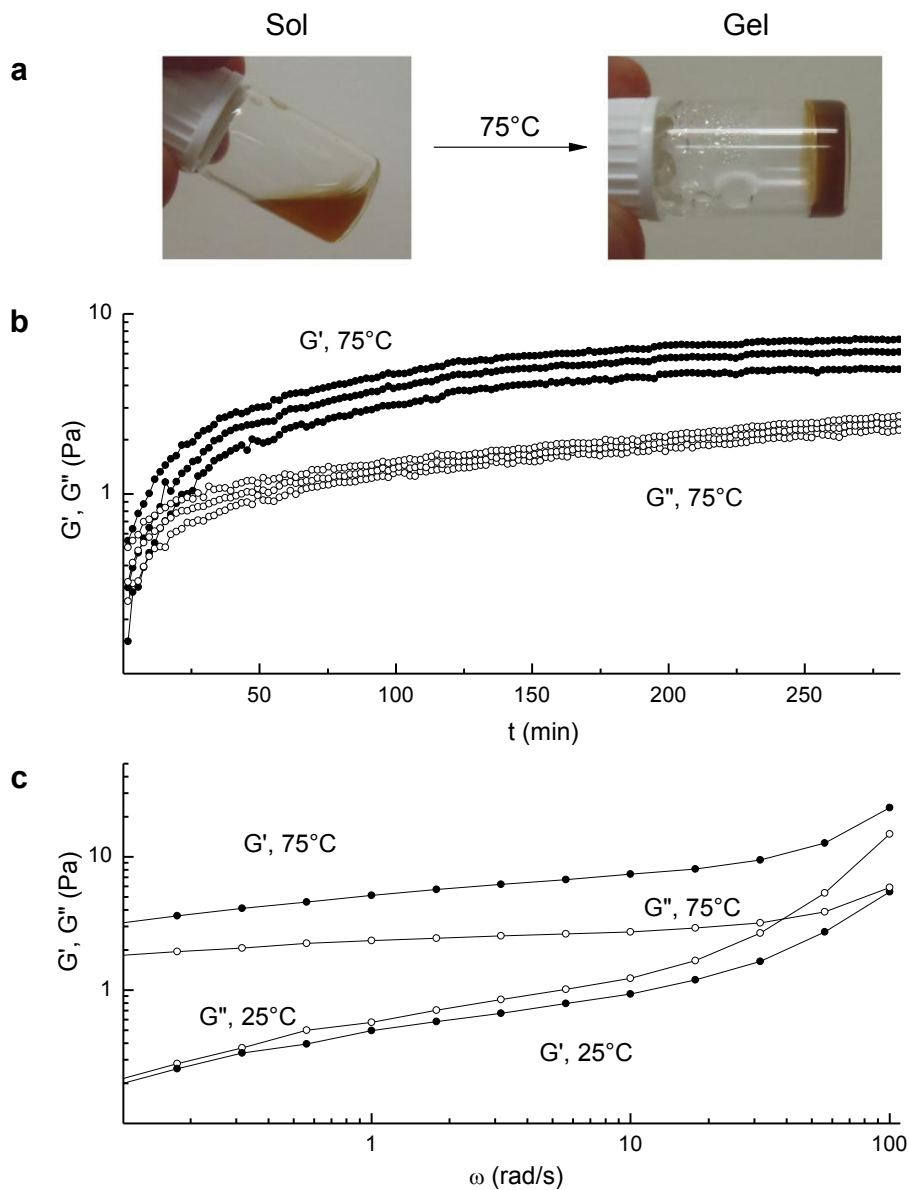


Figure 16. Photographs of the gelation and evolution of elastic (G' , closed symbols) and viscous (G'' , open symbols) moduli, with time and frequency for the system of 1.6 wt. % clicked-chitosan in 2% acetic acid and 0.5% bismaleimide in DMSO, in a ratio of 2:1 (w:w). In **a**: in Gel can be noticed some condensed water in the walls of the container as result of syneresis. In **b**: time sweeps at $\omega = 1, 3.14$ and 10 rad s^{-1} . In **c**: frequency sweeps. Measurements at 25 and 75°C, as shown in the figure.

The mechanical spectrum of the cross-linked system was recorded at this point, giving the typical pattern of a soft polymer network (Figure 16c). It could be noted that both moduli showed little dependence on the frequency, and G' displays higher values than G'' at all frequencies tested. This behavior, different from the other initially shown by this system, is a consequence of the Diels-Alder cross-linking process, during which the relaxation of macromolecular chains is restricted. Nevertheless, it is important to point-out that the values of both moduli did not surpass 10 Pa. These weak mechanical properties are typical of soft hydrogels (Shumilina & Shchipunov, 2002; Nie et al., 2013). This behavior should be explained as a consequence of the severe polymer degradation, which took place during the deprotection of phthaloylated amino groups (reaction 4, Figure 9), and should not be related nor with the Diels-Alder cross-linking reaction, neither with the extent of furan substitution on chitosan polymer chain.

In summary, the results of this work have allowed to reveal the expanded possibilities of renewable resources such as furfural and chitosan to generate new biopolymer based materials. The use of click chemistry procedures, such as Diels-Alder reaction, envisages the design of novel macromolecular networks as good candidates to develop innovative materials with enhanced properties.

Conclusion

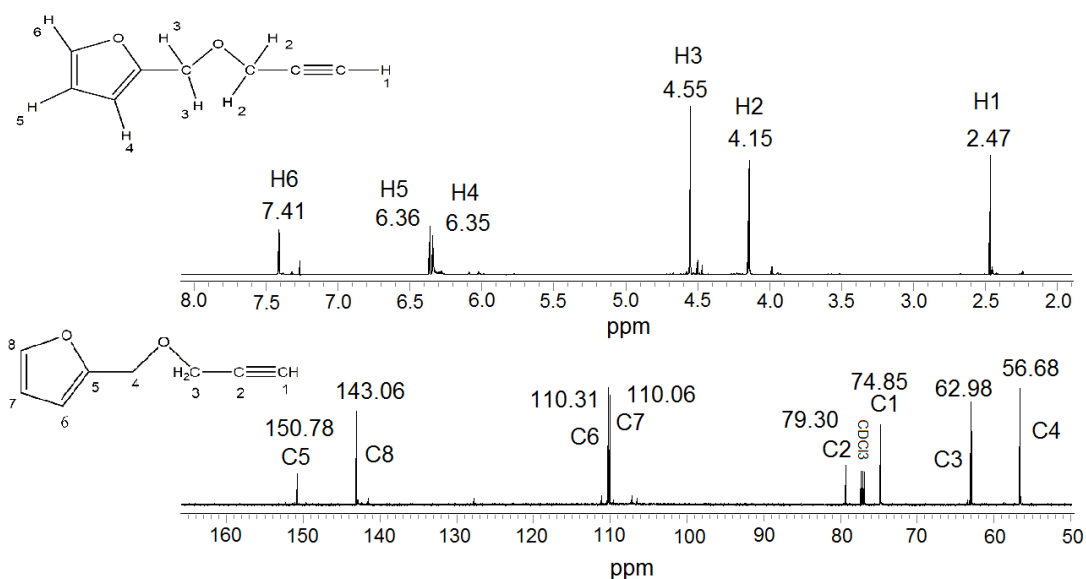
Functional furan-chitosan derivative was successfully prepared by the introduction of furan groups onto the chitosan chains via the Cu(I)-catalyzed 1,3-Huisgen cycloaddition click reaction. This kind of furan-chitosan derivatives could be employed as a suited dienic reagent for the Diels-Alder reaction, with a bismaleimide cross-linking compound to produce a polymer hydrogel via Diels-Alder reaction at 75°C. This chitosan-furan-maleimide system exhibited the typical pattern of a soft hydrogel, indicating that macromolecular chains possess a slower relaxation mechanism than in the sol state.

Acknowledgements

We are grateful to MSc. Karla Guadalupe Martínez Robinson and MSc. Luisa Lorena Silva Gutiérrez for their technical support. This research was financed by Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C and by Fondo de Infraestructura, CONACYT, Mexico (Grant 226082). MM-H acknowledges a stipend from CIAD AC.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.



Supplementary material Figure S1.

10.2. N-(furfural) Chitosan Hydrogels Based on Diels-Alder Cycloadditions and Application as Microspheres for Controlled Drug Release

Marcelino Montiel-Herrera¹, Alessandro Gandini², Francisco M. Goycoolea^{3,5}, Neil E. Jacobsen⁴, Jaime Lizardi-Mendoza⁵, Maricarmen Recillas-Mota¹, Waldo M. Argüelles-Monal^{1*}

¹Laboratorio de Polímeros Naturales, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera al Varadero Nacional km 6.6, Colina Las Playitas, Guaymas, Sonora, México. CP. 85480. ²Materials Engineering Department, Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, 13566-590, São Carlos, Brazil. ³Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Hindenburgplatz 55, 48143 Münster, Germany. ⁴Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arizona, 1306 E. University Blvd, Tucson, AZ. 85721 USA. ⁵Biopolímeros (CTAOA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera a La Victoria, Ejido La Victoria km 0.6 (Apartado Postal 1735) CP 83000 Hermosillo, Sonora, México.

Running title: Chitosan hydrogels produced by Click Chemistry

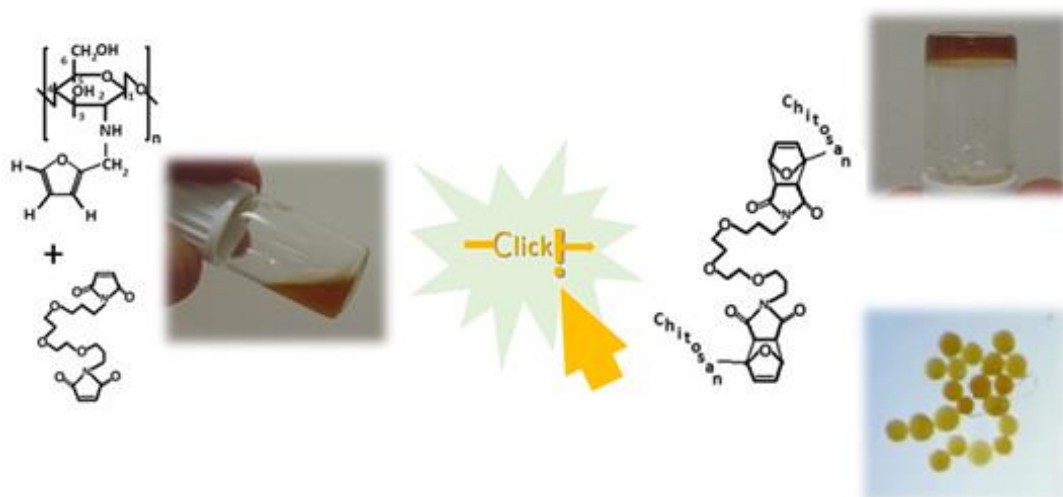
Key words: Chitosan, Furans, Click Chemistry, Diels-Alder, reductive amination, hydrogels.

*Corresponding Author Address: Laboratorio de Polímeros Naturales, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera al Varadero Nacional km 6.6, Colina Las Playitas, Guaymas, Sonora, México. CP. 85480. Tel +52 (622) 22-258-21 Fax +52 (622) 22-528-40 e-mail: waldo@ciad.mx

Abstract

In this study, chitosan was chemically modified by reductive amination in a two-step process. The synthesis of N-(furfural) chitosan (FC) was confirmed by FT-IR and $^1\text{H-NMR}$ analysis, and the degrees of substitution were estimated as 8.3 and 23.8%. The cross-linkable system of bismaleimide (BM) and FC shows that FC shared properties of furan-maleimide chemistry. This system produced non-reversible hydrogel networks by Diels-Alder cycloadditions at 85°C . The system composed of BM and FC (23.8% substitution) generated stronger hydrogel networks than those of FC with an 8.3% degree of substitution. Moreover, the FC-BM system was able to produce hydrogel microspheres. Environmental scanning electron microscopy revealed the surface of the microspheres to be non-porous with small protuberances. In water, the microspheres swelled, increasing their volume by 30%. Finally, microspheres loaded with methylene blue were able to release the dye gradually, obeying second-order kinetics for times less than 600 minutes. This behavior suggests that diffusion is governed by the relaxation of polymer chains in the swelled state, thus facilitating drug release outside the microspheres.

Schematic Abstract



Introduction

Biopolymers can be chemically modified by the insertion of molecules into their structures to react with specific molecules and respond to particular targets. Thus, novel modified-polymers can exhibit new properties, allowing them to display specific responses to one or several stimuli (Recillas et al., 2009). For example, click chemistry and biopolymers such as chitosan, carrageenan and cellulose have been used for these purposes in the recent past (Bertoldo et al., 2011; Ifuku et al., 2011 & 2012).

Click chemistry is the name given to a group of reactions that proceed rapidly under simple experimental conditions, producing high yield of stereospecific molecules that are easily recovered, etc. (Kolb et al., 2001; Kolb & Sharpless, 2003; Crescenzi et al., 2007; Hein et al., 2008). One of those reactions is the well-known Diels-Alder cycloaddition, in which a conjugated diene and a substituted alkene (dienophile) react to generate a substituted cyclohexene (Gandini et al., 2003). Currently, the use of click chemistry in polymer science is a strategy to design polymer-based hydrogels, drug and gene delivery systems, scaffolds for tissue engineering and toxic substance and mineral chelation, among other applications (Lee & Mooney, 2001; Crescenzi et al., 2007; Gao et al., 2009). For example, 6-N,N,N-trimethyltriazole chitosan has been tested for gene delivery; N-carboxymethyl chitosan and dithiocarbamate chitosan have been used as ion scavengers in water treatment; and cross-linked chitosan with collagen-glycosaminoglycans derivatives have been used for tissue engineering and wound healing (Peniche et al., 1998; Gao et al., 2009).

Polymer-based hydrogels are macromolecular networks that swell rather than dissolve in a good solvent. They show useful viscoelastic properties for a wide range of biomedical and technological applications (Lee & Mooney, 2001; Ross-Murphy, 2003). Chitosan itself can form highly viscous solutions at high concentrations in acidic media but does not form true macromolecular networks. However, specific chemical changes in the structure of chitosan can lead to the formation of hydrogels. These chemical changes may occur on its amine moieties and hydroxyl groups as a result of several reactions (Yalpani & Laurance, 1984;

Pastor de Abraham, 2004; Kurita, 2006; Peniche et al., 1998; Bertoldo et al., 2011; Ifuku et al., 2011 & 2012). However, when these modifications are made by amine reduction, usually the reaction is simple and occurs in one or two chemical steps. Nonetheless, in some cases, the chitosan imine product must react with a crosslinker to produce macromolecular networks (Azevedo & Kumar, 2012).

Furan chemistry can be a versatile route for the preparation of novel materials from renewable sources (Gandini, 2008). Furan and maleimide derivatives can react through Diels-Alder cycloaddition above 60°C and this reaction sometimes reverses at temperatures higher than 100°C. As a consequence of these features furan-maleimide Diels-Alder cycloaddition has been conceived as a strategy to generate polymeric materials with potential properties of mendability, recyclability and thermal reversibility (Gandini, 2008, Gandini et al., 2008). Likewise, furfural is a furan derivative produced at major scale annually from renewable sources. Its furan moiety is likely to be linked to maleimide derivatives to yield several architectures of polymeric materials with the benefits of furan chemistry. In addition, furfural can also produce imine products by amine reduction.

In the present work, we report for the first time that a furfural-chitosan derivative designed and synthesized to be able to *click* to a maleimide cross-linker leads to the generation of a chemical polymer gel network. The properties of this material were characterized and it was subsequently used to obtain hydrogel microspheres. This study presents proof-of-principle that renewable resources such as furfural and modified-chitosan, together with click chemistry, can be used to design and produce novel materials.

Materials and Methods

Materials

Chitosan (Fluka, with a degree of N-acetylation of 0.23 calculated from ¹H-NMR and a viscosity-average molecular weight of 1.3 x 10⁵ estimated from intrinsic viscosity measurements at 25°C in 0.3 M acetic acid/0.2 M sodium acetate, Rinaudo et al., 1993) and Milli-Q grade water with conductivity values less than 2

$\mu\text{S}/\text{cm}$ were used through all procedures. All other reagents were purchased from Sigma Aldrich unless otherwise indicated.

Purification of chitosan

Chitosan particles were dissolved in 0.33 M acetic acid and then sequentially filtered through sintered glass filters (pore diameters 100-160, 16-40 and 10-16 μm) and nitrocellulose filters (pore diameters 3, 1.2 and 0.8 μm). Next, the solution was precipitated by the addition of 3 M NH_4OH , and the chitosan was washed with water until the conductivity of the supernatant was less than 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Finally, the product was dried at room temperature under vacuum.

Synthesis of N-(furfural) chitosan (FC)

The free amine groups of chitosan were covalently linked to furfural. Briefly, 1 g chitosan (4.51 $-\text{NH}_2$ mmol) was dissolved in 50 mL of 2% aqueous acetic acid. To synthesize derivatives with two degrees of substitution, chitosan was reacted at room temperature with different stoichiometric amounts of furfural, 25 mg (0.26 mmol) and 125 mg (1.3 mmol) each for 2 h. Then, freshly prepared aqueous 10 mM NaH_3BCN (10 mL) was gradually added to the reaction mixture at 1 mL/6 min intervals by means of a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson, France). The reaction exhibited small bubbles during this process. FC was precipitated with 3 M NH_4OH and then was successively washed with water, water:ethanol 50:50 and 25:75 (v:v) and ethanol. After drying, the product was purified with ethyl ether by Soxhlet extraction during 48 hours. Finally, the purified FC (0.94 g; 94% yield) was dried at room temperature under vacuum.

Synthesis of bismaleimide

Bismaleimide (BM) was prepared in a two-step process with 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine and maleic anhydride as described by Gandini et al. (2008) with few modifications. The first step consisted of the drop-wise addition of two equivalents of maleic anhydride (previously dissolved in diethyl ether) to one

equivalent of 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine. This mixture was agitated for 3 h in a magnetic stirring device at 25°C. Then, this solution was refluxed for 3 h at 50°C to give a white solid material, which was filtered, washed with diethyl ether and dried. The second step consisted of the cyclization of the amic acid end-groups by stirring anhydrous sodium acetate and acetic anhydride refluxed for 5 h at 100°C with a mild stream of N₂. The mixture obtained was poured onto cold water, and the precipitate was filtered, washed with water and dried over sodium sulfate before removing the solvent. The final product, BM, was purified in a SiO₂ chromatographic column using a mixture of petroleum ether and ethyl acetate 1:2 (v:v) as the eluent.

Preparation of N-(furfural) chitosan - bismaleimide hydrogels

A fresh mixture of FC dissolved in 2% acetic acid and BM dissolved in DMSO, in a ratio of 2:1 (w:w), was used in all experiments. Before cross-linking, this mixture was handled as follows: first, the mixture was stirred and sonicated gently for 5 min. Then, it was submitted to five cycles of vacuum/normal pressure to remove air bubbles.

Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Infrared spectra were recorded on a Nicolet Protege (System 460 E.S.P) FT-IR spectrometer (Madison WI, USA) in pellet form with KBr, by the accumulation of 64 scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR)

High-resolution liquid ¹H-NMR spectroscopy was carried out on a Varian Inova-600 Plus (599.7 MHz) equipped with a triple-resonance (HCN) cryogenic probe. All spectra were recorded at 25°C. Separately, chitosan and samples of FC with different degrees of N-furfural substitution were solubilized in DCl/deuterium oxide solution (0.5 N) and tested.

Dynamic Rheology Studies

Oscillatory viscoelastic measurements were performed using a highly sensitive stress controlled Rheometer AR-G2 (TA Instruments, New Castle, DE) equipped with stainless steel plate geometry (diameter 40 mm, gap 1000 μm) and a Peltier system for temperature control. After loading the sample, a thin layer of low-viscosity silicone oil was added around the sample's periphery to prevent evaporation. First, a mechanical spectrum was recorded at 25°C to obtain the variation of the storage (G') and loss (G'') moduli with frequency ($\omega = 0.1\text{-}100 \text{ rad s}^{-1}$). Second, the sample was rapidly heated to 85°C and measurements of G' and G'' were made at three frequencies between 1 and 10 rad s^{-1} over the course of 5 h. Finally, another mechanical spectrum was recorded at 85°C. A strain of 5% was used, thus ensuring that measurements were performed within the linear viscoelastic region, as previously confirmed by strain sweep experiments ($\omega = 10 \text{ rad s}^{-1}$) at 85°C.

N-(furfural) chitosan - bismaleimide hydrogel microspheres

To obtain N-(furfural) chitosan-bismaleimide hydrogel microspheres, it was prepared a fresh mixture of 2.5% FC (8.3% degree of substitution, 150 mg dissolved in 6 mL of 2% acetic solution) and 1% BM dissolved in DMSO, in a ratio of 2:1 (w:w). Thereafter, the mixture was stirred and sonicated gently for 5 min. Then, it was submitted to five cycles of vacuum/normal pressure to remove air bubbles. Next 3 mL of mixture was loaded into a 5 mL syringe to drop-wise it onto vegetable oil at 65°C, under continuous agitation by a helical stirrer. It was important to maintain the microspheres circling into the oil during the procedure (6 h), followed by 1 h of sedimentation at the same temperature. Then the oil was carefully removed, and the formed microspheres were washed out first with hexane (three times) and then with a solution of 2% Contrex (Decon Labs, Inc. King of Prussia, PA, USA) and water. Finally, the microspheres were dried at room temperature.

To measure the diameter of the microspheres the samples were imaged using an optical inverted microscope (AmScope) equipped with a previously calibrated ruler at 25X (0.4 AN). With this purpose, ToupView 3.7 AmScope software was employed.

Morphological studies

The morphology of the microspheres was analyzed using an environmental scanning electron microscope, model EVO LS10 (Carl Zeiss). Dried samples were mounted on aluminum stubs with double-sided sticky carbon tape. Secondary and backscattered electron detectors were used to visualize the samples. First, images of dried microspheres were taken, and then the humidity in the chamber was increased to 100%. Then, samples were dried immediately under high vacuum, and images were recorded again. Other instrument settings are described in the text and figure captions.

Swelling of microspheres

To study the swelling process, a dried microsphere was immersed in water at 25°C until equilibrium, and its diameter was measured as described in section 2.9. From the diameter of the dried and swelled microsphere, its volume was calculated. This procedure was also conducted at 5 and 55°C (n = 5) to evaluate the influence of temperature on the swelling process. The swelling was calculated as follows:

$$S(\%) = \frac{(V_{sm} - V_{dm})}{V_{dm}} \times 100 \quad (1)$$

where V_{sm} and V_{dm} are the volume of swollen and dried microspheres, respectively, as calculated by the change in diameter. The results are given as the means \pm SE.

Release of methylene blue by microspheres

To study the release of methylene blue (MB) by the microspheres, they were firstly loaded with MB. Briefly, a group of 30 microspheres was immersed in 1 mL of aqueous MB (4.5 μ M) and left for 24 h. Then, the supernatant was removed, and

the microspheres were rapidly rinsed with water to remove the excess MB from their surfaces. Finally, the microspheres were dried for 24 h at room temperature.

Loaded microspheres were placed inside a quartz cell containing 3 mL of deionized water to measure the release of MB based on absorbance ($\lambda = 665 \text{ nm}$) in a UV-Vis spectrometer (UNICAM UV500) at different time intervals. Periodically, the quartz cell was gently inverted a few times to mix. All measurements were carried out at room temperature. The concentration of MB released by the microspheres into the aqueous medium was calculated from a calibration curve.

Results and discussion

Synthesis and characterization of N-(furfural) chitosan: FT-IR and ¹H-NMR analysis

Reductive amination is widely used to generate different imine compounds by the reaction between primary or secondary amines and aldehydes (Morrison & Boyd, 1998; Abdel-Magid & Mehrman, 2006). This reaction has been used to synthesize aldehyde-chitosan derivatives in the past to develop polysaccharide derivatives suitable for biomedical applications (Muzzarelli et al., 1989; Muzzarelli et al. 1993; Kumar et al., 2011; Kumar et al., 2012). In this sense, it was decided to synthesize FC by reductive amination (Figure 17). The synthesis of FC was simple and carried out in two steps.

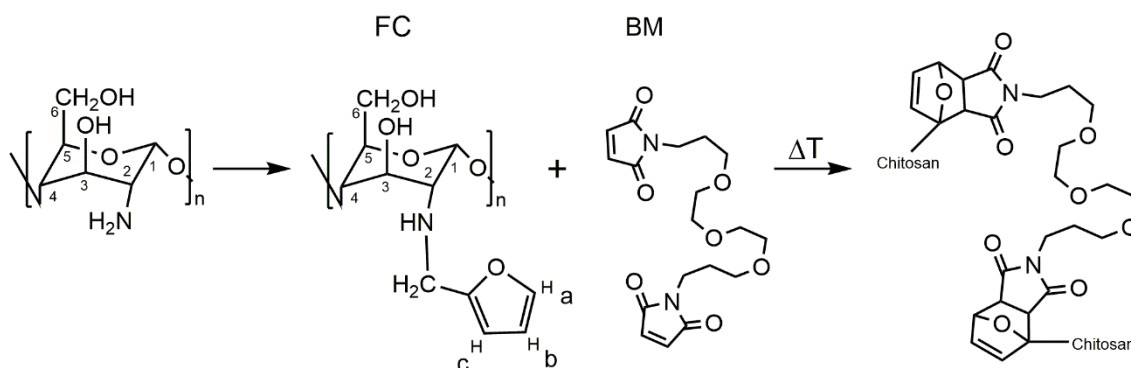


Figure 17. Synthetic scheme for the preparation of N-(furfural) chitosan, FC, and Diels-Alder cycloaddition.

Furfural was covalently linked to free amine groups on chitosan, as indicated by the FT-IR and $^1\text{H-NMR}$ spectra. The FT-IR spectrum exhibits a band (1483 cm^{-1}) associated with the secondary amines on chitosan, as well as several bands related to the unsaturated carbons (1654 , 946 and 823 cm^{-1}) and ether moieties (1130 and 1083 cm^{-1}) of furan rings (Figure 18A) (Kumar & Koh, 2012; Kumar et al., 2012). The $^1\text{H-NMR}$ spectrum shows the expected chemical shifts generated by protons bonded to furan rings (Figure 18B) (Martín-Matute et al., 2003). In addition, all of these signals were absent in the FT-IR and $^1\text{H-NMR}$ spectra of chitosan. These results corroborated the synthesis of FC. Other minor signals were also observed (Figure 18B) and may correspond to unreacted furfural, even when the final product was exhaustively purified by precipitation and 48 hours extraction with ethyl ether [see *Synthesis of N-(furfural) chitosan (FC)*].

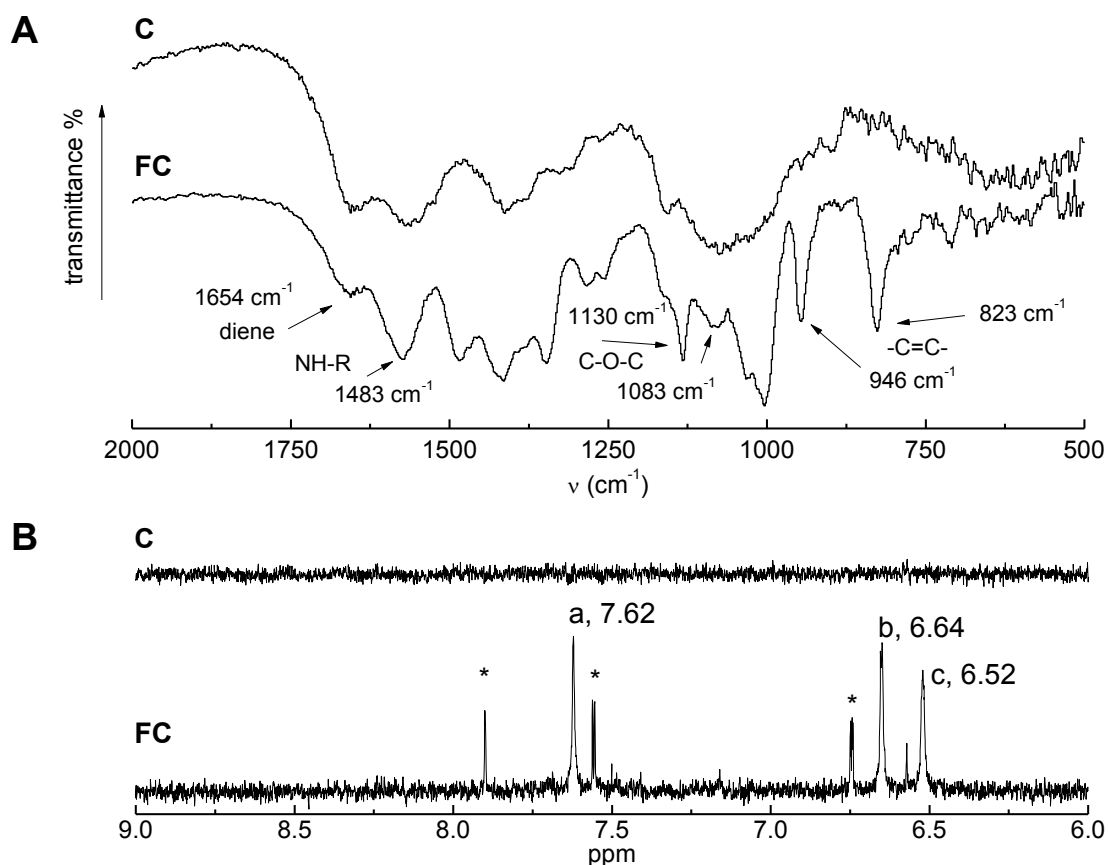


Figure 18. **A:** FT-IR spectra of chitosan (**C**) and N-(furfural) chitosan (**FC**) (in KBr) and **B:** $^1\text{H-NMR}$ spectra of chitosan and N-(furfural) chitosan (8.3% degree of substitution). In **B**, letters a, b and c, are the protons of furfural as represented in Fig. 1. Asterisks indicate unreacted furfural.

The ratio of the $^1\text{H-NMR}$ signal integrals of the protons of furfural linked to chitosan (Brugnerotto et al., 2001) to the integrals of the C2 chitosan protons gave degrees of substitution of 8.3 and 23.8%, respectively, for both derivatives. These degrees of substitution provided the possibility to perform reactions with different stoichiometric ratios between the polymer and cross linker, to produce macromolecular networks.

Rheological studies

According to the literature, dienes such as fulvene-maleimide compounds, maleimide-furan derivatives and cyclopentadienes by themselves can react through Diels-Alder cycloaddition at specific temperatures (Peterson & Palmese, 2009). That is, one compound acts as a diene and the other as a dienophile. For this reason and because the FC in our study shared some of the chemical properties of dienes, the capability of an FC solution alone to generate macromolecular networks was tested. It was found that solutions of 2.5% FC (8.3% degree of furfural substitution) dissolved in acetic acid (2%) did not produce any apparent change in the resulting physical and rheological characters at temperatures up to 85°C.

Macromolecular networks of diverse chitosan derivatives have been achieved by different methodologies (Argüelles-Monal et al., 1998; Guo et al., 1998; Montembault et al., 2005a, b; Azevedo & Kumar, 2012; Kumar & Koh, 2012). In this case, BM was used as a cross-linker between FC chains to form hydrogel networks based on Diels-Alder cycloaddition. The gelation process was studied isothermally by rheology at 85°C. It was found that mixtures of FC and BM at concentrations less than 2% FC (8.3% degree of substitution) and 0.5% BM were not able to generate macromolecular networks (data not shown), probably because the amount of BM is not enough to generate a polymer network, and/or the polymer concentration is lower than the percolation threshold. Based on these

results, all viscoelastic measurements were performed at 85°C on mixtures of 2.5% FC and up to 1.5% BM in the same weight relationship.

Figure 19 presents the variation of viscoelastic moduli during the cross-linking process using 2.5 wt.% FC (8.3% degree of substitution) and bismaleimide solutions at concentrations between 0.7 and 1.5 wt.%. The mechanical spectra at the end of the gelation are also included. The gelation process of the mixture with 0.7% BM does not show any significant change in the values of both moduli (Figure 19A). In fact, this system generated a very weak hydrogel network after 5 h of reaction, as G' shows some dependency over frequency and higher values than G'' before the polymeric network collapsed at frequencies over 30 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figure 19B). Increasing the BM concentration to 1 wt.% results in a firmer hydrogel. The effect of increasing BM in the mixture was observed after 100 min of reaction, when $G' = G''$ (Figure 19C). In this case, the hydrogel formation was faster in comparison with that of 0.7% BM. In addition, G' showed almost no dependence on frequencies below 60 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ and also showed higher values than G'' (Figure 19D). Moreover, when the BM concentration was increased to 1.5%, hydrogel formation occurred even faster. After 60 min of reaction, G' surpassed G'' , and both moduli showed their highest values compared with the other two systems (Figure 19E). Indeed, G' showed values 10 times higher than G'' , and both moduli exhibited very little dependence on frequency (Figure 19F). It is well known that stronger hydrogel networks display a significant parallel distance between G' and G'' over frequency. All mixtures containing 1.5% BM showed this distinction.

These results indicate that macromolecular networks formed between FC and BM are influenced by reaction stoichiometry. For this reason, another mixture using FC with a higher degree of substitution was prepared (23.8% degree of substitution). As expected, the mixture of 2.5% FC and 1% BM generated a stronger polymer network, characterized by quicker and significant increases of both moduli, G' and G'' (Figure 20A). This macromolecular network displayed values of G' and G'' that were several orders of magnitude higher than those displayed by previous systems. The mechanical spectra show that G' and G'' were

independent over frequency (Figure 20B). Combined, these results showed that mixtures of FC with a higher degree of substitution and greater BM concentrations produced faster and stronger polymer networks.

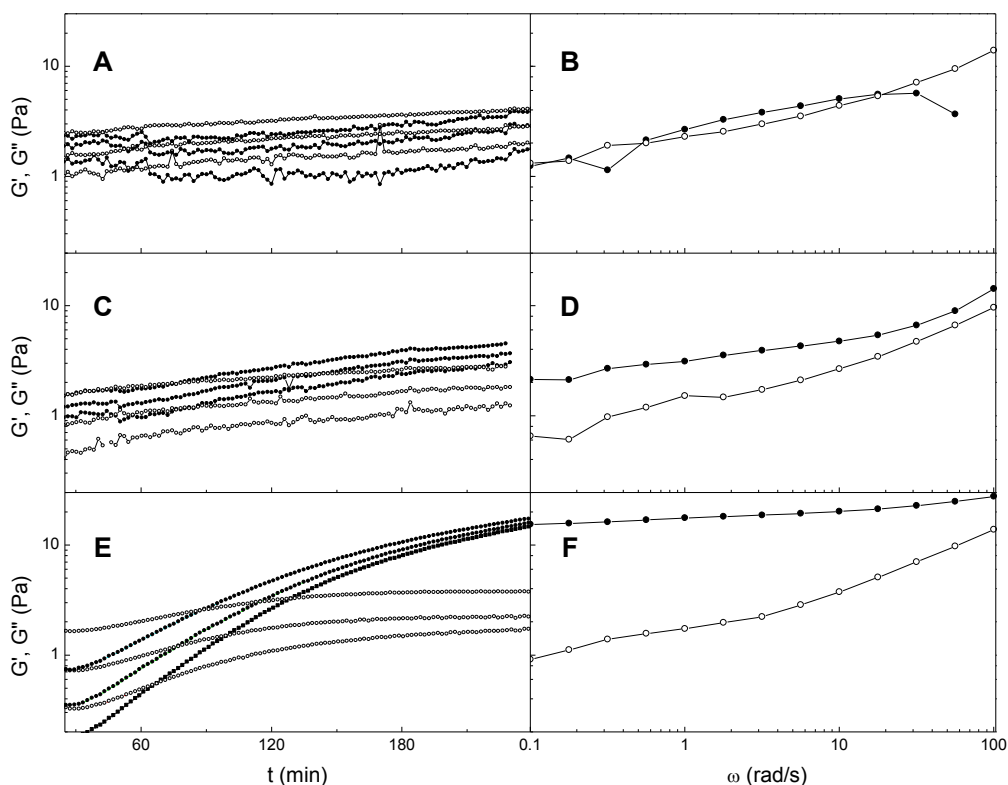


Figure 19. Evolution of elastic modulus (closed symbols), G' , and viscous modulus (open symbols), G'' , with time and frequency for N-(furfural) chitosan 2.5 wt. % (8.3% degree of substitution) in 2% acetic acid and bismaleimide dissolved in DMSO at different concentrations, in a ratio of 2:1 (w:w). Bismaleimide concentration as follows: **A-B**, 0.7%; **C-D**, 1.0%; **E-F**, 1.5%. **A**, **C** and **E**: time sweeps at $\omega = 1, 3.14$ and 10 rad s^{-1} . **B**, **D** and **F**: frequency sweeps. All measurements at 85°C .

Hydrogels produced by chitosan derivatives are considered soft materials as they show large deformation responses, and their moduli have slight frequency dependence by contrast with strong gels that have no frequency dependence. Moreover, the values of G' and G'' can reach up to a few hundred Pascal (Argüelles-Monal et al., 1998; Guo et al., 1998; Argüelles-Monal et al., 2003; Grassi et al., 2007; Azevedo & Kumar, 2012; Kumar & Koh, 2012). The viscoelastic characteristics of some chitosan networks are of interest for the development of new materials, as shown by certain polysaccharide derivatives

obtained by click chemistry and their hydrogels used for biological and biomedical applications (Such et al., 2012). In addition, chitosan has advantageous properties (e.g., biocompatibility, mucoadhesiveness, degradation into amino sugars, positive charges, etc.) that make it attractive for drug delivery systems (Betancourt et al., 2009).

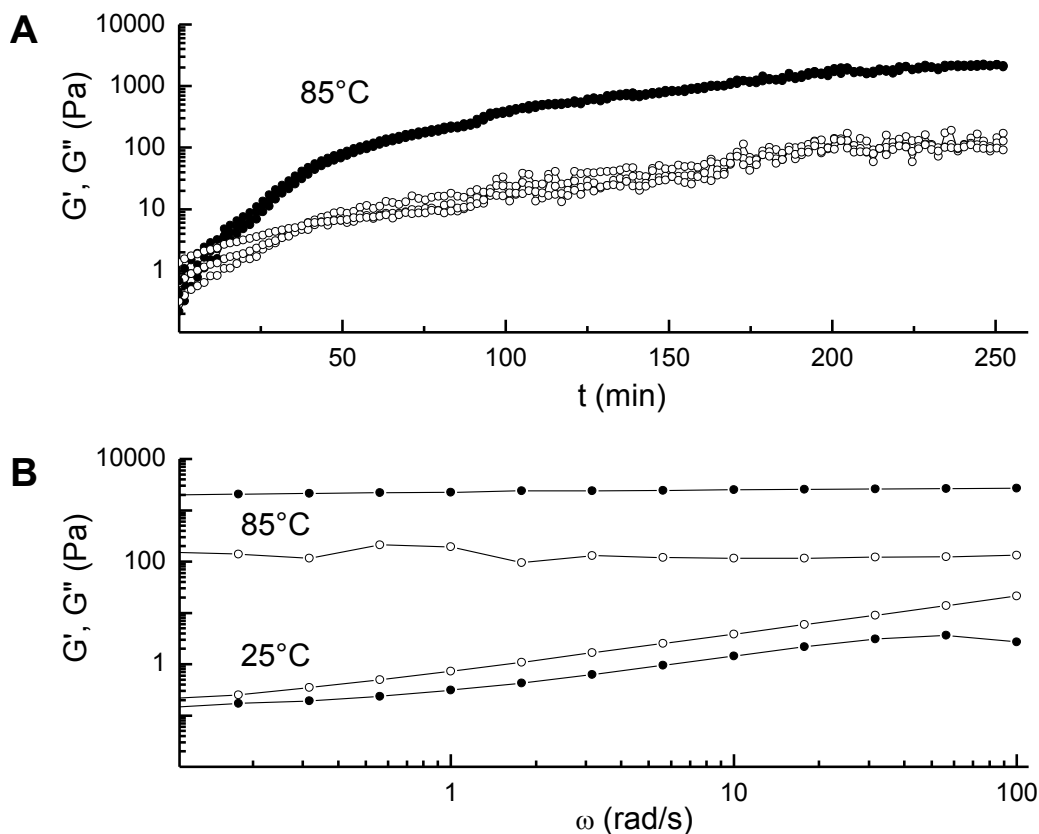


Figure 20. Evolution of elastic modulus (closed symbols), G' , and viscous modulus (open symbols), G'' , with time and frequency for the system of N-(furfural) chitosan 2.5 wt. % FC (23.8% degree of substitution) in 2% acetic acid and 1% bismaleimide in DMSO, in a ratio of 2:1 (w:w). **A:** time sweeps at $\omega = 1, 3.14$ and 10 rad s^{-1} . **B:** frequency sweeps. Measurements at 25 and 85°C , as shown in the figure.

Preparation and characterization of hydrogel microspheres

In this work, FC – BM hydrogel system was utilized to prepare hydrogel microspheres with interesting properties. The microspheres were produced by

means of simple experimental conditions. Dried microspheres presented radii of $66 \pm 4 \mu\text{m}$ ($n = 43$). When in contact with water, the microspheres swelled, gradually reaching their swollen state after 15 min of immersion, and maintained their morphological characteristics for long periods of time (optical micrograph of a dried and swollen microsphere is given in [supplementary material, Figure S2](#)). The swelling process was reversible and independent of the temperature at 5, 25 or 55°C. At either of those temperatures, the microspheres increased their volume by 30%. This feature is important for hydrogels that are required to exhibit volume conservation (swelling and shrinkage) over wide ranges of temperatures ([Kamata et al., 2014](#)).

The morphology of the microspheres was studied with environmental scanning electron microscopy ([Figure 21](#)). The surface topology of dried microspheres were visualized as non-porous with small protuberances ([Figure 21A](#)). These types of structures have been described in several chitosan derivatives ([Kumar et al., 2011](#); [Kumar et al., 2012](#)). The FC – BM microspheres showed collision-like formations in their surfaces, most likely due to the centripetal forces to which they were subjected during production as well as to impacts incurred during processing. Nonetheless, despite their compact surface morphology, the microspheres gradually swelled and changed in volume as the humidity in the chamber increased to 100%. [Figure 21](#) presents a sequence of images from the same microsphere as the humidity was increased inside the microscope. Initially, at 4.6% humidity (1°C, 30 Pa), this microsphere showed a compact structure with small bumps on its surface ([Figure 21A](#)). Then, while the humidity in the chamber was periodically increased from 15 to 100% (1°C, 659 Pa), small pores appeared on some areas of the microsphere's surface ([Figure 21B](#)). These pores remained visible for another 30 min while the humidity levels were decreased to 4.6%. After less than 5 min, the surface of the microsphere returned to its initial state ([Figure 21C, D](#)). This behavior suggests the existence of dynamic viscoelastic properties on the microspheres during the process of swelling in high humidity conditions. Such viscoelastic behavior may generate pores throughout the surface of the microsphere, allowing the diffusion of water throughout the macromolecular

network. These pores could form appropriate pathways inside the microspheres, giving rise to the necessary conditions for use as delivery vehicles.

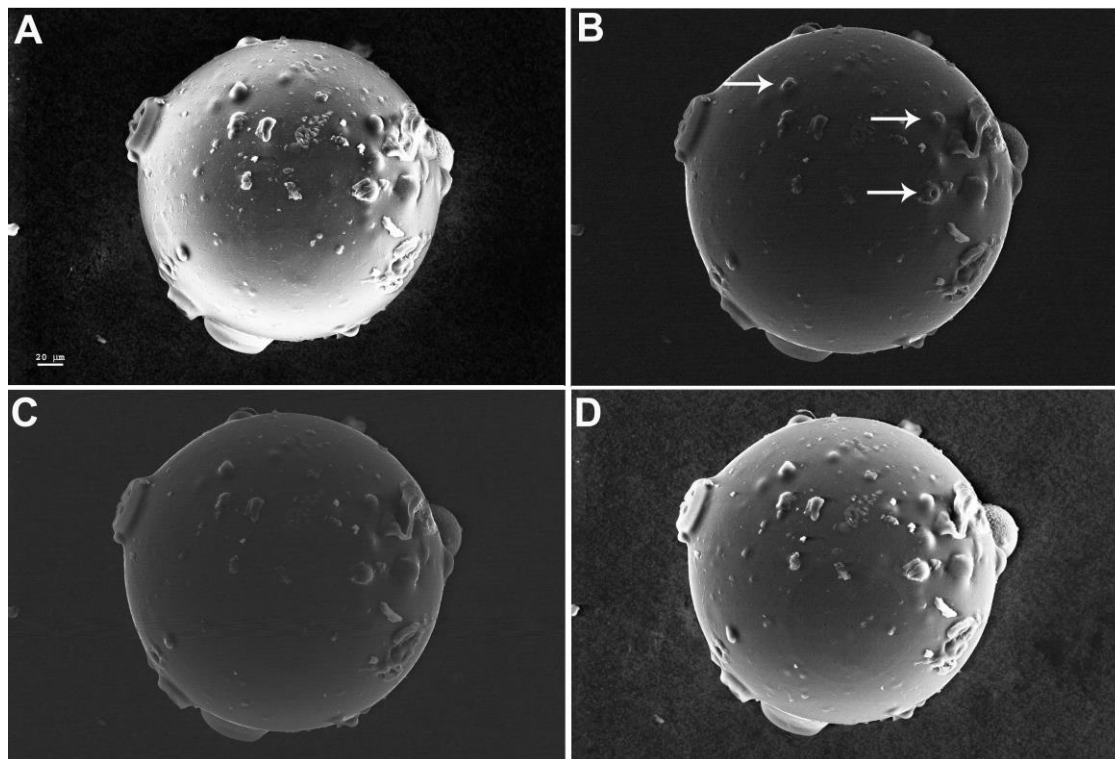


Figure 21. Micrographs of hydrogel microspheres for the system of 2.5% FC (8.3% degree of substitution) in 2% acetic acid and 1% BM in DMSO visualized by environmental scanning electron microscopy. Images were taken at spot size 500, 660X and 20 kV. In **B**, arrows indicate the pores produced at 100% humidity. Temperature and pressure inside the chamber as detailed in the text.

The release of drugs involve several mechanisms, principally based on diffusion, and sometimes occur due to syneresis, erosion or signals produced by the environment (Schwartz, 2002). These mechanisms are influenced by the chemical characteristics of each material. Usually, drugs are released from the core of the hydrogel by diffusion processes; however, interactions between the polymer, the drug and the environment are not absent in these processes. Combined, these factors regulate diffusion and thus drug release. These features must be taken into account in the design of biocompatible materials for specific applications. For example, drug nanocarriers should maintain their sizes and remain unaggregated when injected intravenously, to avoid thrombus formation

in blood vessels during distribution throughout the body (Mora-Huertas et al., 2010).

The capability of these microspheres as a drug delivery system was studied. Methylene blue was used as a model substance (Cardenas et al., 2003). For simplicity, microspheres were loaded with MB to study their release behavior. By the naked eye, it was possible to observe the loading of MB on the microspheres because they changed in color from yellow to dark blue (not shown). Once the microspheres were swollen in water, they slowly released the MB, reaching equilibrium after 8 h (Figure 22). If it is assumed that each microsphere released an equal amount of MB (based on their homogeneous radii), then each released approximately 200 pg/mL every hour until becoming empty. The release of MB by the microspheres behaved as most diffusion-drug delivery systems. Initially, the system presented an exponential growth release of MB (burst) that reached a plateau phase, as a result of the diffusion out of MB from the microspheres (Mora-Huertas et al., 2010).

From Fig. 22, it is evident that the release of MB from the FC – MB microspheres obeys second-order kinetics at times less than 10 hours because the release data were readily fit with Schott's equation (Schott, 1992):

$$\frac{t}{W} = A + Bt \quad (2)$$

where W is the release value at time t , $B = 1/W_{\infty}$ is the inverse of maximum release and $A = 1/(dW/dt)_0$ is the reciprocal of the initial release rate.

It was shown that this equation describes a second-order kinetics process regarding the remaining swelling, in this case, the remaining amount of MB, expressed as:

$$\frac{dW}{dt} = k(W_{\infty} - W)^2 \quad (3)$$

where the specific rate constant, k , is related to parameter A in equation (2) as follows:

$$k = \frac{1}{AW_{\infty}^2} \quad (4)$$

This kinetic profile confirms the suggested elastic behavior in which diffusion is governed by the relaxation of polymer chains in the swollen state, thereby

facilitating drug release outside the microspheres. Moreover, as a positively charged molecule, MB is not electrostatically attracted to chitosan, giving rise to this monotonic second-order kinetics release.

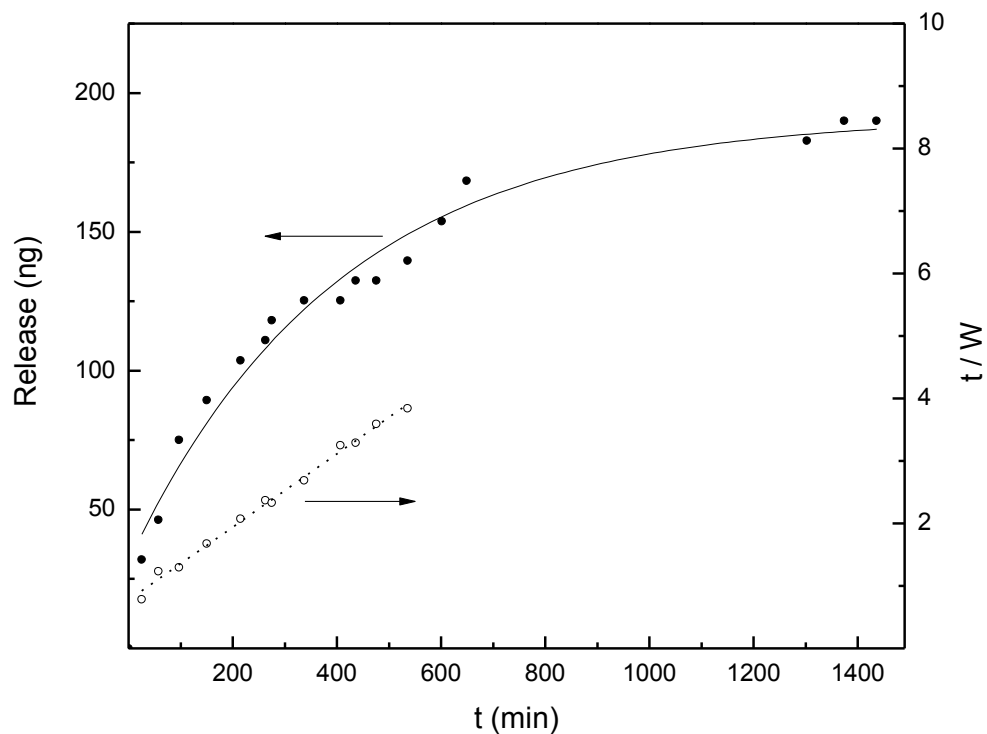


Figure 22. Plot showing the dependence of the release of methylene blue (W) and the reciprocal of the average release rate (t/W) on time at 25°C by hydrogel microspheres for the system of 2.5% FC (8.3% degree of substitution) in 2% acetic acid and 1% BM in DMSO. Filled symbols correspond to experimental values. Dotted line represents the linear regression of the corresponding t/W vs. t plot [Equation (2)].

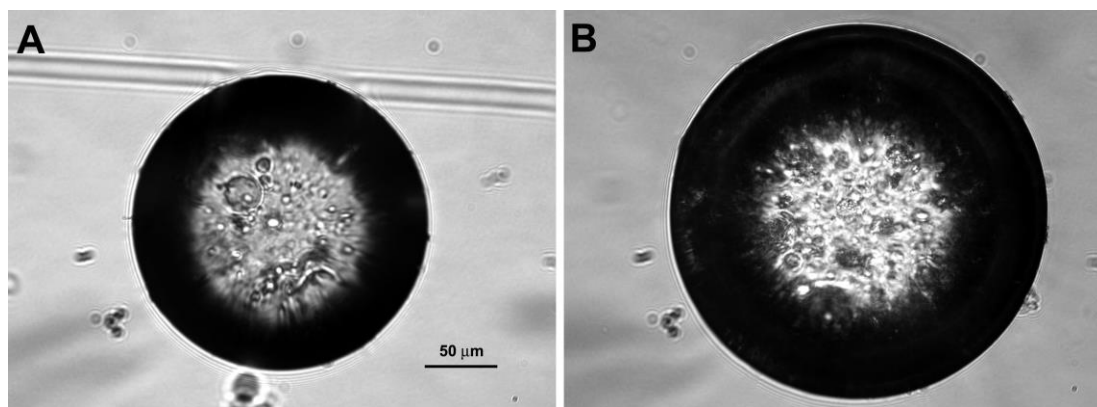
Chitosan micro- and nanovehicles have been proposed for novel biological and biomedical purposes (Betancourt et al., 2009; Kumar & Koh, 2012). In this sense, the FC – BM hydrogel system exhibited the potential use of reductive amination and Diels-Alder cycloaddition to generate materials with remarkable viscoelastic and diffusion properties that could be taken as candidates for the development of easy-to-produce new materials for biotechnological applications. Further studies are needed to test these microspheres as drug carriers for biological systems.

Conclusions

Through simple experimental conditions, the synthesis of a novel chitosan derivative based on the use of renewable resources such as furfural, has been achieved. The FT-IR and NMR analysis of N-(furfural) chitosan suggest the possibility to produce derivatives with different degrees of furfural substitution. This characteristic opens opportunities to investigate the chemical interactions between furan-chitosan derivatives and maleimide compounds via Diels-Alder reactions. In this sense, N-(furfural) chitosan reacted with bismaleimide yielding hydrogel networks with remarkable viscoelastic properties. Thus, non-porous hydrogel microspheres were produced, which exhibited interesting controlled release properties appropriate for the development of biological and biomedical applications.

Acknowledgements

We are grateful to MSc. Karla Guadalupe Martínez Robinson and MSc. Luisa Lorena Silva Gutiérrez for their technical support. This research was financed by Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C and by Fondo de Infraestructura, CONACYT, Mexico (Grant 226082). MM-H acknowledges a stipend from CIAD AC.



Supplement material Figure S2. Micrographs of hydrogel microspheres for the system of 2.5% FC (8.3% degree of substitution) in 2% acetic acid and 1% BM in

DMSO visualized by optical inverted microscopy at 25X. **A:** dried microsphere, **B:** swelled microsphere at 25°C.

XI. CONCLUSIONES

La Click Chemistry es una metodología muy versátil de síntesis orgánica que agrupa reacciones químicas sencillas, estereoespecíficas y de fácil recuperación de las moléculas sintetizadas. En este trabajo se diseñaron y sintetizaron, a través de la Click Chemistry, varios derivados de quitosana con propiedades de la química de los furanos y maleimidas. Las estructuras químicas de dichos derivados se confirmaron por FT-IR y RMN. Además, estos polímeros constituidos a base de furanos y quitosana, permitieron la preparación de hidrogeles en presencia de bismaleimida, a través de cicloadiciones de Diels-Alder.

Los hidrogeles de quitosana químicamente modificada y bismaleimida, mostraron propiedades viscoelásticas ajustables, debido a la influencia generada por el grado de sustitución químico en la quitosana. De particular interés, sistemas compuestos por N-furfural quitosana y bismaleimida, permitieron la producción de microesferas de topología compacta, estables en agua y útiles para la liberación de sustancias de manera controlada. Lo cual sugiere que estas microesferas, podrían aplicarse como vehículos de sustancias de interés para la industria biomédica y farmacológica.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Magid, A. F., & Mehrman, S. J. (2006). A review of sodium triacetoxyborohydride in the reductive amination of ketones and aldehydes. *Organic process research & development*, 10, 971-1031.
- Argin, S., Kofinas, P., & Lo, Y. M. (2014). The cell release kinetics and swelling behavior of physically crosslinked xanthan-chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. *Food hydrocolloids*, 40, 138-144.
- Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Lizardi, J., Peniche, C., & Higuera-Ciapara, I. (2003). Chitin and chitosan in gel network systems. In Bohidar, H. B., Dubin, P., & Osada, Y. (Eds.), *Polymer gels. Fundamentals and applications* (pp. 102-121). ACS Symposium Series 833.
- Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Peniche, C., & Higuera-Ciapara, I. (1998). Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system. *Polymer Gels and Networks*, 6, 429-440.
- Azevedo, E. P., & Kumar, V. (2012). Rheological, water uptake and controlled release properties of a novel self-gelling aldehyde functionalized chitosan. *Carbohydrate polymers*, 90, 894-900.
- Bertoldo, M., Nazzi, S., Zampano, G., & Ciardelli, F. (2011). Synthesis and photochromic response of a new precisely functionalized chitosan with “clicked” spiropyran. *Carbohydrate polymers*, 85, 401-407.
- Betancourt, T., Doiron, A., Homan, K. A., & Brannon-Peppas, L. (2009). Controlled release and nanotechnology. In de Villers, M. M., Aramwit, P., & Kwon, G. S. *Nanotechnology in drug delivery* (pp. 267-312). Springer, USA.
- Boren BC, Narayan S, Rasmussen L, Zhang L, Zhao H, Lin Z, Jia G, Fokin V (2008) Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: scope and mechanism. *J Am Chem Soc* 130:8923-8930
- Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Heux, L., Mazeau, K., & Rinaudo, M. (2001). Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. *Macromolecular symposia*, 168, 1-20.

Cardenas, A., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Higuera-Ciapara, I., & Peniche, C. (2003). Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate. *Macromolecular Bioscience*, 3, 535-539.

Chen Q, Cheng QY, Zhao YC, Han BH. 2009. Glucosamine Hydrochloride Functionalized Water-Soluble Conjugated Polyfluorene: Synthesis, Characterization, and Interactions with DNA. *Macromolecular Rapid Communications* 30: 1651-1655.

Crescenzi, V., Cornelio, L., Di Meo, C., Nardecchia, S., & Lamanna, R. (2007). Novel hydrogels via click chemistry: synthesis and potential biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8, 1844-1850.

Dimitrov I, Jankova K, Hvilstd S. 2010. Synthesis of polystyrene-based random copolymers with balanced number of basic or acidic functional groups. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 48: 2044-2052.

Galego NF, Martínez RS, Peniche CC, Prieto SG, Rieumont JB. 1987. *Química Física de los Polímeros*. Editorial Científico-Técnica. Cuba. p. 3-13.

Gandini A (2005) The application of the Diels-Alder reaction to polymer syntheses based on furan/maleimide reversible couplings. *Polímeros* 15:95-101

Gandini A, Belgacem MN. 2007. Furan chemistry as the service of functional macromolecular materials. Capítulo 18. Ed. DS Argyropoulos. *Materials, chemicals, and energy from forest biomass*. p. 280-295.

Gandini, A. (2008). Polymers from renewable resources: a challenge for the future of macromolecular materials. *Macromolecules*, 41, 9491-9504.

Gandini, A., Coelho, D., & Silvestre, A. J. D. (2008). Reversible click chemistry at the service of macromolecular materials. Part 1: Kinetics of the Diels-Alder reaction applied to furan-maleimide model compounds and linear polymerizations. *European Polymer Journal*, 44, 4029-4036.

Gandini, A., Hariri, S. L., Nest, J-F. (2003). Furan-polyether-modified chitosans as photosensitive polymer electrolytes. *Polymer*, 44, 7565-7572.

Gao, Y., Zhang, Z., Chen, L., Gu, W., & Li, Y. (2009). Synthesis of 6-N,N,N-trimethyltriazole chitosan via “click chemistry” and evaluation for gene delivery. *Biomacromolecules*, 10, 2175-2182.

Grassi, M., Grassi, G., Lapasin, R., & Colombo, I. (2007). *Understanding drug release and absorption mechanisms. A physical and mathematical approach*. (1st ed). CRC Press Taylor & Francis Group. (Chapter 3)

Guo, B., Elgsaeter, A., & Stokke, B. T. (1998). Gelation kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels. *Polymer Gels and Networks*, 6, 113-135.

Hein, C. D., Lui, X. M., & Wang, D. (2008). Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical Research*, 25, 2216-2230.

Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV (2005) Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J Am Chem Soc* 127:210-216

Ifuku, S., Wada, M., Morimoto, M., & Saimoto, H. (2011). Preparation of highly regioselective chitosan derivatives via "click chemistry". *Carbohydrate Polymers*, 85, 653-657.

Ifuku, S., Wada, M., Morimoto, M., & Saimoto, H. (2012). A short synthesis of highly soluble chemoselective chitosan derivatives via "click chemistry". *Carbohydrate Polymers*, 90, 1182-1186.

Kamata, H., Akagi, Y., Kayasuga-Kariya, Y., Chung, U-I., & Sakai, T. (2014). "Nonswellable" hydrogel without mechanical hysteresis. *Science*, 343, 873-875.

Khodaverdi E, Ganji F, Tafaghodi M, Sadoogh M (2013) Effects of formulation properties on sol-gel behavior of chitosan/glycerolphosphate hydrogel. *Iran Polym J* 22:785-790

Kolb, H. C., & Sharpless, K. B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, 8, 1128-1137.

Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2004-2021.

Kumar, S., & Koh, J. (2012). Physicochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6102-6116.

Kumar, S., Dutta, P. K., & Koh, J. (2011). A physic-chemical and biological study of novel chitosan-chloroquinoline derivative for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 356-361.

Kumar, S., Koh, J., Kim, H., Gupta, M. K., & Dutta, P. K. (2012). A new chitosan-thymine conjugate: synthesis, characterization and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 493-502.

Kurita K, Ikeda H, Yoshida Y, Shimojoh M, Harata M (2002) Chemoselective Protection of the Amino Groups of Chitosan by Controlled Phthaloylation: Facile

Preparation of a Precursor Useful for Chemical Modifications. *Biomacromolecules* 3:1-4

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8, 203-226.

Lahann J. 2009. Click Chemistry: A Universal Ligation Strategy for Biotechnology and Materials Science. Ed. J. Lahann. Click Chemistry for Biotechnology and Material Science. 1st edn. John Wiley & Sons, Ltd.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101, 1869-1879.

Li X, Yuan W, Gu S, Ren J. 2010. Synthesis and self-assembly of tunable thermosensitive chitosan amphiphilic copolymers by click chemistry. *Materials Letters* 64: 2663-2666.

Makuska R, Gorochovceva N (2006) Regioselective grafting of poly(ethylene glycol) onto chitosan through C-6 position of glucosamine units. *Carbohydr Polym* 64:319-327

Martín-Matute, B., Nevado, C., Cárdenas, D. J., & Echavarren, A. M. (2003). Intramolecular reactions of alkynes with furans and electron rich arenes catalyzed by PtCl₂: The roles of platinum carbenes as intermediates. *The Journal of the American Chemical Society*, 125, 5757-5766.

Montembault, A., Viton, C., & Domard, A. (2005). Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*, 26, 933-943.

Montembault, A., Viton, C., & Domard, A. (2005). Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. *Biomacromolecules*, 6, 653-662.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.

Morrison, R.T., & Boyd, R. N. (1998). Organic chemistry. (5th ed.) Allyn & Bacon Inc. USA. (Chapter 21).

Muzzarelli, R. A., Biagini, G., Bellardini, M., Simonelli, L., Castaldini, C., Fratto, G. (1993). Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan in dental surgery. *Biomaterials*, 14, 39-43.

Muzzarelli, R., Weckx, M., Filippini, O., & Lough, C. (1989). Characteristic properties of N-Carboxybutyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 11, 307-320.

Nie W, Yuan X, Zhao J, Zhou Y, Bao H (2013) Rapidly in situ forming chitosan/3-polylysine hydrogels for adhesive sealants and hemostatic materials. *Carbohydr Polym* 96:342-348

Nishimura S, Kohgo O, Kurita K, Kuzuhara H (1991) Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective chemical modifications. *Macromolecules* 17:4745-4748

Oliveira JR, Martins MCL, Mafra L, Gomes P (2012) Synthesis of an O-alkynyl-chitosan and its chemoselective conjugation with a PEG-like amino-azide through click chemistry. *Carbohydr Polym* 87:240-249

Pastor de Abram, A. (2004). Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú.

Peniche C, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM. 2008. Monomers, oligomers, polymers and composites from renewable resources. Ed. N. Belgacem y A. Gandini. Elsevier Sci p. 517-542.

Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M. (1998). Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. In M. N. Belgacem, & A. Gandini (Eds.), *Monomers, polymers and composites from renewable resources*, (pp. 517-542). Elsevier B. V.

Peterson, A. M., & Palmese, G. R. (2009). Reversible Diels-Alder cycloaddition for the design of multifunctional network polymers. In E. Lahann (Eds.), *Click chemistry for biotechnology and materials science* (pp. 195-215). John Wiley & Sons, Ltd.

Qin A, Lam YWY, Tang BZ (2010) Click polymerization: progresses, challenges, and opportunities. *Macromolecules* 43:8693-8702

Recillas, M., Silva, L. L., Peniche, C., Goycoolea, F. M., Rinaudo, M., & Argüelles-Monal, W. M. (2009). Thermoresponsive behavior of chitosan-g-N-isopropylacrylamide copolymer solutions. *Biomacromolecules*, 10, 1633-1641.

Rinaudo, M., Milas, M., & Dung, P. L. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15, 280-285.

Ross-Murphy, S. B. (2003). Thermoreversible and irreversible physical gels from biopolymers. In H. B. Bohidar, P. Dubin, & Y. Osada (Eds.), *Polymer gels. Fundamentals and applications* (pp. 51-69). ACS Symposium Series 833.

Schott, H. (1992). Swelling kinetics of polymers. *Journal of Macromolecular Science, Part B.*, 31, 1-9.

Schwartz, M. (2002). Encyclopedia of smart materials. John Wiley & Sons, Inc.

Shumilina EV, Shchipunov YA (2002) Chitosan-carrageenan gels. *Colloid J* 64:413-420

Such, G. K., Johnston, A. P. R., Liang, K., & Caruso, F. (2012). Synthesis and functionalization of nanoengineered materials using click chemistry. *Progress in Polymer Science*, 37, 985-1003.

Wang D, Zhao M, Liu X, Chen Y, Li N, Chen B (2012) Quick and highly efficient copper-catalyzed cycloaddition of organic azides with terminal alkynes. *Org Biomol Chem* 10:229-231

Yalpani, M., Laurance, D. H. (1984). Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives. *Macromolecules*, 17, 272-281.

Yu F, Cao X, Zeng L, Zhang Q, Chen X (2013). An interpenetrating HA/G/CS biomimic hydrogel via Diels-Alder click chemistry for cartilage tissue engineering. *Carbohydr Polym* 97:188-195.

Yuan W, Li X, Gu S, Cao A, Ren J (2011) Amphiphilic chitosan graft copolymer via combination of ROP, ATRP and click chemistry: synthesis, self-assembly, thermosensitivity, fluorescence, and controlled drug release. *Polymer* 52:658-666

Zampano G, Bertoldo M, Ciardelli F. 2010. Defined Chitosan-based networks by C-6-Azide-alkyne "click" reaction. *Reactive & Functional Polymers* 70: 272-281.