



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

MICROGELES POLIMÉRICOS: ENCAPSULADO, LIBERACIÓN DE FÁRMACOS Y
SOLUCIONES COLOIDALES

Tesista: NÉSTOR ARIEL PÉREZ CHÁVEZ

Director: DR. GABRIEL S. LONGO

Co-Director: DR. ALBERTO G. ALBESA

Año: 2024

Guía del Navegante...

En esta primera instancia se busca guiar al lector en la distribución de la presente tesis....se presenta un breve recorrido de cada uno de los capítulos escritos. Cada uno de ellos contiene la información necesaria para autosustentarse, pero hay una interconexión entre ellos en donde se continua y responden preguntas que no se podían delucidar con los modelos anteriores, mostrando así un estudio sistemático de los sistemas poliméricos. En el primer capítulo, nos adentramos en el mundo de los hidrogeles poliméricos, la esencia misma de estos materiales y su relevancia en la industria y la ciencia moderna. Introducción de tema y problema a abordar. Se hará énfasis en los hidrogeles poliméricos, dentro de los cuales encontraremos a los films y a los micro y nanogeles. Se presentarán las motivaciones y objetivos. Además, se mencionará el enfoque utilizado y las herramientas empleadas para llevar a cabo los estudios presentados en la tesis.

El primer sistema polimérico, los films, se retoma como partes de los antecedentes (Capítulo 2), en los cuales se da una primera aproximación de parte de quien escribe a la Teoría Molecular. Se destacan las ventajas del uso de la termodinámica estadística y cómo su combinación con las propiedades moleculares de los sistemas nos permite explicar toda la termodinámica necesaria para la descripción y predicción de comportamientos en condiciones determinadas. Se revisan conceptos generales de la respuesta a estímulo de estas cadenas poliméricas entrecruzadas en solución. En particular, se mostrará la respuesta de los films poliméricos a cambios en el pH y la concentración de sal. En este capítulo también se encontrarán resultados sobre la aplicabilidad en el secuestro de dos proteínas modelos (citocromo y mioglobina). La elección de estos resultados, respuesta a pH, concentración salina y adsorción de proteínas, se debe a que son retomados en los capítulos subsecuentes. En particu-

lar las proteínas se han seleccionado debido a su uso en resultados experimentales en sistemas poliméricos ([\[REFs\]](#)). Además, en los siguientes sistemas de estudio se incorporarán nuevos adsorbatos: insulina y las drogas doxorubicina (y su derivado daunorubicina). La insulina se ha seleccionado debido a su importancia en tratamientos contra la diabetes y la búsqueda de mejores transportadores para mejorar su dosificación. El mismo criterio se ha utilizado en la elección de las drogas doxorubicina y daunorubicina, antraciclinas muy utilizadas en tratamientos anticancerígenos. Es importante destacar que durante este acercamiento a la teoría molecular se logró la publicación de trabajos en los que se hace uso de los films poliméricos en el secuestro de moléculas, con aplicabilidad en la agroquímica [\[1, 2\]](#), y principalmente en su uso de secuestro de fármacos [\[3\]](#), trabajo con el cual nos acercamos a uno de los objetivos de esta tesis.

En el capítulo [3](#), nos encontraremos con una primera aproximación hacia los geles poliméricos. En particular, se presentará un estudio de la termodinámica de estos sistemas. En este capítulo nos valemos de un sistema de dos fases tipo Donnan. Una descripción detallada del mismo se presentará en las primeras hojas del capítulo. Los resultados mostrados forman parte de un trabajo publicado [\[4\]](#), en el cual se plantea el uso de un modelo robusto con el cual se explican los fenómenos observados experimentalmente, desde la fisicoquímica. Se muestra la capacidad de estos microgeles como encapsuladores de drogas terapéuticas y se predicen las condiciones óptimas de laboratorio para dicha tarea.

En el cuarto capítulo, extendemos los conocimientos adquiridos con nuestro modelo de dos fases para incorporar estructura definida a los geles de trabajo. Además de la respectiva descripción que conlleva el estudio de estos geles, se escribe un apartado sobre el trabajo que tomó la obtención de las configuraciones que dan origen a la estructura de los nanogeles.

Finalmente, en el quinto capítulo, se estudia el comportamiento de los nanogeles en solución.

Índice general

Guía del Navegante...	2
1. Introducción	18
1.1. Hidrogeles poliméricos: Aplicaciones biomedicas	18
1.2. Motivación: Encapsulado y Liberación de medicamentos	20
1.3. Objetivos	25
1.4. Antecedentes metodológicos	26
1.5. Metodología	27
2. Films de hidrogeles poliméricos: Adsorción de poliaminas, encapsulado y liberación de fármacos	30
2.1. Introducción	30
2.2. Metodología	33
2.3. Teória Molecular	34
2.3.1. Formalismo Teórico	34
2.3.2. Solución Bulk	46
2.3.3. Modelo molecular	49
2.4. Validación experimental	50
2.4.1. Crecimiento controlado de películas delgadas de PMAA.	51
2.4.2. Captura y liberación de doxorrubicina en presencia de poliaminas	53
2.5. Resultados	54
2.5.1. Resultados teóricos	54
2.5.2. Espectro UV-Visible	61
2.6. Conclusiones	65

3. Microgeles poliméricos: Respuesta a estímulo y encapsulado/liberación de fármacos	67
3.1. Introducción	67
3.2. Metodología	70
3.2.1. Teoría: Fase Microgel	70
3.2.2. Fase solución	77
3.2.3. Minimización gráfica	78
3.2.4. Incoporación de adsorbatos: Modificación del método teórico .	79
3.3. Resultados y discusión	84
3.3.1. Respuesta al pH y la concentración de sal	84
3.3.2. Respuesta a la Temperatura	89
3.3.3. Efecto del grado de entrecruzamiento	93
3.3.4. Adsorción de drogas	94
3.4. Conclusiones	99
4. Impacto de la funcionalización de la red polimérica en la adsorción de proteínas en nanogeles poliméricos.	101
4.1. Introducción	101
4.2. Teoría Molecular	104
4.2.1. Formalismo teórico	105
4.2.2. Solución Bulk	114
4.2.3. Modelo Molecular: Proteínas	116
4.2.4. Modelo Molecular: Red polimérica	116
4.3. Resultados y discusión	119
4.3.1. Caraterización del nanogel	119
4.3.2. Adsorción de proteínas en nanogeles basados en MAA	124
4.3.3. Adsorción de insulina en nanogeles basados en AH	131
4.4. Conclusiones	134
5. Soluciones coloidales	137
5.1. Introducción	137
5.2. Metodología	140
5.2.1. Potencial termodinámico intramolecular	140

5.2.2. Energía intermolecular: Interacción entre nanogeles	146
5.2.3. Simulaciones Monte Carlo	149
5.3. Nanogel de P(NIPAm-MAA) en solución diluida: fluctuación de volumen	151
5.3.1. Fluctuación en Volumen	151
5.4. Resultados: Soluciones	156
5.4.1. Efecto de la concentración de nanogeles	157
5.4.2. Respuesta a estímulos: pH, concentración salina y temperatura.	159
5.5. Conclusiones	167
A. Generación de configuraciones	169
A.1. Configuraciones red polimérica nanogel	169
B. Resolución numérica: Teoría Molecular	172
B.1. Films poliméricos	172
B.2. Nanogeles estructurados	175
Bibliografía	178

Índice de figuras

1.1. Moléculas que conforman los diferentes monómeros de las redes poliméricas que dan respuesta a los hidrogeles. Con respuesta al pH y concentración de sal: alilamina (base), ácido metacrílico y ácido acrílico. con respuesta a la temperatura: N-isopropilacrilamida. Estas moléculas son las utilizadas para los hidrogeles usados en esta tesis. Modelado molecular hace referencia a la construcción de modelos que representen las propiedades moleculares de estos sistemas. En particular se muestra que cada uno de estos monómeros se presenta como una esfera. En cada capítulo se dará detalle de como se da la construcción de esto modelado.	22
1.2. Esquema de funcionamiento de nanogeles como transportadores de medicamentos. A (izquierda): nanogel cargado con una proteína terapéutica que se libera en respuesta a un estímulo (cambio de pH). B (lado derecho): se aprovecha los diferentes pHs que hay en el cuerpo humano para el diseño de nanogeles que liberen drogas terapéuticas en un ambiente específico.	23
2.1. Esquema del modelo de film polimérico compuesto por cadenas de MAA. Se muestra además las poliaminas investigadas con su respectivo modelo molecular de grano grueso.	33
2.2. Número promedio de carga neta de la doxorrubicina y las poliaminas en función del pH en soluciones diluidas. El eje derecho muestra el grado de carga de una unidad de ácido metacrílico aislado. La línea vertical punteada indica el pH fisiológico.	49

2.3. Pasos de la síntesis de la película delgada de PMAA, representados como: A) Iniciador ATRP en sustratos; B) Crecimiento de la película de t-BMA; C) Hidrólisis del t-BMA.	52
2.4. Esquema que muestra la carga de doxorrubicina en el film de hidrogel de PMAA y su liberación en presencia de espermidina.	53
2.5. Gráfico de la adsorción, Γ , de espermina (A), espermidina (B) y putrescina (C) en función de su concentración en la solución bulk. Las diversas curvas en cada panel corresponden a diferentes valores de pH (alrededor de 7) y condiciones de sal fisiológica, $[NaCl] = 100$ mM. Las regiones sombreadas indican el rango de concentraciones saludables de poliaminas [5]. No hay doxorrubicina en estas soluciones.	55
2.6. Mapa de color que muestra la adsorción de la doxorrubicina (ver ecuación 2.46) en función de la composición de la solución, es decir, el pH y $[NaCl]$; la concentración del fármaco en la solución es $[Doxo] = 1$ mM.	57
2.7. Gráfico que muestra el número de carga de la doxorrubicina dentro de la red de PMAA en función del pH, para diferentes concentraciones de sal (líneas sólidas), así como la carga promedio de la molécula en la solución bulk (línea discontinua); $[Doxo] = 1$ mM.	58
2.8. Gráfico de la adsorción de la doxorrubicina (ver ecuación 2.46) en función del pH para soluciones que contienen espermina (A), espermidina (B) y putrescina (C). En cada panel, las diversas curvas sólidas corresponden a soluciones con diferentes concentraciones de poliamina, mientras que la curva discontinua corresponde a una solución sin poliaminas. Todos los resultados corresponden a soluciones de 1 mM de Doxo y 100 mM de $NaCl$	59
2.9. Gráfico que muestra la retención de Doxo, Γ_{ret} (ver ecuación 2.47), en función de la concentración de aminas para soluciones con 100 mM de $NaCl$ y un pH de 6 (panel superior) y pH de 7 (panel inferior).	60

- 2.10. Carga de doxorrubicina en films de PMAA y liberación de las mismas en agua, representada como el cambio en la absorbancia ($a \lambda = 490 \text{ nm}$) en relación con la carga inicial en diferentes tiempos de liberación. Inset: Gráfico de los espectros UV-Vis de los films después de 24 horas en contacto con Doxo (rojo; $t = 0$). Las diversas curvas ilustran la liberación del fármaco después de diferentes tiempos de liberación en agua. La curva negra se incluye como referencia y corresponde a la señal del soporte de vidrio desnudo. A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_0 : Absorbancia del hidrogel completamente cargado. (Resultado experimental) 61
- 2.11. (A) Representación esquemática de la liberación de Doxo mediante la adsorción de poliaminas. Carga y liberación de doxorrubicina en los films de PMAA en soluciones de espermina (B) y espermidina (C), representadas como el cambio en la absorbancia ($a \lambda = 490 \text{ nm}$) en relación con la carga inicial en diferentes momentos de liberación. A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_0 : Absorbancia del hidrogel completamente cargado. (Resultados experimentales) 62
- 2.12. (A) Representación esquemática de la recarga/liberación de Doxo después de la adsorción de poliaminas. (B) El cambio en la absorbancia ($a \lambda = 490 \text{ nm}$) en relación con la carga inicial de Doxo en el film de hidrogel (línea discontinua). A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_h : Absorbancia de la carga inicial de Doxo en la película de hidrogel (antes de la absorción de poliaminas). 64
- 3.1. Microgel polimérico en solución. En el mismo se observan las dos fases que componen al sistema, la fase microgel y la fase solución. A la derecha se muestra la droga utilizada, así como el modelo usado para incorporar la información química que las definen. 70

3.2. Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, pH de 4.65 y $[KCl] = 10^{-2} M$. Cada panel corresponde a un microgel MG100 diferente (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) con 10 % (A), 35 % (B) y 50 % (C) MAA. Las curvas presentan el potencial termodinámico en exceso de la contribución de la solución, $\Omega = \Omega_{MG} - \Omega_s$, en unidades convenientes, donde $V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3$ es el volumen de la partícula polimérica seca. En el panel B, los puntos marcan el radio óptimo para cada temperatura, que es el mínimo global/local de la curva correspondiente (ver tabla 3.2).	78
3.3. Estructura química (arriba) y modelo de grano grueso (abajo) aplicado para describir daunorrubicina y doxorrubicina. Los segmentos de grano grueso $D1 - D4$ se describen en la tabla 3.3.	83
3.4. Tamaño de microgel (A) y grado de carga (B) en función del pH para soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal y $T = 25^\circ C$. Las cadenas de polímero en el microgel MG100-35 tiene $n_{ch} = 100$ segmentos de largo y 35 % MAA. La curva punteada en el panel B es la disociación ideal del ácido metacrílico ($pKa = 4.65$). Los círculos de color en las curvas del panel A marcan el pKa aparente del microgel.	84
3.5. Gráfico del tamaño del microgel en función de la concentración de sal para diferentes soluciones de pH y $T = 25^\circ C$. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen fracciones MAA: 10 % (A), 35 % (B) y 50 % (C).	86
3.6. Curvas del grado de carga MAA (A) y la longitud de Debye (B) dentro de los microgeles MG100-35 en función de la concentración de sal para diferentes valores de pH. Estos resultados corresponden a las mismas condiciones de la figura 3.5B.	88
3.7. Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sal en solución y pH 4.65. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen diferentes fracciones de MAA: 10 % (A), 35 % (B) y 50 % (C).	89

3.8. Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{PT} (A) y la fracción de MAA cargado a esta temperatura (B) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Este microgel P(NIPAm-MAA) tiene una longitud de cadena de $n_{ch} = 100$ y un 35 % de MAA.	90
3.9. (A) Gráfico de temperatura de transición T_{PT} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01$ M; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}}$ en función del pH para las mismas condiciones del panel A (<i>Por ej.</i> , en la T_{PT}); x_{MAA^-} es proporcional a la carga total del polímero; N_{seg} es el mismo para todos los microgeles.	92
3.10. Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura, la concentración de sal y el pH (paneles A, B y C respectivamente). Diferentes curvas corresponden a microgeles con segmentos de 50 (MG050), 100 (MG100) y 200 (MG200) por cadena de polímero, todos con 35 % MAA.	93
3.11. Gráfico de la variación de la temperatura de transición como función de los segmentos por cadena que componen la red polimérica. El polímero que compone el microgel esta compuesto puramente por NIPAm. La concentración de sal es de 0.01 M y el pH de 4.65. La red polimérica esta compuesta por $N_{seg} = 10^7$ segmetos.	95
3.12. Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubicina (A) y doxorrubicina (B) adsorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es 1 mM y $T = 25^\circ C$. el microgel de P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35 % MAA (MG100-35).	96
3.13. Número de carga de las drogas estudiadas: Doxorubicina y Daunorubicina. La intersección con la línea punteada muestra el punto isolectrico de las mismas. Pasado este punto se da una inversión en la carga de las drogas lo que conlleva a una repulsión electrostática con los segmentos de MAA cargados del microgel.	97

4.4. Distribución radial de segmentos MAA, $\lambda_{MAA}(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a un nanogel de MAA-VA diferente que tienen una funcionalización de red particular y 22 % MAA. Estos grupos funcionales están completamente protonados (sin carga) a pH 3 y completamente disociados (cargados) a pH 7.	122
4.5. Distribución radial de todos los segmentos que componen la estructura del nanogel a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a una funcionalización diferente de la red polimérica.	125
4.6. Gráficos de la adsorción en exceso Γ de citocromo c (paneles A y B) y mioglobina (paneles C y D) a nanogeles MAA-VA en función del pH. La concentración de sal es $10^{-3} M$ en los paneles de la izquierda (A y C) y $10^{-2} M$ en los paneles de la derecha (B y D); En los paneles B y C Se muestra en el inset un zoom de la adsorción. Estos nanogeles tienen 22 % MAA; la concentración de proteína es $10^{-6} M$ en cada caso.	126
4.7. Panel A: Gráfico de la distribución radial de las moléculas de citocromo c, $\langle N(r) \rangle$, en función de su posición, para los nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones. Estas partículas tienen 22 % MAA, el pH es 7, la concentración de proteína es de $10^{-6} M$ y la concentración de NaCl es de $10^{-3} M$. El panel B muestra el potencial de la fuerza media, $PMF(r)$, que actúa sobre el citocromo c para las mismas condiciones que el panel A.	128
4.8. Gráfico de la adsorción en exceso Γ del citocromo c en función de la concentración de sal a pH 7 para nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones de red que contienen un 22 % de MAA; la concentración de proteína es de $10^{-6} M$	130
4.9. Gráficos de las moléculas de insulina adsorbidas, Γ , en función del pH para nanogeles AH-VA con diferentes funcionalizaciones. El contenido de AH es del 22 % para las redes poliméricas del panel A y del 35 % para las del panel B (este último grado de funcionalización no se alcanza para el nanogel SF). La concentración de sal es $10^{-3} M$ de NaCl y $[Insulina] = 10^{-6} M$	132

4.10. A: Gráfico de la distribución local de moléculas de insulina, $\langle N(r) \rangle$, en función de la posición para nanogeles AH-VA con un 22 % de segmentos sensibles al pH en diferentes configuraciones de red. El pH es 7.5, la concentración de insulina es de 10^{-6} M y la de NaCl es de 10^{-3} M. B: Potencial de fuerza media, $PMF(r)$ actuando sobre la proteína, en función de la posición para las mismas condiciones que el panel A.	133
5.1. Esquema de un paso en el algoritmo de Metropolis-MonteCarlo. El paso de un estado A a uno B esta mediado por el cambio de energía entre ambas configuraciones.	150
5.2. Energía libre de un nanogel aislado en función del tamaño del mismo. Las curvas corresponden a diferentes condiciones de pH. La concentración salina es 1 mM y la temperatura $25^{\circ}C$.	152
5.3. Gráfico de la fluctuación en volumen de un nanogel aislado. El nanogel esta compuesto por 2×10^5 segmentos (monómeros) repartidos en 200 cadenas de 1000 cadenas cada una	153
5.4. Gráfico de la fluctuación en volumen de un nanogel aislado. El nanogel esta compuesto por 2×10^5 segmentos (monómeros) repartidos en 200 cadenas de 1000 cadenas cada una	155
5.5. Densidad de probabilidad de tamaño para 3 diferentes soluciones, 0.1, 1.0 y 5.0 mg/ml. Cada panel corresponde a un pH de trabajo diferente: 3, 4.65, 5.50 y 7 para los paneles A, B, C, y D respectivamente. Otras condiciones de trabajo son: temperatura $25^{\circ}C$ y 1 mM en [KCl].	157
5.6. Densidad de distribución radial para las tres soluciones de nanogeles. Las curvas corresponden a las tres concentraciones consideradas: 0.10, 1.0, 5 mg/ml. Las condiciones del bulk de la solución son pH 4.65, $[KCl] = 1$ mM, la temperatura del sistema es $25^{\circ}C$.	159
5.7. Variación de las propiedades medias de la solución de nanogeles en función del pH de trabajo. El panel A muestra el tamaño $\langle R \rangle$, el B el grado de carga $\langle f \rangle$ y el C la fracción en volumen $\langle \phi \rangle$. La temperatura es de $25^{\circ}C$ y la concentración salina de 1 mM en $[KCl]$. Cada curva corresponde a un grado de empaquetamiento. Los nanogeles aislados se muestran en los paneles A, B y C.	160

5.8. Variación del radio medio ($\langle R \rangle$) con la concentración de sal para diferentes concentraciones de nanogeles. El pH es 4.65 y 7 para el panel A y B respectivamente. La temperatura del sistema es de 25°C. Las curvas sólidas corresponden a $\rho = 0.10, 1.0$ y 5.0 mg/ml, y a trazos se incorpora la respuesta de un nanogel aislado.	163
5.9. Energía libre interna de un nanogel aislado como función de sus radio. Las diferentes curvas muestran el cambio de la energía al aumentar la temperatura, la concentración salina es 1 mM en [KCl]. Los paneles A y B corresponden a pH 4.65 y 7 respectivamente.	164
5.10. Tamaño medio de la solución de nanogeles como función de la temperatura de la solución. pH 4.65, [KCl] 1m M. Curvas sólidas corresponde a concentraciones $\rho = 0.10, 1.0$ y 5.0 mg/ml de nanogel, a trazos se presenta un sistema con una partícula polimérica aislada.	166
A.1. Estructura base para la generación de configuraciones de nanogeles .	169
A.2. Diferentes radios originados con el potencial armonico de retricciin.	171

Índice de cuadros

2.1. Modelo de grano grueso. Los valores de pKa asignados a las diferentes unidades de grano grueso se obtuvieron todos de la literatura [6–8], y los volúmenes moleculares corresponden a los valores de Van der Waals. Valores entre paréntesis () indican la carga de las especies químicas ionizadas.	51
3.1. Propiedades moleculares de las diferentes especies químicas consideradas. (*Para la especie desprotonada).	76
3.2. Minimización de las curvas de la figura 3.2. Esta tabla resume los radios óptimos de tres microgeles MG100 a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $[KCl] = 10^{-2}M$	79
3.3. Propiedades moleculares para las distintas unidades de grano grueso usadas para el modelado de las drogas Daunorubicina y Doxorubicina. (ver figura 3.3). (* Para unidades ionizables.)	83
3.4. pka aparente de la fig. 3.4 para un gel MG100-35 a $25^{\circ}C$	85

4.1. Parámetros de las partículas de grano grueso(residuos de aminoácidos, iones pequeños, moléculas de solvente y segmentos poliméricos) considerados en el modelo molecular que describe a nuestro sistema. se diferencias grupos en los cuales experimentalmente, se ha observado que estos residuos tienen un pKa que difiere significativamente del valor promedio [9]: *Cys** representa un residuo de cisteína en un puente di-sulfuro. Las histidinas con número y * se encuentran en la citocromo c, donde el número indica el orden en la secuencia en la proteína. De manera similar, las glutaminas indicadas de la misma manera y con diferentes pKa ocurren en la secuencia de la insulina [9]. N-t y C-t denotan los grupos terminales de la secuencia, que añaden un pKa adicional a los primeros y últimos segmentos, respectivamente. El complejo hemo, presente tanto en la citocromo c como en la mioglobina [10, 11], se describe utilizando las unidades de grano grueso Hem1 y Hem2. El complejo contiene dos de cada una de estas unidades.¹¹⁷

Capítulo 1

Introducción

1.1. Hidrogeles poliméricos: Aplicaciones biomedicas.

En la última década, el interés por los hidrogeles poliméricos ha aumentado significativamente debido a la amplia variedad y diversidad de materiales e innovaciones que se pueden lograr con ellos . Estos sistemas poliméricos, que tienen una estructura molecular flexible y adaptable, pueden alterar su forma y propiedades de acuerdo con las condiciones externas. Esta adaptabilidad los convierte en protagonistas indispensables en diversas industrias [12], desde su uso en la creación de espumas y adhesivos [13, 14], hasta su aplicación en la industria cosmética y de pinturas, ofreciendo características singulares a productos que enriquecen nuestra vida diaria [15]. En la industria alimentaria, los hidrogeles poliméricos actúan como aditivos esenciales, contribuyendo a la textura, preservación y seguridad de los alimentos que consumimos [16].

Los hidrogeles tienen aplicaciones significativas en la mejora de la retención de agua y nutrientes en el suelo, lo cual es fundamental para incrementar la productividad agrícola y disminuir la dependencia del riego [17]. Estos materiales también son útiles en la protección de plantas contra sequías y plagas. En el campo de la remediación ambiental, su capacidad para absorber y contener contaminantes es notable [1, 2], contribuyendo así a la purificación de agua, suelo [18]. Además, los hidrogeles facilitan el transporte y la liberación controlada de agentes remediadores, lo que

acelera los procesos de limpieza ambiental [18]. En resumen, los hidrogeles poliméricos se destacan por su versatilidad y su amplio espectro de aplicaciones prácticas. Su habilidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales los posiciona como herramientas valiosas en múltiples sectores industriales.

Uno de los terrenos más importantes en los que los hidrogeles poliméricos han causado un impacto significativo es en el ámbito médico y farmacéutico. Estos materiales se han erigido como protagonistas en la búsqueda de transportadores de fármacos más avanzados, eficientes, y compatibles con el organismo humano. Sus propiedades intrínsecas les permiten ser moldeados y adaptados de manera específica para cumplir con los requisitos únicos de la administración de medicamentos. Esta capacidad permite diseñar hidrogeles que se adapten a las necesidades específicas de cada paciente. Esta intersección entre los hidrogeles poliméricos y la medicina no solo tiene el potencial de revolucionar la forma en que se administran medicamentos, sino que también puede tener un impacto positivo en la calidad de vida de las personas. Se están desarrollando tratamientos más efectivos y personalizados que minimizan los efectos secundarios, gracias a la capacidad de estos materiales para interactuar de manera selectiva con el cuerpo humano. Además, la biodegradabilidad de estos materiales contribuye a la reducción del impacto ambiental, lo que es fundamental en un mundo cada vez más enfocado en la sostenibilidad. La biodegradabilidad de los polímeros que componen a estos hidrogeles permite que se eliminen del cuerpo de manera natural, evitando la necesidad de cirugías para su extracción [19].

En aplicaciones médicas los hidrogeles poliméricos tienen un creciente interés. Como resultado, los hidrogeles de polímeros son actualmente candidatos prometedores para el desarrollo de una variedad de biomateriales con aplicaciones en biosensores [20, 21], ingeniería de tejidos [22, 23], regeneración ósea [24], materiales biomiméticos [25, 26], entre muchas otras aplicaciones biomédicas [27]. Por ejemplo, los films de hidrogeles se pueden utilizar para crear parches transdérmicos que liberen fármacos de manera controlada y sostenida [28].

Estos materiales se forman por la unión de cadenas largas de moléculas orgánicas, es decir polímeros, que pueden tener diferentes grados de entrecruzamiento y solvatación. En la figura 1.1 se ilustra cómo a partir de una cadena polimérica es posible crear una red de la misma y así obtener un film o micro/nanogel. Estos polímeros

están compuestos por monómeros que son quienes otorgan sus cualidades estímulo-responsivas que resultan en sus múltiples posibles aplicaciones. Los films de hidrogeles son capas delgadas de material polimérico (redes tridimensionales entrecruzadas) con variados espesores depositadas o ancladas en superficies. Por otro lado, los microgeles son partículas con una estructura de polímero entrecruzado que, al igual que los films, pueden adsorber grandes cantidades de agua u otro solvente. Los nanogeles, en cambio, son estructuras similares a los microgeles pero de tamaño nanométrico.

En resumen, los hidrogeles poliméricos tienen un gran potencial para revolucionar una amplia gama de industrias, desde la cosmética y alimenticia hasta la medicina y la farmacéutica. Su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones y necesidades los convierte en una herramienta versátil y valiosa para el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones.

1.2. Motivación: Encapsulado y Liberación de medicamentos

La naturaleza hidrofílica de los hidrogeles los hace, generalmente, biocompatibles y poseen una gran capacidad para incorporar moléculas huésped o analitos, tanto orgánicos como inorgánicos, y prevenir su degradación por el medio externo. El ambiente acuoso dentro de las redes poliméricas puede proteger a las proteínas de la desnaturaleza y la agregación en el interior de los hidrogeles [29–31], mientras permanecen activas y estructuradas antes de ser liberadas [32]. Como vehículos para el suministro de drogas, los films y micro/nanogeles poliméricos pueden administrar fármacos de peso molecular bajo, oligonucleótidos, proteínas terapéuticas e incluso combinaciones de drogas, lo cual es esencial en terapias contra el cáncer y las enfermedades infecciosas. Estas aplicaciones son posibles gracias a su respuesta a estímulo que proporciona un mecanismo para el encapsulado y liberación de analitos.

La respuesta a estímulo de los films y micro/nanogeles está fuertemente ligada a la composición de los polímeros que forman parte de su red tridimensional. Los hidrogeles compuestos por cadenas poliméricas que contienen segmentos ácidos como el ácido acrílico o metacrílico (AA y MAA, respectivamente), suelen hincharse (swelling) o deshincharse (deswelling) en respuesta a cambios en el pH de la solución en la

que se encuentran [33]. Esta respuesta al pH viene acompañada con una regulación de carga por parte de la red polimérica, con lo que el material es también capaz de responder simultáneamente a cambios en la concentración salina [34]. Análogamente, los hidrogeles compuestos por cadenas de polímeros termosensibles experimentan una transición de fase de volumen al sobrepasar una temperatura característica [35, 36]. Este comportamiento se origina porque tales polímeros son insolubles en agua por encima de cierta temperatura mínima crítica de solubilidad (LCST por sus siglas en inglés) [37]. En particular, los hidrogeles compuestos por poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) poseen una LCST de alrededor de 32°C [38]. En la figura 1.1 se muestran ejemplos de monómeros, cuyas cadenas poliméricas tienen este tipo de respuesta a cambios de pH, concentración salina y/o temperatura. Ácido metacrílico (MAA) y alilamina (AH) muestran respuesta al pH y a la concentración salina, el polímero de N-isopropilacrilamida (NIPAm) presenta respuesta a la temperatura. En esta tesis estudiaremos redes poliméricas compuestas con estos monómeros, en particular se investiga si es posible utilizar sus hidrogeles poliméricos como dispositivos para aplicaciones biomédicas.

En la administración oral de fármacos, los hidrogeles con respuesta de pH se han investigado como vehículos funcionales que pueden encapsular y administrar proteínas, evitando su degradación por el entorno gastrointestinal [39–41]. Esto se ilustra en la figura 1.2B en la que se muestran los cambios de pH que ocurren a lo largo del proceso digestivo, .

En este ámbito, los cambios de pH presentes a lo largo del tracto digestivo, desde un medio ácido en el estómago (pH 1.2-2) hasta uno neutro o moderadamente alcalino en el intestino delgado (pH 7-8), pueden ser aprovechados para controlar la liberación de fármacos. Además, algunos compartimentos celulares involucrados en la captación de fármacos, como los endosomas tempranos, tienen un pH ácido. La diferencia de pH que existe entre la superficie de la piel y el torrente sanguíneo puede ser aprovechada para la administración transdérmica de fármacos utilizando nanogeles con respuesta al pH [42]. Esto se ve esquematizado en la figura 1.2A en la cual se muestra cómo la respuesta a estímulo, pH de los nanogeles funciona como agente liberador de drogas, en este caso por una expansión de la partícula.

El microambiente local alrededor del tejido canceroso puede presentar un pH más

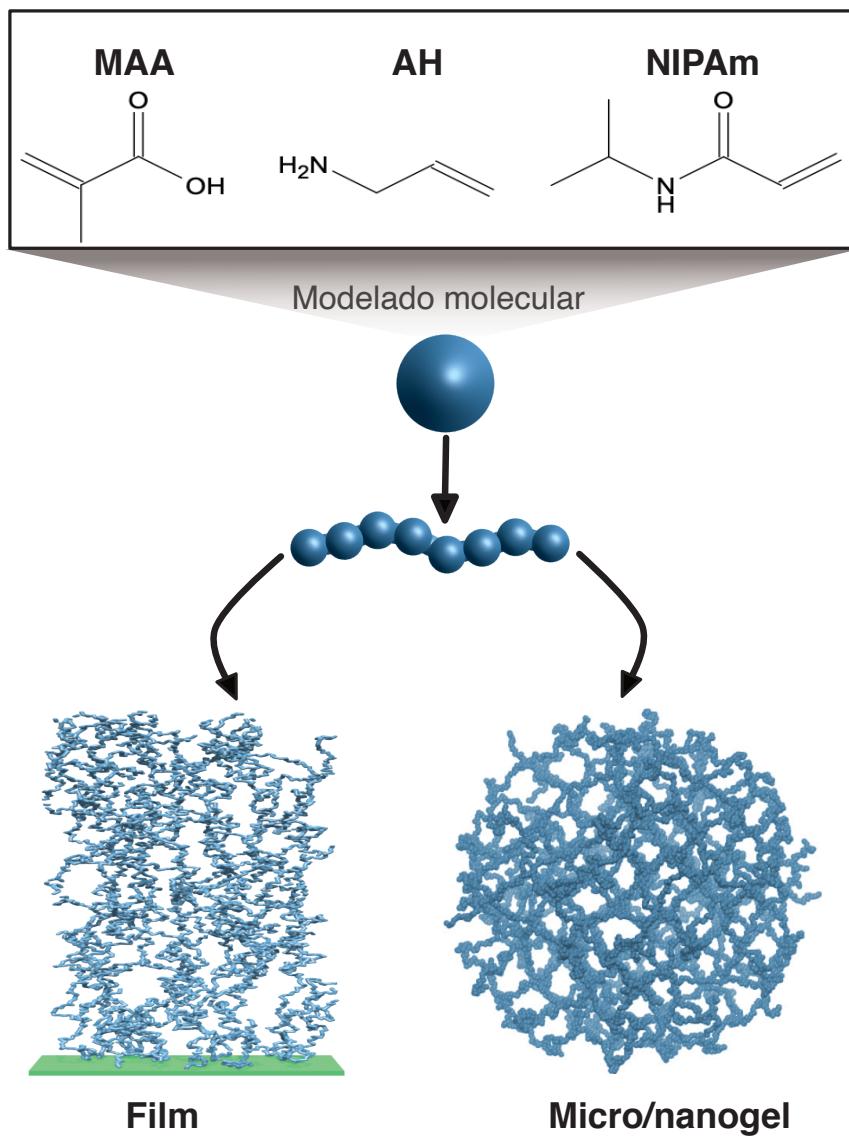


Figura 1.1: Moléculas que conforman los diferentes monómeros de las redes poliméricas que dan respuesta a los hidrogeles. Con respuesta al pH y concentración de sal: alilamina (base), ácido metacrílico y ácido acrílico. con respuesta a la temperatura: N-isopropilacrilamida. Estas moléculas son las utilizadas para los hidrogeles usados en esta tesis. Modelado molecular hace referencia a la construcción de modelos que representen las propiedades moleculares de estos sistemas. En particular se muestra que cada uno de estos monómeros se presenta como una esfera. En cada capítulo se dará detalle de como se da la construcción de esto modelado.

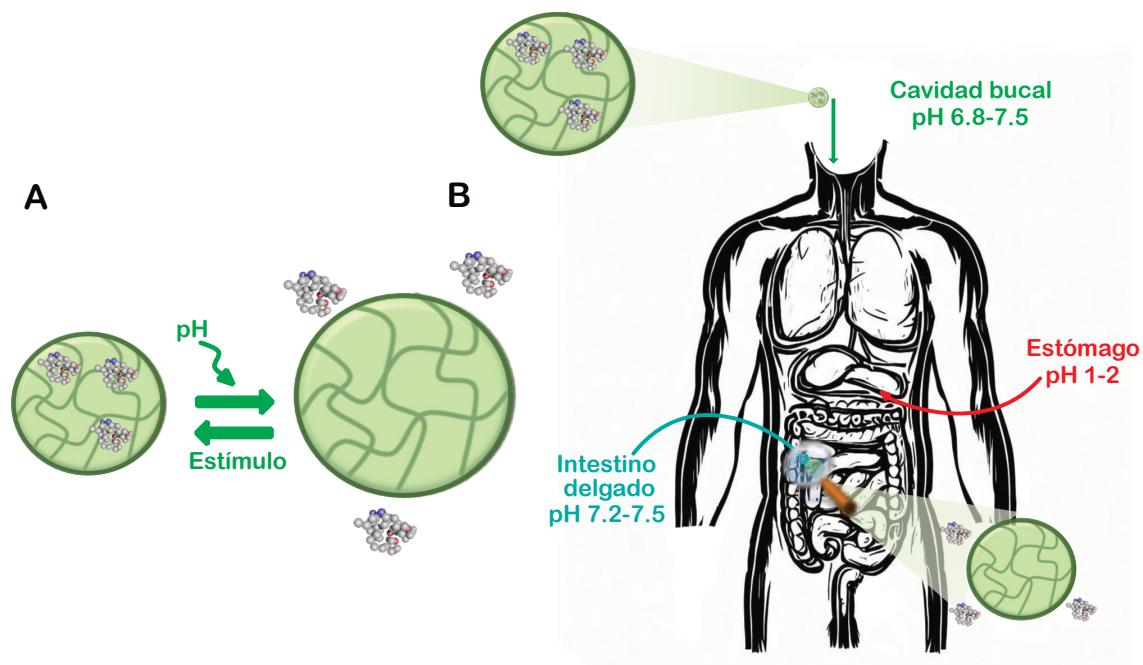


Figura 1.2: Esquema de funcionamiento de nanogeles como transportadores de medicamentos. **A** (izquierda): nanogel cargado con una proteína terapéutica que se libera en respuesta a un estímulo (cambio de pH). **B** (lado derecho): se aprovecha los diferentes pHs que hay en el cuerpo humano para el diseño de nanogeles que liberen drogas terapéuticas en un ambiente específico.

ácido en comparación con las condiciones fisiológicas habituales [43–45], por lo que los nanogeles con respuesta al pH están siendo evaluados para la administración de medicamentos en el tratamiento del cáncer [46, 47]. Por ejemplo, se han utilizado nanogeles de quitina para la administración de doxorubicina en diferentes tipos de cáncer, incluyendo pulmón, mama, hígado y próstata [48].

Por otro lado el polímero termosensible, PNIPAm, al tener una temperatura de transición de volumen cercana a la temperatura corporal, hace que sus hidrogeles despierten un gran interés para aplicaciones biomédicas, como la administración localizada de anestésicos [28, 49]. Es posible diseñar estrategias para controlar la temperatura de transición de los hidrogeles termosensibles, las cuales incluyen la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [50–53]. Este último enfoque produce hidrogeles de respuesta múltiple que son susceptibles, además de a variaciones temperatura, a cambios en el pH y la concentración de sal. En particular se ha demostrado que la temperatura de transición de los microgeles de NIPAm y AA depende del pH de la solución y la concentración de sal [54–57]. Asimismo la temperatura de transición de los microgeles de copolímeros de NIPAm y MAA [58–60] depende de la fracción de monómero ionizable en las cadenas de polímero [54–56, 59, 61–63]. Investigaciones recientes han explorado el uso de microgeles de poli(NIPAm-MAA) en dispositivos para la encapsulación y liberación del fármaco quimioterapéutico doxorrubicina [64–66]. La adición de comonómero ácido en estos microgeles introduce un nuevo mecanismo dependiente del pH para la captura y liberación eficiente de moléculas, haciendo estos sistemas de microgeles multifuncionales especialmente prometedores para el diseño de sistemas avanzados de administración de fármacos [67].

En síntesis, el rango de las potenciales aplicaciones biomédicas de los nanogeles es extenso e incluye desarrollos contra los trastornos neurológicos, las enfermedades cardiovasculares, oftalmológicas, inflamatorias y autoinmunes, así como también avances en el diagnóstico por imágenes, la ingeniería de tejidos, la reconstrucción ósea y el manejo de la diabetes y el dolor. Por ejemplo, los nanogeles de ácido hialurónico están siendo evaluados para inhibir la acumulación de la proteína beta-amiloide en el manejo del Alzheimer [68]. En el tratamiento de la diabetes, se investigan nanogeles sensibles a la glucosa [26] y nuevos métodos de administración de insulina basados

en nanogeles [69].

Estas son algunas razones por las cuales los hidrogeles poliméricos son hoy en día una de las primeras opciones consideradas al diseñar biomateriales con funciones específicas [70, 71]. El estímulo que dispara la respuesta de los hidrogeles puede ser suministrado por un gradiente en la composición fisiológica, ya sea natural o inducido por un estado patológico. La versatilidad de estas partículas difícilmente puede ser alcanzada con otro tipo de materiales incapaces de responder a cambios en las condiciones del medio que pueden ser relativamente moderados. En este sentido uno de los desafíos en la actualidad es aprender a controlar esta respuesta para canalizarla en diferentes aplicaciones. A lo largo de esta tesis se plantea comprender la fisicoquímica, que determina el comportamiento de los hidrogeles poliméricos, en particular films y micro/nanogeles, la cual determina su capacidad de responder a estímulos y como consecuencia su potencialidad para el desarrollo de dispositivos para el encapsulado y liberación de medicamentos.

1.3. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es **desarrollar una descripción comprensiva del comportamiento y respuesta a estímulos de los micro/nanogeles poliméricos mediante el uso de modelos teóricos y computacionales basados en interacciones moleculares**.

Este objetivo nos lleva a determinar si es posible utilizar hidrogeles poliméricos, ya sea en forma de films o micro/nanogeles, como dispositivos inteligentes para el desarrollo de nuevas tecnologías en biomedicina. En particular, el capítulo 2 se dedica al estudio de films de hidrogeles poliméricos compuestos por monómeros de ácido metacrílico, enfocándose en la captura de poliaminas y la administración de drogas terapéuticas, como la doxorubicina. Se analiza cómo interactúan estos films con diversas biomoléculas y/o drogas y cómo responden a cambios en el pH, concentración salina y concentración de adsorbatos, así como los mecanismos subyacentes en la liberación de biomoléculas capturadas. Para abordar estas cuestiones, desarrollamos un método mecano-estadístico que denominamos Teoría Molecular (TM).

En el capítulo 3, se deriva una teoría termodinámica para estudiar el comporta-

miento de microgeles de P(NIPAm-MAA) en respuesta a cambios de pH, concentración de sal y temperatura, se evaluó la actuación de estos microgeles para encapsular y liberar medicamentos en relación a las propiedades del medio. En el capítulo 4 se extiende la TM para investigar cómo la distribución del monómero con respuesta al pH condiciona la adsorción de proteínas terapéuticas en nanogeles de PMAA y PAH. Finalmente, el capítulo 5 aborda cómo los cambios en la concentración de nanogeles de P(NIPAm-MAA) afectan las propiedades de soluciones coloidales, en particular su respuesta al pH, concentración salina y temperatura. Para ello, integramos simulaciones de Monte Carlo con el modelo teórico desarrollado en el capítulo 3.

1.4. Antecedentes metodológicos

Mediante el uso de teoría molecular, se ha logrado estudiar la termodinámica de hidrogeles de cadenas de poliácido entrecruzadas, incluyendo películas delgadas depositadas en superficies [72, 73] y películas de estos mismos films anclados en superficies sólidas [74, 75]. En estos trabajos, Longo et al. [75] ha investigado el rol que cumple los cambios en el pH y la concentración de sal, en el equilibrio ácido/base de poliácidos que componen al film. En otros trabajos se ha aplicado este marco teórico para considerar la adsorción de péptidos y proteínas en nanofilms de hidrogel de cadenas de poliácido entrecruzadas [75–80], observando el trabajo no trivial que tiene el pH al momento de protonar/deprotonar a los distintos adsorbatos.

Las predicciones de esta teoría han demostrado estar en excelente acuerdo cuantitativo con observaciones experimentales para una variedad de sistemas poliméricos [81, 82]. En estos y otros trabajos se ha buscado comprender cómo la adsorción en películas de hidrogel depende del pH y la concentración de sal, tanto en soluciones de proteínas individuales como en mezclas [77, 78, 81]. En este método, la TM, el estado de protonación de los residuos de proteínas y de los segmentos de la red no se asume a priori en función del pH de la solución (el seno o bulk), sino que se predice localmente como resultado de la posición del grupo y su entorno local [34, 81].

1.5. Metodología

Teoría Molecular

En base a los antecedentes metodológicos, los objetivos planteados en la presente tesis se abordaran principalmente con el desarrollo de una teoría molecular con la cual poder describir la termodinámica de los sistemas de interés. Este enfoque teórico nos permite describir el tamaño, la forma, la distribución de carga, el estado de protonación y la conformación de todas las especies moleculares que constituyen al sistema. Para tal fin se usa una descripción molecular de grano grueso de las diferentes especies químicas que componen el sistema.

La TM se deriva al escribir la energía libre del sistema como un funcional de las densidades de las especies en solución, las conformaciones de la red polimérica y el potencial electrostático. La minimización de esta energía respecto a los funcionales del sistema permite describir la termodinámica del sistema. De esta manera, se puede estudiar cómo las variaciones en las condiciones de la solución: la fuerza iónica, el pH, la temperatura, concentración de algún analito de interés, cambian las propiedades termodinámicas.

A lo largo de esta tesis se extiende la TM, en primera instancia, para el estudio de film de hidrogel de políacido para la captura de poliaminas, las cuales, como se demostrará, funcionan como estímulo para la liberación de drogas terapéuticas, en particular la doxorubicina ([capítulo 2](#)). El uso de estos film en este capítulo tuvo la finalidad de comprender los desarrollos teóricos planteados para los sistemas mencionados en los antecedentes metodológicos, [sección 1.4](#). Comprendidas estas primeras bases, fue posible el estudio de la adsorción de proteínas en nanogeles basados en PAH y PMAA, [capítulo 4](#), el cual necesitó de un nuevo desarrollo de teoría molecular. La complejidad de este nuevo estudio requirió el uso de simulaciones por dinámica molecular (DM) para la obtención de las configuraciones de la red polimérica los nanogeles.

Modelo termodinámico dos fases

Se han descrito y aplicado teorías y simulaciones moleculares en varios niveles de resolución para investigar el comportamiento de los hidrogeles poliméricos sensibles a estímulos. Quesada-Pérez et al. [83] han simulado el comportamiento de geles compuestos por polielectrolitos y termosensibles utilizando simulaciones de Monte

Carlo, logrando explicar el comportamiento de hinchamiento de estas partículas. Por otro lado, Ahualli et al. [84] emplearon simulaciones de grano grueso para el modelado de geles polielectrolíticos. Estos trabajos se han centrado principalmente en el hinchamiento y otras propiedades de hidrogeles que tienen una red de polímero permanentemente cargada. Algunos autores han también abordado el efecto de la temperatura y la calidad del solvente [84–88].

Recientemente, estudios mediante simulaciones computacionales han considerado la respuesta al pH de microgeles compuestos de polímeros reguladores de carga [89–93]. Sin embargo, solo unos pocos trabajos teóricos han investigado las propiedades de los microgeles de respuesta múltiple en función de la temperatura, el pH y la concentración de sal [94, 95].

Polotsky et al. [95] basa su teoría en equilibrios osmóticos, teniendo en cuenta explícitamente el equilibrio de ionización dentro de sus microgeles. Estos estudios predicen patrones complejos en la dependencia de las dimensiones de las partículas de microgel, es decir, sus parámetros de control: tamaño y composición.

En el capítulo 3 derivamos una teoría de equilibrio entre dos fases y realizamos una investigación sistemática del comportamiento termodinámico de microgeles compuestos por copolímeros aleatorios de NIPAm y un comonomero ácido, MAA. Este modelo describe la química-física detrás de diversos fenómenos: a saber la expansión del microgel impulsada por el pH, la dependencia del tamaño de partícula en la concentración de sal, y el efecto de los cambios en la temperatura.

La finalidad de esta metodología es obtener las condiciones, dado el pH, temperatura, concentración salina, y tamaño del microgel, que minimizan la energía del sistema. Esto se logra a través de escribir un potencial termodinámico que incluya las diferentes contribuciones que hacen al sistema: entropía de mezcla, energía libre química de las especies protonables, energía asociada a interacciones electrostáticas y del tipo Van der Waals, así como también por las repulsiones estéricas.

Metropolis Monte Carlo

El método de Metropolis Monte Carlo (MCMC) es un método de muestreo estadístico que se utiliza para generar muestras de una distribución de probabilidad desconocida. El método es utilizado en el capítulo 5 para el estudio de soluciones coloidales de nanogeles basados en P(NIPAm-MAA). En cada paso de estas simulaciones un

nanogel de la solución es seleccionado al azar cambiandolo de posición en la solución seguido de una expansión/compresión del mismo. La probabilidad de aceptar o no este paso es mediado por la energía total del paso: energía interna del nanogel y energía de interacción con los demás nanogeles presentes en la solución. La energía interna de estos nanogeles es la energía libre interna obtenida con la metodología del modelo termodinámico de dos fases presentada en el capítulo 3. En este capítulo se desarrolla el estudio de las propiedades coloidales de los soluciones de nanogeles y como se ven afectadas a consecuencia de la composición de la solución, pH, concentración de sal o por la temperatura a la cual se encuentra la misma.

Capítulo 2

Films de hidrogeles poliméricos: Adsorción de poliaminas, encapsulado y liberación de fármacos

2.1. Introducción

Putrescina, espermidina y espermina son poliaminas que tienen dos, tres y cuatro grupos amino respectivamente, y que están presentes en todas las células vivas. Las poliaminas son indispensables para el crecimiento celular y son necesarias en muchos procesos intracelulares e intercelulares. Participan en diversas funciones metabólicas, como la replicación del ADN, la regulación de canales iónicos, la fosforilación de proteínas y la señalización extracelular [5, 96]. Además, las poliaminas interactúan fuertemente con los fosfolípidos de las membranas y, por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en la regulación de las enzimas vinculadas a estas membranas [97].

En el entorno de las células sanas, las poliaminas se encuentran en concentraciones micromolares a unos pocos milimolares [98, 99]. Sin embargo, cerca de las células tumorales, su concentración es relativamente mayor. Numerosos estudios han demostrado que los pacientes con cáncer presentan concentraciones elevadas de poliaminas

tanto en la sangre como en la orina [100]. La producción de putrescina comienza cuando la enzima ornitina decarboxilasa (ODC) la cataliza [5, 7, 101]. Su mayor actividad es la responsable de las concentraciones elevadas de poliaminas [5, 6, 102]. Concentraciones anómalas de poliaminas pueden indicar la presencia de una célula tumoral [103, 104], pero también un exceso de disponibilidad de poliaminas puede aumentar la velocidad a la que los tumores se propagan y metastatizan [5]. Al mismo tiempo, dicho exceso puede inhibir los mecanismos inmunitarios que las células tienen para evitar la propagación del tumor [5, 105]. De hecho, los pacientes con niveles elevados de poliaminas generalmente tienen un pronóstico más desfavorable [5, 106]. Actualmente, existe un gran interés en terapias contra el cáncer que puedan regular/reducir la cantidad de poliaminas en las cercanías de las células tumorales para evitar su propagación [5, 107–109]. En este capítulo, proponemos y exploramos tanto teórica como experimentalmente el concepto de un biomaterial funcional capaz de capturar poliaminas, pero al mismo tiempo utilizar la concentración excesiva de estos marcadores cerca de las células tumorales como un desencadenante para la liberación de un medicamento terapéutico.

Los hidrogeles de cadenas poliméricas entrecruzadas actualmente se consideran para diversas aplicaciones en la investigación biomédica [110]. Por ejemplo, se han explorado biomateriales basados en hidrogeles sensibles al pH como vehículos de administración oral de medicamentos que tienen el potencial de encapsular y transportar un agente terapéutico a través del tracto gastrointestinal, protegiendo la carga del medio ácido del estómago y liberándola en el ambiente neutral del intestino delgado [111–114]. Estos hidrogeles son sensibles a cambios de pH debido a que contienen un número significativo de grupos ácidos débiles. En este contexto, consideraremos un film de hidrogel de ácido poli(metacrilato) (PMAA). Los hidrogeles de PMAA son capaces de responder a diversos estímulos biológicos, incluyendo cambios en el pH fisiológico [47]. Nuestra contribución aborda una pregunta fundamental: ¿Es posible aprovechar las propiedades sensibles al entorno de los hidrogeles de políácido débil en el desarrollo de un biomaterial que pueda incorporar y atrapar poliaminas al mismo tiempo que libera un medicamento terapéutico en respuesta?

La doxorrubicina es una antraciclina que se utiliza comúnmente en la quimioterapia debido a su eficacia en la lucha contra una amplia gama de cánceres, como

carcinomas, sarcomas y cánceres hematológicos [115]. Es uno de los fármacos anti-neoplásicos más potentes y tiene la ventaja experimental de que se puede monitorear mediante fluorescencia y/o absorbancia [116]. Utilizada sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, la doxorrubicina es actualmente el compuesto de su clase con el espectro de actividad más amplio [117]. Además, debido a que tiene carga positiva, la doxorrubicina puede encapsularse en nanogeles aniónicos [114] o inmovilizarse en superficies nanohíbridas cargadas negativamente [118].

El objetivo de este estudio es caracterizar los hidrogeles de PMAA como materiales capaces de capturar poliaminas y liberar simultáneamente doxorrubicina en respuesta. Para lograr este objetivo, aplicamos una teoría molecular desarrollada para investigar la adsorción de poliaminas y doxorrubicina en películas de hidrogel de PMAA desde soluciones. Esta teoría se formula sobre la base de un potencial termodinámico general que tiene en cuenta el costo de energía libre de protonación/desprotonación de unidades titulables, la pérdida entrópica de confinamiento molecular, los grados de libertad conformacionales de la capa polimérica como de los adsorbentes (y sus traslaciones), interacciones electrostáticas y estéricas. Para poder aplicar esta teoría es necesario contar con un modelo molecular que incluya una descripción del tamaño, la forma, la configuración y el estado de carga local de todas las especies químicas presentes en el sistema (espermidina, espermina, putrescina, doxorrubicina y la red de PMAA).

Finalmente, se sintetizaron películas de PMAA y, eligiendo un conjunto de condiciones representativas de toda la colección explorada teóricamente, se llevan a cabo experimentos de adsorción de poliaminas y doxorrubicina y monitoreados por técnicas de UV-Vis. Estos experimentos demuestran la idoneidad del enfoque teórico para explorar nuevos biomateriales y su respuesta en el contexto de aplicaciones relacionadas con el cáncer. En resumen, este capítulo presenta el comportamiento fisico-químico de los hidrogeles desde una perspectiva teórica, lo que permite un estudio sistemático de su respuesta a cambios en el pH, la concentración de sal y poliaminas, y también desde una perspectiva experimental para validar las predicciones de nuestros cálculos.

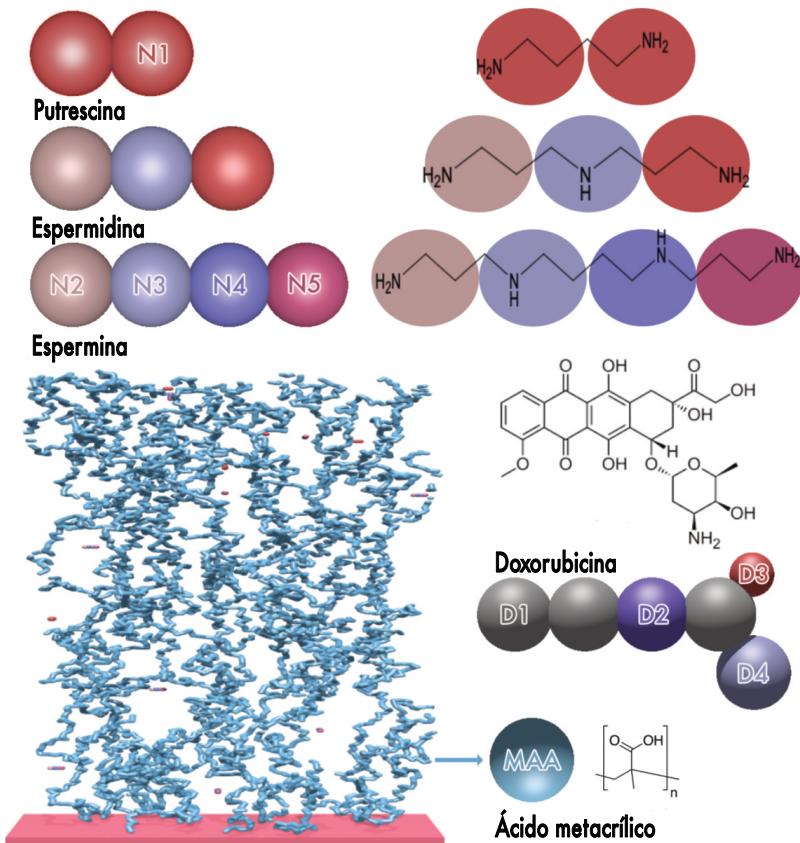


Figura 2.1: Esquema del modelo de film polimérico compuesto por cadenas de MAA. Se muestra además las poliaminas investigadas con su respectivo modelo molecular de grano grueso.

2.2. Metodología

El sistema que estudiamos está esquematizado en la figura 2.1. Consta de una red de PMAA entrecruzado y anclado en una superficie la cual está en equilibrio con una solución que contiene moléculas de agua, iones hidronio e hidróxido, y cloruro de sodio, este último está completamente disociado en iones cloruro y sodio. Además, esta solución contiene tanto doxorubicina como una poliamina o ambas especies. Las poliaminas que hemos considerado son putrescina, espermidina y espermina.

Para estudiar este sistema, aplicamos una teoría molecular que se desarrolló recientemente para investigar la adsorción en films de hidrogel sensibles al pH de mezclas de proteínas [34, 78]. El método empleado aquí es general y se puede extender

a otros ámbitos. Por ejemplo, lo hemos aplicado al estudio de la captura de glifosato en hidrogeles de polialilamina) [1] con fines de remediación ambiental.

A continuación, presentaremos una descripción de la teoría con énfasis en el modelo molecular introducido para describir la doxorubicina, la putrescina, la espermidina y la espermina.

2.3. Teoría Molecular

El método propuesto consiste en minimizar una energía libre generalizada que incluye toda la termodinámica relevante que engloba los procesos del sistema polimérico con una solución. Para tal fin usamos una descripción molecular de grano grueso de las diferentes especies químicas que componen el sistema. Dicha descripción incluye forma, tamaño, distribución de carga y estado de protonación de cada componente molecular. Describiremos la fisicoquímica de un film que se encuentra en equilibrio con una solución acuosa, la cual tiene una composición definida externamente (baño de la solución). Es decir, el pH, la concentración de sal y la concentración de adsorbatos son variables independientes.

2.3.1. Formalismo Teórico

Nuestro film que posee distintos tipos de segmentos: un segmento que sirve como entrecruzante entre las cadenas poliméricas, el cual es considerado electro-neutral, y una unidad sensible al pH: ácido metacrílico. Este film se encuentra en equilibrio con una solución a temperatura, pH y concentración de sal definidas. Además vamos a considerar que en dicha solución hay un adsorbato, denominado *ads*, el cual puede ser la doxorubicina, o alguna de las poliaminas. La generalización del método para incorporar dos o más adsorbatos es relativamente sencilla. Considerando los aspectos anteriores es posible definir la energía libre de Helmholtz:

$$F = -TS_{mez} - TS_{conf,net} + F_{qca,net} + F_{qca,ads} + U_{elec} + U_{ste} + U_{VDW} \quad (2.1)$$

En donde S_{mez} es la entropía de translación (y de mezcla) de las especies libres:

moléculas de agua (H_2O), iones: hidronio (H_3O^+), e hidróxido (OH^-), cationes y aniones de sal y nuestro adsorbato modelo. Aquí, consideramos una sal monovalente, NaCl , la cual está completamente disociada en sus iones cloruro (Cl^-) y sodio (Na^+). $S_{conf,net}$ representa la entropía conformacional que resulta de la flexibilidad de la red polimérica, la cual viene dada por todas las conformaciones diferentes que puede asumir. $F_{qca,net}$, es la energía química libre que describe el equilibrio entre las especies protonadas y desprotonadas de unidades ácidas. Provenientes de las cadenas de PMAA que forman la red polimérica. De manera similar, $F_{qca,ads}$ describe la protonación de residuos titulables del adsorbato. U_{elec} y U_{ste} representan, respectivamente, las energías dadas por las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas. Las interacciones de Van der Waals son representadas en U_{VdW} .

Las expresiones explícitas de la ecuación 2.1 las describimos a continuación.

Como primer término tenemos la entropía de mezcla de las especies móviles, entre ellas consideramos a nuestro adsorbato:

$$-\frac{S_{mez}}{k_B} = A \sum_{\gamma} \int_0^{\infty} dz \rho_{\gamma}(z) (\ln(\rho_{\gamma}(z)v_w) - 1 + \beta\mu_{\gamma}^0) + A \sum_{\theta} \int_0^{\infty} dz \rho_{ads}(\theta, z) (\ln(\rho_{ads}(\theta, z)) - 1 + \beta\mu_{ads}^0) \quad (2.2)$$

en donde $\beta = \frac{1}{k_B T}$, y k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta del sistema. La variable z es la coordenada que mide la distancia a la superficie de soporte de nuestro film, el área total de esta superficies es A . $\rho_{\gamma}(z)$ y μ_{γ}^0 es densidad local, a un z dado, y potencial químico estadar de la especie γ respectivamente. El subíndice γ toma en cuenta la molécula de agua e iones hidronio e hidróxido, iones sodio y cloruro.

El segundo término de la ecuación 2.2 corresponde a la entropía de mezcla del adsorbato. $\rho_{ads}(\theta, z)$ es la densidad local del mismo en la conformación θ . Es decir, θ recorre sobre las configuraciones del adsorbato. Esta conformaciones incluyen rotaciones espaciales de la droga/poliamina. De este modo la densidad local media del adsorbato puede expresarse como:

$$\langle \rho_{ads}(z) \rangle = \sum_{\theta} \rho_{ads}(\theta, z) \quad (2.3)$$

donde la notación $\langle \rangle$ indica promedio de ensamble sobre configuraciones del adsorbato. La entropía conformacional que resulta de la flexibilidad de la red polimérica de nuestro film se representa en:

$$\frac{S_{conf,net}}{k_B} = - \sum_{\alpha} P(\alpha) \ln P(\alpha) \quad (2.4)$$

en donde $P(\alpha)$ denota la probabilidad de que el film se encuentre en la configuración α . Una configuración viene dada por el conjunto de posiciones de cada uno de los segmentos de la red polimérica.

El siguiente término de la ecuación 2.1 describe la energía libre dada por el equilibrio ácido-base de los segmentos de MAA que componen la red.

$$\begin{aligned} \beta F_{qca,net} = A \int_0^{\infty} dz \langle \rho_{MAA}(z) \rangle & [f(z)(\ln f(z) + \beta \mu_{MAA^-}^0) \\ & +(1-f(z))(\ln(1-f(z)) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \end{aligned} \quad (2.5)$$

en donde $f(z)$ es el grado de carga de los segmentos de MAA entre z y $z + dz$. $\mu_{MAA^-}^0$ y μ_{MAAH}^0 son los potenciales químico estandar de las especies desprotonadas y protonadas respectivamente. Además se define:

$$\langle \rho_{MAA}(z) \rangle = \sum_{\alpha} P(\alpha) \rho_{MAA}(\alpha, z) \quad (2.6)$$

donde $\langle \rho_{MAA}(z) \rangle$ es la densidad local de segmentos de MAA en promedio de ensamble. $\rho_{MAA}(\alpha, z)$ es la densidad de estos segmentos cuando el polímero se encuentra en una configuración α . Esta última cantidad es un valor conocido de nuestros cálculos (para cada configuración) que debe ser suplido por un modelo molecular complementario al formalismo teórico.

El equilibrio químico de las unidades titulables del adsorbato es considerado en

el siguiente término de la energía libre:

$$\begin{aligned} \beta F_{qca,ads} = A \int_0^\infty dz \sum_\tau \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle & [g_\tau(z)(\ln g_\tau(z) + \beta \mu_{\tau p}^0) \\ & + (1 - g_\tau(z))(\ln(1 - g_\tau(z)) + \beta \mu_{\tau d}^0)] \end{aligned} \quad (2.7)$$

en donde $\langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle$ representa la densidad local promedio del segmento protonable τ del adsorbato que se define como:

$$\langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle = A \sum_\theta \int_0^\infty dz' \rho_{ads}(\theta, z') n_\tau(\theta, z', z) \quad (2.8)$$

en donde $n_\tau(\theta, z', z)$ es el número de segmentos τ entre z y $z+dz$ cuando el adsorbato se encuentra en la configuración θ y su centro de masa en la posición z' .

La unidad titulable puede estar en estado protonado τp o desprotonado τd , los cuales poseen su potenciales químicos estándar $\mu_{\tau p}^0$ y $\mu_{\tau d}^0$ respectivamente. $g_\tau(z)$ es el grado de protonación de la unidad τ en z . Si $f_\tau(z)$ es el grado de carga local de la unidad, entonces:

1. para unidades ácidas: $g_\tau(z) = 1 - f_\tau(z)$ (las unidades τ se cargan negativamente)
2. para unidades básicas: $g_\tau(z) = f_\tau(z)$ (las unidades τ se cargan positivamente)

La energía electróstatica se define como:

$$\begin{aligned} \beta U_{elec} = A \int_0^\infty dz & \left[\left(\sum_\gamma \rho_\gamma(z) q_\gamma + \sum_\tau f_\tau(z) \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle q_\tau + f(z) \langle \rho_{MAA}(r) \rangle q_{MAA} \right) \beta \psi(z) \right. \\ & \left. - \frac{1}{2} \beta \epsilon (\nabla \psi(z))^2 \right] \end{aligned} \quad (2.9)$$

en donde $\psi(z)$ es el potencial electrostático dependiente de la posición, ϵ es la constante de permitividad del medio, q_γ es la carga correspondiente a la especie móvil

γ , q_τ es la carga que adquieren los segmentos titulables del adsorbato. Finalmente q_{MAA} es la carga que adquiere el segmento de MAA al desprotonarse.

En este contexto, la densidad de carga media es:

$$\langle \rho_q(z) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(z) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(z) \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle q_{\tau} + f(z) \langle \rho_{MAA}(z) \rangle q_{MAA} \quad (2.10)$$

La contribución siguiente en la energía libre viene dada por la repulsión estérica entre todos los segmentos que componen el sistema. Esta contribución se incorpora a través de la siguiente restricción:

$$1 = \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(z) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{ads,\lambda}(z) \rangle v_{\lambda} + \langle \rho_{MAA}(z) \rangle v_{MAA} \right], \quad \forall z \quad (2.11)$$

en donde v_{γ} , v_{λ} y v_{MAA} son los volúmenes moleculares de los segmentos γ de las especies libres, λ en el adsorbato y los segmentos de MAA del polímero respectivamente. $\langle \rho_{ads,\lambda}(z) \rangle$ es definido de la misma forma que en la ecuación 2.8. Cabe destacar que el subíndice λ considera a todos los segmentos del adsorbato, no solo aquellos titulables, es decir $\{\tau\} \in \{\lambda\}$.

La energía proveniente de las interacciones de Van der Waals se expresa en el término U_{VdW} . En este trabajo se ha considerado que todos los segmentos del sistema poseen un carácter hidrofílico. Es decir la interacción entre cada par de segmentos es similar a su interacción con las moléculas de agua. Como resultado la energía de interacción de VdW se considera una constante aditiva a la energía libre, por lo cual puede ser ignorada. En el capítulo 3 mostraremos un ejemplo en donde las interacciones de VdW son tenidas en cuenta y su efecto es considerable .

En este punto la energía libre, ecuación 2.1, se puede escribir como una funcional de la probabilidad de distribución de segmentos de nuestra red polimérica, las densidades locales de cada una de las especies libres, incluidas la densidad de conformaciones de la droga y/o poliamina, los grados de protonación/disociación y el potencial electrostático local. Es decir:

$$F = \sum_{\alpha} \sum_{\theta} \int_0^{\infty} dz f(\alpha, \theta, z) \quad (2.12)$$

en donde:

$$f = f(P(\alpha), \{\rho_{\gamma}(z)\}, \rho_{ads}(\theta, z), \{f_{\tau}(z)\}, f(z), \psi(z)) \quad (2.13)$$

de forma más explícita:

$$\begin{aligned} \beta F = & A \sum_{\gamma} \int_0^{\infty} dz \rho_{\gamma}(z) (\ln(\rho_{\gamma}(z)v_w) - 1 + \beta\mu_{\gamma}^0) \\ & + A \sum_{\theta} \int_0^{\infty} dz \rho_{ads}(\theta, z) (\ln(\rho_{ads}(\theta, z)) - 1 + \beta\mu_{ads}^0) \\ & + \sum_{\alpha} P(\alpha) \ln P(\alpha) \\ & + A \int_0^{\infty} dz \langle \rho_{MAA}(z) \rangle [f(z)(\ln f(z) + \beta\mu_{MAA-}^0) \\ & \quad + (1 - f(z))(\ln(1 - f(z)) + \beta\mu_{MAAH}^0)] \\ & + A \int_0^{\infty} dz \sum_{\tau} \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle [g_{\tau}(z)(\ln g_{\tau}(z) + \beta\mu_{\tau p}^0) \\ & \quad + (1 - g_{\tau}(z))(\ln(1 - g_{\tau}(z)) + \beta\mu_{\tau d}^0)] \\ & + A \int_0^{\infty} dz \left[\left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(z)q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(z) \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle q_{\tau} + f(z) \langle \rho_{MAA}(r) \rangle q_{MAA} \right) \beta\psi(z) \right. \\ & \quad \left. - \frac{1}{2}\beta\epsilon(\nabla\psi(z))^2 \right] \end{aligned} \quad (2.14)$$

El film está en equilibrio con el bulk de la solución. Esta solución posee una composición bien definida (pH, concentración salina y de adsorbatos) además de una temperatura absoluta de trabajo. Lo que implica que el sistema está en contacto con un reservorio de partículas libres, lo cual fija los potenciales químicos de

estas especies. Estos potenciales corresponden a las especies libres pequeñas, μ_γ y del adsorbato, μ_{ads} . Al considerar esta condición de equilibrio químico el potencial termodinámico relevante en el gran potencial:

$$\begin{aligned}\Omega &= F - \sum_\gamma \mu_\gamma N_\gamma - \mu_{ads} N_{ads} \\ &= F - \sum_\gamma A \int_0^\infty dz \mu_\gamma \rho_\gamma(z) - \mu_{ads} N_{ads} \\ &\quad - A \int_0^\infty \mu_{H^+} \left(\sum_\tau \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle g_\tau(z) + (1 - f(z)) \langle \rho_{MAA}(z) \rangle \right)\end{aligned}\tag{2.15}$$

N_γ y N_{ads} son el número total de moléculas de la especie libre γ y adsorbato respectivamente. En la última linea de la expresión, ecuación 2.15, se tiene en cuenta los protones asociados a las especies con segmentos titulables: adsorbato y red polimérica respectivamente.

Se impone una restricción física adicional a nuestro sistema fluido: las condiciones de equilibrio deben satisfacer la condición de incompresibilidad del sistema: ecuación 2.11. Esta restricción se incorpora como:

$$\Phi = \Omega + A \int_0^\infty dz \pi(z) \left[\sum_\gamma \rho_\gamma(z) v_\gamma + \sum_\lambda \langle \rho_{ads,\lambda}(z) \rangle v_\lambda + \langle \rho_{MAA}(z) \rangle v_{MAA} - 1 \right]\tag{2.16}$$

en donde $\pi(z)$ es un multiplicador local de Lagrange. Esta función puede interpretarse como la presión osmótica local. Finalmente, se obtiene un nuevo potencial termodinámico para nuestro sistema, el cual se escribe de forma explícita como:

$$\begin{aligned}
\beta\Phi = & A \sum_{\gamma} \int_0^{\infty} dz \rho_{\gamma}(z) (\ln(\rho_{\gamma}(z)v_w) - 1 + \beta\mu_{\gamma}^0) \\
& + A \sum_{\theta} \int_0^{\infty} dz \rho_{ads}(\theta, z) (\ln(\rho_{ads}(\theta, z)) - 1 + \beta\mu_{ads}^0) \\
& + \sum_{\alpha} P(\alpha) \ln P(\alpha) \\
& + A \int_0^{\infty} dz \langle \rho_{MAA}(z) \rangle [f(z)(\ln f(z) + \beta\mu_{MAA-}^0) \\
& \quad + (1-f(z))(\ln(1-f(z)) + \beta\mu_{MAAH}^0)] \\
& + A \int_0^{\infty} dz \sum_{\tau} \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle [g_{\tau}(z)(\ln g_{\tau}(z) + \beta\mu_{\tau p}^0) \\
& \quad + (1-g_{\tau}(z))(\ln(1-g_{\tau}(z)) + \beta\mu_{\tau d}^0)] \\
& + A \int_0^{\infty} dz \left[\left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(z) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(z) \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle q_{\tau} + f(z) \langle \rho_{MAA}(r) \rangle q_{MAA} \right) \beta\psi(z) \right. \\
& \quad \left. - \frac{1}{2} \beta\epsilon (\nabla\psi(z))^2 \right] \\
& + A \int_0^{\infty} dz \beta\pi(z) \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(z) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{ads,\lambda}(z) \rangle v_{\lambda} + \langle \rho_{MAA}(z) \rangle v_{MAA} - 1 \right] \\
& - \sum_{\gamma} A \int_0^{\infty} dz (\beta\mu_{\gamma}\rho_{\gamma}(z) + \beta\mu_{ads} \langle \rho_{ads}(z) \rangle) \\
& - A \int_0^{\infty} \beta\mu_{H^+} \left(\sum_{\tau} \langle \rho_{ads,\tau}(z) \rangle g_{\tau}(z) + (1-f(z)) \langle \rho_{MAA}(z) \rangle \right)
\end{aligned} \tag{2.17}$$

Obtenida la expresión que define el potencial termodinámico del sistema es necesario encontrar las condiciones en las cuales se minimiza el mismo. Para ello se deriva este potencial respecto a los funcionales que lo componen. A continuación se mostrará la optimización de este gran potencial respecto de los funcionales presentados en ecuación 2.13.

En particular la optimización respecto a la densidad de las especies libres, $\rho_{\gamma}(z)$ resulta en:

$$\frac{\partial \beta \Phi}{\partial \rho_\gamma(z)} = 0 \quad (2.18)$$

Obteniéndose:

$$\rho_\gamma(z)v_w = a_\gamma \exp[-\beta q_\gamma \psi(z)] \exp[-\beta v_\gamma \pi(z)] \quad (2.19)$$

en donde la actividad de la especie γ se define como:

$$a_\gamma = \exp[\beta \mu_\gamma - \beta \mu_\gamma^0] \quad (2.20)$$

En esta expresión se ve la influencia de los potenciales químicos de las especies libres, μ_γ , los cuales deben estar en equilibrio con el bulk de la solución. Las actividades químicas están completamente determinadas por la composición (pH, concentración salina) del seno de la solución.

Luego de su correspondiente optimización el grado de disociación de los segmentos de MAA viene dado por:

$$\frac{f(z)}{1-f(z)} = \frac{K_{a,MAA}^0}{a_{H^+}} \exp[-\beta q_{MAA} \psi(z)] \quad (2.21)$$

en donde la constante termodinámica del equilibrio ácido-base para los segmentos de MAA es:

$$K_{a,MAA}^0 = \exp[-\beta \mu_{MAAH}^0 - \beta \mu_{MAA^-}^0 - \beta \mu_{H^+}^0] \quad (2.22)$$

Del mismo modo para el grado de carga de los segmentos titulables τ , se obtiene:

$$\frac{f_\tau(z)}{1-f_\tau(z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_\tau \psi(z)] \quad (2.23)$$

la constante termodinámica para el equilibrio de los segmentos τ se define:

$$K_{a,\tau}^0 = \exp[-\beta\mu_{\tau p}^0 - \beta\mu_{\tau d}^0 - \beta\mu_{H^+}^0] \quad (2.24)$$

además el exponente, ∓ 1 , en la ecuación 2.23, cambia si se trata de segmentos ácidos ($-$) o básicos ($+$).

Optimizando respecto a la probabilidad de las conformaciones de la red polimérica se obtiene:

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \ln f(z) \right] \\ & \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta q_{MAA} \psi(z) \right] \\ & \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta v_{MAA} \pi(z) \right] \end{aligned} \quad (2.25)$$

en donde:

$$\begin{aligned} Q = & \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \ln f(z) \right] \right\} \\ & + \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta q_{MAA} \psi(z) \right] \right\} \\ & + \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta v_{MAA} \pi(z) \right] \right\} \end{aligned} \quad (2.26)$$

es la constante con la cual se tiene en cuenta que la sumatoria de las probabilidades de cada conformación de la red polimérica sea 1:

$$\sum_{\alpha} P(\alpha) = 1 \quad (2.27)$$

Para la densidad local del adsorbato en una conformación θ se deriva la siguiente expresión:

$$\rho_{ads}(\theta, z) v_w = \tilde{a}_{ads} \prod_{\tau} \exp \left[-A \int_0^{\infty} dz' n_{\tau}(\theta, z, z') \ln f_{\tau}(z') \right] \\ \prod_{\lambda} \exp \left[-A \int_0^{\infty} dz' n_{\lambda}(\theta, z, z') [v_{\lambda} \beta \pi(z') + \beta q_{\lambda} \psi(z')] \right] \quad (2.28)$$

En esta expresión se ha redefinido el potencial químico estándar del adsorbato:

$$\tilde{a}_{ads}^0 = \exp[\beta \mu_{ads} - \beta \tilde{\mu}_{ads}^0] \quad (2.29)$$

en donde se hace la distinción si los segmentos son de naturaleza ácida τ, a o básica τ, b :

$$\beta \tilde{\mu}_{ads}^0 = \beta \mu_{ads}^0 + \sum_{\tau, a} C_{n, \tau} \beta \mu_{\tau d}^0 + \sum_{\tau, b} C_{n, \tau} \beta (\mu_{H^+} - \mu_{\tau p}^0) \quad (2.30)$$

se define el número de composición, $C_{n, j}$, para un segmento j :

$$C_{n, j} = A \int_0^{\infty} dz n_j(\theta, z', z), \forall z' \quad (2.31)$$

La variación del gran potencial respecto del potencial electrostático que da origen a la ecuación de Poisson:

$$\epsilon \nabla^2 \Psi(z) = - \langle \rho_q(z) \rangle \quad (2.32)$$

En esta expresión podemos observar el acoplamiento local entre las interacciones físicas, la organización molecular, los grados de libertad, conformaciones y equilibrios químicos. Para ello hay que tener en cuenta la densidad de carga definida en ecuación 2.10

Para la resolución de nuestro sistema, es decir que el mismo se encuentre en equilibrio, se han impuesto ciertas restricciones, como la incompresibilidad y equilibrio

de potenciales químicos ecuaciones 2.11 y 2.15 respectivamente. Otra restricción que se impone es la electro-neutralidad global del sistema. Es decir:

$$\int_0^\infty dz \langle \rho_q(z) \rangle = 0 \quad (2.33)$$

Esta restricción se satisface en la solución a la ecuación de Poisson al considerar las condiciones de contorno adecuadas, las cuales definimos:

$$\begin{aligned} i) & \lim_{z \rightarrow \infty} \psi(z) = 0 \\ ii) & \left. \frac{d\psi(z)}{dz} \right|_{z=0} = 0 \end{aligned} \quad (2.34)$$

Estas condiciones significan que el potencial electrostático se desvanece a medida que nos alejamos de nuestro film polimérico.

En este punto hemos mostrados las expresiones que optimizan a nuestro gran potencial, y cómo cada uno de estas funciones: $P(\alpha)$, $\rho_\gamma(z)$, $\rho_{ads}(z)$, $f_\tau(z)$, $f(z)$, $\psi(z)$ a su vez terminan siendo definidos por dos potenciales locales: Electrostático $\psi(z)$ y Presión osmótica $\pi(z)$, las actividades de las especies libres y algunas otras cantidades, que son variables conocidas del sistema. Con las condiciones del baño de la solución: concentración de sal, el pH, y concentración de adsorbato es posible calcular las actividades de todas las especies libres considerando las incompresibilidad del sistema y su eletro-neutralidad, así como también la auto-disociación del agua. Las variables conocidas del sistema incluyen el volumen molecular y carga de cada una de las especies libres presentes, las constantes de disociación de los segmentos titulables, así como también la distribución espacial de todos los segmentos para cada una de las conformaciones que tome el film y/o adsorbatos. Todas estas cantidades son provistas por un modelo molecular. Este modelo molecular será descrito más adelante en la sección 2.3.3.

Con esas consideraciones vemos que nuestras funciones desconocidas son $\psi(z)$ y $\pi(z)$ las cuales pueden ser determinadas por sustitución en la diferentes ecuaciones en las que interactúan: la densidad de las especies libres ecuación 2.19, los grados de

disociación de los segmentos del film y de los titulables del adsorbato ecuaciones (2.21 y 2.23) respectivamente, la probabilidad de las conformaciones de la red polimérica ecuación 2.25 y la densidad local del adsorbato (ecuación 2.28).

Una vez obtenidos los potenciales $\pi(z)$ y $\psi(z)$ es posible derivar cualquier cantidad termodinámica de interés a partir de la energía libre o haciendo uso de alguna expresión explícita en base a las funciones definidas anteriormente.

Por ejemplificar la fracción de volumen local ocupada por un adsorbato puede ser calculada como:

$$\langle \phi_{ads}(z) \rangle = A \int_0^{\infty} dz' \sum_{\theta} \rho_{ads}(\theta, z') \sum_{\lambda} n_{\lambda}(\theta, z', z) v_{\lambda} \quad (2.35)$$

Con esta cantidad es posible cuantificar la adsorción del adsorbato en el film.

2.3.2. Solución Bulk

Como mencionamos en la sección anterior, el sistema de estudio está en equilibrio con un reservorio de pH, temperatura y concentración de las especies libres (incluido el adsorbato). La composición de la solución bulk nos proporciona la información de las actividades de las especies móviles, y con ellas sus potenciales químicos.

El potencial termodinámico que describe a la solución bulk puede expresarse de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 \beta \frac{\Phi^b}{V} = & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b (\ln (\rho_{\gamma}^b v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
 & + \sum_{\theta} \rho_{ads}^b(\theta) (\ln (\rho_{ads}^b(\theta)) - 1 + \beta \mu_{ads}^0) \\
 & + \sum_{\tau} \langle \rho_{ads,\tau}^b \rangle [g_{\tau}^b (\ln g_{\tau}^b + \beta \mu_{\tau p}^0) + (1 - g_{\tau}^b) (\ln (1 - g_{\tau}^b) + \beta \mu_{\tau d}^0)] \\
 & + \left[\left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}^b \langle \rho_{ads,\tau}^b \rangle q_{\tau} \right) \beta \psi^b \right] \\
 & + \beta \pi^b \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{ads,\lambda}^b \rangle v_{\lambda} - 1 \right] \\
 & - \sum_{\gamma} (\beta \mu_{\gamma} \rho_{\gamma}^b + \beta \mu_{ads} \langle \rho_{ads}^b \rangle) - \beta \mu_{H^+} \left(\sum_{\tau} \langle \rho_{ads,\tau}^b \rangle g_{\tau} \right)
 \end{aligned} \tag{2.36}$$

en donde el superíndice b denota el Bulk de la solución. Las densidades de cada una de las especies libres es obtenida del límite $z \rightarrow \infty$:

$$\begin{aligned}
 i) \rho_{\gamma}^b &= \rho_{\gamma}(z \rightarrow \infty) \\
 i) \rho_{ads}^b &= \rho_{ads}(z \rightarrow \infty) \\
 ii) \pi^b &= \pi(z \rightarrow \infty) \\
 iii) g_{\tau}^b &= g_{\tau}(z \rightarrow \infty)
 \end{aligned} \tag{2.37}$$

Además el promedio de ensamble de la densidad del adsorbato definido en la ecuación 2.3 se convierte en:

$$\langle \rho_{ads}^b \rangle = \sum_{\theta} \rho_{ads}^b(\theta) \tag{2.38}$$

en consecuencia para las especies libres γ resulta:

$$\rho_{\gamma}^b v_w = a_{\gamma} \exp [-\beta q_{\gamma} \psi^b - \beta \pi^b v_{\gamma}] \tag{2.39}$$

El grado de disociación de los segmentos τ titulables del adsorbato:

$$\frac{f_\tau^b}{1 - f_\tau^b} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_\tau \psi^b] \quad (2.40)$$

finalmente para la densidad del adsorbato se obtiene:

$$\rho_{ads}(\theta) v_w = \tilde{a}_{ads} \prod_\tau \exp [-Cn_\tau \ln f_\tau^b] \prod_\lambda \exp [-cn_\lambda (v_\lambda \beta \pi^b + q_\lambda \psi^b)] \quad (2.41)$$

en donde \tilde{a}_{ads} y $C_{n,\tau}$ (y $C_{n,\lambda}$) son definidos en las ecuaciones 2.29 y 2.31 respectivamente.

Podemos observar nuevamente que estas cantidades quedan en función de la presión osmótica π^b y el potencial electrostático ψ^b del bulk.

Sin embargo si consideramos las condiciones de contorno dada en la ecuación 2.34 para la ecuación de Poisson, vemos que en la solución bulk se debe cumplir: $\psi^b = 0$.

Finalmente para nuestro baño de solución las incógnitas a resolver son la presión osmótica, π^b , y la electro-neutralidad del medio.

$$\sum_\gamma \rho_\gamma^b q_\gamma + \sum_\tau f_\tau(z) (\rho_{ads,\tau}^b) q_\tau = 0 \quad (2.42)$$

Las cuales es posible obtenerlas por resolución numérica al sustituir las ecuaciones 2.39 y 2.41 y sus respectivas actividades (ecuaciones 2.44 y 2.45) en la ecuación 2.42 y la condición de incompresibilidad del bulk de la solución dada por:

$$\sum_\gamma \rho_\gamma^b v_\gamma + \sum_\lambda \langle \rho_{ads,\lambda}^b \rangle v_\lambda = 1 \quad (2.43)$$

Como se mencionó al inicio de esta sección la resolución del bulk de la solución, en concreto el cálculo de π^b , nos provee la información para las actividades de las especies móviles:

$$a_\gamma = \frac{\rho_\gamma^b v_w}{\exp [-\beta \pi^b v_\gamma]} \quad (2.44)$$

y para el adsorbato:

$$\tilde{a}_{ads} = \rho_{ads}(\theta) v_w \exp [cn_\tau \ln f_\tau^b] \exp [cn_\lambda(v_\lambda \beta \pi^b)] \quad (2.45)$$

Hay que tener en cuenta que las densidades en el bulk de la solución son parámetros de entrada en cada cálculo. Una vez que se establecen el pH, la concentración de sal y de nuestra droga y/o poliamina, estas densidades pueden ser determinadas (usando la electro-neutralidad de la solución del bulk y la auto-disociación de equilibrio del agua).

2.3.3. Modelo molecular

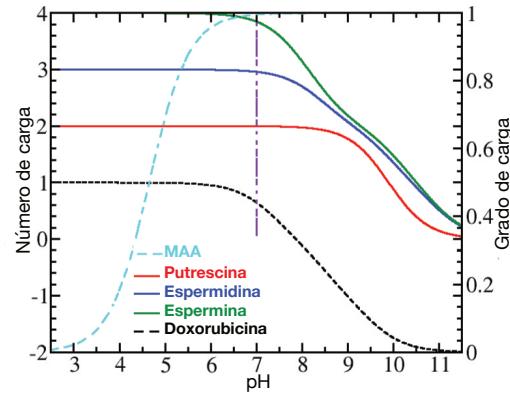


Figura 2.2: Número promedio de carga neta de la doxorrubícina y las poliaminas en función del pH en soluciones diluidas. El eje derecho muestra el grado de carga de una unidad de ácido metacrílico aislado. La línea vertical punteada indica el pH fisiológico.

Este formalismo teórico requiere una representación molecular de todas las especies químicas en el sistema. La figura 2.1 incluye el esquema de grano grueso utilizado

para el MAA y las especies en solución. Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) se representan utilizando sus diferentes grupos amino (N1 a N5). El modelo de doxorubicina incluye los anillos (D1, D2 y D4) así como el grupo carboxílico (D3). El volumen, pKa y carga de estos grupos, al igual que los de las moléculas de agua e iones, se presentan en la tabla 2.1. Las geometrías moleculares, así como los valores de pKa asignados a las diferentes unidades de grano grueso, se han obtenido de la literatura [6–8].

La red polimérica está compuesta por cadenas entrecruzadas de 50 segmentos de longitud; cada segmento de cadena es una representación de grano grueso de una unidad de MAA (ver la figura 2.1). Esta red tiene una topología similar a la de un diamante, con las unidades de entrecruzamiento con una coordinación igual a cuatro [92, 119–121]. Las conformaciones de la red se generan mediante simulaciones de dinámica molecular. El set de configuraciones fueron obtenidas de un trabajo anterior, realizado en el mismo grupo de investigación. Como puede verse en la referencia [78].

Con el esquema de pKa descrito anteriormente, la figura 2.2 muestra la carga eléctrica promedio de cada poliamina y la de la doxorubicina. El gráfico también muestra el grado de carga de un monómero de MAA aislado en una solución diluida. La fuerza impulsora para la adsorción, de nuestros adsorbatos en el film, son las atracciones electrostáticas entre la poliamina/droga y el MAA. La carga positiva de todos los adsorbatos disminuye con el aumento del pH. El polímero incrementa su carga eléctrica negativa a medida que aumenta el pH. Por lo tanto, esperamos que la adsorción sea una función no monotónica del pH de la solución. Además, el punto isoeléctrico de la doxorubicina se encuentra alrededor del pH neutro, lo que implica que el fármaco es neutro en cuanto a carga en condiciones fisiológicas y tiene carga negativa a valores de pH más altos.

2.4. Validación experimental

Con el fin de respaldar la teoría y el modelado molecular, se prepararon films de hidrogel poliméricos de PMAA y se llevaron a cabo experimentos de carga y liberación de doxorubicina en presencia de espermina y espermidina. Los resultados

CG unit	<i>pKa</i>	<i>q</i>	<i>v</i> (nm ³)
<i>N</i> ₁	9.9	(+1)	0.051
<i>N</i> ₂	10.9	(+1)	0.051
<i>N</i> ₃	8.4	(+1)	0.063
<i>N</i> ₄	7.9	(+1)	0.063
<i>N</i> ₅	10.1	(+1)	0.051
<i>D</i> ₁	-	0	0.085
<i>D</i> ₂	7.34	(-1)	0.085
<i>D</i> ₃	8.46	(-1)	0.035
<i>D</i> ₄	9.46	(+1)	0.085
<i>MAA</i>	4.65	(-1)	0.065
<i>H</i> ₂ <i>O</i>	-	0	0.03
<i>H</i> ₃ <i>O</i> ⁺	-	+1	0.03
<i>OH</i> ⁻	-	-1	0.03
<i>Na</i> ⁺	-	+1	0.033
<i>Cl</i> ⁻	-	-1	0.033

Cuadro 2.1: Modelo de grano grueso. Los valores de pKa asignados a las diferentes unidades de grano grueso se obtuvieron todos de la literatura [6–8], y los volúmenes moleculares corresponden a los valores de Van der Waals. Valores entre paréntesis () indican la carga de las especies químicas ionizadas.

aquí presentados se realizaron en colaboración con el grupo de investigación.

2.4.1. Crecimiento controlado de películas delgadas de PMAA.

Los films de PMAA se obtuvieron mediante la técnica de Polimerización Radical por Transferencia de Átomo (ATRP por sus siglas en inglés), que permite la polimerización iniciada en la superficie. La síntesis completa de la película de PMAA consta de tres pasos principales, como se representa en la figura 2.3. Estos pasos son los siguientes: 1) Inmovilización del iniciador de ATRP en los sustratos (portaobjetos de vidrio y obleas de silicio de un solo pulido). 2) Procedimiento de ATRP utilizando ter-butil metacrilato (t-BMA) y N,N'-Metilenbisacrilamida (BIS) como agente de entrecruzante 3) Hidrólisis de los films resultantes de ter-butil metacrilato entrecruzado con ácido trifluoroacético para obtener las películas de PMAA.

1) *Inmovilización del iniciador de ATRP en los sustratos.* Después de limpiar con agua jabonosa, etanol y acetona en un baño ultrasónico, los portaobjetos de vidrio

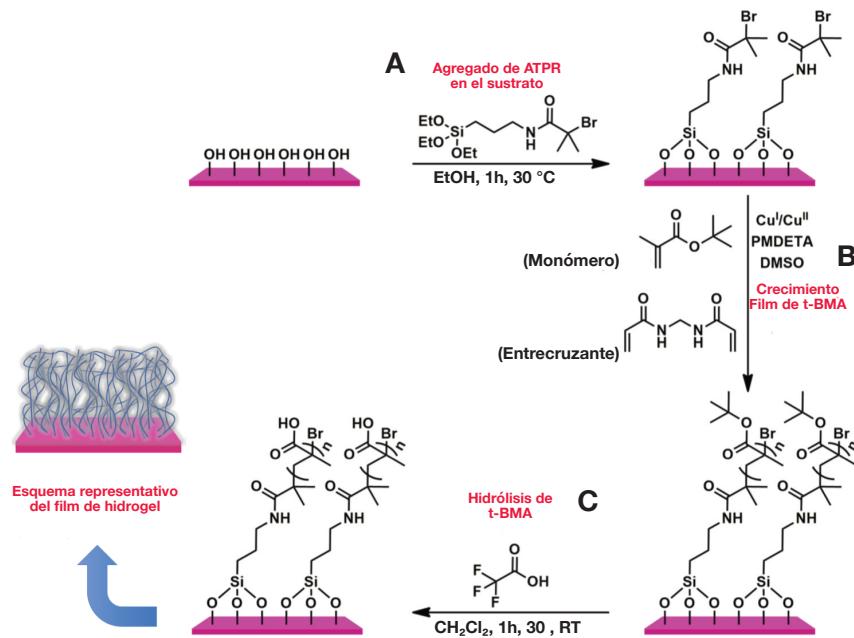


Figura 2.3: Pasos de la síntesis de la película delgada de PMAA, representados como: A) Iniciador ATRP en sustratos; B) Crecimiento de la película de t-BMA; C) Hidrólisis del t-BMA.

y las obleas de silicio se modificaron mediante inmersión en una solución al 2% v/v de 2-bromo-2-metil-N-(3-(tri-etoxisilil)propil)propenamida (preparada según lo informado previamente en la referencia [122]) en etanol seco durante 1 hora a 30°C. Luego, los sustratos se lavaron con etanol y se curaron durante 2 horas en un horno 60°C bajo vacío. El ángulo de contacto medido (goniómetro de ángulo de contacto Ram-Hart modelo 290) utilizando agua fue de alrededor de $63.6^\circ \pm 0.1^\circ$ sin cambios con el tiempo, ligeramente menor que el del portaobjetos de vidrio ($64.7^\circ \pm 0.2^\circ$).

2) *Crecimiento de la película de ter-butil metacrilato.* Las polimerizaciones de ATRP se llevaron a cabo de acuerdo con la referencia [123]. Se preparó una solución de t-BMA (15 ml, 92 mmol, Aldrich 98 %), BIS (422 mg, 2.76 mmol, Aldrich 99 %), CuBr₂ (4.1 mg, 0.018 mmol, Aldrich 99.999 %), y N,N,N,N,N-Pentametildietilentriamina (PMDETA, 0.12 ml, 0.55 mmol, Aldrich, 99 %) disuelta en DMSO (15 ml) y se desgasificó mediante burbujeo de N₂ durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se agregó CuBr (26.5 mg, 0.18 mmol, Aldrich 99.999 %) y la mezcla se dejó bajo N₂ durante 15 minutos. Simultáneamente, los sustratos con iniciador se sellaron en

tubos Schlenk y se desgasificaron mediante ciclos de vacío/N₂. Luego, la mezcla de reacción se inyectó en estos tubos Schlenk para cubrir completamente las muestras. La mezcla se dejó reposar durante 24 horas bajo N₂, y luego se retiraron los sustratos y se lavaron con DMSO, acetona y se secaron con N₂. El ángulo de contacto medido fue de 89.3°± 0.1° sin cambios con el tiempo.

3) *Hidrólisis del ter-butil metacrilato entrecruzado obtenido.* Las películas entrecruzadas de PtBMA se sumergieron en una solución de ácido trifluoroacético (Aldrich 99 %) en CH₂Cl₂ (50 % v/v) durante una hora a temperatura ambiente. Luego, los sustratos se lavaron varias veces con agua y se dejaron sumergidos en agua durante 10 minutos antes de secarlos con N₂. El ángulo de contacto medido utilizando agua disminuyó con el tiempo, desde un valor inicial de alrededor de 69° hasta 63°; este comportamiento indica una exitosa hidrólisis de la película de PtBMA en una película de PMAA más hidrofílica, exponiendo grupos carboxílicos, que se hinchan/hidratan con el tiempo.

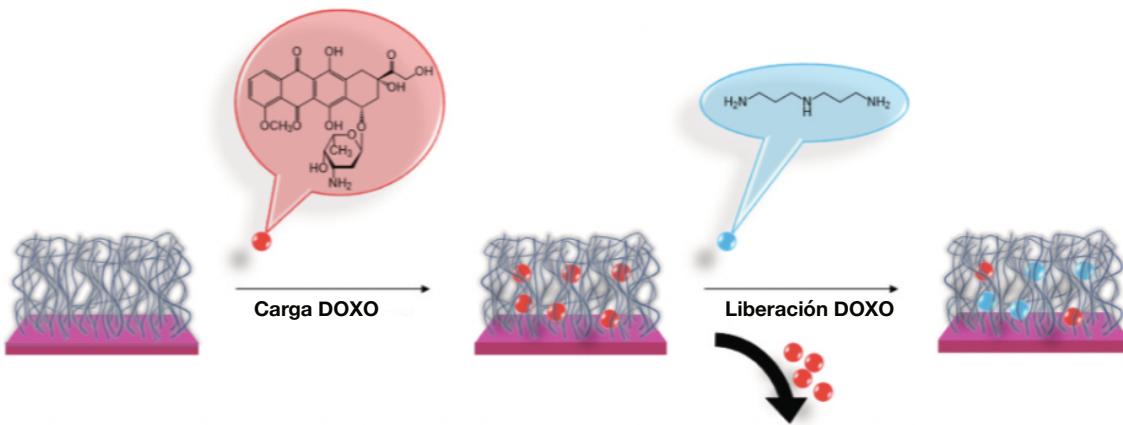


Figura 2.4: Esquema que muestra la carga de doxorrubicina en el film de hidrogel de PMAA y su liberación en presencia de espermidina.

2.4.2. Captura y liberación de doxorrubicina en presencia de poliaminas

La carga de doxorrubicina (Doxo, Aldrich 98.0-102.0 % en clorhidrato de doxorrubicina) se realizó sumergiendo las películas de PMAA en una solución de la droga al

10^{-2} M en agua ultrapura *Milli-Q* ($18,2 M\Omega cm$) durante 24 horas en el refrigerador (ver figura 2.4). Se utilizaron las bandas de absorción de Doxo en el rango de 450-550 nm para caracterizar su carga en el film utilizando un espectrofotómetro Lambda 35 de Perkin Elmer. Para ello, después de la carga, los sustratos se sumergieron durante unos segundos en agua ultrapura para eliminar las moléculas adheridas a la superficie y se secaron con un flujo de N_2 . Finalmente, los sustratos se colocaron verticalmente en el camino óptico del espectrofotómetro y se realizaron los análisis, abarcando el rango de 200-800 nm, con una velocidad de escaneo de 480 nm/min y un ancho de ranura de 1 nm.

La liberación se realizó sumergiendo los sustratos cargados en agua o en soluciones de espermidina (Aldrich > 99 %) o espermina (Aldrich > 97 %), cada una al 2.8 % en peso/volumen (ver figura 2.4) en diferentes momentos. La liberación se siguió de la misma manera que la carga. Estas soluciones de poliaminas se neutralizaron con hidróxido de sodio al 0.1 M, lo que aumentó la fuerza iónica desde el agua pura y llevó a un pH final de 7. Todos los experimentos se realizaron utilizando agua ultrapura *Milli-Q*. La concentración de poliamina se eligió para explorar un régimen de saturación, equivalente al extremo de la región explorada en las predicciones teóricas (ver en secciones siguientes). De esta manera, se pueden comparar cualitativamente las cantidades de carga de amina equivalentes.

2.5. Resultados

2.5.1. Resultados teóricos

La primera pregunta que abordamos es cómo responden los hidrogeles de PMAA a las soluciones de poliaminas. El enfoque termodinámico permite considerar la adsorción dentro de la red polimérica a partir de soluciones que contienen estas aminas. Definimos la adsorción como:

$$\Gamma_{ads} = \int_0^{\infty} (\rho_{ads}(z) - \rho_{ads}^{bulk}) dz \quad (2.46)$$

Donde la coordenada z mide la distancia desde la superficie que sostiene al film,

y el subíndice ads se refiere al adsorbato de interés. La función local $\rho_{ads}(z)$ es la densidad del adsorbato, y $\rho_{ads}^b = \lim_{z \rightarrow \infty} \rho_{ads}(z)$ es la densidad en la solución bulk, lejos del film de hidrogel.

Esta definición de Γ cuantifica la masa de moléculas adsorbidas por unidad de área en exceso de la contribución impuesta por la solución bulk en equilibrio con el film.

La expresión dada por la ecuación 2.46 describe la adsorción de cada una de las aminas, pero también es válida para la doxorrubicina.

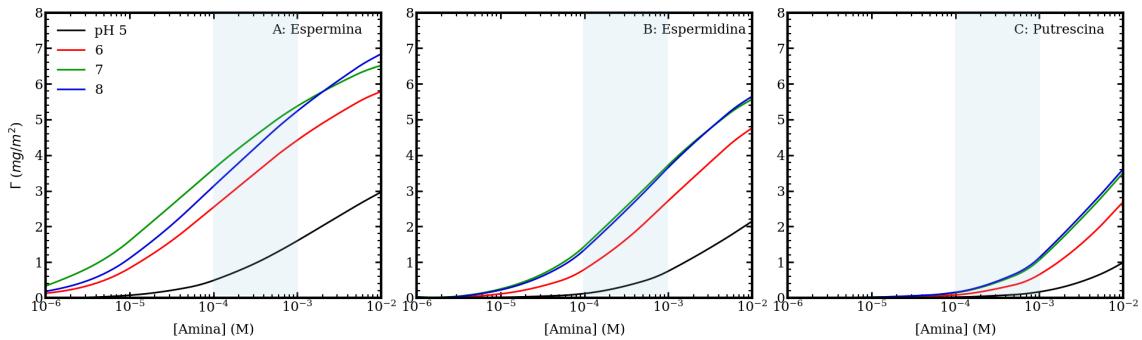


Figura 2.5: Gráfico de la adsorción, Γ , de espermina (A), espermidina (B) y putrescina (C) en función de su concentración en la solución bulk. Las diversas curvas en cada panel corresponden a diferentes valores de pH (alrededor de 7) y condiciones de sal fisiológica, $[NaCl] = 100$ mM. Las regiones sombreadas indican el rango de concentraciones saludables de poliaminas [5]. No hay doxorrubicina en estas soluciones.

La figura 2.5 muestra las isotermas de adsorción para cada una de las poliaminas en función de su concentración en la solución en el bulk. Debido a que existen informes que indican que los alrededores de las células tumorales son ácidos [44, 124–128], se incluyen isotermas de adsorción para diferentes valores de pH. Enfatizamos que el primer objetivo es investigar la capacidad de los hidrogeles de PMAA para secuestrar poliaminas en condiciones fisiológicas; luego, los resultados de la figura 2.5 corresponden a soluciones en ausencia de doxorrubicina y con 100 mM de $[NaCl]$. La adsorción aumenta con la concentración creciente de poliaminas.

En la cercanía de las células sanas, la concentración de poliaminas se encuentra en el rango de 10^{-4} a 10^{-3} M, lo que puede aumentar en un orden de magnitud más alrededor de los tumores [5]. Los resultados de la figura 2.5 sugieren que los hidrogeles de PMAA pueden responder a estas condiciones capturando cantidades crecientes

de aminas. En particular, la putrescina muestra un comportamiento aparentemente de encendido/apagado en torno a la transición entre las concentraciones saludables a patológicas. No hay adsorción apreciable hasta concentraciones por arriba de 10^{-3} M. Además, excepto para las soluciones más ácidas (pH 5), este comportamiento de adsorción se mantiene para diferentes valores de pH en torno a las condiciones fisiológicas, lo que señala la capacidad del hidrogel para adaptarse a pequeños cambios de pH causados por células dañadas.

Las poliaminas adsorbidas se distribuyen de manera más o menos homogénea dentro de la película de hidrogel. Sin embargo, esta distribución está correlacionada con la densidad del polímero: se encuentran concentraciones más altas de poliamina en las regiones de fracción de volumen localmente alta de PMAA. Por lo tanto, las poliaminas tienen una mayor probabilidad de encontrarse cerca de las intersecciones de la red, donde ocurre la mayor densidad de polímero. Un comportamiento similar ha sido predicho por Sai et al. [129] mediante simulaciones de dinámica molecular, quienes sugirieron que los anfífilos de cromóforos se autoensamblan en los nodos de hidrogeles polielectrolíticos entrecruzados químicamente.

En condiciones similares, el hidrogel adsorbe más espermina que espermidina y putrescina (compare los paneles A, B y C de la fig. 2.5, respectivamente), lo que se puede explicar sobre la base de la carga positiva neta de las poliaminas: cuanto más cargada se encuentre la amina, más se adsorberá en el film porque una carga positiva más alta reduce el costo entrópico de la confinación del contraión al tiempo que permite las atracciones electrostáticas con el polímero de MAA.

Schimka et al. [130] han estudiado la interacción entre microgeles de polímero y surfactantes fotosensibles con poliaminas sintéticas como grupos principales. Estos surfactantes tienen diferentes números de grupos amino con cargas entre +1 y +3. Los microgeles aniónicos se deshinchan cuando se exponen a una concentración suficientemente alta de surfactante (dependiendo del estado de isomerización del surfactante). Su estudio muestra tanto experimental como teóricamente que se necesita una mayor concentración de surfactante para desencadenar el deshinchamiento de los microgeles cuando se reduce la carga del grupo principal de poliamina. Este comportamiento indica que aumentar el número de grupos amino facilita la captación del surfactante por parte del microgel, en acuerdo con los resultados aquí presentados.

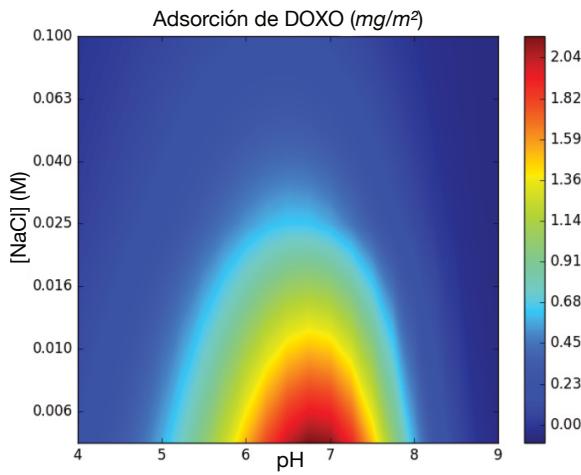


Figura 2.6: Mapa de color que muestra la adsorción de la doxorrubiciна (ver ecuación 2.46) en función de la composición de la solución, es decir, el pH y $[\text{NaCl}]$; la concentración del fármaco en la solución es $[\text{Doxo}] = 1 \text{ mM}$.

A continuación, consideramos la capacidad de las películas de hidrogel de PMAA para incorporar doxorrubiciна (Doxo). Los hidrogeles de cadenas de poliácido entrecruzadas son sensibles a cambios en la fuerza iónica de la solución o la concentración de sal [131]. Este comportamiento puede no ser relevante en entornos biológicos con una concentración de iones altamente regulada. Sin embargo, controlar la concentración de sal es fundamental en el laboratorio para aumentar la carga del agente terapéutico dentro del material. Por lo tanto, hemos considerado la adsorción de doxorrubiciна en condiciones de laboratorio típicas, abarcando un amplio rango de pH y $[\text{NaCl}]$.

La figura 2.6 muestra la adsorción en exceso de Doxo, calculada utilizando la ecuación 2.46. Esta figura resalta el efecto de la disminución de la salinidad para aumentar la adsorción del fármaco. Debido a que la carga de la doxorrubiciна es +1 (a bajo pH), su adsorción compite con la de los iones de sodio para neutralizar la carga del polímero. Por lo tanto, las mejores condiciones para su incorporación en la película corresponden a la reducción de la disponibilidad de iones de sal.

En nuestro modelo, la doxorrubiciна tiene su punto isoeléctrico (pI) a pH 7.8. Se puede observar que en la figura 2.6 se muestra que las condiciones óptimas para la adsorción impulsada electrostáticamente ocurren en valores de pH cercanos al pI.

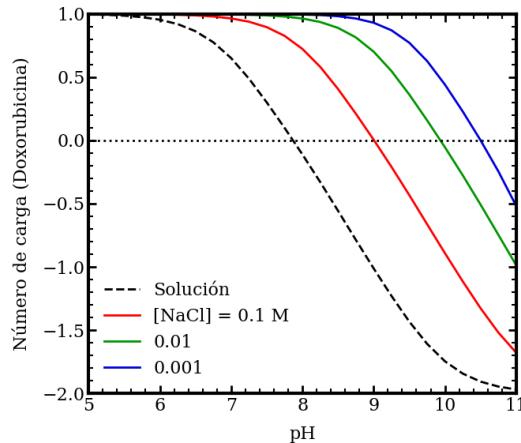


Figura 2.7: Gráfico que muestra el número de carga de la doxorrubicina dentro de la red de PMAA en función del pH, para diferentes concentraciones de sal (líneas sólidas), así como la carga promedio de la molécula en la solución bulk (línea discontinua); $[Doxo] = 1 \text{ mM}$.

Este resultado se puede explicar considerando que el pH disminuye dentro del film, un efecto que se ha predicho para el interior de una variedad de sistemas poliméricos cargados, desde cadenas individuales, capas de polímero injertado, polielectrolitos con estructura de estrella, hasta geles con diferentes topologías [73, 95, 132–134]. Este efecto resulta en una regulación de la carga, especialmente por parte del grupo difenólico de la doxorrubicina (ver D2 en la fig. 2.1 con pK_a 7.3), que se protona al adsorberse. Dentro del film, las moléculas de Doxo adsorbidas están, en promedio, más cargadas positivamente que en la solución; este comportamiento se describe en la figura 2.7. A un pH fijo, el efecto de reducir las concentraciones de sal de la solución es aumentar la carga promedio de las moléculas adsorbidas. En particular, el pI aparente (en donde la carga del adsorbato es cero) de la Doxo adsorbida, puede aumentar varias unidades de esta manera.

A continuación, evaluamos si la doxorrubicina puede liberarse del hidrogel cuando el material está en contacto con soluciones de poliaminas. La figura 2.8 muestra la adsorción de Doxo en el film a partir de soluciones que contienen diferentes concentraciones de poliaminas. Como referencia, los gráficos también incluyen la adsorción de doxorrubicina a partir de soluciones que no contienen poliaminas. Nuevamente, consideramos una concentración de sal fisiológica de 100 mM, pero ampliamos el

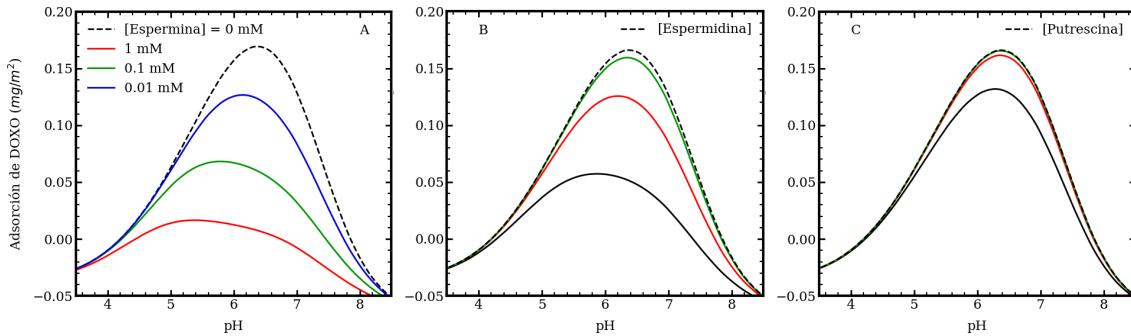


Figura 2.8: Gráfico de la adsorción de la doxorrubicina (ver ecuación 2.46) en función del pH para soluciones que contienen espermina (A), espermidina (B) y putrescina (C). En cada panel, las diversas curvas sólidas corresponden a soluciones con diferentes concentraciones de poliamina, mientras que la curva discontinua corresponde a una solución sin poliaminas. Todos los resultados corresponden a soluciones de 1 mM de Doxo y 100 mM de $NaCl$.

rango de valores de pH para describir las condiciones que podrían ocurrir alrededor de tejidos enfermos ácidos. La adsorción de doxorrubicina es una función no monotónica del pH de la solución, con un máximo entre 6 y 7. Este comportamiento no monotónico era de esperar, ya que la carga neta negativa del polímero es una función creciente del pH de la solución (ver figura 2.2), mientras que la carga positiva promedio de la Doxo disminuye hasta volverse negativa eventualmente a valores de pH lo suficientemente altos (ver figura 2.7).

La cantidad de doxorrubicina en el film disminuye cuando las poliaminas están presentes en la solución (compare las diferentes curvas de línea sólida en la figura 2.8 con la curva de línea discontinua en cada panel), lo cual se debe a la captura de poliaminas como se describe en la figura 2.5. Esta disminución en la adsorción de Doxo en comparación con las soluciones sin el fármaco se puede interpretar como una liberación del material. Dado que la espermina es la eléctricamente más cargada, es la más eficiente en fomentar la desorción de Doxo (ver panel A de la figura 2.8).

Para cuantificar aún más cómo el fármaco se desorbe de la película de hidrogel cuando se incorporan aminas en la solución, definimos la reducción relativa en la adsorción de doxorrubicina:



Figura 2.9: Gráfico que muestra la retención de Doxo, Γ_{ret} (ver ecuación 2.47), en función de la concentración de aminas para soluciones con 100 mM de $NaCl$ y un pH de 6 (panel superior) y pH de 7 (panel inferior).

$$\Gamma_{ret} = \frac{\Gamma_{Doxo}([Amina])}{\Gamma_{Doxo}^0} \quad (2.47)$$

donde Γ_{ret} es la retención de Doxo, $\Gamma_{Doxo}([Amina])$ es la adsorción de doxorrubicina para soluciones de amina (ver curvas de línea sólida en la figura 2.8), y $\Gamma_{Doxo}^0 = \Gamma_{Doxo}([Amina] = 0)$ es la adsorción en soluciones sin poliaminas (ver la figura 2.6 y las curvas de línea discontinua en la figura 2.8).

La figura 2.9 muestra la retención de Doxo en presencia de cada una de las poliaminas en condiciones fisiológicas y a un pH de 6. Si todo el fármaco se mantiene dentro de la película para una solución de poliamina, entonces $\Gamma_{ret} \approx 1$; mientras que $\Gamma_{ret} \approx 0$ indica que todo el fármaco ha sido liberado. Los valores negativos

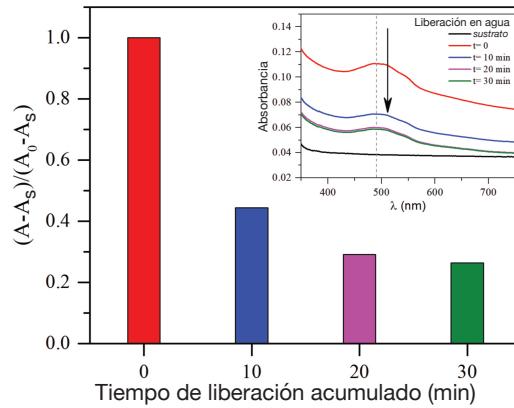


Figura 2.10: Carga de doxorrubicina en films de PMAA y liberación de las mismas en agua, representada como el cambio en la absorbancia ($\lambda = 490\text{ nm}$) en relación con la carga inicial en diferentes tiempos de liberación. Inset: Gráfico de los espectros UV-Vis de los films después de 24 horas en contacto con Doxo (rojo; $t = 0$). Las diversas curvas ilustran la liberación del fármaco después de diferentes tiempos de liberación en agua. La curva negra se incluye como referencia y corresponde a la señal del soporte de vidrio desnudo. A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_0 : Absorbancia del hidrogel completamente cargado. (Resultado experimental)

de Γ_{ret} pueden ocurrir porque $\Gamma_{Doxo}([Amina])$, que es una cantidad en exceso en el bulk, puede tomar valores negativos, lo que indica que en esas condiciones las aminas evitan la adsorción de Doxo en la película.

La retención de doxorrubicina en el hidrogel disminuye a medida que aumenta la concentración de poliamina. Esto es cierto para todas las aminas y para pH 7 y 6 (ver figura 2.9). Como se mencionó anteriormente, la espermina es la más eficiente en promover la liberación de Doxo del hidrogel. Sin embargo, a altas concentraciones de amina, todas las poliaminas pueden impulsar la liberación de cantidades significativas de doxorrubicina.

2.5.2. Espectro UV-Visible

La carga de doxorrubicina en el hidrogel se caracterizó mediante experimentos de UV-Vis, analizando la absorbancia a $\lambda = 490\text{ nm}$. Para abordar la liberación de Doxo después de la exposición al agua, los datos de absorbancia se normalizaron en consecuencia, restando la absorbancia del sustrato de vidrio (A_s) y luego dividiendo

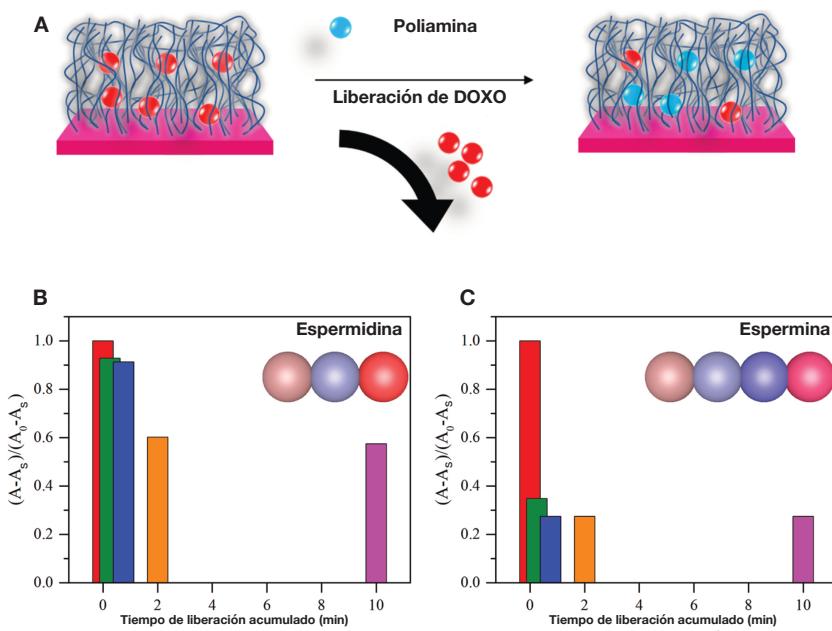


Figura 2.11: (A) Representación esquemática de la liberación de Doxo mediante la adsorción de poliaminas. Carga y liberación de doxorrubiciна en los films de PMAA en soluciones de espermina (B) y espermidina (C), representadas como el cambio en la absorbancia ($\lambda = 490\text{ nm}$) en relación con la carga inicial en diferentes momentos de liberación. A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_0 : Absorbancia del hidrogel completamente cargado. (Resultados experimentales)

por la absorbancia del hidrogel completamente cargado (A_0), también con la resta de A_s . La figura 2.10 muestra el cambio relativo en la absorbancia después de un tiempo de liberación dado para un hidrogel previamente cargado durante 24 h. El inset muestra los espectros UV-Vis después de diferentes tiempos de liberación en agua. Los resultados experimentales en $t = 0$ (los espectros rojos mostrados en el inset de la figura 2.10) evidencian que las películas de PMAA incorporan doxorrubiciна dentro de su red polimérica. La absorbancia a $\lambda = 490\text{ nm}$ para ese espectro corresponde a la barra roja en la figura principal. Después de un tiempo de exposición al agua lo suficientemente largo, la liberación de las películas es solo parcial, lo que demuestra la afinidad del fármaco por la película. Sin embargo, existe una clara y significativa liberación inicial del fármaco en los primeros 10 minutos, un comportamiento que no se observa en las etapas posteriores de liberación, donde las medidas se reducen a los mismos espectros (ver el inset de la figura 2.10).

La liberación de Doxo puede ser desencadenada al exponer la película de hidrogel a poliaminas, como se representa en la figura 2.11A. Para evaluar este comportamiento, se realizaron experimentos de liberación utilizando espermidina y espermina como poliaminas modelo. La figura 2.11 muestra los cambios en la absorbancia relativa para las películas de PMAA cargadas con Doxo y su liberación en contacto con soluciones de espermidina (panel B) y espermina (panel C) en diferentes tiempos de exposición. La putrescina no se consideró en los experimentos debido a su baja adsorción en comparación con la espermina y la espermidina (ver figura 2.5). Los resultados muestran que la liberación del fármaco en presencia de estas poliaminas es más rápida que en agua, lo que respalda las predicciones de nuestra teoría y modelo molecular: los hidrogeles de PMAA actúan como plataformas de adsorción para las poliaminas, y tal incorporación puede desencadenar la liberación de un fármaco previamente cargado.

La figura 2.11, paneles B y C, muestran que la liberación en presencia de espermina es más rápida que con la incorporación de espermidina: después de una exposición de 15 segundos a la espermina, ya no hay señal UV de Doxo, mientras que se requiere un contacto tres veces más largo con espermidina para alcanzar la misma etapa de liberación. Además, la magnitud de la liberación de Doxo utilizando espermidina es menos significativa en comparación con la liberación casi completa inducida por la espermina. Estos resultados indican que el número de grupos amino determina su retención en la película de hidrogel, lo que concuerda con las predicciones de nuestra teoría molecular (ver figura 2.9) y el trabajo de Schimka et al. [130].

Después de la carga de poliaminas y la liberación concomitante de Doxo, las películas de PMAA se expusieron a una nueva solución de Doxo para evaluar si la adsorción de poliaminas impediría en la readsorción de doxorrubicina, como se muestra en la figura 2.12A. Estos experimentos tienen como objetivo responder si una vez liberada por la adsorción de poliaminas, la doxorrubicina se vuelve a adsorber en el hidrogel, disminuyendo su concentración en el medio. En línea con el comportamiento esperado, la retención de espermina por la película de hidrogel dificulta significativamente la readsorción de Doxo dentro de la red polimérica. Por otro lado, los films de hidrogel cargados con espermidina en contacto con Doxo muestran la posibilidad de recargar el fármaco, lo que sugiere una interacción diferente, dependiendo de la

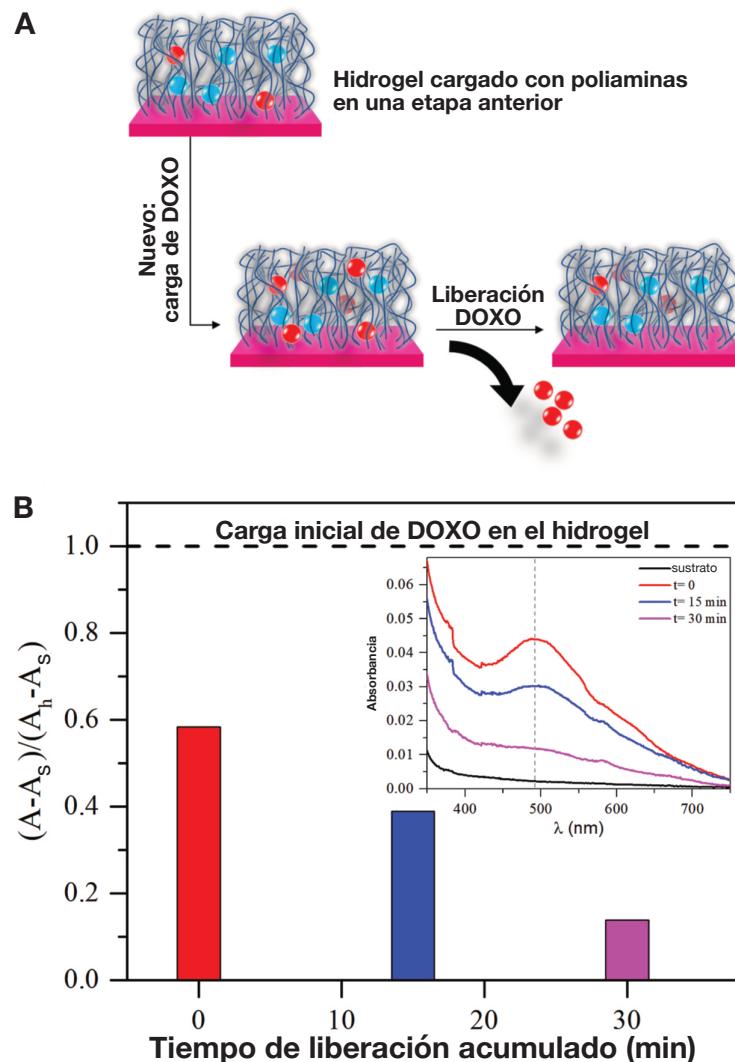


Figura 2.12: (A) Representación esquemática de la recarga/liberación de Doxo después de la adsorción de poliaminas. (B) El cambio en la absorbancia ($\lambda = 490$ nm) en relación con la carga inicial de Doxo en el film de hidrogel (línea discontinua). A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_h : Absorbancia de la carga inicial de Doxo en la película de hidrogel (antes de la absorción de poliaminas).

poliamina. Como se muestra en el panel B de la figura 2.12, la espermidina permite una recarga inicial de Doxo en el film, pero esta carga se libera fácilmente al medio, en comparación con los resultados de la figura 2.10, donde incluso después de 1 hora de exposición al agua, el Doxo no se libera. Estos resultados también resaltan la

interacción más fuerte de la espermina (en comparación con la espermidina) con la red polimérica.

En resumen, nuestros resultados experimentales y teóricos muestran el potencial de los films de hidrogel basadas en PMAA para cargar fármacos terapéuticos, que se exploró utilizando la Doxorrubicina como fármaco modelo. Si bien el hidrogel funciona como una plataforma de liberación controlada, la presencia de altas concentraciones de poliaminas en el medio circundante puede desencadenar la liberación del fármaco al interactuar con la red polimérica.

2.6. Conclusiones

Las poliaminas son esenciales para el metabolismo celular, ya que están involucradas en diferentes procesos celulares y sirven como nutrientes para el crecimiento celular. En células dañadas que muestran un crecimiento descontrolado, como los tumores, hay un aumento en la necesidad de nutrientes, lo que provoca un exceso medible en las concentraciones de poliaminas en los compartimentos extracelulares. Este aumento en la concentración de poliaminas juega un papel clave en la aceleración de la diseminación de tumores y puede servir como indicador de células cancerosas. Concentraciones anómalas de poliaminas pueden ser la base para terapias que se centren en la eliminación de nutrientes y la prevención de metástasis, así como para evaluar el avance de la quimioterapia.

En este contexto, nuestro objetivo en este capítulo fue demostrar el siguiente concepto: los hidrogeles basados en PMAA se pueden emplear para desarrollar biomateriales capaces de capturar poliaminas y liberar un fármaco terapéutico en respuesta. Hemos desarrollado un modelo molecular de grano grueso para describir la doxorrubicina, la putrescina, la espermidina y la espermina. Utilizando este modelo molecular y una teoría termodinámica, nuestros resultados proporcionan información sobre la adsorción de poliaminas y doxorrubicina en películas de hidrogel de PMAA.

Estos resultados predicen la capacidad de los hidrogeles de PMAA para capturar cantidades crecientes de poliaminas a medida que aumenta la concentración del medio en condiciones de sal fisiológicas. Esta adsorción aumenta con el número de grupos amino; la espermina muestra la preferencia más fuerte por el hidrogel. Este

comportamiento resulta de la interacción entre la carga positiva de los grupos amino y los segmentos de MAA desprotonados (cargados negativamente).

Hemos considerado la carga de un fármaco contra el cáncer como la doxorrubicina en el hidrogel de PMAA. Las condiciones óptimas de encapsulación en el laboratorio corresponden a una baja concentración de sal y un pH entre 6 y 7. Este resultado es contrario a la intuición, ya que el punto isoeléctrico de la doxorrubicina se encuentra alrededor de pH neutro. Este enfoque puede explicarse por la protonación del fármaco al adsorberse en el hidrogel en el medio de pH más bajo.

Cuando tanto la doxorrubicina como una poliamina están presentes en la solución en contacto con el hidrogel, las poliaminas dificultan significativamente la adsorción del fármaco (en comparación con las soluciones que contienen solo doxorrubicina). Este efecto se intensifica a medida que aumenta la concentración de poliaminas en la solución. La eficiencia para excluir el fármaco de la película aumenta con la carga eléctrica de la poliamina (es decir, el número de grupos amino); la espermina es la más eficiente de las tres aminas consideradas para lograr esta respuesta. Como hemos demostrado, este comportamiento se puede interpretar como la liberación de doxorrubicina al capturar poliaminas.

Los films de PMAA se sintetizaron mediante polimerización radical de transferencia de átomos y se caracterizaron en condiciones específicas para respaldar nuestras predicciones teóricas. La adsorción y liberación de doxorrubicina en agua, soluciones de espermidina y espermina se estudiaron mediante espectroscopia UV-Vis. Estos resultados experimentales respaldan claramente el concepto propuesto de encapsulación de doxorrubicina dentro de estos films y la liberación de fármacos dependiente de poliaminas.

En resumen, nuestros estudios combinados teóricos y experimentales indican que los hidrogeles basados en ácido polimetacrílico tienen un gran potencial para servir como componente funcional en biomateriales que pueden capturar poliaminas y liberar un fármaco terapéutico en respuesta.

Capítulo 3

Microgeles poliméricos: Respuesta a estímulo y encapsulado/liberación de fármacos

3.1. Introducción

Los microgeles son partículas blandas formadas por cadenas de polímero entrecruzadas que pueden mostrar tanto un comportamiento coloidal como macromolecular [135, 136]. Inmersos en soluciones acuosas, estas partículas incorporan y retienen grandes cantidades de agua dentro de su estructura polimérica. Sus diámetros varían desde decenas de nanómetros (*nanogeles*) hasta varios micrones (*macrogeles*). La característica más sorprendente de estas partículas es su capacidad para absorber o liberar solvente y cambiar de tamaño en respuesta a una variedad de estímulos externos. Este comportamiento sensible a estímulo es reversible y depende de la composición química de la red polimérica.

Los microgeles compuestos por cadenas de polímero que contienen segmentos ácidos como ácido acrílico o metacrílico (AA y MAA, respectivamente) se hinchan o deshinchan en respuesta a cambios en el pH de la solución [33, 137]. El pH particular que marca el inicio y caracteriza esta transición es el pKa aparente del microgel, que

depende de la concentración de sal en la solución y a menudo difiere del pKa intrínseco del monómero ácido. Estos microgeles también ajustan su tamaño en respuesta a cambios en la concentración de sal en la solución [33].

Análogamente, los microgeles de algunos polímeros termosensibles experimentan una transición de fase volumétrica (VPT, por sus siglas en inglés) cuando se calientan por encima de una temperatura característica (VPTT o T_{pt}) [35, 36]. Este comportamiento se origina porque estos polímeros son insolubles en agua por encima de cierta temperatura crítica mínima de solución (LCST, por sus siglas en inglés) [37]. Normalmente, la LCST del polímero y la VPTT de la red entrecruzada son aproximadamente idénticas. Este es el caso de las partículas de microgel de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) [35], cuyo colapso de volumen ocurre por encima de 32°C, que es la LCST del polímero lineal [38].

Dado que la VPTT de los microgeles de PNIPAm se encuentra alrededor de la temperatura corporal, sus microgeles han generado un gran interés en aplicaciones biomédicas [49]. Las estrategias para controlar la VPTT de los microgeles incluyen la síntesis de nuevos monómeros termosensibles [50, 51], así como la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [52, 53]. Este último enfoque produce microgeles multiresponsivos que son susceptibles a cambios en la temperatura, pH y concentración de sal [33, 138]. Los microgeles de N-isopropilacrilamida (NIPAm) y ácido acrílico (AA) han sido ampliamente estudiados [54–57]; también se han investigado microgeles de copolímeros de NIPAm y ácido metacrílico (MAA) [58–60]. La VPTT de estos microgeles multiresponsivos depende del pH de la solución, la concentración de sal y la fracción de monómero ionizable en las cadenas de polímero [54–56, 59, 61–63]. Además, la incorporación del co-monómero ácido proporciona un mecanismo controlado por el pH para la adsorción/liberación de moléculas de carga de signo opuesto, lo que hace que los microgeles multiresponsivos sean atractivos para el diseño de sistemas de administración de medicamentos [67].

Las aplicaciones basadas en microgeles de polímero están volviéndose cada vez más diversas y de mayor importancia en diferentes áreas de la tecnología [135]. Nanocomuestos hechos de microgeles de poli(NIPAm-*co*-MAA) que incorporan nanopartículas de oro o plata o estructuras metal-orgánicas tienen aplicaciones potenciales en el desarrollo de materiales con actividad catalítica ajustable para la degradación

de contaminantes industriales [139–141]. Estos microgeles también se pueden aplicar en el desarrollo de emulsiones sensibles al pH, salinidad y temperatura [142–145], o como plantillas para el ensamblaje de nanomateriales [62]. Los nano/microgeles de polímero multiresponsivos son excelentes candidatos para el desarrollo de aplicaciones biomédicas mínimamente invasivas, incluyendo bases estructurales para la ingeniería de tejidos [27]. Culver et al. [146] han utilizado nanogeles funcionalizados de poli(NIPAm-*co*-MAA) para la detección de diferentes proteínas. Recientemente, se han investigado dispositivos basados en microgeles de poli(NIPAm-*co*-MAA) para la encapsulación/liberación del fármaco quimioterapéutico Doxorubicina [64–66].

En este contexto, en este capítulo derivamos una teoría de equilibrio de dos fases y realizamos una investigación sistemática del comportamiento termodinámico de microgeles compuestos por copolímeros aleatoriamente dispuestos de NIPAm y un co-monómero ácido. Este modelo describe la química y física detrás de todos los siguientes fenómenos: la hinchazón de los microgeles impulsada por el pH, la dependencia no monótona del tamaño de partícula con la concentración de sal y el colapso de la red al aumentar la temperatura por encima de la VPTT. Estas predicciones proporcionan una imagen clara de los efectos de la composición de la solución (pH, concentración de sal) y la química del polímero (contenido de MAA, grado de entrecruzamiento) en la VPT. También se muestran las mejores condiciones para la encapsulación de Doxorubicina y Daunorubicina dentro de estos microgeles. Los cálculos son específicos para el ácido metacrílico con un $pK_a = 4.65$, pero el comportamiento fisicoquímico reportado puede describir cualitativamente una variedad de microgeles basados en NIPAm que han sido modificados con otros monómeros ácidos que tienen diferentes pK_a y diferentes solubilidades a pH bajo.

El comportamiento de los microgeles de poli(NIPAm-*co*-MAA), incluyendo su VPT y la interacción con polímeros de carga opuesta, ha sido descrito utilizando una variedad de técnicas experimentales [58–60, 64, 147–149]. También se han estudiado teóricamente mediante simulaciones moleculares de grano grueso para investigar el comportamiento de microgeles de polímeros sensibles a estímulos [83, 84, 150]. Estos trabajos se han centrado principalmente en el swelling y otras propiedades de partículas que tienen una red de polímero permanentemente cargada [85–88, 151–159], y algunos han abordado el efecto de la temperatura y la calidad del solvente

[84–88, 155]. Recientemente, algunos estudios utilizando simulaciones han considerado la respuesta al pH de los microgeles compuestos por polímeros reguladores de carga [89, 91–93, 160]. Sin embargo, solo unos pocos trabajos teóricos han investigado las propiedades de microgeles multiresponsivos en función de la temperatura, el pH y la concentración de sal [94, 95].

3.2. Metodología

3.2.1. Teoría: Fase Microgel

Consideremos un modelo de dos fases: un microgel de poli(NIPAm-*co*-MAA) (P(NIPAm-MAA)) (la fase 1, denotada por *MG*) en contacto con una solución acuosa (fase 2, denotada por *s*). Externamente, podemos controlar la temperatura *T*, el pH y la concentración de sal de esta solución, en estas condiciones el microgel asume un radio *R* y con ello un volumen $V = \frac{4}{3}\pi R^3$. El potencial termodinámico cuyo mínimo produce las condiciones de equilibrio dentro de la fase de microgel es un semi gran potencial, Ω_{MG} .

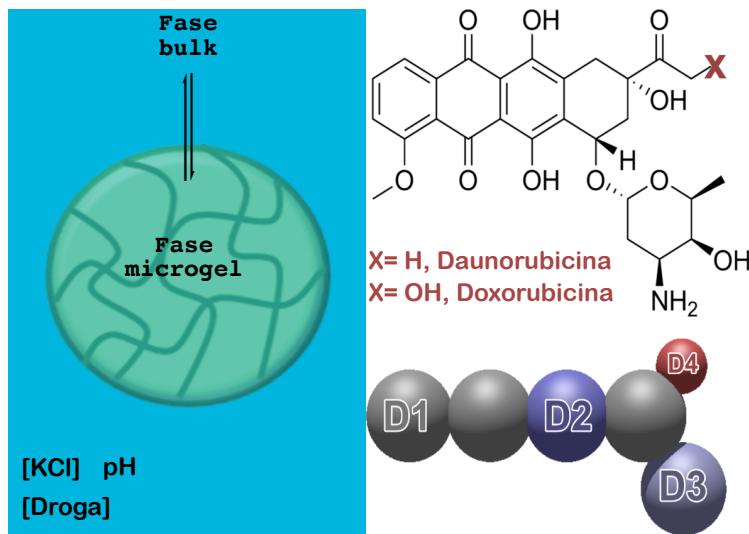


Figura 3.1: Microgel polimérico en solución. En el mismo se observan las dos fases que componen al sistema, la fase microgel y la fase solución. A la derecha se muestra la droga utilizada, así como el modelo usado para incorporar la información química que las definen.

$$\begin{aligned}\Omega_{MG} = & -TS_{mez} + F_{qca,MAA} + F_{ela} \\ & + U_{elec} + U_{ste} + U_{VdW} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} N_{\gamma}\end{aligned}\quad (3.1)$$

En donde S_{mez} es la entropía de traslación (y mezcla) de las especies libres en la fase del microgel: moléculas de agua (w), hidronio (H_3O^+) e iones de hidróxido (OH^-), y cationes de sal (+) y aniones (-). Hemos considerado una sal monovalente, KCl , completamente disociada en iones de potasio y cloruro.

$$-\frac{S_{mez}}{k_B} = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \quad (3.2)$$

en donde $\beta = \frac{1}{k_B T}$, T es la temperatura del sistema y k_B es la constante de Boltzmann. La densidad numérica de la especie γ es ρ_{γ} y μ_{γ}^0 es su potencial químico estándar, v_w es el volumen de una molécula de agua. Además $\gamma \in \{w, H_3O^+, OH^-, +, -\}$.

$F_{qca,MAA}$ es la energía química libre que describe la protonación de equilibrio de las unidades de MAA.

$$\beta F_{qca,MAA} = \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA-}^0) + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \quad (3.3)$$

donde ϕ_{MAA} es la fracción de volumen que ocupan estos segmentos, v_{MAA} es el volumen de este segmento, y f es el grado de disociación del mismo. La fracción de volumen de los segmentos MAA cargados es $f\phi_{MAA}$, y la de las unidades protonadas (o sin carga) es $(1-f)\phi_{MAA}$. Los potenciales químicos estándar son μ_{MAA-}^0 y μ_{MAAH}^0 para las especies desprotonadas (cargadas) y protonadas, respectivamente. Utilizamos el término segmento para identificar las unidades químicas que componen las cadenas poliméricas (MAA y NIPAm).

F_{ela} es la energía libre elástica que explica la libertad conformacional de la red polimérica.

$$\beta F_{ela} = \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch}} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \quad (3.4)$$

Esta expresión es descrita por Moncho-Jordá and Dzubiella [87] quienes usaron el modelo de elasticidad del caucho, donde N_{seg} es el número total de segmentos en la red de polímero y n_{ch} es el número de segmentos por cadena de polímero o *longitud de cadena*. La constante de elasticidad en esta energía es proporcional al cociente $\frac{N_{seg}}{n_{ch}}$, que representa el número (total) de cadenas de polímero en el microgel. El radio del microgel seco es R_0 , lo que satisface con la expresión:

$$\frac{4}{3} \pi R_0^3 = V_0 = N_{seg} \left(x_{MAA} v_{MAA} + x_{NIPAm} v_{NIPAm} \right) \quad (3.5)$$

donde V_0 es el volumen de la partícula seca; x_{MAA} y x_{NIPAm} son la fracción de los segmentos MAA y NIPAm en el microgel, respectivamente. Entonces, el número total de segmentos MAA es $x_{MAA} N_{seg}$ y el de unidades NIPAm es $x_{NIPAm} N_{seg}$, estos últimos con un volumen v_{NIPAm} . Los microgeles que consideramos aquí satisfacen $x_{NIPAm} = 1 - x_{MAA}$.

U_{elec} y U_{ste} representan respectivamente las energías que resultan de las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas.

$$\beta U_{elec} = \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi_{MG} \quad (3.6)$$

donde q_{γ} y q_{MAA} son la carga eléctrica de las moléculas γ y de los segmentos de MAA, respectivamente. El potencial electrostático dentro de la fase de microgel es ψ_{MG} . Fuera de esta fase el potencial es nulo $\psi_s = 0$

Se impone una restricción de electro-neutralidad del microgel, que puede expre-

sarse como:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} = 0 \quad (3.7)$$

Las interacciones estéricas se incorporan como una segunda restricción al sistema, la cual consiste en que el volumen de la fase microgel está completamente ocupado por los segmentos de la red y las especies químicas libres.

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} = 1 \quad (3.8)$$

donde v_{γ} es el volumen molecular de la especie γ , y la fracción de volumen de cada componente de la red son:

$$\phi_{MAA} = N_{seg} \frac{x_{MAA} v_{MAA}}{\frac{4}{3} \pi R^3} \quad (3.9)$$

$$\phi_{NIPAm} = N_{seg} \frac{x_{NIPAm} v_{NIPAm}}{\frac{4}{3} \pi R^3} \quad (3.10)$$

U_{VdW} es la contribución que describe las interacciones efectivas polímero-solvente; para este trabajo se ha realizado la siguiente aproximación:

$$U_{VdW} = U_{NIPAm-w} + U_{MAA-w} \quad (3.11)$$

en donde $U_{NIPAm-w}$ incorpora la transición hidrofílica-hidrofóbica de PNIPAm al aumentar la temperatura por encima de su temperatura de transición crítica. Del mismo modo U_{MAA-w} hace cuenta de la interacción entre los segmentos de MAA y agua. Los resultados presentes en este capítulo consideran a los segmentos de MAA completamente hidrofílicos y por tanto $U_{MAA-w} = 0$

$$\beta U_{VdW} = U_{NIPAm-w} = \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \quad (3.12)$$

Este término explica la respuesta de PNIPAm a los cambios de temperatura

a través de un parámetro de interacción polímero solvente, χ , que depende de la temperatura y la fracción de volumen de NIPAm, ϕ_{NIPAm} . Según Afroze et al. [161], este parámetro de Flory-Huggins se puede expresar como:

$$\begin{aligned}\chi(T, \phi_{NIPAm}) = & g_0(T) + g_1(T)\phi_{NIPAm} \\ & + g_2(T)\phi_{NIPAm}^2\end{aligned}\quad (3.13)$$

con

$$g_k(T) = g_{k0} + \frac{g_{k1}}{T} + g_{k2}T \quad (3.14)$$

para $k = 0, 1, 2$, los coeficientes son: $g_{00} = -12,947$, $g_{02} = 0,044959 \text{ K}^{-1}$, $g_{10} = 17,920$, $g_{12} = -0,056944 \text{ K}^{-1}$, $g_{20} = 14,814$, $g_{22} = -0,051419 \text{ K}^{-1}$ y $g_{k1} \equiv 0$ [161]

Finalmente, la suma sobre γ expresa el equilibrio químico con la fase de solución, donde μ_γ y N_γ son el potencial químico y el número de moléculas de la especie γ , respectivamente. Aquí, el subndice γ identifica las especies químicas libres, $\gamma \in \{w, H_3O^+, OH^-, +, -\}$. Hay que tener en cuenta que Ω_{MG} es un semi-gran potencial porque la fase de microgel puede intercambiar cada una de estas moléculas con la fase de solución, mientras que la red de polímero está confinada dentro de la primera.

$$\sum_\gamma N_\gamma \mu_\gamma = \sum_\gamma \rho_\gamma \beta \mu_\gamma + \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \quad (3.15)$$

Esta contribución muestra el equilibrio químico entre el microgel y la fase de solución, donde el segundo término en la derecha representa a los protones asociados a unidades de MAA; a saber, $\mu_{H^+} \equiv \mu_{H_3O^+}$ se conjuga con el número total de protones,

$$N_{H_3O^+} + N_{MAAH} = V \left(\rho_{H_3O^+} + (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \right) \quad (3.16)$$

Con todo esto la forma explícita del potencial termodinámico es:

$$\begin{aligned}
 \beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = & \\
 & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
 & + \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA^-}^0) \\
 & \quad + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \\
 & + \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch} V} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \\
 & + \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi_{MG} \\
 & + \beta \pi_{MG} \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} - 1 \right] \\
 & + \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \\
 & - \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} - \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}}
 \end{aligned} \tag{3.17}$$

En donde π_{MG} es la presión osmótica de la fase de microgel, introducido como un multiplicador de Lagrange para imponer la restricción de incompresibilidad, ecuación 3.8.

Nuestro potencial termodinámico esta escrito explícitamente en función de las densidades de todas las especies, el grado de carga del MAA y el radio del microgel, $\Omega_{MG}(R) \equiv \Omega_{MG}(\{\rho_{\gamma}\}, f, R)$. Para obtener las expresiones de $\{\rho_{\gamma}\}$ y f de tal forma que sean consistentes con el equilibrio termodinámico, minimizamos Ω_{MG} respecto a estas cantidades, y sujeto a las restricciones ecuaciones 3.8 y 3.7; dicho procedimiento conduce a:

$$\rho_{\gamma} v_w = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_{MG} v_{\gamma} - \beta \psi_{MG} q_{\gamma}) \tag{3.18}$$

$$\frac{f}{1-f} = \frac{K_{MAA}^0}{a_{H^+}} \exp(-\beta \psi_{MG} q_{MAA}) \tag{3.19}$$

donde $a_{\gamma} = e^{\beta \mu_{\gamma} - \beta \mu_{\gamma}^0}$ es la actividad de la especie γ . La constante de equilibrio

Species	pKa	q (e)	v (nm^3)
$H_2O(w)$			0.03
H_3O^+		+1	0.03
OH^-		-1	0.03
$K^+ (+)$		+1	0.04
$Cl^- (-)$		-1	0.047
MAA	4.65	-1*	0.09
NIPAm			0.12

Cuadro 3.1: Propiedades moleculares de las diferentes especies químicas consideradas. (*Para la especie desprotonada).

termodinámico que describe la protonación/desprotonación MAA es

$$K_{MAA}^0 = e^{\beta\mu_{MAAH}^0 - \beta\mu_{MAA}^0 - \beta\mu_{H^+}^0} \quad (3.20)$$

Esta cantidad es posible calcularla directamente a partir del pKa del ácido.

Si se considera un valor de R , las únicas incógnitas restantes para determinar $\Omega_{MG}(R)$ son la presión osmótica, π_{MG} y el potencial electrostático, ψ_{MG} . Estas dos cantidades se pueden calcular resolviendo numéricamente la incompresibilidad y la electro-neutralidad de la fase de microgel, ecuación 3.8 y ecuación 3.7, respectivamente. Para resolver estas ecuaciones utilizamos un método híbrido de Powell sin jacobiano y un código FORTRAN desarrollado en el grupo de investigación. En resumen, es posible calcular la variación de $\Omega_{MG}(R)$ en función del radio del microgel R , y con ello calcular el valor del radio óptimo del gel para unas condiciones dadas (pH, temperatura, concentración de sal). Esto se ilustra en la sección 3.2.3.

Todas las demás cantidades involucradas en el cálculo de $\Omega_{MG}(R)$ son valores de entradas, incluidas las propiedades de las diferentes especies químicas consideradas, que se resumen en la tabla 3.1. Usamos $pK_w = 14$ para describir el equilibrio de disociación del agua. Las actividades de todas las especies químicas libres se pueden calcular a partir de la concentración de estas moléculas en la fase de solución, como se analiza a continuación.

3.2.2. Fase solución

En la solución, el potencial termodinámico es:

$$\begin{aligned} \beta \frac{\Omega_s}{V} = & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s (\ln(\rho_{\gamma}^s v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0 - \beta \mu_{\gamma}) \\ & + \beta \pi_s \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s v_{\gamma} - 1 \right] \end{aligned} \quad (3.21)$$

el superíndice/subíndice s indica las densidades en la fase solución. Al escribir la ecuación 3.21, hemos considerado un volumen de referencia igual al del microgel, V , y se ha considerado, como se mencionó con anterioridad, cero el potencial electrostático en la fase de solución. Además en la ultima línea de la ecuación 3.21 se ha incorporado la restricción para la incompresibilidad del sistema como un multiplicador de Lagrange, con π_s como la presión osmótica en la fase solución.

Una vez que se establece la composición de la solución (pH y concentración de sal), conocemos las densidades de todas las especies químicas en esta fase, que deben satisfacer tanto las restricciones de incompresibilidad así como también de neutralidad de carga:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s v_{\gamma} = 1 \quad (3.22)$$

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s q_{\gamma} = 0 \quad (3.23)$$

con

$$\rho_{\gamma}^s v_w = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_s v_{\gamma}) \quad (3.24)$$

para $\gamma \in \{w, H_3O^+, OH^-, +, -\}$. Al solucionar la ecuación 3.22 y 3.23 se puede conocer π_s , con ello podemos determinar las actividades de todas las especies químicas libres, y con las mismas resolver el sistema de la fase microgel. Los resultados de la minimización de la energía con un dado valor de R es presentada en la siguiente sección.

3.2.3. Minimización gráfica

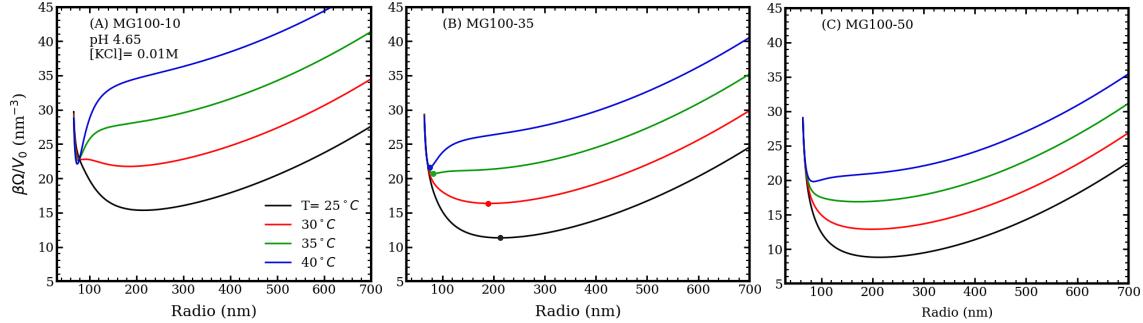


Figura 3.2: Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, pH de 4.65 y $[KCl] = 10^{-2} M$. Cada panel corresponde a un microgel MG100 diferente (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) con 10 % (A), 35 % (B) y 50 % (C) MAA. Las curvas presentan el potencial termodinámico en exceso de la contribución de la solución, $\Omega = \Omega_{MG} - \Omega_s$, en unidades convenientes, donde $V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3$ es el volumen de la partícula polimérica seca. En el panel B, los puntos marcan el radio óptimo para cada temperatura, que es el mínimo global/local de la curva correspondiente (ver tabla 3.2).

Como mencionamos en la sección 3.2.1 es posible determinar completamente la energía libre de la fase de microgel para cualquier R dado. Las variables independientes en este cálculo son la temperatura, el pH y la concentración de sal de la solución en contacto con la fase microgel. El número de segmentos en la red de polímero N_{seg} , la longitud de la cadena n_{ch} y la fracción de segmentos MAA, x_{MAA} , caracterizan completamente a nuestro microgel, es decir son variables de entrada pre-establecidas.

Consideramos microgeles con $N_{seg} = 10^7$ segmentos y $n_{ch} = 50, 100$ y 200 , que tienen $x_{MAA} = 0.1, 0.35$ o 0.5 . En la figura 3.2 mostramos el efecto de aumentar o reducir la cantidad de monómero ácido teniendo como referencia a los microgeles de poli(NIPAm-*co*-MAA) que poseen 35 % MAA.

Estos microgeles están etiquetados como $MGn_{ch}\text{-}p_{MAA}$, donde p_{MAA} es el porcentaje de MAA. Por ejemplo, MG100-10 corresponde a un microgel con $n_{ch} = 100$ y $x_{MAA} = 0.1$.

Para determinar el tamaño del microgel para un conjunto dado de condiciones, recurrimos a una minimización gráfica de su potencial termodinámico. Para cada conjunto de condiciones (pH, sal y T), obtenemos $\Omega(R) = \Omega_{MG}(R) - \Omega_s(R)$. En esta

expresión obtenemos el potencial termodinámico en exceso de la contribución de la solución. Con ella podemos encontrar el R_{opt} , siendo este el radio óptimo, tal que la curva tenga un mínimo global (y local). Como ejemplo, este procedimiento se ilustra en la figura 3.2 para microgeles MG100. Los resultados obtenidos de la minimización de las curvas figura 3.2 se resumen en la tabla 3.2.

Radio óptimo (nm)(MG100)					
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	Gel seco, R_0
10 % MAA	215	184	75	74	65
35 % MAA	213	193	84	76	64
50 % MAA	213	199	172	85	63

Cuadro 3.2: Minimización de las curvas de la figura 3.2. Esta tabla resume los radios óptimos de tres microgeles MG100 a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $[KCl] = 10^{-2}M$.

3.2.4. Incoporación de adsorbatos: Modificación del método teórico

Nuestro objetivo es caracterizar estos microgeles como dispositivos inteligentes, en el transporte de medicamentos. Para ello es necesario analizar la adsorción de algunas drogas terapéuticas. En el presente capítulo realizamos el análisis usando como droga modelo a la Doxorubicina y un derivado de ella: Daunorubicina. Ambas drogas son empleadas frecuentemente en tratamientos contra el cáncer.

Para describir la adsorción de un analito a la fase de microgel, al potencial ter-

modinámico de la ecuación 3.17 se le adicionan los siguientes términos:

$$\begin{aligned}
 \beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = & \dots \\
 & + \rho_a (\ln(\rho_a v_w) - 1 + \beta \mu_a^0) \\
 & + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} [g_{\tau} (\ln g_{\tau} + \beta \mu_{\tau,p}^0) \\
 & \quad + (1 - g_{\tau}) (\ln(1 - g_{\tau}) + \beta \mu_{\tau,d}^0)] \\
 & + \left(\rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} \right) \beta \psi_{MG} \\
 & - \rho_a \beta \mu_a - \beta \mu_{H^+} \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} g_{\tau}
 \end{aligned} \tag{3.25}$$

en donde la primera línea (lado derecho) representa los grados de libertad de traslación, donde ρ_a es la densidad numérica del analito y μ_a^0 su potencial químico estándar. Las siguientes dos líneas describen el equilibrio ácido-base de las unidades titulables del analito; el subíndice τ recorre dichas unidades moleculares que tienen un grado de protonación g_{τ} y un volumen v_{τ} . El analito tiene n_{τ} de estos segmentos; $\mu_{\tau,p}^0$ y $\mu_{\tau,d}^0$ son el potencial químico estándar de las especies protonadas y desprotonadas, respectivamente, que se relacionan con la constante de disociación ácida:

$$K_{a,\tau}^0 = e^{\beta \mu_{\tau,p}^0 - \beta \mu_{\tau,d}^0 - \beta \mu_{H^+}^0} \tag{3.26}$$

La siguiente línea en la ecuación 3.25 describe la contribución del analito a la energía electrostática, donde f_{τ} es el grado de carga de las unidades τ , que es igual a g_{τ} si τ es un grupo básico, o $(1 - g_{\tau})$ si la unidad es ácida; q_{τ} es la carga de las especies ionizadas. Los dos últimos términos dan cuenta del equilibrio químico entre el microgel y la fase de solución, donde μ_a es el potencial químico del analito.

Además, la ecuación 3.8 debe incorporar la fracción total de volumen ocupada por el analito: $\rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda}$, donde λ recorre todos los tipos de segmentos que forman la molécula, incluyendo unidades titulables $\{\tau\} \in \{\lambda\}$. La presencia del analito en la fase de solución también representa contribuciones adicionales al potencial termodinámico Ω_s de ecuación 3.21, que contienen los mismos componentes que ecuación 3.25.

Con todo lo anterior se puede reescribir:

Para la fase gel:

$$\begin{aligned}
 \beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = & \\
 & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
 & + \rho_a (\ln(\rho_a v_w) - 1 + \beta \mu_a^0) \\
 & + \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA-}^0) \\
 & \quad + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \\
 & + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} [g_{\tau} (\ln g_{\tau} + \beta \mu_{\tau,p}^0) \\
 & \quad + (1-g_{\tau})(\ln(1-g_{\tau}) + \beta \mu_{\tau,d}^0)] \\
 & + \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch} V} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \\
 & + \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} \right) \beta \psi_{MG} \\
 & + \beta \pi_{MG} \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} - 1 \right] \\
 & + \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \\
 & - \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} - \rho_a \beta \mu_a - \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} - \beta \mu_{H^+} \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} g_{\tau}
 \end{aligned} \tag{3.27}$$

En las cuales las restricciones físicas para la fase gel son incompresibilidad:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} \tag{3.28}$$

y electro-neutralidad:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} = 0 \quad (3.29)$$

Para la fase solución:

$$\begin{aligned} \beta \frac{\Omega_s}{V} &= \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s (\ln(\rho_{\gamma}^s v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0 - \beta \mu_{\gamma}) \\ &\quad + \rho_a^s (\ln \rho_a^s v_w - 1 + \beta \mu_a^0 - \beta \mu_a) \end{aligned} \quad (3.30)$$

y sus respectivas restricciones:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} \quad (3.31)$$

y

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} = 0 \quad (3.32)$$

De la optimización de nuestro nuevo gran potencial Ω_{MG} se obtiene:

$$\frac{f_{\tau}}{1 - f_{\tau}} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{\tau}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta \psi_{MG} q_{\tau}} \quad (3.33)$$

para el grado de carga de las unidades τ , donde el signo \mp diferencia el caso de un grupo ácido ($-$) de uno básico ($+$). Para la densidad del analito obtenemos:

$$\rho_a v_w = \frac{\tilde{a}_a}{\prod_{\tau} (1 - f_{\tau})^{n_{\tau}}} \cdot \exp \left(-\beta \pi_{MG} \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} \right) \quad (3.34)$$

donde esta última ecuación requiere una re-definición de la actividad del analito \tilde{a}_a . (De forma similar como se hizo con los adsorbatos del capítulo 2 en la ecuación 2.29).

Expresiones similares a la ecuación 3.34 y ecuación 3.33 se derivan para la fase

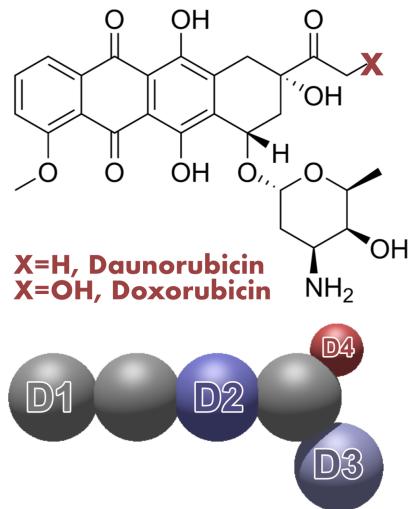


Figura 3.3: Estructura química (arriba) y modelo de grano grueso (abajo) aplicado para describir daunorrubicina y doxorrubicina. Los segmentos de grano grueso $D1 - D4$ se describen en la tabla 3.3.

CG unit	pK_a	$q\ (e)$	$v\ (\text{nm}^3)$
$D1$	-	0	0.085
$D2$	7.34	-1*	0.085
$D3$	9.46	+1*	0.085
$D4\ (\text{Doxo})$	8.46	-1*	0.035
$D4\ (\text{Dauno})$	-	0	0.035

Cuadro 3.3: Propiedades moleculares para las distintas unidades de grano grueso usadas para el modelado de las drogas Daunorubicina y Doxorubicina. (ver figura 3.3). (* Para unidades ionizables.)

de solución; y con ellas se puede obtener las actividades de los analitos y especies libres.

Consideraremos la adsorción de los fármacos quimioterapéuticos Daunorrubicina (Dauno) y Doxorrubicina (Doxo) en nuestros microgeles P(NIPAm-MAA) en diferentes condiciones. El modelo molecular aplicado para describir estos analitos se ilustra en la figura 3.3 y la parametrización se presenta en la tabla 3.3 [3].

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Respuesta al pH y la concentración de sal

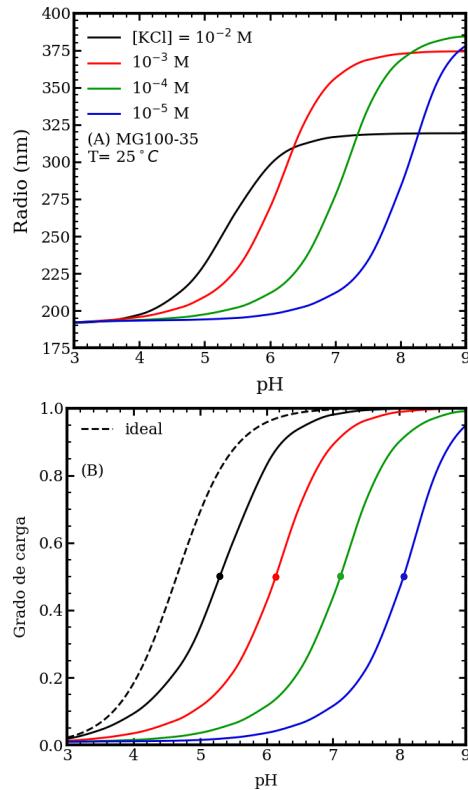


Figura 3.4: Tamaño de microgel (A) y grado de carga (B) en función del pH para soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal y $T = 25^\circ\text{C}$. Las cadenas de polímero en el microgel MG100-35 tiene $n_{ch} = 100$ segmentos de largo y 35 % MAA. La curva punteada en el panel B es la disociación ideal del ácido metacrílico ($pK_a = 4.65$). Los círculos de color en las curvas del panel A marcan el pK_a aparente del microgel.

En esta sección, describiremos el comportamiento de los microgeles en respuesta a cambios en la composición de la solución. En primer lugar nos enfocaremos en temperaturas por debajo de la temperatura crítica del PNIPAm, donde el microgel experimenta un colapso. El efecto de la temperatura se evaluará en la sección 3.3.2.

La Figura 3.4A muestra el tamaño del microgel (radio, R) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Los microgeles de P(NIPAm-MAA) se hinchan al

aumentar el pH. A medida que el pH se incrementa, un número creciente de unidades de MAA se desprotona y, por lo tanto, se cargan eléctricamente. La Figura 3.4B muestra cómo la fracción de MAA cargados (f : grado de carga; ver ecuación 3.19) depende del pH de la solución. El hinchamiento observado en el panel A, que surge al aumentar el pH, es una respuesta a las crecientes repulsiones dentro del microgel, resultado del aumento de la carga eléctrica en la red polimérica, como se observa en el panel B.

El inicio de la transición de este swelling se desplaza a valores de pH más altos cuando se reduce la concentración de sal (ver Figura 3.4A). Las curvas de disociación de protones del panel B presentan el mismo desplazamiento a pH más altos, en comparación con el comportamiento ideal de un monómero de MAA aislado en solución diluida.

El pKa aparente es el pH en el cual la mitad de los segmentos de MAA se desprotonan, y este valor cuantifica el comportamiento de carga del microgel (ver Figura 3.4B), así como la transición de expansión (como se observa en el panel A, marcado con círculos en $\text{pH} = \text{pKa}$). Los pKa aparentes de la Figura 3.4B se muestran en la Tabla 3.4.

[KCl] (M)	pKa apa. (25°C)
10^{-5}	8.10
10^{-4}	7.15
10^{-3}	6.15
10^{-2}	5.35
ideal (pKa)	4.65

Cuadro 3.4: pka aparente de la fig. 3.4 para un gel MG100-35 a 25°C.

Una concentración relativamente alta de iones de sal dentro del microgel da como resultado el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre los segmentos MAA cargados; estas interacciones repulsivas se vuelven de corto alcance. Cuando el pH de la solución aumenta, la disociación de los segmentos de MAA sucede sin un costo energético alto originado por las repulsiones electrostáticas. En estas condiciones, la desprotonación de MAA, inducida por la energía química libre (equilibrio ácido-base), se approxima al comportamiento ideal o de una solución diluida (comparándose los casos de alta concentración salina con la curva de línea punteada en la Figura 3.4B).

Por el contrario, a bajas concentraciones de sal, el efecto de apantallamiento se debilita y las repulsiones electrostáticas dentro de la red son de mayor alcance. Incluso si hay pocas cargas y distantes en la red, interactuarán entre sí. Para reducir la contribución energética de tales repulsiones electrostáticas hay una disminución significativa en la carga de las unidades de MAA a estas condiciones de baja salinidad; en consecuencia, el pK_a aparente aumenta. El precio a pagar es aumentar la energía química libre, cuya contribución se minimiza cuando el grado de protonación es el ideal.



Figura 3.5: Gráfico del tamaño del microgel en función de la concentración de sal para diferentes soluciones de pH y $T = 25^\circ C$. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen fracciones MAA: 10 % (A), 35 % (B) y 50 % (C).

La Figura 3.5 ilustra cómo el tamaño de los microgeles de P(NIPAm-MAA) depende de la concentración de sal para diferentes valores de pH. A una salinidad relativamente alta, estos microgeles se expanden con el aumento de la concentración de sal, lo que es consistente con los resultados de dispersión de luz dinámica (DLS) reportados por Wong et al. [62] para microgeles P(NIPAm-MAA) y concentraciones de KCl en el rango de 0.1-0.5 M.

Las curvas de la Figura 3.5 muestran un comportamiento reentrante. El tamaño del microgel incrementa en una primera instancia y luego disminuye al aumentar la concentración de sal. Esta respuesta no monotónica es más acentuada cuando la carga del polímero aumenta debido a un mayor contenido de unidades de MAA (observado en los diferentes paneles de la Figura 3.5).

Se han informado transiciones de expansión-compresión en diversas concentraciones de sal en una variedad de sistemas poliméricos con regulación de carga. El

grosor de las capas de poliácidos débiles anclados es una función no monotónica de la concentración de sal de la solución según lo predicho mediante la teoría del campo medio autoconsistente [162–165], lo cual ha sido confirmado por resultados experimentales [82]. De manera similar, los resultados teóricos predicen que el tamaño de los polielectrolitos débiles ramificados en forma de estrella muestra un máximo en función de la concentración de sal de la solución [166, 167]. También se ha predicho que el espesor de las películas de poliácidos débiles entrecruzados mostrará este comportamiento de expansión reentrante [168].

En este mismo sentido, se ha predicho una transición de compresión a expansión impulsada por la concentración de sal para los nanogeles de polielectrolitos fuertes [154]. Este comportamiento, en el caso de los polielectrolitos “quencheados”, se atribuye a los efectos de volumen excluidos de los iones absorbidos a altas concentraciones salinas.

Más relevante para nuestro estudio, son los resultados teóricos de una transición reentrante de hinchazón a colapso para microgeles sensibles al pH y la temperatura [95]. Polotsky et al. [95] explica que el aumento de la concentración de sal promueve inicialmente la disociación de carga de los grupos ácidos débiles hasta alcanzar la saturación, momento en el cual el grado de disociación alcanza el valor ideal. Más allá de este punto, el aumento de la concentración de sal en la solución solo favorece el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas y, por lo tanto, el microgel se deshincha.

Experimentalmente, Capriles-González et al. [94] informaron sobre el swelling no monotónico de los microgeles de poli(NIPAm-*co*-AA) (P(NIPAm-AA)) en función de la concentración de NaCl utilizando técnicas de DLS.

El aumento de la concentración de sal de la solución tiene dos efectos opuestos sobre las propiedades del microgel. Por un lado, aumenta el apantallamiento de interacciones de carga eléctrica a medida que se incorporan los iones dentro del gel; las repulsiones electrostáticas entre los monómeros de MAA cargados están cada vez más apantalladas. El alcance efectivo de estas repulsiones se acorta, favoreciendo el deshinchamiento. Por otro lado, este apantallamiento permite una mayor desprotonación de los monómeros de MAA, promovida por el equilibrio ácido-base. La disociación de carga por el contrario, favorece el hinchamiento de la particula para

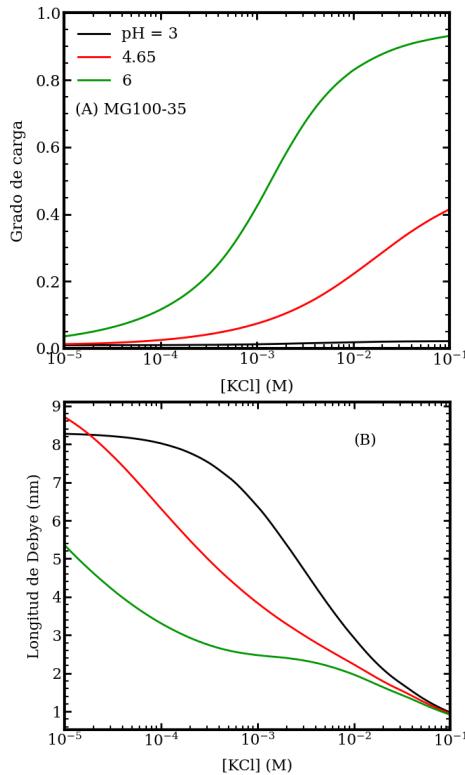


Figura 3.6: Curvas del grado de carga MAA (A) y la longitud de Debye (B) dentro de los microgeles MG100-35 en función de la concentración de sal para diferentes valores de pH. Estos resultados corresponden a las mismas condiciones de la figura 3.5B.

reducir las repulsiones electrostáticas.

La figura 3.6 ilustra este doble efecto de aumentar la concentración de sal en la solución, lo que conduce al comportamiento de hinchamiento-deshinchamiento. El panel A muestra que la carga del microgel aumenta monótonamente con la concentración de sal. En el panel B, usamos la longitud de Debye, calculada con la ecuación 3.35, para cuantificar la extensión de las interacciones electrostáticas. El alcance efectivo de estas interacciones se acorta dentro del microgel a medida que aumenta la concentración de sal. Se puede observar en la figura 3.6 que en condiciones de pH 3 la carga dentro del microgel es insignificante, lo que resulta en un hinchamiento muy poco apreciable en la figura 3.5B.

El cálculo de la longitud de Debye λ_D^{-1} se obtuvo con:

$$\lambda_D^{-1} = \sqrt{4\pi l_B \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma}^2} \quad (3.35)$$

en donde l_B es la longitud de Bjerrum, ρ_{γ} y q_{γ} es la densidad y carga de la especie libre γ respectivamente.

Esta teoría requiere que el interior del microgel sea de carga neutra. La conjugación de cargas poliméricas y contraiones debe estar equilibrada. Claudio et al. [152] demostró que esta es una aproximación razonable cuando el microgel es más grande que $R = 125$ nm y tiene un 50 % de monómeros cargados. Los microgeles P(NIPAm-MAA) aquí planteados son más grandes que ese tamaño en la mayoría de las condiciones, particularmente cuando el pH está por encima del pKa aparente y la mayoría de los grupos MAA están desprotonados.

3.3.2. Respuesta a la Temperatura

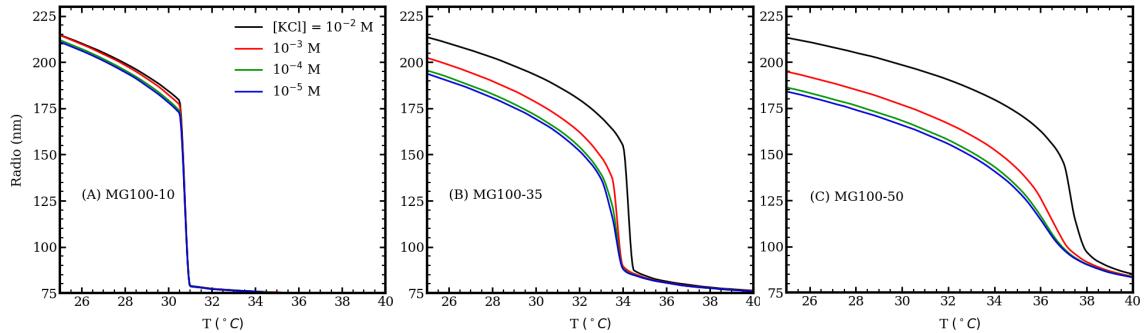


Figura 3.7: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sal en solución y pH 4.65. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen diferentes fracciones de MAA: 10 % (A), 35 % (B) y 50 % (C).

Discutido el efecto del pH y la concentración de sal, ahora nos enfocaremos en mostrar la respuesta de los microgeles de P(NIPAm-MAA) frente a cambios en la temperatura. En cada panel de la figura 3.7 se muestra el tamaño de tres partículas MG-100 como función de la temperatura a distintas concentraciones salinas. A baja temperatura, estos microgeles muestran un estado relativamente hinchado (baja

densidad de polimero) , mientras que a altas temperaturas se encuentra en un estado colapsado (alta densidad de polímero).

Esto último ocurre dado que el PNIPAm adquiere un comportamiento hidrofóbico por encima de su LCST, expulsando el solvente de su interior y colapsando su estructura [169]. El tamaño de la partícula en este estado es independiente de la concentración salina o el pH y posee un radio relativamente cercano al del microgel seco (ver tabla 3.2).

Por otro lado, el estado hinchado del gel está dominado por las repulsiones electrostáticas entre los segmentos de MAA cargados y los contraiones adsorbidos, como fue descrito en la sección 3.3.1. El tamaño y la carga del microgel son funciones monotónicamente decrecientes de la temperatura.

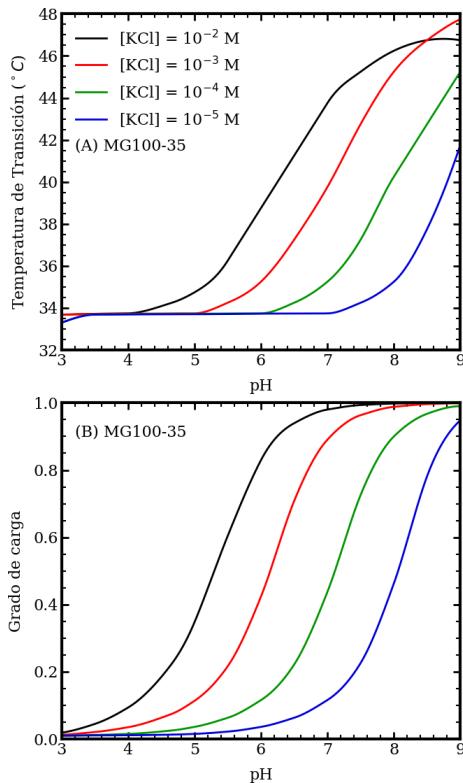


Figura 3.8: Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{PT} (A) y la fracción de MAA cargado a esta temperatura (B) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Este microgel P(NIPAm-MAA) tiene una longitud de cadena de $n_{ch} = 100$ y un 35 % de MAA.

En la mayoría de las condiciones, pero no en todas, la transición entre estos dos estados del microgel es brusca y ocurre en un rango estrecho alrededor de una temperatura bien definida, que definimos como Temperatura de Transición de Fase (T_{PT} por sus siglas en inglés). Comparando los diferentes paneles de la figura 3.7, vemos que aumentar el contenido de MAA de los microgeles conduce a una transición más suave alrededor de T_{PT} .

La figura 3.8A muestra que la T_{PT} aumenta con el pH y la concentración de sal. Estos resultados son consistentes con los experimentos de DLS que muestran que la temperatura de transición volumétrica de los microgeles P(NIPAm-MAA) aumenta con el pH [147], lo que también se ha observado experimentalmente para los microgeles P(NIPAm-AA) [94]. En este trabajo se ha definido T_{PT} como el punto de inflexión de las curvas $R(T)$ de la figura 3.7 entre los estados hinchado y colapsado [170].

El panel B de la figura 3.8 muestra el grado de carga de los segmentos de MAA en su T_{PT} . Existe una clara correlación entre la dependencia de T_{PT} con el pH y la salinidad, y el estado de carga del microgel en las condiciones T_{PT} . La temperatura de transición aumenta con el pH y la concentración de sal, al igual que la carga de la red de polímeros.

A diferencia de este comportamiento, la T_{PT} , de los microgeles basados en PNIPAm y co-monomeros permanentemente cargados, disminuye con la concentración de sal [53]. En este caso, la carga del polímero permanece constante, mientras que la incorporación de iones de sal solo debilita las repulsiones electrostáticas entre las cargas.

Los resultados de la figura 3.8 muestran que la temperatura de transición está controlada por la cantidad de carga dentro del microgel. De hecho, aumentar el contenido de MAA tiene el mismo efecto de desplazar la T_{PT} a valores más altos, como se observa en la figura 3.9A. Una vez más, este comportamiento resulta de una estructura polimérica más cargada.

Para comparar el estado de carga de microgeles con diferentes contenidos de MAA, utilizamos la fracción total de monómeros cargados:

$$x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}} = fx_{MAA} \quad (3.36)$$

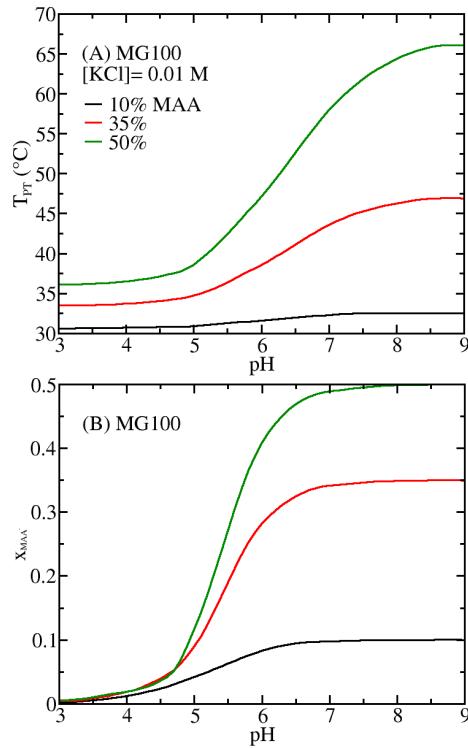


Figura 3.9: (A) Gráfico de temperatura de transición T_{PT} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01$ M; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}}$ en función del pH para las mismas condiciones del panel A (Por ej. , en la T_{PT}); x_{MAA^-} es proporcional a la carga total del polímero; N_{seg} es el mismo para todos los microgeles.

Donde N_{MAA^-} es el número de segmentos MAA desprotonados, todas las demás cantidades se han definido en la sección 3.2.1. x_{MAA^-} es proporcional a la carga total de la red de polímero, y debido a que todos los microgeles tienen el mismo número total de segmentos, la constante de proporcionalidad es la misma para todos los porcentajes de MAA considerados. La figura 3.9B muestra que existe una clara correlación entre T_{PT} y la carga total del microgel (dada por x_{MAA^-}) al cambiar el pH o el contenido de MAA del polímero.

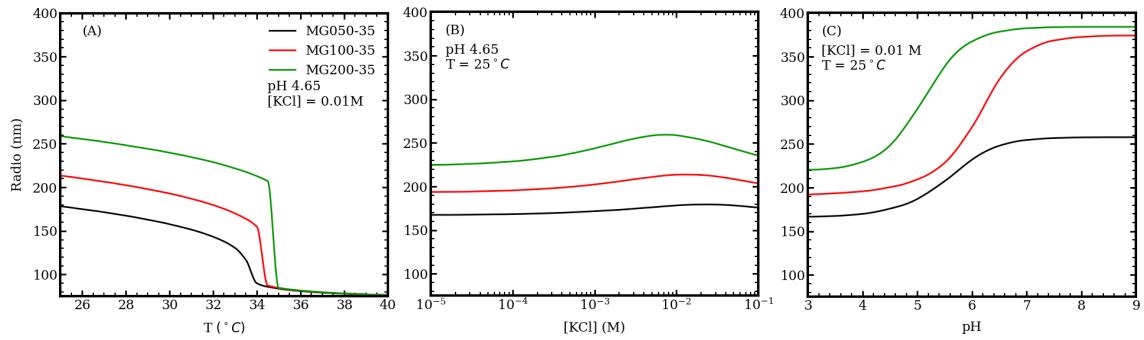


Figura 3.10: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura, la concentración de sal y el pH (paneles A, B y C respectivamente). Diferentes curvas corresponden a microgeles con segmentos de 50 (MG050), 100 (MG100) y 200 por cadena de polímero, todos con 35 % MAA.

3.3.3. Efecto del grado de entrecruzamiento

En esta instancia vamos a analizar cómo el grado de entrecruzamiento de la red polimérica afecta el comportamiento previamente descrito de nuestros microgeles. Consideramos microgeles con segmentos de 50, 100 y 200 por cadena, manteniendo el mismo número total de segmentos. A medida que la cantidad de segmentos por cadena disminuye, aumenta el grado de entrecruzamiento en el microgel. La figura 3.10 muestra la respuesta de los microgeles con un porcentaje de MAA del 35 % ante cambios de temperatura (panel A), concentración de sal (panel B) y pH (panel C).

Los microgeles con menor grado de entrecruzamiento (mayor número de segmentos por cadena) presentan un mayor grado de hinchamiento, a iguales condiciones este comportamiento de los microgeles P(NIPAm-MAA) ha sido confirmado experimentalmente [171]. Cualitativamente, la respuesta a la concentración de sal y al pH es similar para todas las longitudes de cadena consideradas (paneles B y C de la figura 3.10, respectivamente). Una observación interesante es que la disminución del grado de entrecruzamiento conduce a una transición de volumen más brusca a medida que aumenta la temperatura (figura 3.10A), y además, la T_{PT} aumenta. Estos resultados son consistentes con los trabajos de Li and Tanaka [172] y Wu and Zhou [173], quienes informaron un cambio en la transición de volumen de PNIPAm de continua a discontinua a medida que disminuye la concentración del entrecruzante en la síntesis.

En la figura 3.10, también se observa que el aumento de la longitud de la cadena (disminución del grado de entrecruzamiento) desplaza la temperatura de transición (T_{PT}) hacia valores más altos. Esto concuerda con los resultados de la espectroscopía UV obtenidos por Lee et al. [61] para los microgeles P(NIPAm-AA). Este comportamiento se observa en todo el rango de condiciones exploradas en este capítulo.

La constante de fuerza de la contribución elástica a la energía libre es inversamente proporcional a la longitud de la cadena n_{ch} (ver ecuación 3.17). Al reducir el grado de entrecruzamiento, el microgel se vuelve más flexible y en consecuencia se hincha, lo que permite la aparición de una mayor carga eléctrica en la red de polímero. En consecuencia, se requiere una temperatura más alta para inducir el colapso de la red de polímero cargado. Hemos demostrado que la temperatura de transición está fuertemente correlacionada con el grado de carga del polímero.

La presencia de unidades ácidas acentúa la dependencia de la T_{PT} con la longitud de la cadena, ya que incorpora el equilibrio de protonación al balance del potencial termodinámico. Sin embargo, esta respuesta es intrínseco a la interacción entre las propiedades hidrofóbicas y la elasticidad de la red polimérica. De hecho, la temperatura de transición de los microgeles de PNIPAm puros también aumenta con la longitud de la cadena, aunque el efecto es significativamente más débil en ausencia de segmentos de MAA. Esto puede observarse en la figura 3.11 en la cual se muestra el cambio de la temperatura de transición como función del número de segmentos por cadena dentro de la red polimérica. Estos geles están compuestos enteramente por monómeros de NIPAm, con un total de $N_{seg} = 10^7$ segmentos en todo el microgel. El pH es de 4.65 y la concentración salina de 0.01 M.

3.3.4. Adsorción de drogas

Los microgeles poliméricos son investigados como vehículos inteligentes para el transporte de medicamentos debido a sus propiedades únicas. Estos sistemas nano-estructurados (en este caso microestrucutrados) ofrecen una plataforma versátil para la encapsulación, protección y liberación controlada de sustancias bioactivas. Los microgeles pueden responder a estímulos externos, como se ha mostrado en las secciones anteriores, con cambios de pH, temperatura y concentración de iones, lo que les permite liberar su carga terapéutica de manera selectiva y específica en el sitio deseado.

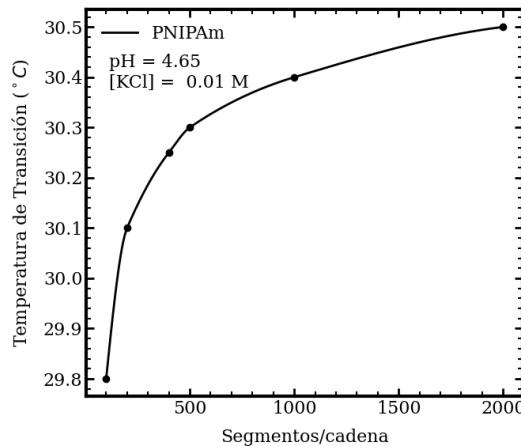


Figura 3.11: Gráfico de la variación de la temperatura de transición como función de los segmentos por cadena que componen la red polimérica. El polímero que compone el microgel esta compuesto puramente por NIPAm. La concentración de sal es de 0.01 M y el pH de 4.65. La red polimérica esta compuesta por $N_{seg} = 10^7$ segmentos.

Por ejemplo, se sabe que el pH extracelular del tejido tumoral es más bajo que el del tejido sano [174], lo que hace que los microgeles con respuesta al pH sean idóneos para la administración local de medicamentos contra el cáncer [175].

Peppas et al. [176] han estudiado ampliamente los microgeles sensibles al pH basados en MAA como transportadores inteligentes que pueden operar utilizando los diferentes niveles de acidez que ocurre a lo largo del tracto digestivo y prevenir la degradación de fármacos en el estómago [177–180].

En esta sección, evaluamos la capacidad de los microgeles P(NIPAm-MAA) para incorporar fármacos quimioterapéuticos. En particular, investigamos las mejores condiciones para la encapsulación de fármacos en condiciones de laboratorio. Consideramos la doxorrubicina (Doxo) y la daunorrubicina (Dauno) las cuales son dos de las antraciclinas más importantes y ampliamente utilizadas en la quimioterapia para tratar una gran gama de tejidos cancerígenos [115, 117, 181, 182]. Estas drogas se pueden seguir utilizando fluorescencia y absorbancia, lo que las hace atractivas desde el punto de vista de la investigación [3, 116, 183]. Además, estos fármacos tienen carga eléctrica positiva, lo que puede facilitar su encapsulación en microgeles de polímeros aniónicos [114]. Serpe et al. [116] han estudiado la captación y liberación termicamente activadas de Doxo a partir de películas capa por capa de microgeles de

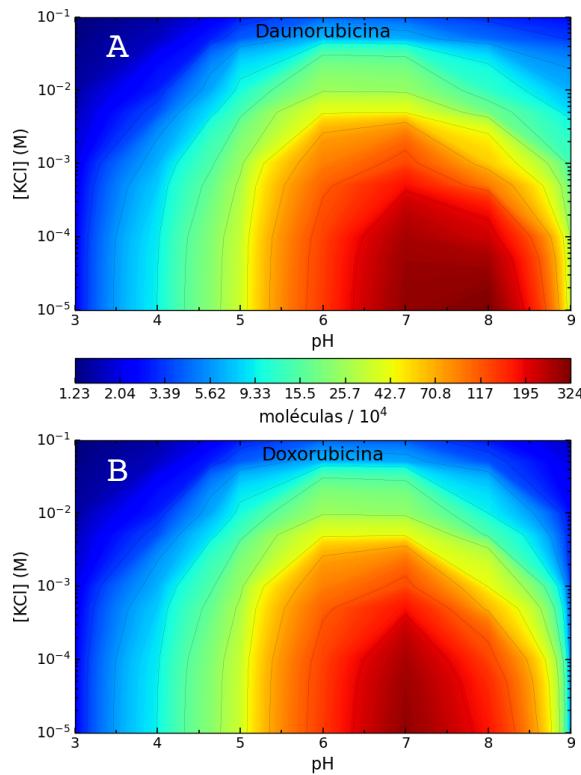


Figura 3.12: Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubricina (A) y doxorrubricina (B) adsorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es 1 mM y $T = 25^\circ\text{C}$. El microgel de P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35% MAA (MG100-35).

P(NIPAm-AA) y poli(clorhidrato de alilamina). Más recientemente, utilizando resonancia magnética nuclear de lapso de tiempo, Martínez-Moro et al. [65] han descrito la interacción entre Doxo y microgeles P(NIPAm-MAA) a diferentes condiciones.

La figura 3.12 ilustra el número de moléculas de Dauno (panel A) y Doxo (panel B) dentro del microgel en relación con la concentración de sal y el pH de la solución. Se observa que las condiciones óptimas para la encapsulación de estos fármacos terapéuticos corresponden a una baja concentración de sal y un pH de 6 a 8. La reducción en la concentración de sal favorece la adsorción. Tanto Dauno como Doxo presentan una carga neta de +1 a pH ácido y neutro (ver la figura 3.13).

Como resultado, la adsorción de Dauno/Doxo tiene que competir con la adsorción de iones de potasio para neutralizar la carga negativa de la red del polímero

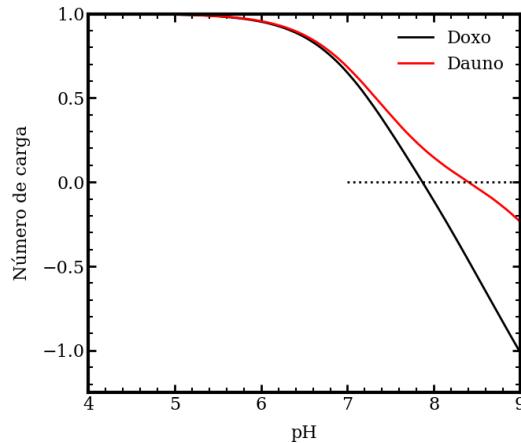


Figura 3.13: Número de carga de las drogas estudiadas: Doxorubicina y Daunorubicina. La intersección con la línea punteada muestra el punto isoeléctrico de las mismas. Pasado este punto se da una inversión en la carga de las drogas lo que conlleva a una repulsión electrostática con los segmentos de MAA cargados del microgel.

(Pérez-Chávez et al. [3]). En la figura 3.6, se observa que en ausencia de un fármaco disuelto, la carga del microgel disminuye a medida que se reduce la concentración de sal, lo que aparentemente entra en conflicto, dada la baja carga eléctrica que adquieren, con la mejora de la adsorción observada en la figura 3.12 bajo estas condiciones. Sin embargo, después de la adsorción del fármaco, el grado de carga de los segmentos de MAA aumenta significativamente, especialmente en condiciones de baja concentración de sal. Además, es importante destacar que este comportamiento está particularmente asociado con la relativamente alta concentración de fármaco considerada en estos resultados (1 mM).

La fracción de segmentos de MAA cargados negativamente en el polímero aumenta con el pH, lo que explica por qué también aumenta la adsorción de Dauno/Doxo en condiciones ácidas. Sin embargo, en condiciones alcalinas, la carga neta positiva de estos fármacos disminuye con el aumento del pH, lo que desfavorece su adsorción. Por lo tanto, la adsorción de Dauno/Doxo es una función no monotónica del pH.

En nuestro modelo, los puntos isoeléctricos de Dauno y Doxo son 8.4 y 7.9, respectivamente ver fig. 3.13. La figura 3.12 muestra que la adsorción de ambas moléculas puede ser significativa alrededor y por encima de estos valores de pH. En otras palabras, hay una adsorción considerable de moléculas con carga negativa

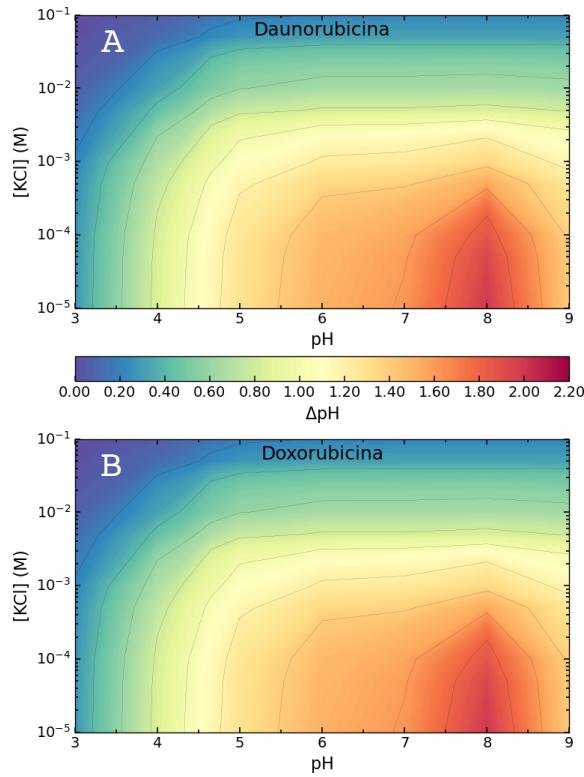


Figura 3.14: Mapas de color que muestran el cambio en el pH dentro del microgel, $\Delta pH = pH - pH_{GEL}$ en función de sal y el pH de la solución para daunorrubricina (A) y doxorrubricina (B). Estos cambios son reportados para las mismas condiciones de la figura 3.12, es decir: la concentración de fármaco en solución es 1 mM y $T = 25^\circ C$, el microgel de P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35 % MAA (MG100-35).

en solución dentro de la red de polímero con carga del mismo signo. Aunque estas moléculas están cargadas negativamente en la fase de solución, la adsorción ocurre porque el pH disminuye dentro del microgel, lo que permite que los fármacos regulen su carga eléctrica y permanezcan cargados positivamente dentro del microgel (fig. 3.14).

El punto isoeléctrico más bajo de la doxorrubricina, respecto a la daunorrubricina, se debe a la desprotonación de su grupo hidroxilo sustituyente (véase el segmento D4 en la figura 3.3 y tabla 3.3). Como resultado de esta carga negativa adicional en condiciones alcalinas, el rango de pH de adsorción es ligeramente más amplio para la daunorrubricina.

3.4. Conclusiones

En este capítulo mostramos una teoría termodinámica para un sistema compuesto de dos fases con el cual se describe la respuesta de diferentes nano/microgeles de P(NIPAm-MAA) a los cambios en el pH, la concentración de sal y la temperatura del medio. Estas partículas blandas se hinchan con el aumento del pH, lo cual es resultado de las repulsiones electrostáticas entre los segmentos cargados de MAA a medida que se disocian. Este comportamiento de hinchamiento está controlado por la carga eléctrica del polímero [184]. El inicio de esta transición impulsada por el pH se puede caracterizar adecuadamente utilizando el pKa aparente de los segmentos de MAA, que se desplaza a valores de pH más altos a medida que disminuye la concentración de sal en la solución.

A pH constante y por debajo de la LCST del PNIPAm, el tamaño de estos microgeles es una función no monótona de la concentración de sal. El aumento de la salinidad de la solución puede provocar tanto expansión como compresión de la red polimérica, dependiendo del rango de concentración de sal. Esta transición de hinchamiento-deshinchamiento reentrante surge como resultado de la competencia entre los efectos opuestos del aumento de la concentración de sal en los sistemas de polielectrolito débil, que tanto promueve la disociación de la carga como mejora el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas.

A medida que aumenta la temperatura, se produce una transición de fase volumétrica diferente que está asociada a la hidrofobicidad intrínseca del PNIPAm por encima de su LCST. La temperatura de transición de fase de estos microgeles depende de la cantidad de MAA en el polímero, el grado de entrecruzamiento, el pH de la solución y la concentración de sal. Cambiar estas variables independientes y/o los parámetros de diseño son formas de modificar el estado de carga del microgel. El mensaje principal de este capítulo es que la cantidad de carga en la estructura del polímero controla la temperatura de transición de fase volumétrica de los microgeles multiresponsivos.

También se ha evaluado la capacidad de estos microgeles para encapsular dos fármacos quimioterapéuticos típicos, de carga eléctrica positiva. El óptimo enfoque para mejorar la partición de estos fármacos en el microgel es reducir la concentración de sal en la solución. Las condiciones de encapsulación corresponden a valores de pH

alrededor o por encima de los puntos isoeléctricos de estos fármacos, donde estas moléculas tienen carga negativa en la solución de encapsulación.

Capítulo 4

Impacto de la funcionalización de la red polimérica en la adsorción de proteínas en nanogeles poliméricos.

4.1. Introducción

El diseño de vehículos funcionales para la encapsulación, transporte y liberación dirigida de agentes terapéuticos es uno de los principales desafíos actuales de la bionanotecnología [185]. A pesar de estar formulados para tratar específicamente ciertas enfermedades, muchos medicamentos no logran aprovechar su potencial debido a interacciones no deseadas con el entorno que rodea el objetivo [186]. Las nanopartículas son exploradas como una solución para evitar estas limitaciones, sirviendo como portadores inteligentes que pueden proteger los medicamentos contra factores de cambios. Se han investigado diversos nanotransportadores, incluyendo liposomas, micelas poliméricas y partículas inorgánicas, por su potencial para transportar y liberar eficazmente cargas moleculares [187, 188]. Estos nanotransportadores pueden aumentar el tiempo de circulación mientras confieren propiedades que ayudan a evadir los sistemas inmunitarios o digestivos [189]. Además, al aumentar el tiempo de circulación de los medicamentos, estos nanotransportadores también pueden ayudar

a abordar otro problema y reducir la necesidad de dosificaciones frecuentes.

Los nanogeles, en particular, son nanopartículas blandas con diámetros menores de 200 nm que pueden absorber y liberar cantidades relativamente grandes de solvente en respuesta a cambios en su entorno. Dependiendo de la composición química del polímero entrecruzado que forma el esqueleto del nanogel, estas partículas pueden expandirse o comprimirse de manera reversible como resultado de cambios en la temperatura [190], el pH [191], la concentración de sal [192] y una variedad de otros estímulos externos [135, 193, 194]. Estas propiedades únicas de los nanogeles de polímero se pueden aprovechar para dirigir la entrega de medicamentos a microambientes específicos, como los entornos ácidos de los tumores [195] o tejidos heridos o inflamados con temperaturas más altas [196]. Además, se pueden incorporar grupos en su superficie polimérica, lo que permite que el nanogel se ligue selectivamente a receptores en el objetivo y aumente la especificidad de la entrega [197–200]. La capacidad de los nanogeles para liberar medicamentos de manera controlada en entornos específicos también puede ayudar a prevenir la resistencia a los medicamentos [198].

Una fracción significativa y creciente de los nuevos medicamentos desarrollados para tratar diferentes enfermedades son proteínas [201]. La estabilidad de estas proteínas es un problema práctico, ya que son fácilmente desnaturalizadas por cambios en el pH o la temperatura [202]. Se ha demostrado que los hidrogeles y nanogeles de polímero ayudan a prevenir la desnaturalización de las proteínas y la pérdida de actividad bajo las condiciones mencionadas anteriormente [176, 203]. La capacidad de mantener la conformación nativa de las proteínas, combinada con el comportamiento sensible a estímulos de los nanogeles, los convierte en candidatos adecuados para desarrollar vehículos funcionales para la encapsulación, transporte y liberación dirigida de proteínas terapéuticas. Además, la red de polímeros de los nanogeles se puede adaptar con diferentes grupos funcionales para controlar simultáneamente las interacciones específicas y no específicas con las proteínas, aumentando así la eficacia de la encapsulación y entrega.

A pesar de sus muchas ventajas, el desarrollo de sistemas de entrega de medicamentos basados en nanogeles todavía está en sus primeras etapas, y hay muchas cuestiones que deben abordarse antes de que esta tecnología pueda desarrollarse extendidamente. En particular, dado que se requiere que funcionen en fluidos

biológicos, comprender cómo se comportan e interactúan los nanogeles con las proteínas en términos de la composición de su red de polímeros y la de la solución de proteínas en la cual estén presentes es crucial para su aplicación exitosa. En este capítulo, utilizamos un enfoque teórico para estudiar cómo la identidad química y la distribución espacial de los grupos funcionales en la red de polímeros modifican la respuesta del nanogel y su interacción con proteínas específicas, con el foco en la adsorción/desorción de proteínas impulsada electrostáticamente. El objetivo es desarrollar una mejor comprensión de los factores que influyen en el rendimiento de estos sistemas e identificar estrategias para mejorar su efectividad en el contexto de los nanovehículos para la entrega de medicamentos.

Se consideraran nanogeles compuestos por redes de copolímeros que contienen tanto un monómero hidrofílico y cargado-neutralmente como uno sensible al pH, y sus interacciones con proteínas globulares pequeñas, como el citocromo c, la insulina y la mioglobina, que tienen diferentes puntos isoeléctricos. La interacción de estas proteínas con microgeles poliméricos iónicos o sensibles al pH ha sido estudiada previamente [191, 204–206]. Por ejemplo, Smith y Lyon [205] demostraron que la reducción de la concentración de sal mejora la unión del citocromo c a microgeles basados en ácido acrílico. Estos sistemas también se han abordado utilizando teoría y simulaciones moleculares [78, 207]. Además, los microgeles poliméricos sensibles al pH se evalúan en la búsqueda de medios más efectivos y menos invasivos para la administración de insulina [111, 208], lo que tiene una importancia inmensa en la investigación biomédica actual [209] .

Estudiamos nanogeles basados en copolímeros de alcohol vinílico (VA) y ácido metacrílico (MAA; donante de protones) o alilamina (AH; aceptor de protones). Debido a su biocompatibilidad, estos monómeros se utilizan ampliamente en aplicaciones de administración de medicamentos [111, 210, 211]. Con el objetivo de obtener una comprensión más profunda de los factores que afectan el rendimiento de estos sistemas e identificar estrategias para ajustar sus interacciones con diferentes proteínas, desarrollamos y aplicamos una teoría termodinámica estadística que permite una descripción a nivel molecular de todas las especies químicas. Este método incorpora una descripción explícita de las conformaciones de la red cuyo resultado es la capacidad de expandirse/comprimirse elásticamente, confinamiento entrópico de iones y

solventes, química de equilibrio ácido-base, así como interacciones electrostáticas y repulsiones estéricas. Específicamente, investigamos el efecto de la distribución espacial de unidades sensibles al pH en toda la red de polímeros en el swelling del nanogel y la adsorción de proteínas.

4.2. Teoría Molecular

Para el estudio de estos nanogels se desarrolló un formalismo similar al descrito en el capítulo 2 para el estudio de films de hidrogeles poliméricos con respuesta a estímulo. En este formalismo buscamos minimizar una energía libre del sistema. Se incorpora una caracterización molecular usando un modelo de grano grueso de las diversas especies químicas presentes. El sistema en estudio es un nanogel aislado en equilibrio con una solución acuosa que tiene una composición de bulk definida externamente. Es decir, el pH, la concentración de sal y la concentración de proteína son nuestras variables independientes. La red polimérica que da estructura al nanogel contiene dos tipos de segmentos: una unidad sensible al pH, ya sea ácida (MAA) o básica (AH), y un segmento neutro (VA); los segmentos que describen al entrecruzante en la red se describen como segmentos de carga neutral.

El potencial termodinámico que describe el sistema es:

$$\begin{aligned}\Omega_{NG} = & - TS_{mez} - TS_{conf,net} + F_{qca,net} + F_{qca,pro} \\ & + U_{elec} + U_{ste} + U_{VdW} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} N_{\gamma} - \mu_{pro} N_{pro}\end{aligned}\tag{4.1}$$

donde S_{mez} es la entropía de traslación (y de mezcla) de las especies de la solución: moléculas de agua (H_2O), iones de hidronio (H_3O^+), iones de hidróxido (OH^-), cationes de sal, aniones de sal y proteína. Consideramos una sal monovalente, NaCl completamente disociada en iones de sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-). $S_{conf,net}$ representa la entropía conformacional que resulta de la flexibilidad de la red de polímeros, que puede asumir muchas conformaciones diferentes. $F_{qca,net}$ es la energía química libre que describe el equilibrio entre las especies protonadas y desprotonadas de unidades funcionales (ácidas/básicas) en el polímero. De manera similar, $F_{qca,pro}$ describe la

protonación de residuos titulables de la proteína. U_{elec} y U_{ste} representan, respectivamente, la energía asociada a las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas. U_{VdW} contiene las interacciones de Van der Waals entre los distintos segmentos y el solvente. Finalmente, la suma de γ expresa el equilibrio químico entre el sistema y la solución bulk que representa un reservorio de pH, concentraciones y temperatura para las partículas libres, donde μ_γ y N_γ son el potencial químico y el número de moléculas de especie γ , respectivamente; el subíndice γ recorre las especies químicas libres. El siguiente término tiene en cuenta el equilibrio químico entre sistema y solución para la proteína.

Las expresiones explícitas de cada uno de estos componentes, así como la minimización del potencial termodinámico, es descrita en la siguiente sección.

4.2.1. Formalismo teórico

A continuación describiremos la forma explícita de cada uno de las contribuciones a Ω_{NG} , donde los segmentos protonables del polímero serán considerados como unidades de ácido metacrílico (MAA). Sin embargo, las expresiones análogas se aplican para el caso de nanogeles que tienen segmentos básicos.

En primera instancia tenemos la entropía de traslación y de mezcla de las especies móviles, incluida la proteína:

$$-\frac{S_{mez}}{k_B} = \sum_\gamma \int_0^\infty dr G(r) \rho_\gamma(r) (\ln(\rho_\gamma(r) v_w) - 1 + \beta \mu_\gamma^0) + \sum_\theta \int_0^\infty dr G(r) \rho_{pro}(\theta, r) (\ln(\rho_{pro}(\theta, r)) - 1 + \beta \mu_{pro}^0) \quad (4.2)$$

donde $\beta = \frac{1}{k_B T}$, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta del sistema, $\rho_\gamma(r)$ y μ_γ son la densidad local, a una distancia r del origen de coordenadas, y potencial químico de la especie γ respectivamente. El subíndice γ toma en cuenta las moléculas de agua y sus iones (hidronio e hidróxido), y los iones disociados de la sal (Na^+ , Cl^-). $G(r) = 4\pi r^2$ es la constante de simetría de nuestro sistema. Para escribir la ecuación 4.2 hemos asumido que nuestro sistema tiene simetría esférica donde el origen de coordenadas se encuentra en el centro de masa de la red polimérica.

En el segundo término de la entropía de mezcla donde se considera el aporte de la proteína, $\rho_{pro}(\theta, r)$ es la densidad local de la proteína en conformación θ . Una conformación de la proteína esta definida por la posición relativa de sus unidades o por diferentes rotaciones espaciales de la misma estructura. La densidad local total de proteína es:

$$\langle \rho_{pro}(r) \rangle = \sum_{\theta} \rho_{pro}(\theta, r) \quad (4.3)$$

$S_{conf,net}$ representa la entropía conformacional resultante de la flexibilidad de la red polimérica que forma al nanogel. Estas conformaciones son denotadas por el set $\{\alpha\}$.

$$\frac{S_{conf,net}}{k_B} = - \sum_{\alpha} P(\alpha) \ln P(\alpha) \quad (4.4)$$

En donde $P(\alpha)$ es la probabilidad que el nanogel se encuentre en la configuración α . Una conformación α viene especificada por la posición de todos los segmentos de la red polimérica. La fracción en volumen de estos segmentos puede expresarse como:

$$\langle \phi^i(r) \rangle = \frac{1}{G(r)} \sum_{\alpha} P(\alpha) \phi_r^i(\alpha, r) \quad (4.5)$$

En donde el superíndice i indica el tipo de segmento ($i = MAA/VA/crosslink$), y la notación entre brackets, $\langle \rangle$, hace referencia al promedio de ensamble sobre las conformaciones de la red polimérica. $\frac{\phi_r^i(\alpha, r)}{G(r)}$ nos proporciona la fracción de volumen que ocupan los segmentos de tipo i entre las esferas concéntricas de radio r y $r + dr$, cuando la red está en la configuración α .

El siguiente término describe la energía química libre originada por el equilibrio ácido-base de los segmentos de MAA presentes en el nanogel.

$$\begin{aligned} \beta F_{qca,net} = & \int_0^{\infty} dr G(r) \frac{\langle \phi^{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} [f(r)(\ln f(r) + \beta \mu_{MAA^-}^0) \\ & + (1 - f(r))(\ln(1 - f(r)) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \end{aligned} \quad (4.6)$$

donde $f(r)$ es el grado de carga de los segmentos MAA en la capa esférica entre r y $r+dr$. $\mu_{MAA^-}^0$ y μ_{MAAH}^0 son los potenciales químicos estándar de las especies desprotonadas y protonadas respectivamente. v_{MAA} es el volumen molecular del segmento de MAA.

El equilibrio químico de las unidades proteicas titulables se considera en el siguiente término del potencial termodinámico:

$$\beta F_{qca,pro} = \int_0^\infty dr G(r) \sum_\tau \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle [g_\tau(r)(\ln g_\tau(r) + \beta \mu_{\tau p}^0) + (1 - g_\tau(r))(\ln(1 - g_\tau(r)) + \beta \mu_{\tau d}^0)] \quad (4.7)$$

en donde $\langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle$ representa la densidad local promedio del segmento titulable τ de la proteína.

El cual es definido como:

$$\langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle = \sum_\theta \int_0^\infty dr' \frac{G(r')}{G(r)} \rho_{pro}(\theta, r') m_\tau(\theta, r', r) \quad (4.8)$$

en donde $m_\tau(\theta, r', r) dr$ nos da el número de segmentos τ de una proteína en su conformación θ con su centro de masa en r' , que ocupan el volumen entre las esferas concéntricas de radios r y $r+dr$.

Nótese que el subíndice τ hace referencia a las unidades/residuos titulables de la proteína, pero estas expresiones son válidas para todos los segmentos de la proteína:

$$\langle \rho_{pro,\lambda}(r) \rangle = \sum_\theta \int_0^\infty dr' \frac{G(r')}{G(r)} \rho_{pro}(\theta, r') m_\lambda(\theta, r', r) \quad (4.9)$$

donde λ describe un segmento arbitrario de la proteína ($\{\tau\} \in \{\lambda\}$).

los subíndices p y d de la ecuación 4.7 representan estados protonado y desprotonado respectivamente de un segmento τ . De este modo $\mu_{\tau p}^0$ y $\mu_{\tau d}^0$ son los potenciales químicos estándar de estos estados respectivamente.

Utilizando el grado de asociación local de protones a los segmentos τ , $g_\tau(r)$,

podemos definir el grado de carga local del segmento $f_\tau(r)$ como:

1. Para unidades ácidas: $g_\tau(r) = 1 - f_\tau(r)$ (los segmentos τ se cargan negativamente)
2. Para unidades básicas: $g_\tau(r) = f_\tau(r)$ (los segmentos τ se cargan positivamente)

La energía electrostática se define:

$$\beta U_{elec} = \int_0^\infty dr G(r) \left[\left(\sum_\gamma \rho_\gamma(r) q_\gamma + \sum_\tau f_\tau(r) \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle q_\tau + f(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi(r) - \frac{1}{2} \beta \epsilon (\nabla \psi(r))^2 \right] \quad (4.10)$$

donde $\psi(r)$ es el potencial electrostático dependiente de la posición, y ϵ la permitividad del medio, q_γ es la carga de la especie móvil γ , q_τ corresponde a la carga del segmento titulable de la proteína y q_{MAA} es la carga de un segmento de MAA.

En este contexto, podemos definir la densidad local de carga:

$$\langle \rho_q(r) \rangle = \sum_\gamma \rho_\gamma(r) q_\gamma + \sum_\tau f_\tau(r) \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle q_\tau + f(r) \frac{\langle \phi^{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (4.11)$$

El siguiente término en el potencial termodinámico se debe a la repulsión estérica, el cual se incorpora a través de la siguiente restricción física.

$$1 = \left[\sum_\gamma \rho_\gamma(r) v_\gamma + \sum_\lambda \langle \rho_{pro,\lambda}(r) \rangle v_\lambda + \sum_i \langle \phi^i(r) \rangle \right], \quad \forall r \quad (4.12)$$

en donde v_λ es el volumen molecular de cada segmento λ que compone a la proteína.

U_{VdW} es la energía de interacción de Van der Waals (VdW). En este sistema se ha asumido que todos los segmentos tienen un carácter hidrofílico. Es decir, las interacciones de VdW entre diferentes pares de segmentos y éstas con moléculas de

agua son similares. Como resultado, la energía de interacción neta VdW representa una constante aditiva a la energía total del potencial y esta contribución puede ser ignorada.

Para completar el gran potencial de la ecuación 4.1, se tiene en cuenta el equilibrio químico de las especies móviles:

$$\begin{aligned} \mu_\gamma N_\gamma + \mu_{pro} N_{pro} = & \int_0^\infty dr G(r) \left[\sum_\gamma \rho_\gamma(r) \mu_\gamma + \mu_{pro} \langle \rho_{pro}(r) \rangle \right. \\ & \left. + \mu_{H^+} \sum_\tau g_\tau \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle + \mu_{H^+} (1 - f(r)) \frac{\langle \phi^{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (4.13)$$

Los primeros dos términos del lado derecho de la ecuación explican el equilibrio químico de las especies móviles γ y de las proteínas dentro de la solución. Los dos últimos términos consideran los iones de hidrógeno ligados a segmentos protonados de la proteína y a segmentos de MAA de la red polimérica.

Finalmente la forma explícita de nuestro gran potencial es expresado:

$$\begin{aligned}
\beta\Omega_{NG} = & \sum_{\gamma} \int_0^{\infty} dr G(r) \rho_{\gamma}(r) (\ln(\rho_{\gamma}(r)v_w) - 1 + \beta\mu_{\gamma}^0) \\
& + \sum_{\theta} \int_0^{\infty} dr G(r) \rho_{pro}(r) (\ln(\rho_{pro}(\theta, r)v_w) - 1 + \beta\mu_{pro}^0) \\
& + \sum_{\alpha} P(\alpha) \ln P(\alpha) \\
& + \int_0^{\infty} dr G(r) \frac{\langle \phi^{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} [f(r)(\ln f(r) + \beta\mu_{MAA-}^0) \\
& \quad + (1-f(r))(\ln(1-f(r)) + \beta\mu_{MAAH}^0)] \\
& + \int_0^{\infty} dr G(r) \sum_{\tau} \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle [g_{\tau}(r)(\ln g_{\tau}(r) + \beta\mu_{\tau p}^0) \\
& \quad + (1-g_{\tau}(r))(\ln(1-g_{\tau}(r)) + \beta\mu_{\tau d}^0)] \\
& + \int_0^{\infty} dr G(r) \left[\left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(r) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(r) \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle q_{\tau} + f(r) \frac{\langle \phi^{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta\psi(r) \right. \\
& \quad \left. - \frac{1}{2} \beta\epsilon (\nabla\psi(r))^2 \right] \\
& + \int_0^{\infty} \beta\pi(r) dr G(r) \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(r) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(r) \rangle v_{\lambda} + \sum_i \langle \phi^i(r) \rangle - 1 \right) \\
& - \int_0^{\infty} dr G(r) \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(r) \beta\mu_{\gamma} + \beta\mu_{pro} \langle \rho_{pro}(r) \rangle + \beta\mu_{H+} \sum_{\tau} g_{\tau}(r) \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle \right. \\
& \quad \left. + \beta\mu_{H+} (1-f(r)) \frac{\langle \phi^{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} \right]
\end{aligned} \tag{4.14}$$

Para esta expresión, 4.14, se ha introducido la restricción de la incompresibilidad del volumen (ecuación 4.12), y se incorpora un multiplicador de Lagrange $\pi(r)$ para garantizar su cumplimiento, el cual representa la presión osmótica del sistema.

El siguiente paso es la búsqueda de las condiciones que minimizan el potencial termodinámico. Esto se logra al derivar respecto de las densidades locales $\rho_{\gamma}(r)$, el

potencial electrostático $\psi(r)$, el grado de carga, tanto de los segmentos provenientes de la proteína; $f_\tau(r)$ como del polímero, $f(r)$, además de la probabilidad de las diferentes conformaciones de la red polimérica $P(\alpha)$ y la densidad local de la proteína $\rho_{pro}(\theta, r)$

En particular la expresión de optimización para el grado de carga, $f(r)$ de los segmentos titulables de la red polimérica que compone al nanogel:

$$\frac{\partial \beta \Omega_{NG}}{\partial f(r)} = 0 \quad (4.15)$$

Obteniéndose:

$$\frac{f(r)}{1 - f(r)} = \left(\frac{a_{H^+}}{k_{a,MAA}^0} \right)^{-1} e^{-\beta q_{MAA} - \psi(r)} \quad (4.16)$$

En donde $a_{H^+} = e^{\beta(\mu_{H^+} - \mu_{H^+}^0)}$ es la actividad del H^+ .

En la expresión anterior, ecuación 4.16, $K_{a,MAA}^0$ es la constante termodinámica del equilibrio ácido-base:

$$k_{a,MAA}^0 = \exp(\beta \mu_{MAA}^0 - \beta \mu_{A^-}^0 - \beta \mu_{H^+}^0) \quad (4.17)$$

Similarmente para los segmentos titulables τ de la proteína:

$$\frac{f_\tau(r)}{1 - f_\tau(r)} = \left(\frac{a_{H^+}}{k_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta q_\tau \psi(r)} \quad (4.18)$$

El exponente ∓ 1 hace la diferencia sobre segmentos ácidos (-) o básicos (+).

Con la constante termodinámica para el equilibrio ácido/base de los segmentos τ es:

$$k_{a,\tau}^0 = \exp(\beta \mu_{\tau p}^0 - \beta \mu_{\tau d}^0 - \beta \mu_{H^+}^0) \quad (4.19)$$

Para las especies libres, su densidad localizada se expresa como:

$$\rho_\gamma(r)v_w = a_\gamma \exp(-\beta\psi(r)q_\gamma) \exp(-\beta\pi(r)v_w) \quad (4.20)$$

En el mismo sentido, para la proteína $\rho(\theta, r)$,

$$\frac{\partial \beta \Omega_{NG}}{\partial \rho(\theta, r)} = 0 \quad (4.21)$$

obtenemos:

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, r)v_w &= \tilde{a}_{pro} \prod_\tau \exp \left[- \int_0^\infty dr' m_\tau(\theta, r, r') \ln f_\tau(r') \right] \\ &\times \prod_\lambda \exp \left[- \int_0^\infty dr' m_\lambda(\theta, r, r') (\beta\psi(r')q_\lambda + \beta\pi(r')v_\lambda) \right] \end{aligned} \quad (4.22)$$

en donde se ha redefinido la actividad de la proteína como:

$$\tilde{a}_{pro} = \exp(\beta\mu_{pro} - \beta\tilde{\mu}_{pro}^0) \quad (4.23)$$

Con

$$\beta\tilde{\mu}_{pro}^0 = \beta\mu_{pro}^0 + \sum_{\tau,a} C_{n,\tau} \beta\mu_{\tau a}^0 + \sum_{\tau,b} C_{n,\tau} \beta(\mu_{H^+} - \mu_{\tau p}^0) \quad (4.24)$$

τ, a y τ, b suman sobre segmentos ácidos o básicos respectivamente. Además se ha definido el número de composición para un segmento k , $C_{n,k}$:

$$\int_0^\infty dr' m_\lambda(\theta, r, r') = C_{n,\lambda} \quad \forall r \quad (4.25)$$

La optimización con respecto a la probabilidad de una configuración α de la red

de polímero

$$\frac{\partial \beta \Omega_{NG}}{\partial P(\alpha)} = 0 \quad (4.26)$$

resulta en:

$$\begin{aligned} P(\alpha) &= \frac{1}{Q} \exp \left[- \sum_i \int_0^\infty dr \beta \pi(r) \phi_r^i(\alpha, r) \right] \\ &\times \exp \left[- \int_0^\infty dr \beta \psi(r) \frac{\phi_r^{MAA}(\alpha, r)}{v_{MAA}} q_{MAA} \right] \\ &\times \exp \left[- \int_0^\infty dr \ln(f(r)) \frac{\phi_r^{MAA}(\alpha, r)}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (4.27)$$

Donde Q es una constante que asegura que $\sum_\alpha P(\alpha) = 1$.

La variación de Ω_{NG} con respecto al potencial electrostático da lugar a la ecuación de Poisson:

$$\epsilon \nabla^2 \psi(r) = - \langle \rho_q(r) \rangle \quad (4.28)$$

Considerando la simetría de nuestro problema:

$$\epsilon \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial \Psi(r)}{\partial r} \right) = - \langle \rho_q(r) \rangle \quad (4.29)$$

Otra restricción física a tener en cuenta en este punto es la electro-neutralidad del sistema, que es:

$$\int_0^\infty dr G(r) \langle \rho_q(r) \rangle = 0 \quad (4.30)$$

Esta restricción se satisface imponiendo las condiciones de contorno adecuadas

al resolver la ecuación 4.29. Estas condiciones de contorno son:

$$\lim_{r \rightarrow \infty} \psi(r) = 0 \quad (4.31)$$

$$\left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=0} = 0 \quad (4.32)$$

Ahora todas las funciones que componen el potencial termodinámico Ω_{NG} se han expresado en términos del potencial electrostático local $\psi(r)$, la presión osmótica dependiente de la posición $\pi(r)$ y algunas cantidades de entrada que incluyen las actividades de las especies libres. Dada la concentración de sal, el pH y la concentración de proteínas en la solución bulk, todas estas actividades se pueden calcular imponiendo la incompresibilidad y la neutralidad de carga a dicha solución y utilizando la condición de equilibrio de la auto-disolución del agua. Entonces, las únicas incógnitas restantes son $\psi(r)$ y $\pi(r)$ valor de r . Estas funciones locales se calculan resolviendo numéricamente las ecuaciones 4.12 y 4.29.

4.2.2. Solución Bulk

La composición química de la solución bulk se encuentra en equilibrio termodinámico con el nanogel. Es decir los potenciales químicos de las especies con movilidad son iguales en cualquier punto del sistema. El cálculo de estas actividades nos proveen las condiciones de entrada o contorno para la solución de nuestro problema. En esta sección, expresamos esas actividades en términos de la composición química de la solución bulk.

La solución bulk puede considerarse como el límite $r \rightarrow \infty$:

$$\begin{aligned} i) \rho_\gamma^b &= \rho_\gamma(r \rightarrow \infty) \\ ii) \pi^b &= \pi(r \rightarrow \infty) \\ iii) f_\tau^b &= f_\tau(r \rightarrow \infty) \end{aligned} \quad (4.33)$$

Además, las condiciones de contorno expresadas en la ecuación 4.32 implican que:

$$\psi^b = \psi(r \rightarrow \infty) = 0 \quad (4.34)$$

En este contexto, para las especies libres (excluyendo la proteína):

$$\rho_\gamma^b v_w = a_\gamma e^{-\beta \pi^b v_w} \quad (4.35)$$

El grado de carga f_τ de los segmentos de la proteína puede escribirse como:

$$\frac{f^b}{1 - f^b} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} \quad (4.36)$$

la densidad de la proteína $\rho_{pro}^b(\theta)$ es:

$$\begin{aligned} \rho_{pro}^b(\theta) v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_\tau \exp [-C_{n,\tau} \ln f_\tau^b] \\ & \prod_\lambda \exp [-C_{n,\lambda} (\beta \pi^b v_\lambda)] \end{aligned} \quad (4.37)$$

donde $C_{n,\lambda}$ es el número de composición para el segmento λ , definido en la ecuación 4.25.

Para la solución bulk, la restricción de incompresibilidad está dada por:

$$1 = \sum_\gamma \rho_\gamma^b v_\gamma + \sum_\lambda \langle \rho_{pro,\lambda}^b \rangle v_\lambda \quad (4.38)$$

y la electro-neutralidad del sistema:

$$\langle \rho_q^b \rangle = \sum_\gamma \rho_\gamma^b q_\gamma + \sum_\tau f_\tau^b \langle \rho_{pro,\tau} \rangle q_\tau = 0 \quad (4.39)$$

Observamos que las expresiones que definen al bulk de la solución quedan definidas por la presión osmótica del bulk π^b . Dicho potencial puede obtenerse con la resolución de las restricciones dadas por las ecuaciones 4.38 y 4.39.

4.2.3. Modelo Molecular: Proteínas

Consideramos la interacción del nanogeles de P(MAA-VA) o P(AH-VA) con tres proteínas diferentes: citocromo c, insulina y mioglobina. Para describir estas moléculas, utilizamos un modelo de grano grueso donde cada residuo de aminoácido se representa mediante una única partícula centrada en la posición del carbono α . La secuencia y posición de todos los carbonos α se toman de la estructura cristalográfica obtenida de la base de datos de proteínas [212]: 2B4Z para el citocromo c [10], IZNI para la insulina [213] y 3RGK para la mioglobina [11].

A cada partícula de grano grueso en este modelo se le asigna un volumen y un pKa (si la unidad es titulable) según el aminoácido que representan; esto se resume en la Tabla 4.1. Estos pKa se toman de datos experimentales y representan valores promedio sobre un gran número de proteínas [9]. En la mayoría de los casos, el pKa de un residuo no se desvía significativamente del valor promedio. Sin embargo, en casos específicos, algunos residuos muestran un pKa diferente.

Utilizando este modelo molecular, la figura 4.1 muestra la carga (número) de las tres proteínas en solución diluida en función del pH. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el cual la carga neta de una proteína es cero. A partir del gráfico, obtenemos los valores 9.65 (9.6 [214], 5.5 (5.3 [215]), 7.15 (7.2 [216]) para el pI del citocromo c, insulina y mioglobina respectivamente; los valores entre paréntesis son los pI de las proteínas reportados experimentalmente.

4.2.4. Modelo Molecular: Red polimérica

Además del modelo de proteína presentado en la sección anterior, necesitamos especificar un modelo molecular para describir la red que compone a nuestro nanogel. Este modelo debe proporcionar un conjunto representativo de configuraciones moleculares de la red polimérica. Una conformación particular de la red se da por la posición espacial de todos sus segmentos. La red del nanogel está compuesta por cadenas poliméricas entrecruzadas de 25 segmentos de longitud. En total, esta red contiene 10054 segmentos. Cada segmento es una representación simplificada de una unidad neutra (VA), un monómero ácido/básico (MAA/AH) o un segmento entrecruzante. La tabla 4.1 incluye el volumen y el pKa (si la unidad es titulable) utilizados

grupo	<i>v</i> (nm ³)	pka	grupo	<i>v</i> (nm ³)	pKa
Ala	0.067		Met	0.124	
Arg	0.148	12.5(+)	Phe	0.135	
Asn	0.096		Pro	0.09	
Asp	0.091	3.5 (-)	Ser	0.073	
Cys	0.086	6.8 (-)	Thr	0.093	
Cys*	0.086		Trp	0.163	
Gln	0.114		Val	0.105	
Glu	0.109	4.2(-)	N-t	—	7.7(+)
GluA4*	0.109	2.62 (-)	C-t	—	3.3 (-)
GluB13*	0.109	2.20(-)	Hem1	0.172	3.8 (-)
GluB21*	0.109	3.71 (-)	Hem2	0.138	
Gly	0.048		AH	0.068	9.5(+)
His	0.118	6.6 (+)	MAA	0.085	4.65(+)
His18*	0.118	2.4 (+)	VA	0.085	
His26*	0.118	2.9 (+)	H ₂ O	0.033	
His33*	0.118	6.35 (+)	OH ⁻	0.033	
Ile	0.124		H ₃ O ⁺	0.033	
Leu	0.124		Na ⁺	0.043	
Lys	0.135	10.5(+)	Cl ⁻	0.047	

Cuadro 4.1: Parámetros de las partículas de grano grueso(residuos de aminoácidos, iones pequeños, moléculas de solvente y segmentos poliméricos) considerados en el modelo molecular que describe a nuestro sistema. se diferencias grupos en los cuales experimentalmente, se ha observado que estos residuos tienen un pKa que difiere significativamente del valor promedio [9]: *Cys** representa un residuo de cisteína en un puente di-sulfuro. Las histidinas con número y * se encuentran en la citocromo c, donde el número indica el orden en la secuencia en la proteína. De manera similar, las glutaminas indicadas de la misma manera y con diferentes pKa ocurren en la secuencia de la insulina [9]. N-t y C-t denotan los grupos terminales de la secuencia, que añaden un pKa adicional a los primeros y últimos segmentos, respectivamente. El complejo hemo, presente tanto en la citocromo c como en la mioglobina [10, 11], se describe utilizando las unidades de grano grueso Hem1 y Hem2. El complejo contiene dos de cada una de estas unidades.

para describir estas unidades.

La red del nanogel posee una topología tipo diamante, donde los segmentos entrecruzantes se colocan en la posición original de los átomos de carbono. Los entrecruzantes se conectan a 4 cadenas poliméricas. La construcción de esta red se realizó en primera instancia por la translación tridimensional de la celda unidad en donde

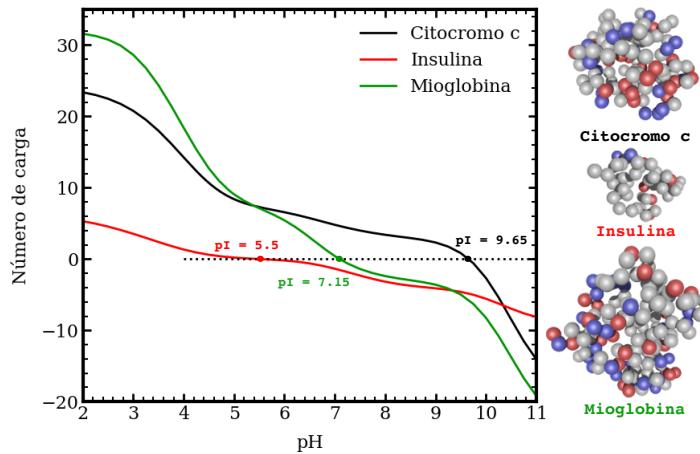


Figura 4.1: Izquierda: Número de carga de las proteínas en una solución diluida en función del pH (curvas sólidas); los círculos llenos marcan el punto isoeléctrico, donde la carga neta de la proteína es cero. La representación de grano grueso de las proteínas se ilustra a la derecha, donde los residuos de aminoácidos se representan mediante una esfera única (rojo: residuo ácido; azul: residuo básico; gris: residuos de carga neutral).

todas las cadenas poliméricas se encuentran alargadas, como segundo paso se realizó un corte esférico de radio R_{cut} medido desde el centro de masa de la estructura. El valor de R_{cut} se hace de tal manera de obtener aproximadamente 10000 segmentos en total.

Originalmente, todas las cadenas poliméricas se conectan a dos entrecruzantes, pero como resultado de este procedimiento, el corte esférico, algunas cadenas quedan lindantes en la superficie de la red, es decir conectadas a un solo entrecruzante. La mayoría de estas cadenas *colgantes* superficiales son más cortas que 25 segmentos. En conjunto, estas cadenas contienen el 22 % del número total de segmentos. Para generar las diferentes conformaciones moleculares de la red del polímero, se ha realizado simulaciones de dinámica molecular usando GROMACS 5.1.2 [217].

Consideramos diferentes nanogeles sensibles al pH que contienen grupos ácidos (MAA) o básicos (AH), y evaluamos tres topologías diferentes para la distribución espacial de estos segmentos funcionales, que se esquematizan en la Figura 4.2: (i) una estructura *aleatoriamente funcionalizada* (Random Functionalization: RF) don-

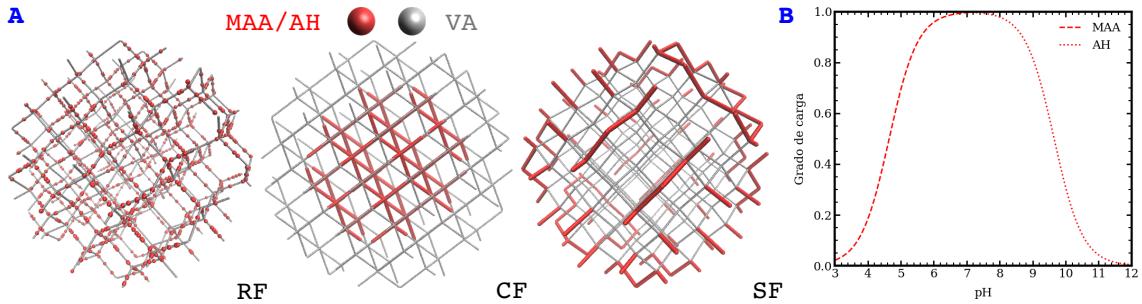


Figura 4.2: A: Los nanogeles estan formados por cadenas de copolímeros entrecruzadas con un segmento de carga neutral (VA: alcohol vinílico) y una unidad funcional (ya sea MAA: ácido metacrílico o AH: alilamina). Este esquema ilustra las tres distribuciones de los co-monómeros consideradas; de izquierda a derecha: RF: una distribución aleatoria de grupos funcionales en toda la red; CF: las unidades funcionales ocupan el centro/núcleo de la red; SF: solo las cadenas colgantes libres en la superficie de la red están funcionalizadas con unidades sensibles al pH. B: Gráfico del grado de carga ideal dependiente del pH de la unidad funcional aislada en solución diluida.

de los segmentos sensibles al pH se distribuyen aleatoriamente en toda la red, (ii) una estructura *funcionalizada en el núcleo* (Core Functionalization: CF), donde las unidades sensibles al pH ocupan el centro del nanogel, y (iii) una estructura *funcionalizada en la superficie* (Surface Functionalization: SF) en la cual solo las cadenas colgantes en la superficie de la red son ionizables.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Caraterización del nanogel

En esta primera instancia, se examinará el comportamiento (la respuesta) de los nanogeles en función del pH en ausencia de proteínas.

Para cuantificar el tamaño de un nanogel, utilizaremos el radio medio de la partícula, R , que se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:

$$R = \frac{4}{3} \frac{\int_0^\infty dr G(r) r \langle \phi(r) \rangle}{\int_0^\infty dr G(r) \langle \phi(r) \rangle} \quad (4.40)$$

donde r es la distancia desde el centro de masa de la red polimérica (como se ha

mencionado en la sección 4.2.1 se asume simetría radial); $\langle \phi(r) \rangle$ es la fracción de volumen local de la red polimérica; los corchetes angulares indican el promedio de ensamble sobre las diferentes conformaciones de la red (ver ecuación 4.5); $G(r) = 4\pi r^2$ es el área de la superficie de una esfera de radio r .

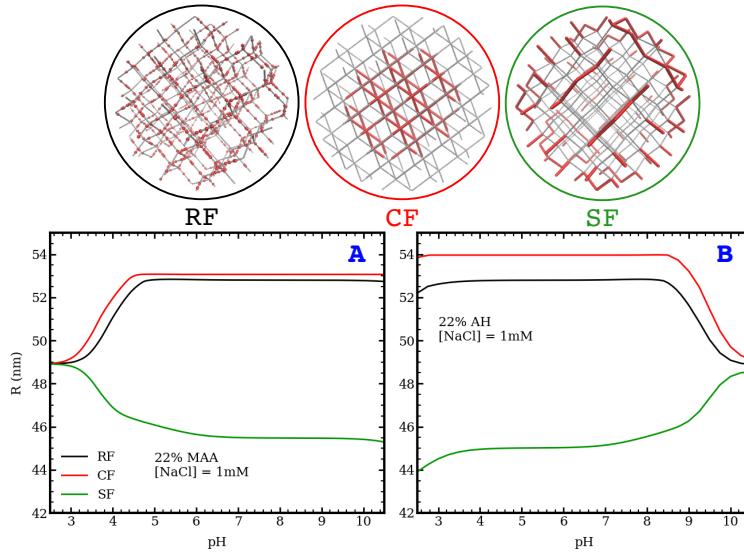


Figura 4.3: Radio promedio, R , en función del pH para nanogeles de copolímero MAA-VA (panel A) y AH-VA (panel B). Se consideran tres estructuras diferentes en cada caso donde las unidades funcionales (MAA/AH) se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la red polimérica (RF), ocupan el centro de la red (CF), o modifican las cadenas colgantes dentro del polímero, interfaz de solución (SF). En todos los casos, el 22 % de los segmentos de estas redes son sensibles al pH; La concentración de NaCl es $10^{-3} M$.

La Figura 4.3 muestra la relación entre el radio promedio (R) y el pH para las tres estructuras diferentes: RF, CF y SF. En el panel A, se describe un nanogel con segmentos ionizables de MAA, mientras que en el panel B se presenta un nanogel basado en AH. En ambos casos, la concentración de sal es de 1 mM y la fracción de monómero funcional (MAA o AH) es del 22 %. Los nanogeles basados en MAA, funcionalizados al azar (RF) y en el núcleo (CF), se hinchan a medida que aumenta el pH (panel A). Esto se debe a que los segmentos MAA se desprotonan y adquieren carga eléctrica a medida que el pH aumenta (ver Figura 4.2B), lo que resulta en repulsiones electrostáticas dentro de la red. Para reducir estas interacciones repulsivas, la distancia entre las unidades cargadas de MAA debe aumentar, lo que provoca

un aumento en el tamaño de la red para separar estos segmentos cargados. En resumen, la expansión neta de la red ocurre debido al aumento de la distancia espacial entre las unidades cargadas de MAA, como resultado de la necesidad de disminuir la repulsión entre ellas.

Por otro lado, la red funcionalizada en su superficie con MAA muestra un comportamiento de expansión completamente diferente, como se puede observar en la Figura 4.3A. Este nanogel se deshincha a medida que las unidades titulables se cargan al aumentar el pH. Para explicar este comportamiento contrario a lo esperado, hemos examinado la distribución local de segmentos dentro de estas estructuras en diferentes condiciones. Hemos utilizado la distribución radial de los monómeros funcionales para los nanogeles MAA. Esta cantidad se define como:

$$\lambda_{MAA}(r) = 4\pi r^2 \langle \phi^{MAA}(r) \rangle \quad (4.41)$$

en donde $\langle \phi_{MAA}(r) \rangle$ da la fracción de volumen local de los segmentos de ácido metacrílico (ver ecuación 4.5) Hay que tener en cuenta que $\lambda_{MAA}(r)dr$ da el número de segmentos MAA en la capa esférica entre r y $r + dr$ medido desde el centro del nanogel. Además, la integral $\int_0^\infty \lambda_{MAA}(r)dr$ da el número total de monómeros MAA en la red.

La Figura 4.4 muestra la distribución radial de los segmentos de MAA para las diferentes redes consideradas. En cada caso, se incluyen resultados para una solución de pH 3, donde los segmentos MAA tienen carga neutra, y pH 7, donde están completamente cargados (ver Figura 4.2B). Para una funcionalización de tipo aleatoria (Panel A), la distribución de los segmentos MAA se desplaza hacia la interfaz de solución del nanogel a medida que la red se carga eléctricamente al aumentar el pH. Este desplazamiento ocurre para reducir las repulsiones electrostáticas entre los segmentos MAA cargados.

Como resultado, toda la distribución del polímero también se extiende, incluidas las unidades VA de carga neutra (ver Figura 4.5). El mismo comportamiento tiene lugar para una funcionalización central (Panel B), aunque por diseño, los segmentos MAA en esta red, ya sea que estén cargados o no, es más probable que ocurran a distancias más cortas del centro del nanogel en comparación con las otras estructuras.

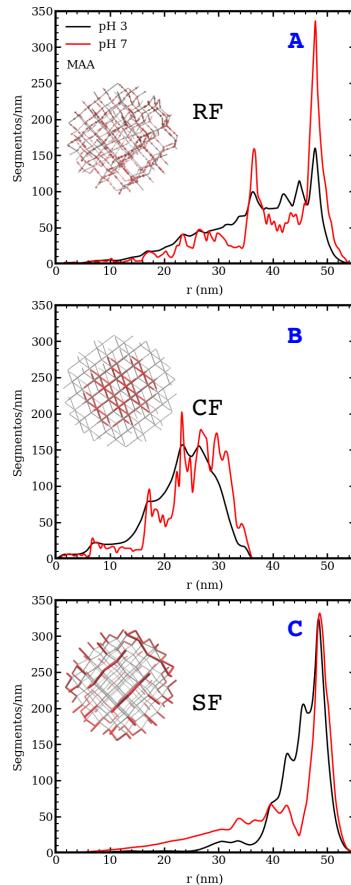


Figura 4.4: Distribución radial de segmentos MAA, $\lambda_{MAA}(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a un nanogel de MAA-VA diferente que tienen una funcionalización de red particular y 22 % MAA. Estos grupos funcionales están completamente protonados (sin carga) a pH 3 y completamente disociados (cargados) a pH 7.

El desplazamiento de segmentos a valores más altos de r observado en los paneles A y B de la Figura 4.4 explica el aumento del tamaño promedio del nanogel con pH observado en la Figura 4.3A para las estructuras RF y CF.

Por otro lado, la Figura 4.4C muestra que la distribución superficial de segmentos de MAA se desplaza hacia el interior cuando la red se carga con el aumento de pH. Para reducir las repulsiones dentro de la red, las cadenas libres (de la superficie) de PMAA, que se asientan en la superficie del nanogel a un pH bajo, también intentan ocupar el volumen dentro de la red cuando están cargadas. Este desplazamiento hacia

el interior de la distribución de polímero (Figura 4.5C) explica el comportamiento de compresión del nanogel tipo SF con el aumento del pH observado en la Figura 4.3A. Nótese, sin embargo, que a pesar de este desplazamiento parcial hacia el interior de la red, la posición más probable de los segmentos MAA siempre es la interfaz polímero-solución para soluciones de pH alto y bajo. Al empujar toda la estructura hacia el interior del nanogel, los segmentos de MAA quedan igualmente expuestos a la solución

El comportamiento de los nanogeles compuestos por AH es análogo al de las redes basadas en MAA, pero en respuesta al cambio de pH en la dirección opuesta. Los grupos AH se protonan y se cargan positivamente con la disminución del pH (ver figura 4.2B). Para nanogeles de AH funcionalizados aleatoriamente y en su núcleo, este aumento en la carga eléctrica con la disminución del pH provoca un desplazamiento hacia afuera de la distribución del segmento. Del mismo modo que se observó para los nanogeles compuestos por MAA, lo que explica la expansión observada en la figura 4.3B; mientras tanto, para la estructura tipo SF, el deswelling con la disminución del pH (figura 4.3B) es consistente con un desplazamiento hacia adentro del polímero

La figura 4.5 muestra la distribución de todos los segmentos que componen la red polimérica de los diferentes nanogeles. Al igual que en la figura 4.4 presentamos la distribución para dos diferentes valores de pH. Que corresponden a los estados protonado (pH 3) y desprotonado (pH 7) de los segmentos de MAA. En los paneles A y B se observa un mayor número de segmentos a valores más altos de r al cargarse el nanogel. Observándose el swelling reportado en la figura 4.3A para lo nanogeles tipo RF y CF. En cambio, el desplazamiento hacia dentro de los segmentos de la red polimérica al transicionar de un estado cargado a uno descargado en la distribución superficial (SF) (figura 4.5C) explica la disminución del tamaño del nanogel observada en la figura 4.3A.

El comportamiento de los nanogeles compuestos por AH es análogo al de las redes basadas en MAA, pero en respuesta al cambio de pH en la dirección opuesta. Los grupos AH se protonan y se cargan positivamente con la disminución del pH (ver Figura 4.2B). Para nanogeles de AH funcionalizados aleatoriamente y en su núcleo, este aumento en la carga eléctrica con la disminución del pH provoca un

desplazamiento hacia afuera de la distribución del segmento, similar a lo observado para los nanogeles compuestos por MAA. Esto explica la explicación del nanogel observada en la Figura 4.3B. Por otro lado, para la estructura tipo SF, la disminución del tamaño del nanogel con la disminución del pH que se observa en la Figura 4.3B es consistente con un desplazamiento de los segmentos que componen la red hacia el interior del nanogel.

En la figura 4.5 se muestra la distribución de todos los segmentos que componen la red polimérica de los diferentes nanogeles (en este caso basados en MAA). Al igual que en la Figura 4.4, presentamos la distribución para dos valores diferentes de pH, correspondientes a los estados protonado (pH 3) y desprotonado (pH 7) de los segmentos de MAA. En los paneles A y B se observa un aumento en la cantidad de segmentos a valores más altos de r a medida que el nanogel se carga eléctricamente. Este comportamiento es consistente con el aumento del radio del nanogel observado en la figura 4.3 para las estructuras RF y CF. Por otro lado, el desplazamiento hacia el interior de los segmentos de la red polimérica al transicionar de un estado cargado a uno descargado en la distribución superficial (SF) explica la disminución del tamaño del nanogel observada en la figura 4.3B.

4.3.2. Adsorción de proteínas en nanogeles basados en MAA

En la sección anterior, se evaluó el impacto de la funcionalización de la red y la composición química en la respuesta del nanogel a las variaciones de pH en ausencia de proteínas. La reorganización de los segmentos de la red polimérica es resultado de los cambios en el pH, con una dependencia en la elección de diseño, es decir, la distribución de unidades funcionales dentro de la red.

En esta parte, se mostrará el impacto de esta reorganización de la red polimérica en el nivel de adsorción de proteínas en diferentes nanogeles, así como la distribución espacial de las proteínas adsorbidas. En particular, se presentará el análisis de la adsorción del citocromo c y mioglobina en las diferentes estructuras de nanogeles basados en MAA. Además, se realizarán estudios de adsorción de insulina, pero en este caso con nanogeles que contienen AH como segmento protonable.

Para estos estudios, se considerará un nanogel polimérico con centro de masa centrado en $r = 0$ en contacto con una solución acuosa de proteína con concentración

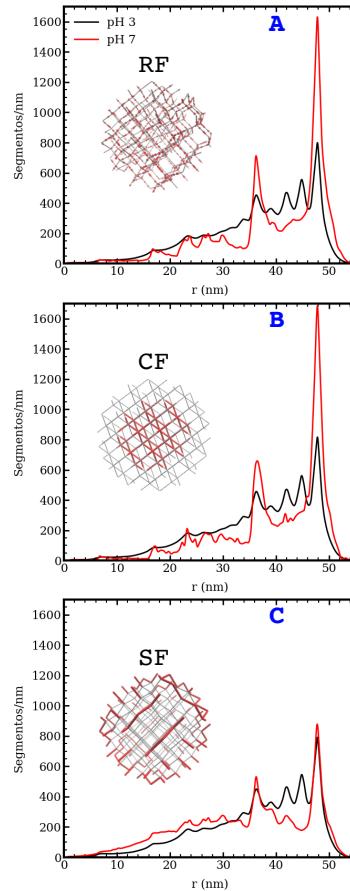


Figura 4.5: Distribución radial de todos los segmentos que componen la estructura del nanogel a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a una funcionalización diferente de la red polimérica.

definida. El número de proteínas adsorbidas dentro de la capa esférica entre r y $r + dr$ se define como la cantidad en exceso.

$$\langle N(r) \rangle dr = 4\pi r^2 (\langle \rho(r) \rangle - \rho_{bulk}) dr \quad (4.42)$$

en donde $\langle \rho(r) \rangle$ y $\rho_{pro}^b = \lim_{r \rightarrow \infty} \langle \rho(r) \rangle$ son respectivamente la densidad (en número) local y en el bulk de la proteína. La integración de $\langle N(r) \rangle$ produce la *adsorción en exceso* (en adelante, simplemente la adsorción) que cuantifica el número de proteínas incorporadas a la red polimérica,

$$\Gamma = \int_0^{\infty} \langle N(r) \rangle dr \quad (4.43)$$

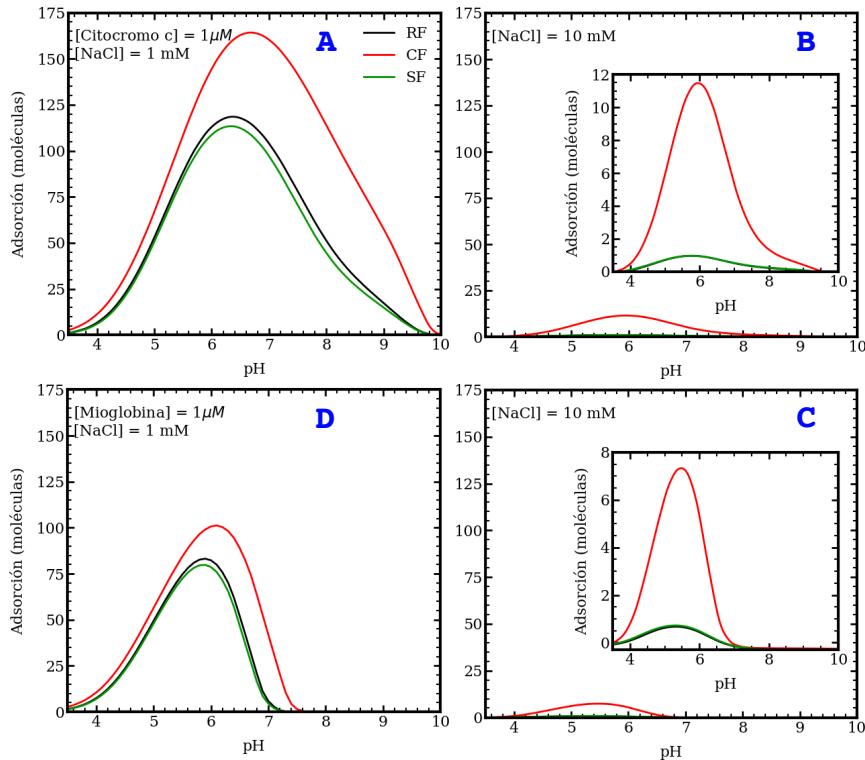


Figura 4.6: Gráficos de la adsorción en exceso Γ de citocromo c (paneles A y B) y mioglobina (paneles C y D) a nanogeles MAA-VA en función del pH. La concentración de sal es $10^{-3} M$ en los paneles de la izquierda (A y C) y $10^{-2} M$ en los paneles de la derecha (B y D); En los paneles B y C Se muestra en el inset un zoom de la adsorción. Estos nanogeles tienen 22 % MAA; la concentración de proteína es $10^{-6} M$ en cada caso.

La Figura 4.6 muestra la adsorción de soluciones, en dilución infinita, de citocromo c (paneles superiores, A y B) y mioglobina (paneles inferiores, C y D) en nanogeles de MAA-VA con diferentes funcionalizaciones en su red. El pH se utilizó como variable independiente en estos cálculos, y también se evaluó el efecto de la concentración de NaCl al comparar diferentes paneles en la misma línea. Los nanogeles de la Figura 4.6 contienen un 22 % de MAA, lo que implica que todos los

segmentos en las cadenas superficiales de la red son MAA.

Se puede observar que la adsorción de proteínas muestra un comportamiento no monotónico en función del pH, alcanzando un máximo en la región entre pH 5 y 7. Este comportamiento está influenciado por la concentración de sal y la proteína específica considerada. Esta respuesta se puede explicar mediante las interacciones electrostáticas y el comportamiento de protonación de los segmentos de MAA y de las proteínas. A medida que el pH aumenta por encima del pKa intrínseco de MAA (4.65), las unidades ácidas del polímero se disocian, cargando negativamente la red. Por encima del pKa del MAA, pero por debajo del punto isoeléctrico de cada proteína, esta adquieren carga positiva. En estas condiciones, las interacciones atractivas entre las proteínas y la red polimérica promueven la adsorción. Sin embargo, en ambos extremos de la escala de pH, estas interacciones son bajas: a pH bajo, el MAA está protonado y tiene carga neutra, mientras que a pH alto, las proteínas tienen carga negativa. En ambos casos, esto conduce a una ausencia de adsorción ($\Gamma \approx 0$) o incluso a una desorción ($\Gamma < 0$).

En general, la adsorción de citocromo c y la de mioglobina son cualitativamente similares. Sin embargo, existen dos diferencias principales: (i) la magnitud de la adsorción ,el citocromo c se adsorbe significativamente más y (ii) el rango de pH en el que ocurre la adsorción (el citocromo c se adsorbe en un rango de pH más amplio debido a su punto isoeléctrico más alto, 9.65 en comparación con 7.15 para la mioglobina). Esto implica que, bajo condiciones similares, el nivel máximo de adsorción de citocromo c se alcanza a un pH ligeramente más alto.

En cuanto a las otras configuraciones, la Figura 4.6 muestra que la distribución central de los segmentos MAA conduce a una adsorción significativamente mayor en la mayoría de las condiciones. Este comportamiento se debe a que dicha distribución de segmentos MAA permite una incorporación más efectiva de la proteína adsorbida con carga eléctrica opuesta. Por otro lado, el comportamiento de adsorción en las redes funcionalizadas aleatoriamente y en la superficie es sorprendentemente similar en el rango de pH y concentraciones de sal estudiadas, tanto para las diferentes proteínas como entre sí. Aunque las distribuciones de unidades funcionales entre las estructuras RF y SF difieren significativamente a pH bajo, se vuelven relativamente similares entre sí después de la reorganización del nanogel a un pH más alto cuando

las unidades MAA se cargan. Esto explica la adsorción comparable de proteínas observada en los nanogeles RF y SF (comparece los paneles A y C de la Figura 4.4).

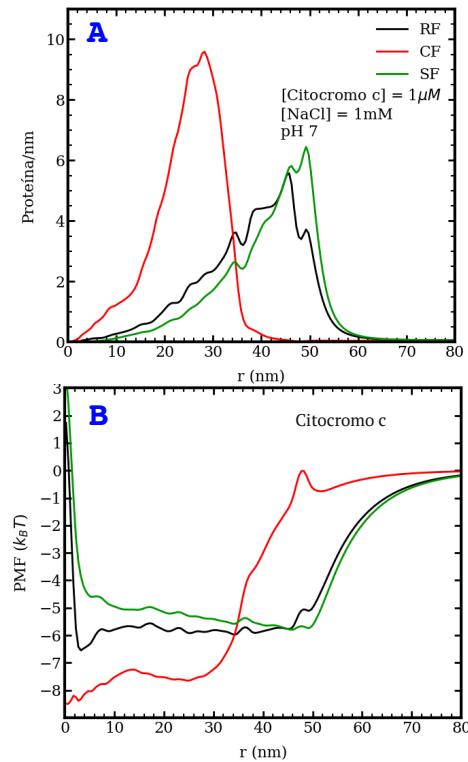


Figura 4.7: Panel A: Gráfico de la distribución radial de las moléculas de citocromo c, $\langle N(r) \rangle$, en función de su posición, para los nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones. Estas partículas tienen 22 % MAA, el pH es 7, la concentración de proteína es de $10^{-6} M$ y la concentración de NaCl es de $10^{-3} M$. El panel B muestra el potencial de la fuerza media, $PMF(r)$, que actúa sobre el citocromo c para las mismas condiciones que el panel A.

Para explicar el mejor rendimiento de los nanogeles MAA funcionalizados en su núcleo para la incorporación de proteínas, se muestra en la Figura 4.7A la distribución radial de las moléculas de citocromo c en función de la distancia r al centro de masa del nanogel. La solución tiene un pH de 7 y una concentración de NaCl de 1 mM, que corresponden aproximadamente a las condiciones de máxima adsorción de esta proteína en la Figura 4.6A. Existe una clara correlación entre la distribución de los grupos funcionales a lo largo de la red polimérica y la ubicación del citocromo c adsorbido.

Cuando el centro de la red está funcionalizado, la mayor probabilidad de encontrar las proteínas ocurre en el interior del nanogel, entre 20 y 30 nm. En la figura 4.7A, el número máximo de proteínas adsorbidas se produce a $r = 28$ nm para 1 mM de NaCl. Coherentemente, el perfil de distribución de los grupos MAA cargados muestra un máximo suave en esta región espacial (ver Figura 4.4B, curva roja). Es decir, las proteínas adsorbidas se ubican donde pueden estar rodeadas de segmentos de la red con carga eléctrica opuesta. Curiosamente, el mismo fenómeno ocurre en la adsorción a los nanogeles RF y SF. Las distribuciones de MAA cargados muestran un máximo pronunciado cerca de la superficie del nanogel, entre 45 y 50 nm (ver curvas rojas en la figura 4.4, paneles A y C). La figura 4.7A muestra que el citocromo c se adsorbe preferentemente en estas regiones de alta densidad de MAA, y por ende una alta densidad de carga eléctrica.

Al comparar las distribuciones de citocromo c dentro de los nanogeles RF y SF en la Figura 4.7A, observamos que los perfiles son relativamente similares entre sí. Como era de esperar, si solo se funcionaliza la superficie, el perfil de la proteína se desplaza hacia la interfaz polímero-solución.

Para cuantificar aún más la interacción con los nanogeles, utilizamos el potencial de fuerza media (PMF) que actúa sobre una proteína a una distancia r desde el centro de la red polimérica. El PMF se define como:

$$\text{PMF}(r) = -k_B T \ln \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\rho_{\text{bulk}}} \quad (4.44)$$

donde $\lim_{r \rightarrow \infty} \text{PMF}(r) = 0$, lo que indica que la interacción nanogel-proteína desaparece cuando están suficientemente lejos.

La Figura 4.7B muestra el PMF que actúa sobre el citocromo c en las mismas condiciones que en el panel A, pero para las tres diferentes funcionalizaciones de nanogeles. En el interior del nanogel, la interacción de la proteína con la estructura CF es la más fuerte, aproximadamente $-8k_B T$ en el rango espacial de $r = 0$ a 30 nm. Esta interacción es de relativo corto alcance, ya que disminuye significativamente por encima de $r > 40$ nm.

Por otro lado, las interacciones del citocromo c con los nanogeles RF y SF se extienden más lejos, hasta 55 – 60 nm. En el interior del nanogel, estas interacciones

son más débiles que aquellas de la estructura CF. La energía libre de adsorción es aproximadamente $-6k_B T$, y se mantiene casi constante dentro del nanogel RF.

Para el nanogel funcionalizado en la superficie, sin embargo, el mínimo del PMF también es de alrededor de $-6k_B T$, y ocurre junto a la interfaz polímero-solución a $r \approx 50$ nm. A diferencia de la estructura RF, esta interacción no es constante dentro del nanogel.

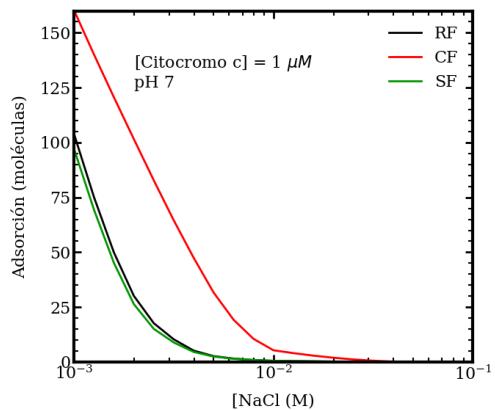


Figura 4.8: Gráfico de la adsorción en exceso Γ del citocromo c en función de la concentración de sal a pH 7 para nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones de red que contienen un 22 % de MAA; la concentración de proteína es de $10^{-6} M$.

Una característica de la adsorción de proteínas que nos falta discutir es el efecto de la concentración de sal. Tanto para el citocromo c como para la mioglobina, la figura 4.6 muestra que la incorporación de proteínas dentro de los diferentes nanogeles se ve significativamente mejorada al disminuir la concentración de sal en la solución. Para caracterizar mejor este comportamiento, la figura 4.8 presenta la adsorción de citocromo c en función de la concentración de NaCl a pH 7. Este gráfico muestra que todas las funcionalizaciones de la red presentan un comportamiento cualitativamente similar, con una disminución drástica en la adsorción entre 1 y 10 mM de NaCl. A 100 mM, todos los nanogeles muestran una adsorción cercana a cero o negativa, dado que es una adsorción por exceso esto último significa que hay menos proteína en el interior del nanogel que en la solución bulk.

Cuando la concentración de sal en la solución es alta, tanto los iones Na^+ como los iones Cl^- se encuentran en altas concentraciones dentro del nanogel. Estos

iones opacan las atracciones electrostáticas entre las cargas positivas de la proteína y las cargas negativas del nanogel, que son la fuerza impulsora para la adsorción de proteínas. En efecto, estas atracciones se vuelven de corto alcance y no son lo suficientemente fuertes como para dar lugar a una adsorción significativa, de ocurrir dicho fenómeno. Por otro lado, si la concentración de NaCl es menor, estas interacciones electrostáticas se ven menos apantalladas y efectivamente tienen un alcance mayor, lo que favorece la adsorción de proteínas. Por lo tanto, la disminución de la concentración de sal mejora la adsorción. Este comportamiento ha sido observado en experimentos; los brushes de polielectrolíticos muestran un aumento en la adsorción de proteínas a baja concentración de sal [218–221].

Al considerar vehículos para aplicaciones de liberación de proteínas, nuestros resultados sugieren que las mejores condiciones para la encapsulación corresponden a una baja concentración de sal. Los perfiles de adsorción de la figura 4.8 son cualitativamente similares para las tres funcionalizaciones, pero el número de proteínas dentro del nanogel siempre es significativamente mayor para la estructura CF. Esta característica puede ser crítica en el diseño de vehículos de liberación para un objetivo que tenga una concentración de sal intermedia. El CF incorpora más proteínas en las mismas condiciones, pero puede no ser capaz de liberarlas si el objetivo tiene una concentración de sal intermedia. Para estas condiciones, la funcionalización aleatoria podrá liberar toda su carga.

4.3.3. Adsorción de insulina en nanogeles basados en AH

La insulina no se adsorbe a los nanogeles de MAA de la sección 4.3.2. Esto se debe a que el punto isoeléctrico de la insulina y el pKa del MAA están cerca entre sí (5.5 y 4.65 respectivamente), lo que significa que para soluciones donde la proteína tiene carga positiva, el nanogel tiene carga neutra, y si el nanogel tiene carga negativa, también la tiene la proteína. En este contexto, se investiga la adsorción de insulina en un nanogel de alilamina, que tiene carga positiva por debajo de su pKa de 9.5, superponiéndose con el rango donde la insulina tiene carga negativa. Aparte de los monómeros funcionales, la estructura de estas redes de copolímero AH-VA es la misma que la de los nanogeles de MAA-VA descritos anteriormente.

La figura 4.9A muestra la adsorción de insulina en nanogeles basados en AH con

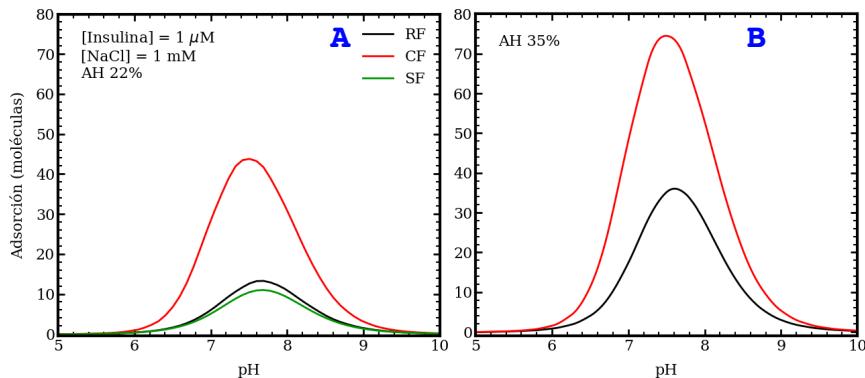


Figura 4.9: Gráficos de las moléculas de insulina adsorbidas, Γ , en función del pH para nanogeles AH-VA con diferentes funcionalizaciones. El contenido de AH es del 22 % para las redes poliméricas del panel A y del 35 % para las del panel B (este último grado de funcionalización no se alcanza para el nanogel SF). La concentración de sal es 10^{-3} M de NaCl y $[Insulina] = 10^{-6}$ M.

diferentes funcionalizaciones espaciales. Una vez más, hemos considerado redes con un 22 % de monómeros sensibles al pH para poder incluir resultados para el nanogel SF, cuyas cadenas colgantes están completamente compuestas de AH. Las principales características de este gráfico son cualitativamente similares a las de la adsorción de citocromo c y mioglobina en los nanogeles de MAA (ver figura 4.6). Es decir, la insulina muestra una adsorción no monotónica en función del pH de la solución. Además, observamos que la distribución central de los segmentos de AH captura más insulina que las funcionalizaciones aleatorias o superficiales. Los nanogeles RF y SF muestran perfiles de adsorción dependientes del pH relativamente similares. Finalmente, una mayor concentración de sal tiene un efecto crítico en la magnitud de la adsorción de insulina, que disminuye significativamente debido al aumento del apantallamiento de las atracciones electrostáticas entre la red y la proteína por los iones móviles

La figura 4.9A muestra que los nanogeles basados en AH son efectivos para encapsular insulina. Sin embargo, a pesar de las similitudes cualitativas entre los perfiles de adsorción de esta figura y los de citocromo c y mioglobina (4.6A y C), vemos que la cantidad de moléculas de insulina capturadas por los nanogeles de AH es significativamente menor que la de las otras proteínas capturadas por los nanogeles basados en MAA. Por esta razón, también hemos evaluado el efecto del grado de funcionali-

zación de la red de polímero para mejorar la adsorción de proteínas. La figura 4.9B presenta la adsorción de insulina para nanogeles con un 35 % de segmentos de AH. En este caso, la estructura funcionalizada en la superficie no se incluye porque no hay suficientes segmentos en las cadenas colgantes para llegar a ese porcentaje. Un mayor contenido de AH promueve una mayor adsorción, como se puede observar al comparar ambos paneles de la figura 4.9. Una vez más, el nanogel CF adsorbe más insulina que la red RF (más del doble de proteínas para las condiciones de estos cálculos).

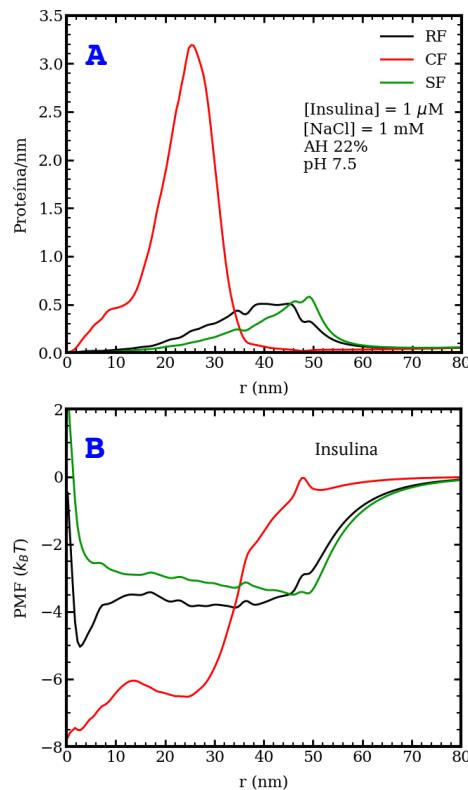


Figura 4.10: A: Gráfico de la distribución local de moléculas de insulina, $\langle N(r) \rangle$, en función de la posición para nanogeles AH-VA con un 22 % de segmentos sensibles al pH en diferentes configuraciones de red. El pH es 7.5, la concentración de insulina es de 10^{-6} M y la de NaCl es de 10^{-3} M . B: Potencial de fuerza media, $PMF(r)$ actuando sobre la proteína, en función de la posición para las mismas condiciones que el panel A.

A continuación, describimos la distribución de moléculas de insulina dentro de los nanogeles basados en AH. La figura 4.10A muestra cómo se disponen espacialmente

las proteínas adsorbidas dentro de los diferentes nanogeles basados en AH con un grado de funcionalización del 22%; utilizamos ese grado de funcionalización para comparar los resultados de los nanogeles CF, RF y SF. El pH de estos resultados corresponde al máximo de adsorción de la figura 4.9A. La adsorción de insulina en el nanogel CF no solo es significativamente mayor que la adsorción en los nanogeles RF y SF, sino que también ocurre en una posición más profunda dentro de la estructura. La posición más probable de una molécula de insulina se encuentra alrededor de $r = 25$ nm para el nanogel CF, mientras que esta posición se desplaza a alrededor de 40-45 y 50 nm para las estructuras RF y SF, respectivamente.

Para los nanogeles basados en MAA, la figura 4.7A muestra diferencias relativamente menores entre las distribuciones de citocromo c en los nanogeles RF y SF. Estas diferencias se acentúan ligeramente al observar la adsorción de insulina en los nanogeles AH-VA, como se muestra en la figura 4.10A. La distribución de insulina se desplaza hacia el interior de la red en el nanogel modificado aleatoriamente en comparación con la funcionalización superficial, donde las proteínas tienen más probabilidades de ocupar la vecindad inmediata de la interfaz nanogel-solución. Los perfiles de distribución de insulina siguen siendo relativamente similares para estas dos estructuras.

El panel B de la figura 4.10 muestra el potencial de fuerza media que actúa sobre las moléculas de insulina en las mismas condiciones que el panel A. La interacción atractiva en la insulina adsorbida varía desde -8 hasta $-6k_BT$ en el interior de la estructura CF y desde -5 hasta $-4k_BT$ en el nanogel RF. En el nanogel SF, el potencial presenta un mínimo de $-4k_BT$ en la superficie y luego aumenta monótonamente a medida que r disminuye dentro del gel. En general, los resultados de esta sección muestran, una vez más, que el diseño de la red (mediante la síntesis del nanogel) proporciona una herramienta para controlar la distribución y localización de proteínas dentro del nanogel.

4.4. Conclusiones

En este capítulo investigamos la adsorción de proteínas en nanogeles poliméricos con diferentes funcionalizaciones espaciales y sensibles al pH. Se desarrolló y aplicó

una teoría termodinámica basada en un modelo molecular. El enfoque se centró en la influencia de las interacciones electrostáticas, por lo cual se describieron tres proteínas con diferentes puntos isoeléctricos (insulina, mioglobina y citocromo c) utilizando un modelo molecular basado en sus estructuras cristalográficas. Exploramos las propiedades de los nanogeles sensibles al pH modificados con mónomeros de ácido metacrílico o de alilamina. Se consideraron tres configuraciones diferentes, con los segmentos sensibles al pH distribuidos al azar, en el centro o en la superficie de la red del nanogel.

Se examinó el comportamiento de estos nanogeles en función del pH cuando no hay proteínas presentes en la solución. Los resultados muestran que, para los nanogeles basados en ácido metacrílico, tanto los estructurados con distribución distribuidos al azar como los funcionalizados en el núcleo se expanden con el aumento del pH, debido a la desprotonación y carga de los segmentos de ácido metacrílico, lo que conduce a repulsiones electrostáticas intra-red. Por otro lado, la red de ácido metacrílico funcionalizada en la superficie se comprimen a medida que las unidades titulables se cargan con el aumento del pH. Este comportamiento contra-intuitivo se puede explicar al observar la distribución local de los segmentos que componen la red dentro de estas estructuras en diferentes condiciones. La reorganización de la red del nanogel en respuesta a cambios en el pH depende de la funcionalización espacial específica. Se realizó el mismo análisis para los nanogeles basados en alilamina y se obtuvieron resultados análogos, con la dirección de los estímulos invertida; la diferencia clave radica en el comportamiento de sus unidades sensibles al pH: mientras que el ácido metacrílico es ácido, la alilamina está cargada a pH bajo y es neutra a pH alto.

Se evaluó la adsorción de citocromo c y mioglobina en las diferentes estructuras de nanogeles basados en MAA, y se encontró que la adsorción de proteínas es una función no monotónica del pH. Los detalles cuantitativos de los perfiles de adsorción dependen de la concentración de sal y de la proteína específica. La respuesta al pH puede explicarse en términos de las interacciones electrostáticas y el comportamiento de protonación tanto de los segmentos de MAA como de los residuos de proteína. La reorganización de los segmentos de las cadenas poliméricas en los nanogeles como resultado de los cambios de pH depende de la configuración espacial de las unidades funcionales dentro de la red, lo que también regula el nivel y la localización de

las proteínas adsorbidas. También hemos investigado la adsorción de insulina en nanogeles de alilamina. Los resultados muestran que los nanogeles basados en AH son eficaces para encapsular insulina, y un mayor grado de funcionalización resulta en una mayor adsorción.

En el contexto del uso de nanogeles sensibles al pH para la liberación de proteínas, los resultados enfatizan la importancia de considerar la distribución espacial de las unidades funcionales en la red de nanogeles durante la síntesis. Este factor de diseño no solo afecta la respuesta mecánica macroscópica del nanogel y su nivel de adsorción de proteínas, sino que también influye en la localización de las proteínas adsorbidas dentro del nanogel. La funcionalización interna cerca del centro de la red polimérica conduce a una mayor encapsulación de proteínas, pero estos adsorbatos son menos accesibles para las interacciones superficiales con un determinado target. Por otro lado, la distribución aleatoria de unidades sensibles al pH ofrece un mejor rendimiento si la entrega requiere interacciones proteína-objetivo. La funcionalización superficial del nanogel proporciona una mejor disponibilidad de proteínas en la interfaz nanogel-objetivo, aunque potencialmente puede implicar una síntesis más compleja.

La dependencia de la adsorción de proteínas de la concentración de sal puede aprovecharse en el diseño de portadores funcionales para la entrega de proteínas. Estos hallazgos indican que es mejor encapsular proteínas a bajas concentraciones de sal y liberarlas a altas concentraciones salinas, donde interactúan más débilmente con el nanogel. Si el entorno objetivo tiene una concentración de sal intermedia, un nanogel con una distribución aleatoria de monómeros sensibles al pH es más adecuado. En conclusión, los resultados de este capítulo demuestran el papel crítico que desempeña la funcionalización de la red y la composición química en el control de la respuesta del nanogel a las variaciones de pH y en la adsorción de proteínas en estos materiales. Esta información es valiosa para el diseño de nanogeles sensibles al pH como vehículos para la encapsulación, el transporte y la administración de proteínas.

Capítulo 5

Soluciones coloidales

5.1. Introducción

Las soluciones coloidales de nanogeles poliméricos han ganado atención significativa debido a sus propiedades únicas y aplicaciones potenciales en varios campos. Los nanogeles son partículas poliméricas reticuladas con dimensiones en el rango coloidal [222]. Estas partículas combinan las propiedades de los polímeros y de los coloides, como su capacidad de dispersar la luz, que les confiere propiedades ópticas únicas o su capacidad de adsorber solvente en el que se encuentran, permitiéndoles estabilidad en diferentes medios; en particular en medios biológicos, les permite ser utilizados en aplicaciones biomédicas [136]. Son partículas blandas, deformables y permeables con una estructura formada por una red polimérica. [136]. En solución, pueden absorber el solvente y expandir su volumen significativamente hacia un estado de baja densidad de polímero [4, 223]. La concentración de estas soluciones de nanogeles, además posee influencia en su estabilidad, como su solubilidad en agua y tamaño [224].

Estas soluciones son capaces de responder a diversos estímulos externos como la temperatura, la presión, el pH, la fuerza iónica y la presencia de diferentes biomoleculas. La complejidad de esta respuesta a estímulo de las soluciones, a su vez, genera una mayor complejidad en cualquier dispersión compuesta por ellas [136]. En este sentido además de conocer como responden los nanogeles a diversos estímulos, es necesario estudiar cómo se ve modificada la respuesta de estas partículas cuando forman

soluciones coloidales. En particular la capacidad de responder a diferentes estímulos externos viene mediada por la composición de la red polimérica. Los nanogeles compuestos por cadenas de polímero que contienen segmentos ácidos como ácido acrílico o metacrílico (AA y MAA, respectivamente) se expanden o comprimen en respuesta a cambios en el pH de la solución [33, 137]. De la misma forma, nanogeles compuestos polímeros termosensibles, por ejemplo, PNIPAm, experimentan una transición de fase volumétrica cuando se calientan por encima de una temperatura característica [35, 36]. Este comportamiento se origina porque estos polímeros son insolubles en agua por encima de cierta temperatura crítica mínima de solución (LCST, por sus siglas en inglés) [37]. Este tipo de transiciones, tanto en respuesta al pH como a la temperatura, son reversibles. Es decir, se aplica el estímulo externo en una dirección provocando la expansión de la partícula (swelling), la aplicación del estímulo en dirección opuesta resulta en la compresión del nanogel (deswelling). La incorporación de co-monómeros termosensibles y con respuesta al pH a la red polimérica permite la obtención de nanogeles multi-responsivos, los cuales son atractivos para el diseño de sistemas inteligentes que funcionen en diferentes áreas de la tecnología [135]. Se han estudiado microgeles de copolímeros de NIPAm y ácido metacrílico (MAA) [58–60], encontrándose que su temperatura de cambio de fase depende del pH de la solución, la concentración de sal y la fracción de monómero ionizable en las cadenas de polímero [54–56, 59, 61–63]. La incorporación del co-monómero de MAA proporciona un mecanismo controlado por el pH para la adsorción/liberación de moléculas de carga de signo opuesto, lo que hace que los microgeles multiresponsivos sean atractivos para el diseño de diversos sistemas, entre ellos la administración de medicamentos [67]. En otros trabajos [225, 226] se han enfocado en el estudio de la arquitectura y composición de los hidrogeles, lo que permite adaptar estas partículas para que posean propiedades específicas. Del mismo modo se han estudiado soluciones coloidales, algunos estudios muestran a los nanogeles como partículas esféricas que interactúan únicamente con un potencial de núcleo duro, es decir, esferas duras [223]. Alziyadi and Denton [227] utilizaron simulaciones de dinámica molecular con una teoría de Poisson-Boltzmann para estudiar microgeles cargados superficialmente. En otros estudios, [225, 228], se ha hecho énfasis en soluciones con concentraciones altas de microgeles, en las cuales las partículas se empaquetan densamente y forman una fase

cristalina o amorfa. Esta capacidad de comprimirse y formar diferentes fases de los nano/microgeles se convierte en un aspecto clave que influye en las interacciones a nivel macroscópico. Todas estas propiedades únicas de los nanogeles poliméricos, incluida su estabilidad coloidal, los convierten en candidatos prometedores para una amplia gama de aplicaciones tales como biosensores [20, 21], ingeniería de tejidos [22, 23], regeneración ósea [24], materiales biomiméticos [25, 26], entre muchas otras aplicaciones biomédicas [27].

El capítulo 3 se dedicó al desarrollo de una teoría termodinámica para el entendimiento de microgeles con respuesta a la temperatura, pH y concentración de sal. Los resultados presentados en dicho capítulo describen la fisicoquímica detrás de los fenómenos del swelling de estos microgeles impulsada por el pH, la dependencia no monótona del tamaño de partícula con la concentración de sal. El aumento de la salinidad de la solución puede provocar tanto expansión como compresión de la red polimérica, dependiendo del rango de concentración de sal. En este nuevo capítulo damos un paso más adelante mostrando un estudio sistemático de soluciones coloidales compuestos por nanogeles de P(NIPAm-co-MAA). Para este propósito se hará uso de una metodología basada en un algoritmo Monte Carlo en el cual se combinan potenciales de interacción partícula-partícula y de termodinámica desarrollada en [4].

En este nuevo capítulo se incorporan potenciales entre partículas de la solución de tal forma de estudiar los efectos de la concentración de nanogeles en la solución de los mismos. Estos potenciales buscan incorporar la naturaleza de los nanogeles de trabajo: su permeabilidad, capacidad de absorber solvente y adquirir carga eléctrica. Por un lado, se agrega el potencial de Hertz, el cual tiene en cuenta la elasticidad de los nanogeles, lo que permite describir su capacidad de deformarse. El potencial de Yukawa es un potencial de interacción electrostática entre dos partículas. Se puede utilizar para describir la interacción electrostática entre dos nanogeles poliméricos, que pueden tener carga eléctrica. El potencial de Yukawa tiene en cuenta la carga eléctrica de los nanogeles y las condiciones del medio en el que se encuentran, en particular la fuerza iónica del medio. El uso de estos potenciales permite describir los efectos que tiene la concentración de nanogeles sobre la respuesta a estímulo, como lo son el pH, la temperatura y la concentración salina del medio.

5.2. Metodología

Se realizó un estudio sistemático de la comportamiento de soluciones de nanogeles, variando la concentración salina, el pH y la concentración de partículas. Además, se estudió el efecto de la temperatura sobre los nanogeles. En las siguientes secciones se describen los potenciales de interacción entre partículas y el potencial termodinámico que da origen a la energía intramolecular.

5.2.1. Potencial termodinámico intramolecular

La energía libre interna de cada nanogel se calcula en base al potencial termodinámico desarrollado por Pérez-Chávez et al. [4] que tiene en cuenta la elasticidad de la red polimérica, la energía libre química dada por los segmentos titulables (segmentos de MAA), la energía libre asociada a la entropía de mezcla de los iones que componen la solución, la energía por interacciones electrostáticas internas o con el solvente, así como la energía generada por efectos de repulsión estérica. Es decir, la fisicoquímica relevante del nanogel

Para obtener este potencial termodinámico, desarrollamos un modelo de dos fases. La primera fase está ocupada por nuestro nanogel, cuya red polimérica esta compuesta por poli(NIPAm-co-MAA) (P(NIPAm-MAA)). Esta fase se denota por NG . La fase nanogel se encuentra en contacto con una solución acuosa (fase 2, denotada por s), en la cual están presentes las moléculas de agua, hidronio e hidróxido, así como también los iones de prevenientes de la sal del medio (K^+ y Cl^-). Con este modelo, podemos controlar variables externas como la temperatura T y la composición de la solución, es decir, el pH y la concentración de sal. Bajo estas condiciones, un nanogel aislado asume un radio R y, con ello, un volumen $V = \frac{4}{3}\pi R^3$. El potencial termodinámico cuyo mínimo produce las condiciones de equilibrio dentro de la fase de nanogel es un semi gran potencial, Ω_{NG} .

$$\begin{aligned} \Omega_{NG} = & - TS_{mez} + F_{qca,MAA} + F_{ela} \\ & + U_{elec} + U_{ste} + U_{VdW} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} N_{\gamma} \end{aligned} \quad (5.1)$$

En donde S_{mez} es la entropía de traslación (y mezcla) de las especies libres en la fase del nanogel: moléculas de agua (w), hidronio (H_3O^+) e iones de hidróxido (OH^-), y cationes de sal (+) y aniones (-). Hemos considerado una sal monovalente, KCl , completamente disociada en iones de potasio y cloruro.

$$-\frac{S_{mez}}{k_B} = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \quad (5.2)$$

en donde $\beta = \frac{1}{k_B T}$, T es la temperatura del sistema y k_B es la constante de Boltzmann. La densidad numérica de la especie γ es ρ_{γ} y μ_{γ}^0 es su potencial químico estándar, v_w es el volumen de una molécula de agua. Además $\gamma \in \{w, H_3O^+, OH^-, +, -\}$.

$F_{qca,MAA}$ es la energía libre química que describe la protonación de equilibrio de las unidades de MAA.

$$\beta F_{qca,MAA} = \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA-}^0) + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \quad (5.3)$$

donde ϕ_{MAA} es la fracción de volumen que ocupan estos segmentos (dentro del volumen del nanogel aislado), siendo v_{MAA} su volumen, y f es el grado de disociación del mismo. La fracción de volumen de los segmentos MAA cargados es $f\phi_{MAA}$, y la de las unidades protonadas (o sin carga eléctrica) es $(1-f)\phi_{MAA}$. Los potenciales químicos estándar son μ_{MAA-}^0 y μ_{MAAH}^0 para las especies desprotonadas (cargadas) y protonadas, respectivamente. Se define como segmento a las unidades químicas que componen las cadenas de la red polimérica (MAA y NIPAm).

La energía libre elástica que describe la libertad conformacional de la red polimérica es F_{ela} :

$$\beta F_{ela} = \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch}} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \quad (5.4)$$

En donde N_{seg} es el número total de segmentos en la red de polímero y n_{ch} es el número de segmentos por cadena de polímero o *longitud de cadena*. La constante

de elasticidad en esta energía es proporcional al cociente $\frac{N_{seg}}{n_{ch}}$, que representa el número total de cadenas de polímero en el nanogel. El radio del nanogel seco es R_0 , que satisface:

$$\frac{4}{3}\pi R_0^3 = V_0 = N_{seg} \left(x_{MAA}v_{MAA} + x_{NIPAm}v_{NIPAm} \right) \quad (5.5)$$

donde V_0 es el volumen de la partícula seca; x_{MAA} y x_{NIPAm} son la fracción de los segmentos MAA y NIPAm en el nanogel, respectivamente. El número total de segmentos MAA es $x_{MAA}N_{seg}$ y el de unidades NIPAm es $x_{NIPAm}N_{seg}$, estos últimos con un volumen v_{NIPAm} . Los nanogeles que consideramos aquí satisfacen $x_{NIPAm} = 1 - x_{MAA}$.

U_{elec} y U_{ste} representan, respectivamente, las energías que resultan de las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas.

$$\beta U_{elec} = \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi_{MG} \quad (5.6)$$

donde q_{γ} y q_{MAA} son la carga eléctrica de las moléculas γ y de los segmentos desprotonados de MAA, respectivamente. El potencial electrostático dentro de la fase de nanogel es ψ_{NG} . En la fase solución el potencial electrostático es nulo $\psi_s = 0$

Se impone una restricción de electro-neutralidad del microgel, que puede expresarse como:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} = 0 \quad (5.7)$$

Las interacciones estéricas se incorporan como una segunda restricción al sistema, la cual consiste en que el volumen de la fase nanogel está completamente ocupado por los segmentos de la red y las especies químicas libres.

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} = 1 \quad (5.8)$$

donde v_γ es el volumen molecular de la especie γ , y la fracción de volumen de cada componente de la red es:

$$\phi_{MAA} = N_{seg} \frac{x_{MAA} v_{MAA}}{\frac{4}{3}\pi R^3} \quad (5.9)$$

$$\phi_{NIPAm} = N_{seg} \frac{x_{NIPAm} v_{NIPAm}}{\frac{4}{3}\pi R^3} \quad (5.10)$$

U_{VdW} es la contribución que describe las interacciones efectivas polímero-solvente; para este trabajo se ha realizado la siguiente aproximación:

$$U_{VdW} = U_{NIPAm-w} + U_{MAA-w} \quad (5.11)$$

en donde $U_{NIPAm-w}$ incorpora la transición hidrofílica-hidrofóbica de PNIPAm al aumentar la temperatura por encima de su LCST. Del mismo modo U_{MAA-w} hace cuenta de la interacción entre los segmentos de MAA y agua. Para el presente potencial intramolecular se ha considerado a los segmentos de MAA completamente hidrofílicos y por tanto $U_{MAA-w} = 0$

$$\beta U_{VdW} = U_{NIPAm-w} = \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \quad (5.12)$$

Este término modela la respuesta de PNIPAm a los cambios de temperatura a través de un parámetro de interacción polímero solvente, χ , que depende de la temperatura y la fracción de volumen de NIPAm, ϕ_{NIPAm} . Según Afroze et al. [161], este parámetro de Flory-Huggins se puede expresar como:

$$\begin{aligned} \chi(T, \phi_{NIPAm}) &= g_0(T) + g_1(T)\phi_{NIPAm} \\ &\quad + g_2(T)\phi_{NIPAm}^2 \end{aligned} \quad (5.13)$$

con

$$g_k(T) = g_{k0} + \frac{g_{k1}}{T} + g_{k2}T \quad (5.14)$$

para $k = 0, 1, 2$, los coeficientes son: $g_{00} = -12,947$, $g_{02} = 0,044959 \text{ K}^{-1}$, $g_{10} = 17,920$, $g_{12} = -0,056944 \text{ K}^{-1}$, $g_{20} = 14,814$, $g_{22} = -0,051419 \text{ K}^{-1}$ y $g_{k1} \equiv 0$. [161]

Finalmente, la sumatoria sobre γ , en ecuación 5.1 expresa el equilibrio químico con la fase de solución, donde μ_γ y N_γ son el potencial químico y el número de moléculas de la especie γ , respectivamente. Hay que tener en cuenta que Ω_{NG} es un semi-gran potencial porque la fase del nanogel puede intercambiar cada una de estas moléculas con la fase de solución, mientras que la red de polímero está confinada dentro de la primera.

$$\sum_{\gamma} N_{\gamma} \mu_{\gamma} = \sum_{\gamma} V \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} + \beta \mu_{H^+} (1-f) V \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \quad (5.15)$$

El segundo término en la derecha de la ecuación 5.15 representa a los protones asociados a unidades de MAA; a saber, $\mu_{H^+} \equiv \mu_{H_3O^+}$ se conjuga con el número total de protones,

$$N_{H_3O^+} + N_{MAAH} = V \left(\rho_{H_3O^+} + (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \right) \quad (5.16)$$

Con todo esto la forma explícita del potencial termodinámico es:

$$\begin{aligned}
& \beta \frac{\Omega_{NG}(R)}{V} = \\
& \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
& + \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA^-}^0) \\
& \quad + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \\
& + \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch} V} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \\
& + \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi_{NG} \\
& + \beta \pi_{NG} \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} - 1 \right] \\
& + \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \\
& - \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} - \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}}
\end{aligned} \tag{5.17}$$

En donde π_{NG} es la presión osmótica de la fase nanogel, introducida como un multiplicador de Lagrange para imponer la restricción de incompresibilidad, ecuación 5.8.

Finalmente el potencial termodinámico esta escrito explícitamente en función de las densidades de todas las especies, el grado de carga del MAA y el radio del nanogel, $\Omega_{NG}(R) \equiv \Omega_{NG}(\{\rho_{\gamma}\}, f, R)$. Para obtener las expresiones de $\{\rho_{\gamma}\}$ y f de tal forma que sean consistentes con el equilibrio termodinámico único del nanogel aislado, minimizamos Ω_{NG} respecto a estas cantidades, y sujeto a las restricciones ecuaciones 5.8 y 5.7; dicho procedimiento conduce a:

$$\rho_{\gamma} v_w = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_{NG} v_{\gamma} - \beta \psi_{NG} q_{\gamma}) \tag{5.18}$$

$$\frac{f}{1-f} = \frac{K_{MAA}^0}{a_{H^+}} \exp(-\beta \psi_{NG} q_{MAA}) \tag{5.19}$$

donde $a_{\gamma} = e^{\beta \mu_{\gamma} - \beta \mu_{\gamma}^0}$ es la actividad de la especie γ . La constante de equilibrio ter-

modinámico que describe la protonación/desprotonación de los segmentos de MAA es:

$$K_{MAA}^0 = e^{\beta\mu_{MAAH}^0 - \beta\mu_{MAA}^0 - \beta\mu_{H^+}^0} \quad (5.20)$$

Esta cantidad es posible calcularla directamente a partir del pKa del ácido.

Si se considera un valor de R , las únicas incógnitas restantes para determinar $\Omega_{NG}(R)$ son la presión osmótica, π_{NG} y el potencial electrostático, ψ_{NG} . Estas dos cantidades se pueden calcular resolviendo numéricamente la incompresibilidad y la electro-neutralidad de la fase nanogel, ecuación 5.8 y ecuación 5.7, respectivamente. Para resolver estas ecuaciones utilizamos un método híbrido de Powell sin jacobiano y un código FORTRAN desarrollado en nuestro grupo de investigación. En resumen, es posible calcular la variación de $\Omega_{NG}(R)$ en función del radio del nanogel R , y encontrando su mínimo calcular el valor del radio óptimo del nanogel para unas condiciones dadas (pH, temperatura, concentración de sal).

Una descripción más detallada del calculo del potencial termodinámico intramolecular puede encontrarse en la referencia [4] y en el capítulo 3

5.2.2. Energía intermolecular: Interacción entre nanogeles.

Para el estudio de las soluciones de nanogeles hemos considerado la energía atribuida a las interacciones entre los mismos. Este aporte aporte energético originado por la interacción entre las partículas que componen la solución viene dado por dos tipos de potenciales: el primero de estos toma en cuenta la capacidad de deformación de los nanogeles, potencial de Hertz, y el segundo que describe la interacción electrostática mediada por la composición de la solución, potencial de Yukawa. La suma de las energías dada por estos potenciales se define como U_{inter} .

$$U_H + U_Y = U_{inter} \quad (5.21)$$

en donde U_H y U_Y representan al potencial de Hertz y el el potencial de Yukawa respectivamente. En las siguientes líneas describiremos a los dos potenciales considerados que componen a U_{inter} .

Potencial de Hertz

El primer potencial, U_H , cuantifica las interacciones elásticas efectivas entre cada par de partículas. Es decir la energía originada por la deformación de los nanogeles, cualidad intrínseca de nuestras partículas. El potencial de Hertz permite que los nanogeles puedan deformarse al momento de interaccionar entre ellos, en nuestro modelo implica un pequeño solapamiento de las partículas, lo cual hace al sistema más flexible respecto a un modelo de esferas duras.

$$\beta u_{ij}^H(r) = \left(\frac{1-r}{a_i + a_j} \right)^{5/2} \times b_{ij} \quad (5.22)$$

En donde a_i y a_j corresponde a los radios de las partículas i y j respectivamente y siendo r la distancia entre sus centros de masas. b_{ij} es la constante de interacción entre las partículas i y j . Esta constante se define para cada par de partículas:

$$b_{ij} = \frac{8}{15} \left[\frac{1-v_i^2}{Y_i} + \frac{1-v_j^2}{Y_j} \right]^{-1} \times (a_i + a_j)^2 \sqrt{a_i a_j} \quad (5.23)$$

en donde v_i y v_j es el radio de Poisson para cada nanogel. El radio de Poisson es una medida de cómo se contrae un material cuando se estira. Se define como la razón entre la deformación transversal y la deformación longitudinal, este generalmente oscila entre 0.3 y 0.5. Un valor de v de 0.5 indica que el polímero no experimenta cambios de volumen al ser estirado [229]. Por otro lado el módulo de Young Y es un parámetro que mide la rigidez de un material y se define como la razón entre el esfuerzo y la deformación longitudinal cuando el material está sometido a una carga [230]. La teoría de escalado para geles poliméricos en buenos solventes [231, 232] predice que este módulo es proporcional a la temperatura, el tamaño y composición del gel (número de segmentos, densidad de entrecruzante, etc).

$$Y \sim \frac{T N^*}{a^3} \quad (5.24)$$

en donde T es la temperatura del sistema a el radio del nanogel y N^* hace referencia

al número de segmentos/densidad de entrecruzamiento.

Potencial de Yukawa

El potencial de Yukawa describe las interacciones electrostáticas considerando la composición del medio, en particular de la fuerza iónica. El potencial de Yukawa fue previamente utilizados para el estudio de las propiedades estructurales de suspensiones de microgeles iónicos Weyer and Denton [233], polímeros estrellas.[234]. Para nuestro sistema el potencial de Yukawa cuantifica las repulsiones electrostáticas originadas por la carga adquirida de los nanogeles debido a la desprotonación de los monomeros de MAA que compone a cada partícula.

De forma explícita se define el potencial de Yukawa en dos partículas como:

$$\beta u_{ij}^Y(r) = l_B q_i q_j \frac{e^{\kappa(a_i + a_j - r)}}{(1 + \kappa a_i)(1 + \kappa a_j)} \frac{e^{-\kappa r}}{r} \quad (5.25)$$

En donde q_i y q_j son las cargas netas que poseen los nanogeles i y j respectivamente. a_i , a_j y r se definen de la misma forma que en la ecuación 5.22. El valor κ corresponde a la constante de apantallamiento de Debye, y l_B a la constante de Bjerrum, siendo estas últimas dos variables las que consideran las propiedades del medio en la que se encuentran inmersos los nanogeles. En particular, sobre la constante de apantallamiento de Debye nos dice que una concentración alta de sal, y con ello de sus iones, se traduce en un mayor apantallamiento de las cargas eléctricas interactuantes de los nanogeles. Obteniéndose interacciones de corto alcance. De forma contraria, a menores concentraciones de iones, las interacciones entre nanogeles se vuelven de largo alcance, debido al menor apantallamiento.

Energía intermolecular

Al considerar la naturaleza de cada potencial, Hertz y Yukawa, podemos considerar su efectividad en función de la distancia r que separa a un par de partículas a_i y a_j .

$$U_{inter}(r) = \begin{cases} U_H & \text{if } r \leq a_i + a_j \\ U_Y & \text{if } r > a_i + a_j \end{cases} \quad (5.26)$$

en dónde el potencial de Hertz solo actúa en casos de superposición de partículas $r \leq a_i + a_j$ y Yukawa para interacciones por fuera del solapamiento. Finalmente se definen explicitamente U_H y U_Y como:

$$U_H = \frac{1}{2} \sum_{i,i \neq j}^{Np} \beta u_{ij}^H \quad (5.27)$$

$$U_Y = \frac{1}{2} \sum_{i,i \neq j}^{Np} \beta u_{ij}^Y \quad (5.28)$$

siendo estos la suma sobre todos los pares de partículas i, j que interactúan en la solución.

5.2.3. Simulaciones Monte Carlo

El modelado de las soluciones se realizó utilizando el método de Monte Carlo. Este se basa en la evaluación de diferentes estados o configuraciones del sistema de trabajo a través de la generación de números aleatorios.

En este capítulo, se trabaja con soluciones de nanogeles en la cual un cambio de configuración consiste en el movimiento y cambio de tamaño que puede ser un aumento o disminución del radio de una partícula seleccionada al azar. Este esquema de trabajo puede visualizarse en la figura 5.1 en la cual se muestra un paso del algoritmo propuesto. Una partícula, en el estado **A**, de todas las presentes en la solución es cambiada de posición, y en este caso, se disminuye su tamaño, obteniéndose el estado **B**.

La probabilidad de aceptar o no dichos cambios en el sistema viene dado por:

$$P = \min\{e^{-(\Delta U_{inter} + \Delta \Omega_{intra})}, 1\} \quad (5.29)$$

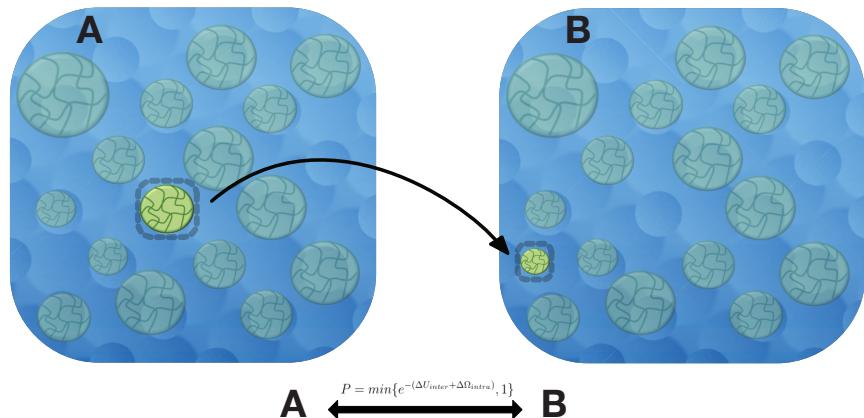


Figura 5.1: Esquema de un paso en el algoritmo de Metropolis-MonteCarlo. El paso de un estado **A** a uno **B** esta mediado por el cambio de energía entre ambas configuraciones.

en donde ΔU_{inter} y $\Delta \Omega_{intra}$ son los cambios en energía de los estados inicial y final.

De la expresión, ecuación 5.29, puede notarse que, si el cambio de energía es negativo, es decir, se pasa de un estado menos estable a uno energéticamente más estable, este paso es aceptado automáticamente. Se obtiene una probabilidad de 1.

Si el cambio de energía es desfavorable, es decir, $\Delta U_{inter} + \Delta \Omega_{intra} > 0$, la probabilidad de aceptarlo es menor a uno. En este caso, se sortea un número aleatorio y, si este es menor o igual a la probabilidad de aceptación, el paso se acepta. De lo contrario, se rechaza.

Se define para obtener la probabilidad de aceptar o no un paso de la simulación:

$$\begin{aligned}\Delta \Omega_{intra} &= \Omega(R_B) - \Omega(R_A) \\ \Delta U_{inter} &= U_{inter,B} - U_{inter,A}\end{aligned}\tag{5.30}$$

en donde $\Omega(R_B)$ y $\Omega(R_A)$ es la energía intramolecular para un nanogel con radio R_B y radio R_A provenientes de los estados **B** y **A** respectivamente. Del mismo modo se define ΔU_{inter} , como la diferencia de energía intermolecular de los estados **A** y **B**.

5.3. Nanogel de P(NIPAm-MAA) en solución diluida: fluctuación de volumen

El estudio de las soluciones de nanogeles necesita un previa caracterización y comprensión de los sistemas aislados, en particular nos interesa caracterizar la fluctuación en volumen que pueden tener estos sistemas al varias las condiciones de su entorno. Es posible sustraer esta información a partir del potencial termodinámico de un nanogel aislado en solución.

La respuesta a estímulo se estudió en detalle en la referencia [4], donde además de observar los cambios en el pH, temperatura y concentración de sal, se estudia cómo son modificadas sus propiedades con la estructura del microgel.

El nanogel considerado en este estudio posee $N_{seg} = 10^4$ segmentos con $n_{ch} = 100$ segmentos por cadena, las cuales tienen un 35 % de MAA en su estructura polimérica, $x_{MAA} = 0,35$. El 65 % restante está compuesto por monómeros de NIPAm.

En la figura 5.2, se observa el potencial termodinámico asociado a un nanogel aislado en función de su radio. Las curvas presentadas corresponden a tres concentraciones salinas. El pH del sistema es 4.65, el cual coincide con el pKa intrínseco del monómero de MAA aislado. La temperatura para este sistema es de 25°C. De cada una de las curvas se obtiene el mínimo local/total de la energía intramolecular de un nanogel aislado. Este mínimo energético corresponde al radio óptimo del nanogel aislado. Se puede notar que hay un aumento en el radio óptimo del nanogel a medida que disminuye la concentración salina.

Bajo condiciones de pH 4.65, hay una fracción de segmentos de MAA cargados eléctricamente dentro de la red polimérica; en consecuencia, esta se expande para disminuir las repulsiones electrostáticas. Dicho efecto se magnifica con la disminución de la concentración de sal, la cual proporciona contraiones que apantallan las cargas.

Este resultado fue reportado en [4] y discutido en el capítulo 3 sobre el rol que cumple la concentración salina como estímulo de los hidrogeles poliméricos.

5.3.1. Fluctuación en Volumen

Fluctuación de volumen es una variación del volumen de un sistema, que se produce debido a la pequeños cambios en la temperatura del sistema. Son una medida

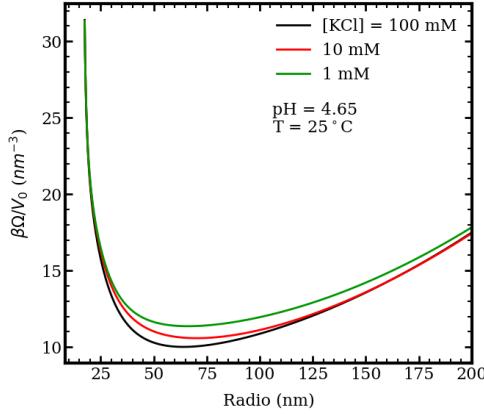


Figura 5.2: Energía libre de un nanogel aislado en función del tamaño del mismo. Las curvas corresponden a diferentes condiciones de pH. La concentración salina es 1 mM y la temperatura 25°C.

de la inestabilidad del tamaño, en nuestro caso, de un nanogel. A mayor fluctuación, mayor es la inestabilidad. Se puede calcular la fluctuación en volumen mediante [235]:

$$\frac{\Delta V}{V} = \sqrt{\frac{k_B T}{V} \kappa_T} \quad (5.31)$$

en donde ΔV es la varianza del volumen del nanogel que se define como:

$$\Delta V = \sqrt{\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2} \quad (5.32)$$

Además, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura del sistema y κ_T es la incompresibilidad isotérmica. Es una medida de la resistencia a la compresión del sistema. A mayor κ_T , mayor rigidez. Se define como la relación entre la variación de presión y volumen de un fluido a temperatura constante, considerando nuestro potencial termodinámico, Ω_{NG} , se puede obtener la siguiente forma:

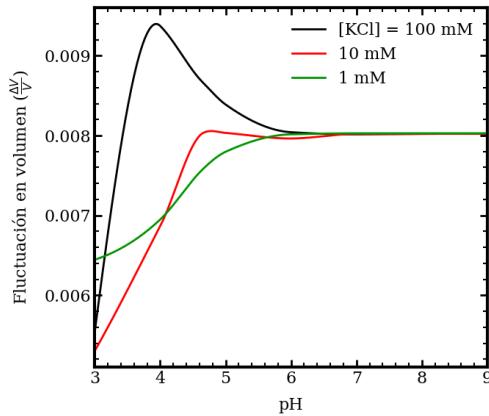


Figura 5.3: Gráfico de la fluctuación en volumen de un nanogel aislado. El nanogel esta compuesto por 2×10^5 segmentos (monómeros) repartidos en 200 cadenas de 1000 cadenas cada una

$$\begin{aligned}\kappa_T &= -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \\ &= \frac{1}{V} \left(\frac{\partial^2 \Omega_{NG}}{\partial V^2} \right)_T^{-1} \\ \kappa_T &= 12\pi R_{eq} \left(\frac{\partial^2 \Omega_{NG}}{\partial R^2} \right)_{T,R=R_{eq}}^{-1}\end{aligned}\quad (5.33)$$

en la cual R_{eq} hace referencia al radio de equilibrio, es decir al mínimo de las curvas de la energía Ω_{NG} , presentadas en 5.2. Todas las demás variables fueron previamente definidas en la sección 5.2.2

En base a estas consideraciones, se confeccionó la figura 5.3. En esta figura, se observa la fluctuación de un nanogel aislado en función del pH de la solución. Se presentan curvas correspondientes a tres condiciones salinas: 1, 10 y 100 mM en KCl. La temperatura es de 25°C, condiciones en las cuales el PNIPAm posee un comportamiento hidrofílico. En estas condiciones, las fluctuaciones mostradas en esta figura no se ven afectadas por la presencia de este co-monómero. En términos generales, se observa que la fluctuación del sistema a las diferentes condiciones presentadas es de muy baja magnitud, del orden de 10^{-3} . Sin embargo, dentro de estos valores, se

puede notar un aumento de la fluctuación al aumentar el pH hasta estabilizarse en valores de pH mayores a 6. A bajos valores de pH, el nanogel no posee carga eléctrica, ya que los monómeros de MAA que componen la red polimérica se encuentran protonados (estamos por debajo del pKa intrínseco del MAA). En estas condiciones, un cambio en el tamaño del nanogel requiere cambios en la energía dada por la adsorción de solvente y de los iones presentes en el sistema, además de la contribución elástica que conlleva el cambio de radio. Con el aumento en el grado de carga de la red polimérica se esperaría una entrada de contraíones. A valores por debajo del pKa intrínseco del MAA la red polimérica que compone al nanogel no posee carga eléctrica, en consecuencia las fluctuaciones son bajas. A pH alto se obtiene el mayor grado de carga posible, sin cambios en la carga las fluctuaciones se estabilizan.

En particular, altas concentraciones salinas promueven una desprotonación de los segmentos de MAA para pequeños aumentos de pH. Esto se debe a que los iones presentes en la solución pueden apantallar la carga eléctrica adquirida por los grupos carboxílicos de los monómeros de MAA. Como resultado, la entrada de iones favorece la fluctuación en volumen del nanogel. A medida que aumenta el pH, más unidades de MAA adquieren carga eléctrica, por lo cual un cambio en su volumen se ve favorecido. Para minimizar las repulsiones eléctricas de la red polimérica, el nanogel puede expandirse o adsorber más cantidad de contraíones presentes en la solución. Como resultado, se observa un aumento en la fluctuación del sistema, el cual se intensifica con el aumento de la concentración salina.

A condiciones de pH altos, un valor de 7, el nanogel se encuentra completamente desprotonado, cargado eléctricamente. La fluctuación del sistema es mayor y se estabiliza como consecuencia de que no es posible un cambio en el grado de carga eléctrica del nanogel. En una situación de pH intermedios, la desprotonación es incompleta y el nanogel puede expandirse o contraerse, por lo cual la fluctuación en el sistema es la mayor de todas.

En la figura 5.4 se muestra el efecto de la temperatura en las fluctuaciones en el volumen del nanogel. Se presentan tres curvas correspondientes a tres valores característicos de pH: por debajo y por encima del pH intrínseco del MAA, pH 3 y 7, respectivamente, y pH 4.65, igual al pKa del MAA aislado.

A pH 3 el nanogel no posee carga eléctrica, y como mencionamos antes, las fluc-

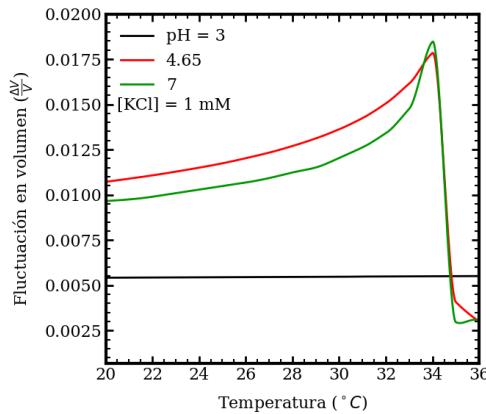


Figura 5.4: Gráfico de la fluctuación en volumen de un nanogel aislado. El nanogel esta compuesto por 2×10^5 segmentos (monómeros) repartidos en 200 cadenas de 1000 cadenas cada una

tuaciones a este valor de pH son bajas. El aumento de éstas es por efecto del cambio de la temperatura, en particular por el cambio en la hidrofobicidad de PNIPAm. Sin embargo, no se observan cambios apreciables a medida que se aumenta la temperatura del sistema, incluso cerca de la temperatura de transición del PNIPAm, alrededor de los 32°C. Por arriba de esta temperatura, el nanogel adopta un estado colapsado y no hay ninguna fuerza impulsora que promueva un cambio en su volumen.

En la misma figura, 5.4, a valores de pH 4.65 y 7, los monómeros de MAA se encuentran mayormente desprotonados, la red polimérica adquiere carga eléctrica. A temperatura baja las fluctuaciones son mayores que a pH 3 por efecto de la desprotonación de la red polimérica. En particular son mayores a pH 4.65 dado que es posible una regulación de carga eléctrica, a pH 7 todos los segmentos de MAA se encuentran desprotonados. Con el aumento de temperatura hay un aumento de las fluctuaciones del sistema. Esto ocurre hasta llegar a la temperatura característica de transición volumétrica del PNIPAm, al seguir aumentando la temperatura se origina un colapso en la estructura del nanogel, siendo las interacciones entre los segmentos de NIPAm las predominantes y estabilizando un tamaño específico del nanogel. Las fluctuaciones en este cambio de fase volumétrico son las mayores. Pasada la transición las fluctuaciones decaen a los valores más bajos posibles.

El estudio de las fluctuaciones en volumen de estos sistemas aislados nos muestran

la baja magnitud en las mismas. No hay una fuerza impulsora significativa para que los nanogeles cambien su volumen. Esto puede traducirse en que en una solución coloidal, diluida, la población de tamaños de nanogeles sea única o con muy poca dispersión.

En la siguiente sección se mostraran los resultados de soluciones de nanogeles, desde concentraciones diluidas a una muy concentrada. Se verá cual es el rol de las interacciones entre las partículas y si se mantiene o no la tendencia de las fluctuaciones en volumen encontradas en esta sección.

5.4. Resultados: Soluciones

En esta sección mostraremos los resultados obtenidos en el estudio sistemático de tres soluciones de nanogeles compuestos por segmentos de N-isopropilamina y ácido metacrílico. La red polimérica, P(NIPAm-MAA), posee un 35 % de MAA. Para cada una de estas soluciones, se estudiaron su respuesta a cambios en el pH, la temperatura y la concentración salina. En cada caso, se comparará con un nanogel a dilución infinita, es decir, un sistema aislado. Las soluciones consideradas corresponden a 0.10 mg/ml, 1.0 mg/ml y 5.0 mg/ml las cuales fueron seleccionadas en base a la fracción en volumen que ocuparían al alcanzar el tamaño esperado en un sistema aislado.

Como mencionamos en la sección 5.2.3, la metodología utiliza simulaciones Monte Carlo. Estas se componen de 5×10^6 pasos; cada paso de simulación se compone de una compresión/expansión y cambio de posición espacial de una partícula que compone la solución. La caja de simulación está compuesta por 100 nanogeles. Los parámetros de construcción de cada nanogel han sido especificados en la sección 5.3: Nanogeles con $N_{seg} = 10^4$ segmentos y $n_{ch} = 100$ segmentos por cadena. Estas cantidades fueron elegidas en base a un estudio sistemático de las fluctuaciones en volumen de los nanogeles. Estos resultados mostraron que, cuanto más rígidos (es decir, cadenas más cortas) son los nanogeles, menores son las fluctuaciones.

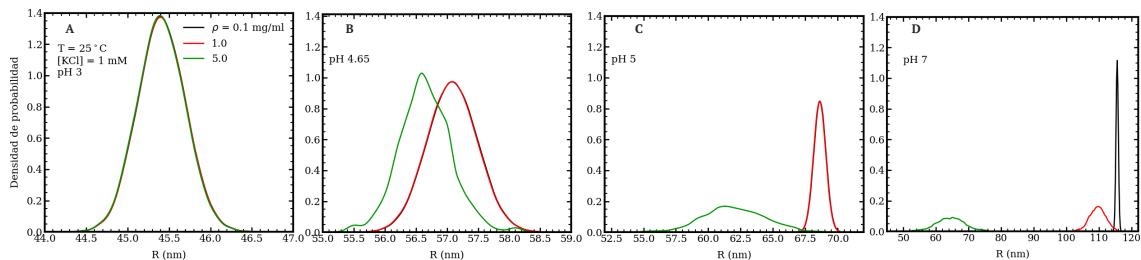


Figura 5.5: Densidad de probabilidad de tamaño para 3 diferentes soluciones, 0.1, 1.0 y 5.0 mg/ml. Cada panel corresponde a un pH de trabajo diferente: 3, 4.65, 5.50 y 7 para los paneles A, B, C, y D respectivamente. Otras condiciones de trabajo son: temperatura 25°C y 1 mM en [KCl].

5.4.1. Efecto de la concentración de nanogeles

En la figura 5.5 se muestra la densidad de probabilidad de distribución de tamaños de tres soluciones de nanogeles. Las condiciones del bulk de cada una de las soluciones corresponden a una temperatura de 25°C y una concentración de sal de 1 mM en $[KCl]$, en cada panel se muestra un pH de estudio distinto, 3, 4.65, 5 y 7 para los paneles A, B, C y D respectivamente. Estos valores son considerados por estar por debajo (pH 3) y por arriba (pH 5) del pKa intrínseco de los monómeros de MAA (pH 4.65) y condiciones de neutralidad (pH 7), que son condiciones cercanas al pH fisiológico. Las diferentes curvas dentro de cada panel representan una concentración diferente, 0.10, 1.0 y 5.0 mg/ml.

La figura 5.5 nos muestra, de forma general, que los perfiles de densidad de probabilidad en tamaño de los nanogeles varía con la concentración y el pH del medio. Se puede observar que el aumento del pH desplaza las curvas hacia valores mayores de radio. Lo que se puede explicar por el aumento en el número de segmentos de MAA que se desprotonan a medida que se aumenta el pH. En la sección 5.4.2 daremos una explicación más detallada de este fenómeno.

Observando la figura 5.5A notamos que todas las concentraciones de nanogeles exhiben picos definidos, lo que sugiere una distribución de tamaño más uniforme. La variación entre los radios es como máximo 2 nm. Bajo estas condiciones no se aprecia ninguna fuerza impulsora que modifique significativamente el tamaño de los nanogeles, de hecho no se puede apreciar una diferencia importante entre cada una de las soluciones de las partículas.

A medida que el pH aumenta a 4.65, figura 5.5B, la distribución correspondiente a una concentración de 5 mg/ml se diferencia de las otras dos. El desplazamiento es hacia menores valores de radio. Esta separación es aun mayor a medida que se aumenta el pH, panel C. Finalmente en la figura 5.5D a pH 7, las diferencias entre las concentraciones se incrementan hasta observar una separación entre las concentraciones consideradas. Esta disminución del tamaño puede explicarse al considerar los potenciales de interacción entre partículas. Al estar las partículas muy próximas entre sí, interactúan bajo la influencia de los potenciales de Hertz y Yukawa. Para disminuir la energía dada por estas interacciones, los nanogeles buscan disminuir su tamaño, si bien esto conlleva un aumento en la energía libre interna del nanogel, ver figura 5.2, el aumento de la energía libre interna es menor que el producido por las interacción intermoleculares. A medida que disminuimos la concentración de nanogeles, estos pueden aumentar su tamaño para acercarse más a su radio ideal. Es por ello que en ausencia de interacciones de a pares, una dilución infinita, las partículas tienden a aumentar su radio hasta minimizar la energía interna.

La capacidad de fluctuación de tamaño de los nanogeles es fuertemente afectada por la capacidad de los nanogeles de interactuar con otro vecino, lo cual está interrelacionado con la concentración de la solución. En ese sentido, la figura 5.6 muestra la distribución radial para las tres diferentes soluciones de nanogeles. Consideramos las mismas condiciones del bulk de la figura 5.5, es decir, pH 4.65, temperatura de 25°C y concentración salina de 1 mM.

Observamos que la solución con concentración más alta de nanogeles ($\rho = 5.0$ mg/ml) exhibe un perfil de distribución radial característico de sistemas líquidos, donde se pueden distinguir picos marcados en la distribución que indican la presencia de una estructura ordenada a corta distancia, lo que sugiere una cierta estructuración en la disposición de las primeras partículas vecinas dentro de la solución.

Por otro lado, las soluciones más diluidas ($\rho = 0.10$ y 1.0 mg/ml) muestran un perfil que asciende gradualmente, alcanzando un máximo menos definido y manteniéndose así con pequeñas variaciones. Este comportamiento es análogo al de un sistema gaseoso, donde la distribución de partículas es más aleatoria y menos estructurada.

Estos resultados pueden indicar que las interacciones entre los nanogeles son

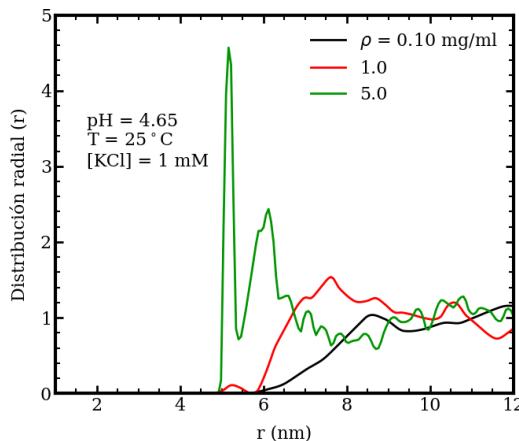


Figura 5.6: Densidad de distribución radial para las tres soluciones de nanogeles. Las curvas corresponden a las tres concentraciones consideradas: 0.10, 1.0, 5 mg/ml. Las condiciones del bulk de la solución son pH 4.65, $[\text{KCl}] = 1 \text{ mM}$, la temperatura del sistema es 25°C .

más frecuentes en soluciones de mayor concentración, lo que conduce a una mayor correlación espacial y, por ende, a un mayor ordenamiento, donde se observó un comportamiento de un líquido. En contraste, a baja concentración, presenta menos interacciones, las partículas están más espaciadas, reflejando un sistema con menor correlación entre partículas.

5.4.2. Respuesta a estímulos: pH, concentración salina y temperatura.

pH

En esta sección estudiamos la influencia en la respuesta a estímulos, en particular los resultados que mostramos más abajo surgen de los cambios en el pH, la concentración salina y la temperatura. En primera instancia, veremos cómo se comportan las soluciones con la variación del pH.

La Figura 5.7 ilustra cómo varían ciertas propiedades medias de las soluciones de nanogeles en función del pH. Se destacan el tamaño promedio ($\langle R \rangle$), el grado de disociación ($\langle f \rangle$) y la fracción en volumen ($\langle \phi \rangle$), correspondientes a los paneles A, B y C, respectivamente. A una temperatura de 25°C y con una concentración de $[\text{KCl}]$ de 1 mM, se observa principalmente la respuesta de los segmentos de MAA, mostrando

que el polímero NIPAm es hidrofílico bajo estas condiciones. Se han analizado tres concentraciones distintas de nanogeles, $\rho = 0.10, 1.0$ y 5.0 mg/ml, para estudiar el efecto de la concentración. En los paneles A y B, las curvas punteadas representan el comportamiento en un sistema de dilución infinita.

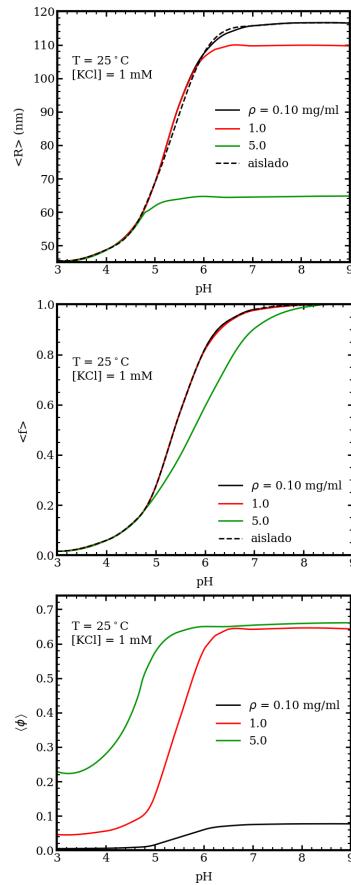


Figura 5.7: Variación de las propiedades medias de la solución de nanogeles en función del pH de trabajo. El panel A muestra el tamaño $\langle R \rangle$, el B el grado de carga $\langle f \rangle$ y el C la fracción en volumen $\langle \phi \rangle$. La temperatura es de 25°C y la concentración salina de 1 mM en $[KCl]$. Cada curva corresponde a un grado de empaquetamiento. Los nanogeles aislados se muestran en los paneles A, B y C.

El radio medio de los nanogeles crece con el aumento del pH, independientemente de la concentración contemplada en nuestro estudio. Esto se atribuye a la influencia del pH en la carga de los segmentos de MAA: a un pH más elevado, más segmentos de MAA se desprotonan, incrementando la carga eléctrica negativa del nanogel. En

el panel B (5.7B), se observa que el aumento del pH también eleva el grado de disociación de los segmentos de MAA. Este crecimiento en tamaño es resultado de las repulsiones electrostáticas en la red polimérica de los nanogeles, como se reportó en [4], donde se indica que estas repulsiones disminuyen al distanciar los centros de carga de la estructura del nanogel.

El efecto de la concentración de los nanogeles se evidencia al examinar las distintas curvas en cada panel, correspondientes a diferentes concentraciones. El comportamiento de la solución más diluida, 0.10 mg/ml, es similar al del sistema aislado en todo el rango de pH. La concentración intermedia, 1.0 mg/ml, presenta una dinámica parecida, aunque muestra diferencias alrededor del pH 6. En cambio, la solución más concentrada, 5.0 mg/ml, solo se asemeja al sistema aislado a pH inferiores a 5.

En términos generales, al aumentar la concentración de nanogeles, se observa una reducción en la respuesta esperada de un sistema aislado, con una disminución de más del 40% para la solución más concentrada. A diferencia de un sistema aislado, las soluciones de nanogeles presentan interacciones energéticas intermoleculares, influenciadas por los potenciales de Hertz y Yukawa. Estas diferencias en tamaño o grado de carga se explican no solo por la energía libre interna de cada nanogel, sino también por las interacciones entre ellos. Esto se hace evidente al observar la figura 5.7C: en la cual se muestra cómo cambia la fracción en volumen con respecto al cambio de pH, aumentando rápidamente con este y aún más para concentraciones más altas. Una mayor fracción en volumen implica una mayor interacción entre las partículas. Con más partículas en un mismo volumen, la proximidad entre ellas aumenta, lo que intensifica su interacción.

Los potenciales de Hertz y Yukawa, detallados en la sección 5.2.2, incrementan la energía del sistema a medida que los nanogeles se aproximan. El aumento en el volumen de las partículas disminuye la distancia entre ellas, resultando en un aumento de la energía total del sistema. Para reducir esta energía de interacción, las partículas adquieren un tamaño menor al esperado en un sistema aislado. Esta diferencia con respecto al sistema aislado conlleva un incremento en la energía libre interna de los nanogeles, pero se compensa con una disminución en la energía de interacción. Este efecto se amplifica con el aumento en la concentración, como se observa en las diferentes curvas de la figura 5.7A. Además, este cambio en el tamaño

de los nanogeles afecta su grado de carga, generando un efecto entrópico que impulsa a los iones a salir de los entornos confinados de los nanogeles de menor tamaño hacia la solución, lo que a su vez reduce el apantallamiento en los segmentos de MAA desprotonados. La energía libre química necesaria para desprotonar los segmentos de MAA es mayor, lo que se traduce en un desplazamiento hacia valores más altos de pH para alcanzar el mismo grado de carga que un sistema ideal.

Concentración salina

La figura 5.8 exhibe el comportamiento del tamaño medio $\langle R \rangle$ de los nanogeles en función de la concentración salina a un pH de 4.65 y 7, paneles A y B respectivamente, la temperatura del sistema es de 25°C. Las curvas sólidas representan la respuesta a estímulo para tres concentraciones de nanogeles $\rho = 0.1, 1.0$ y 5.0 mg/ml, mientras que la línea punteada muestra la respuesta de un nanogel aislado. En ambos paneles se observa una transición reentrante característica, donde inicialmente el tamaño de los nanogeles aumenta con la concentración salina hasta un máximo antes de disminuir, indicando un colapso en el tamaño de las partículas. Este fenómeno se atribuye a la interacción entre los monómeros cargados y la adsorción de contraiones provenientes del KCl. Bajo estas condiciones de pH (ya sea 4.65 o 7) hay una proporción de los segmentos de MAA que se encuentran desprotonados, véase la figura 5.7B, con mayor magnitud a pH 7. A bajas concentraciones salinas, el apantallamiento sobre estos segmentos cargados eléctricamente es insuficiente, lo que conlleva a un aumento del tamaño de los nanogeles para minimizar las repulsiones electrostáticas. Si se aumenta la concentración de contraiones, en primera instancia se favorece la protonación de los segmentos de MAA [4], provocando un aumento del *swelling* de los nanogeles presentes en la solución. Con una mayor concentración de sal, el incremento en la adsorción de contraiones aumenta lo que conduce a un mejor apantallamiento de los contraiones, reduciendo las repulsiones entre los segmentos de MAA desprotonados. En este punto se esperaría que este aumento en el apantallamiento de las cargas permita que más segmentos se desprotonen y se aumente aún más el radio de las partículas, sin embargo, el efecto observado es el contrario: colapso de la estructura de los nanogeles. El exceso de contraiones en el interior de los nanogeles tiene como consecuencia que las interacciones electrostáticas se vuelvan de muy corto alcance, permitiendo que los centros de carga puedan acercarse

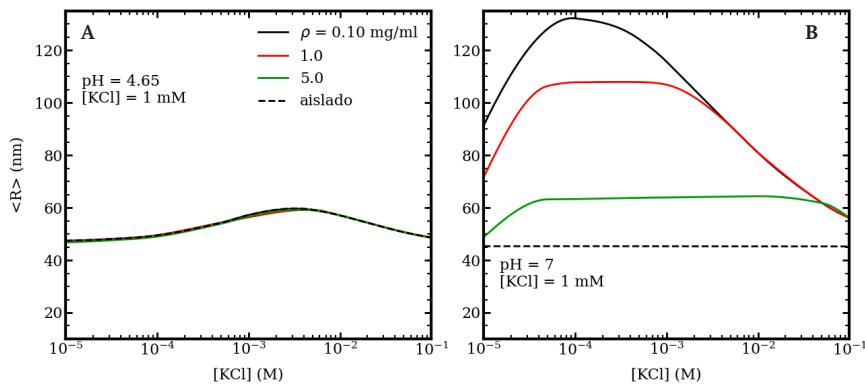


Figura 5.8: Variación del radio medio ($\langle R \rangle$) con la concentración de sal para diferentes concentraciones de nanogeles. El pH es 4.65 y 7 para el panel A y B respectivamente. La temperatura del sistema es de 25°C. Las curvas sólidas corresponden a $\rho = 0.10$, 1.0 y 5.0 mg/ml, y a trazos se incorpora la respuesta de un nanogel aislado.

mucho más, lo que facilita una relajación y disminución en la energía elástica de los nanogeles. Esta transición reentrante es más evidente a pH 7 donde los segmentos de MAA desprotonados (con carga eléctrica) son mayoría.

Respecto al efecto de la concentración de las soluciones, se puede observar que a medida que aumenta la concentración de nanogeles, menor es la respuesta de estas partículas a cambios en la concentración salina. Esto último se evidencia mejor en la figura 5.8B a un pH de 7. Esto se debe a que en estas condiciones, el tamaño y grado de carga de estas partículas están bien diferenciados, figura 5.7A y B. La diferencia se puede atribuir al costo energético de las interacciones entre nanogeles, el cual es compensado con un menor tamaño de los mismos. Una mayor vecindad de nanogeles, ver figura 5.6, hace que interactúen aún más entre ellos, aumentando la energía intermolecular del sistema. Al igual que en la figura 5.7, es la energía libre interna de los nanogeles la que aumenta como consecuencia de poder reducir la energía atribuida a los potenciales de Hertz y Yukawa. A medida que se diluye lo suficiente la solución, nos acercamos al comportamiento ideal, es decir, un nanogel aislado donde las partículas pueden aumentar su tamaño para reducir su energía libre interna sin mayor costo en las interacciones intermoleculares.

Temperatura

A continuación haremos un análisis sobre la respuesta de nuestras soluciones de nanogeles cuando el estímulo que se les aplica son cambios en la temperatura. En

este sentido, en la figura 5.9 se muestra la energía libre interna de un nanogel aislado en función de su tamaño y cómo es su respuesta con el cambio de la temperatura. En el panel A, con un pH del bulk de 4.65, podemos observar cómo al aumentar la temperatura se da la aparición de un nuevo mínimo en la energía libre a valores más pequeños de radio. Vemos un desplazamiento de un mínimo alrededor de los 60 nm hacia valores de 12 nm. Esto se debe al efecto de hidrofobicidad del PNIPAm que compone la red de las partículas. Este mínimo global se va profundizando al aumentar la temperatura. Por lo cual se esperaría un estado colapsado bien definido al aumentar la temperatura de las soluciones de partículas consideradas en este estudio . Por otro lado, en el panel B se considera un pH del bulk de 7, a diferencia del panel A, vemos que la coexistencia de dos mínimos en la energía libre interna, uno correspondiente a bajos valores de radio, un estado colapsado del nanogel, y otro a valores mayores de radio. A temperaturas bajas, el mínimo energético correspondiente al estado colapsado es un mínimo local, pasando a ser uno global al aumentar mucho más la temperatura. Esta coexistencia de estados se debe a que a pH 7 existe una buena proporción de segmentos de MAA desprotonados, con lo cual las repulsiones electrostáticas entre estos segmentos favorecen, a bajas temperaturas, un estado swelling, mientras que las interacciones del PNIPAm prefieren una estructura colapsada.

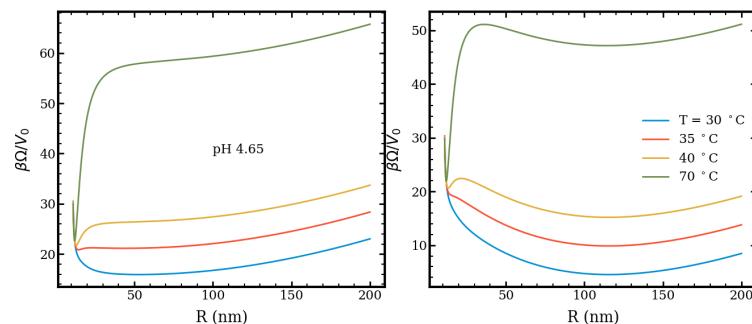


Figura 5.9: Energía libre interna de un nanogel aislado como función de sus radio. Las diferentes curvas muestran el cambio de la energía al aumentar la temperatura, la concentración salina es 1 mM en [KCl]. Los paneles A y B corresponden a pH 4.65 y 7 respectivamente.

La figura 5.10 muestra la respuesta a los cambios de temperatura de las soluciones estudiadas. El panel A corresponde a un pH de 4.65, mientras que los paneles B y

C muestran la respuesta al estímulo de temperatura a un pH de 7, la concentración salina es 1 mM en $[KCl]$. Las diferentes curvas corresponden a las diferentes concentraciones: 0.10, 1.0 y 5.0 mg/ml, y a trazos se presenta la respuesta de un nanogel aislado.

En todos los paneles se puede apreciar cómo, superando cierta temperatura, los nanogeles colapsan. Esto es causado por el efecto de la temperatura sobre el PNIPAm que conforma la estructura de las partículas estudiadas. Esta característica es propia de los polímeros de PNIPAm [4], los cuales poseen una temperatura crítica mínima de solución, que siendo superada aumenta la hidrofobicidad del PNIPAm observándose un colapso en la estructura de la que forman parte. Se puede observar que una vez superada esta temperatura crítica todas las concentraciones contempladas tienden al mismo estado de deswelling y este mismo es inherente al pH de la solución bulk considerado. El radio, de aproximadamente 12 nm, que adquieren las partículas es tan pequeño que el efecto de las interacciones entre pares desaparece, predominando fuertemente solo la energía libre intramolecular de los nanogeles.

En la figura 5.10A vemos que a condiciones de pH 4.65 no hay diferencias apreciables entre las distintas concentraciones de nanogeles y una partícula aislada. La diferencia en la temperatura de transición de estos sistemas es menor a 0.2°C. Bajo estas condiciones, pH 4.65, no hay diferencias apreciables para las tres soluciones, véase figura 5.7A y B, consideradas. El estado de carga eléctrica de los nanogeles en estas condiciones es el mismo. En este sentido, la fuerza impulsora, es decir, la hidrofobicidad del PNIPAm, no tiene ningún impedimento para llegar al deswelling del sistema y al disminuir el tamaño de cada partícula por efecto de la hidrofobicidad de los segmentos del PNIPAm, también se reducen las interacciones entre nanogeles. Estos resultados son consistentes con la existencia de un solo mínimo en la energía libre de los nanogeles, ver figura 5.9A. Es decir, hay una predominancia en el estado de estructura colapsada de las partículas.

Continuando con nuestra descripción del efecto de la temperatura, vemos en la figura 5.10B y C el comportamiento de las soluciones cuando el pH de la solución tiene un valor de 7. Observamos una respuesta cualitativamente similar al panel A, el paso de un estado swelling a uno colapsado al superar una temperatura crítica. Sin embargo, a diferencia de la condición de pH 4.65, presentamos dos respuestas

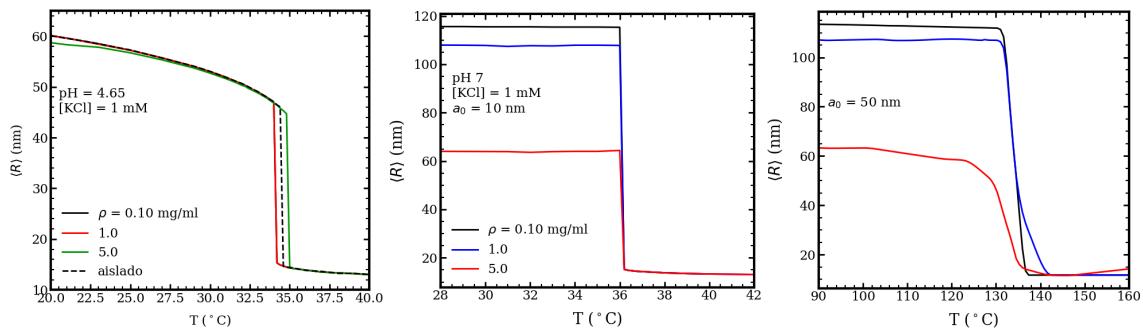


Figura 5.10: Tamaño medio de la solución de nanogeles como función de la temperatura de la solución. pH 4.65, $[KCl]$ 1m M. Curvas sólidas corresponde a concentraciones $\rho = 0.10, 1.0$ y 5.0 mg/ml de nanogel, a trazos se presenta un sistema con una partícula polimérica aislada.

diferentes para un mismo pH (7). Esto se debe a la elección de las condiciones iniciales con las que se realizan las simulaciones. Esta elección se atribuye a la energía libre interna de los nanogeles, figura 5.2B.

Para ambos paneles, podemos destacar que el estado inicial, hinchado, de las partículas disminuye con el aumento de la concentración de los nanogeles. Este comportamiento se atribuye a los potenciales de Hertz y Yukawa, para los cuales un aumento de la concentración significa una mayor energía de interacción de pares a medida que aumenta el tamaño por efecto del pH, véase figura 5.7A, con lo cual, para minimizar la energía total del sistema, las partículas adquieren un menor tamaño respecto al esperado en un sistema aislado. Por otro lado, vemos que nuevamente el estado colapsado es igual para las tres soluciones, siendo este el mismo que para un sistema aislado.

En el panel 5.10B se ha considerado radios de nanogeles en estado seco, deshidratado ($R = 10$ nm), mientras que en el panel 5.10C se ha considerado un estado swelling de las partículas, $R = 50$ nm. La elección de estos dos estados se ha realizado en base a la energía libre interna presentada en la figura 5.9B, considerando condiciones iniciales de tamaño de los nanogeles con valores de radios a la izquierda de los mínimos energéticos. En el panel B, se observa que la temperatura de transición es menor que para un nanogel aislado. Se observa que la disminución de tamaño de las partículas, para reducir la cantidad de interacción entre nanogeles, va de la mano con la disminución de la energía libre de las partículas por efecto hidrofóbico

del PNIPAm. Estos resultados son consistentes con la respuesta al pH y concentración salina de las soluciones. Sin embargo, al considerar el panel C, observamos un aumento de casi 90 °C, respecto al sistema aislado, hasta alcanzar una temperatura de transición de alrededor de 136 °C. Las condiciones iniciales de las partículas, $R = 50$ nm, le otorgan una estructura lo suficientemente expandida para permitir la desprotonación de más segmentos de MAA, respecto a su estado seco, siendo esto el principal obstáculo para los nanogeles de alcanzar su estado colapsado por el efecto del PNIPAm. En la figura 5.10B puede notarse que hay una barrera energética alta entre los dos mínimos, la cual disminuye al aumentar la temperatura, por ello solo a temperaturas lo suficientemente altas, más de 100 °C, es posible pasar esta barrera. Este desplazamiento a una temperatura más alta se atribuye a las repulsiones electrostáticas internas de los nanogeles. A pH 7 y un radio inicial mayor, hay una fracción alta de monómero de MAA desprotonados, por lo cual un colapso en los nanogeles significa un acercamiento de los centros de carga, lo que aumentaría la energía libre intramolecular. El colapso de los nanogeles implica un desplazamiento del equilibrio ácido/base de los monómeros de MAA hacia mayores pHs, para así evitar su desprotonación y con ello las repulsiones eléctricas. Este desplazamiento es compensado energéticamente con el aumento de la temperatura. En consecuencia, se necesita una temperatura más alta, respecto al panel B, para hacer colapsar la estructura de las partículas.

Finalmente, podemos destacar el rol de la concentración de partículas, el cual no parecía tener efecto en la transición swelling-colapso de la red polimérica. En el panel 5.10C, vemos cómo la transición pasa de ser tan brusca a una transición más suave, curva correspondiente a la concentración de 5 mg/ml. La mayor energía puesta en juego por los potenciales de interacción y una barrera energética entre un estado expandido/colapsado que disminuye con la temperatura se acoplan para permitir una transición más gradual.

5.5. Conclusiones

En este capítulo se investigó el comportamiento de soluciones compuestas por nanogeles poliméricos a diferentes concentraciones. Se aplicó metodología basada en

simulaciones Monte Carlo. El enfoque se centró en la influencia de la concentración de partículas sobre la respuesta a estímulos de nanogeles compuestos por P(NIPAM-MAA). Se consideraron tres estímulos diferentes: cambios en el pH, la temperatura y la concentración de sal. Además, se estudió el efecto de la concentración de nanogeles en la solución ante estos estímulos.

Los perfiles encontrados para las distintas concentraciones de trabajo nos indican el comportamiento de un sistema gaseoso (concentraciones de 0.10 y 1 mg/ml), mientras que a una concentración de 5 mg/ml se observa un comportamiento más cercano a un líquido. Para las concentraciones más bajas, observamos que sus propiedades se desvían mínimamente del sistema a dilución infinita. En general, el comportamiento reportado es cualitativamente similar a un sistema con dilución infinita, siendo una disminución en la magnitud del comportamiento lo que predomina al aumentar la concentración de nanogeles. En particular, la respuesta a cambios de pH también conlleva un aumento en el pKa aparente de la solución en concentraciones altas.

La respuesta a la temperatura sigue los mismos lineamientos reportados en la respuesta al pH y concentración salina, es decir, un comportamiento cualitativo similar al sistema en dilución infinita. En particular, a pH 4.65 no se encontró diferencia alguna sobre un nanogel aislado, pero a pH 7 se reporta un comportamiento interesante que depende de las condiciones iniciales en las que se encuentra la solución de nanogeles. Si partimos desde un agregado de partículas en estado seco, observamos que la concentración de la solución disminuye la temperatura de transición de la misma; por otro lado, si el punto de partida son soluciones con nanogeles en estado swelling y pH alto, la temperatura necesaria para colapsar la estructura de estos nanogeles aumenta drásticamente.

Apéndice A

Generación de configuraciones

A.1. Configuraciones red polimérica nanogel

La red de polímeros que forma el nanogel tiene una topología similar a la del diamante, donde los entrecruzamientos se colocan en la posición original de los átomos de carbono y se conectan a cuatro cadenas de polímeros.

Para construir esta red, primero definimos una estructura tridimensional donde todas las cadenas de polímeros se alargan. Luego, solo conservamos aquellos segmentos contenidos dentro de una esfera de radio R_{cut} colocada en el centro de masa de la estructura. R_{cut} se elige de manera que la red resultante tenga aproximadamente 10^4 segmentos. En total, la red que resulta de esta estrategia tiene 10026 segmentos.

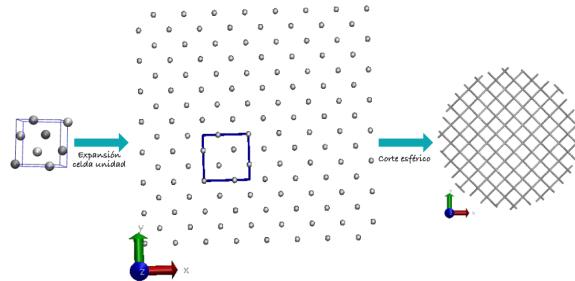


Figura A.1: Estructura base para la generación de configuraciones de nanogeles

Originalmente, todas las cadenas de polímeros conectan dos entrecruzamientos, pero como resultado del procedimiento mencionado anteriormente, algunas quedan

colgando en la superficie de la red y se conectan solo a un entrecruzamiento. Estas cadenas colgantes contienen el 22 % del número total de segmentos.

Para obtener configuraciones de esta estructura, hemos realizado simulaciones de Dinámica Molecular utilizando GROMACS 5.1.2 [217]. Para describir las interacciones no enlazadas entre los segmentos de la red, utilizamos un potencial de Leonard-Jones puramente repulsivo con un desplazamiento.

$$V_{LJ} = \begin{cases} 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \epsilon & \text{if } r_{ij} < 2^{1/6}\sigma \\ 0 & \text{otro.} \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

Donde $\epsilon = 1k_B T$ y $\sigma = 0.5$ nm, y r_{ij} es la distancia entre los segmentos i y j . Para generar una variedad de configuraciones compactas de la estructura polimérica, en algunas simulaciones también aplicamos una restricción de posición radial. Este potencial se utiliza para restringir partículas (en nuestro caso, los segmentos entrecruzadores de la red) a una región esférica específica del volumen de simulación. Esta región esférica está delimitada por un radio r_{fb} . De manera simplificada, la energía potencial asociada con esta fuerza externa tiene la siguiente forma:

$$V_{fb}(r_i) = \begin{cases} 0 & \text{if } r_i < r_{fb} \\ \frac{1}{2}k_{fb} (r_i - r_{fb})^2 & \text{otro.} \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

Donde r_i es la distancia entre la posición del segmento entrecruzador i y el centro de masa de la red, y k_{fb} es la constante de fuerza.

Un enfoque similar puede utilizarse para generar conformaciones de red elongadas (hinchadas). En este caso, aplicamos un potencial armónico que restringe las partículas fuera de una región esférica específica. Esta situación se describe utilizando valores negativos de r_{fb} , y este potencial solo se aplica a los entrecruzamientos más superficiales de la red. Más detalles sobre estos potenciales con fondo plano se pueden encontrar en la referencia [236].

Para generar conformaciones compactas, hemos realizado simulaciones de Dinámica Molecular utilizando $r_{fb} = 17.5, 20, 22.5$ y 25 en unidades de σ .

Para conformaciones hinchadas, hemos utilizado valores de r_{fb} desde -80σ hasta -50σ con un paso de 5σ ; y luego desde -50σ hasta -27.5σ con un paso de 2.5σ .

Estos valores se refieren a la red libre (sin la restricción potencial) que tiene un radio aproximado de 26σ . Se ha utilizado $k_{fb} = 50\frac{\varepsilon}{\sigma^2}$.

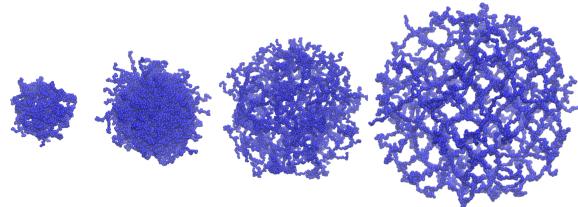


Figura A.2: Diferentes radios originados con el potencial armonico de retricin.

En cada ejecución de la simulación, el sistema se equilibró durante 5 ns y luego la simulación continuó durante otros 10 ns. Durante este tiempo de producción, se registró una configuración cada 20 ps, lo que resulta en un total de 500 configuraciones por simulación y un total de 10000 configuraciones.

Apéndice B

Resolución numérica: Teoría Molecular

B.1. Films poliméricos

La obtención de resultados a partir de la teoría planteada en los capítulos 2 y 4 requiere la solución numérica de ecuaciones integro-diferenciales. Para tal propósito es conveniente pasar de un sistema continuo a uno discreto. La discretización de nuestro modelo se realiza en capas de espesor δ . En particular, para el capítulo 2, la suma sobre cada uno de estas capas reemplazan a las integrales a lo largo del eje z , esto se debe a la simetría sobre los ejes x e y que se ha utilizado para el desarrollo de la TM para hidrogeles de films poliméricos.

Por exemplificar este cambio, la ecuación de incompresibilidad expresada en ec. 2.11 es reescrita como:

$$1 = \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{ads,\lambda}(i_z) \rangle v_{\lambda} + \langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle v_{MAA} \right], \text{ con } i_z = 1, 2, 3.., n_z \quad (\text{B.1})$$

Esta expresión nos permite resolverla en cada una de las capas i_z , cuya posicin es descrita usando la coordenada $z_i = (i_z - 0,5)\delta$, lo cual las ubica en el centro de cada capa. i_z toma los valores de 1 a n_z , donde se toma a n_z lo suficientemente grande

para que las densidades de cada una de las especies involucradas, así como también el potencial electrostático, converjan a sus valores en el baño de la solución (el bulk de la solución). Es decir: $\rho_\gamma(n_z) = \rho_\gamma^b$, $\rho_{ads}(\theta, n_z) = \rho_{ads}^b(\theta)$ y $\psi(n_z) = \psi^b = 0$. Para valores de $n_z \geq 500$ es posible obtener estas condiciones (dado que no son impuestas por se en la teoría).

Reescribiendo las expresiones de los funcionales de la sección 2.3, obtenemos para la densidad discreta de las especies libres:

$$\rho_\gamma(i_z)v_w = a_\gamma \exp[-\beta q_\gamma \psi(i_z)] \exp[-\beta v_\gamma \pi(i_z)] \quad (\text{B.2})$$

El grado de disociación para los segmentos de MAA que componen la red polimérica de nuestro film, de la ecuación 2.21:

$$\frac{f(i_z)}{1 - f(i_z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,MAA}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_{MAA} \psi(i_z)] \quad (\text{B.3})$$

Análogamente para el adsorbato, ecuación 2.23:

$$\frac{f_\tau(i_z)}{1 - f_\tau(i_z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_\tau \psi(i_z)] \quad (\text{B.4})$$

en donde τ hace referencia a los segmentos del adsorbato. Y en la que se tiene en cuenta que el exponente -1 , para segmentos ácidos y $+1$ para los básicos.

La densidad de los segmentos que compone la red polimérica se expresa como:

$$\langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle = \sum_{\alpha} P(\alpha) \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \quad (\text{B.5})$$

En donde se redefine $P(\alpha)$:

$$\begin{aligned}
P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \ln f(i_z) \right] \\
& \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta q_{MAA} \psi(i_z) \right] \\
& \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta v_{MAA} \pi(i_z) \right]
\end{aligned} \tag{B.6}$$

en donde $\psi(i_z)$ y $\pi(i_z)$ son los valores discretos de la interacción de estos potenciales. Además $\rho_{MAA}(\alpha, i_z)$ es la distribución discreta para una conformación α la cual son provistas por el tipo de modelo molecular a usar.

La densidad discreta del adsorbato se expresa:

$$\begin{aligned}
\rho_{ads}(\theta, i_z) v_w = & \tilde{a}_{ads} \prod_{\tau} \exp \left[-A\delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\tau}(\theta, i_z, j_z) \ln f_{\tau}(j_z) \right] \\
& \prod_{\lambda} \exp \left[-A\delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\lambda}(\theta, i_z, j_z) [v_{\lambda} \beta \pi(j_z) + q_{\lambda} \psi(j_z)] \right]
\end{aligned} \tag{B.7}$$

Finalmente discretizando la ecuación de Poisson, para el potencial electrostático, obtenemos:

$$\epsilon \frac{\psi(i_z + 1) + \Psi(i_z - 1) + 2\psi(i_z)}{\delta^2} = \langle \rho_q(i_z) \rangle \tag{B.8}$$

en esta expresión se ha reemplazado la derivada segunda el potencial por su diferencia finita. Además la densidad discreta de carga se define:

$$\langle \rho_q(i_z) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_z) \langle \rho_{ads,\tau}(i_z) \rangle q_{\tau} + f(i_z) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_z) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \tag{B.9}$$

Así como fueron definidas las condiciones de contorno en la ecuación 2.34 es ne-

cesario redefinirla para el sistema discreto. Estas condiciones deben satisfacer el desvanecimiento del potencial electrostático, $\psi(n_z) = 0$. Además se debe cumplir que la derivada del mismo entre la superficie de soporte y el film se anule. Para ello es necesario agregar una capa $i_z = 0$. Y resultando:

$$\frac{\psi(1) - \psi(0)}{\delta} = 0 \quad (\text{B.10})$$

lo que implica que $\psi(0) = \psi(1)$.

En resumen dadas las condiciones del bulk de la solución, o condiciones de laboratorio, compuestas por el pH, concentración de sal y adsorbatos, temperatura, restaría conocer las cantidades $\psi(i_z)$ y $\pi(i_z)$ para cada capa i_z . Variables que pueden ser obtenidas al resolver en cada capa las ecuaciones B.1 y B.8. De esta forma el número de ecuaciones totales a resolver es $2n_z$ (dos por cada capa). el número de términos de cada ecuación es dependiente de la cantidad de especies involucradas con sus respectivas conformaciones. Este sistema de ecuaciones es resuelto usando el método de Newton con Jacobiano libre, implementado en códigos FORTRAN desarrollados en el grupo de trabajo.

B.2. Nanogeles estructurados

Para obtener resultados de la minimización de la energía, las ecuaciones integro-diferenciales no lineales descritas en el capítulo 4 (secciones 4.2.1 y 4.2.2) deben resolverse numéricamente. Para lograr esto, el volumen del sistema se divide en capas de espesor $\delta = 0.5$. En esta división se ha considerado una simetría radial

En las ecuaciones presentadas, las sumas sobre capas reemplazan las integrales a lo largo de la coordenada r , mientras que las diferencias finitas reemplazan las derivadas.

Reescribiendo, la restricción de incomprensibilidad se expresa como:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(i_r) \rangle v_{\lambda} + \sum_i \langle \phi_i(i_r) \rangle \quad (\text{B.11})$$

Lo que nos da una ecuación para cada capa i_r , en donde cada posición es escrita

por la coordenada $r_i = (i_r - 0,5)\delta$. La variable i_r toma valores de 1 a n_r , en donde n_r es un número suficientemente grande de capas para que se satisfagan las restricciones impuestas en nuestro sistema. Entre ellas $\rho_\gamma(n_r) \approx \rho_\gamma^b$, $\rho_{pro}(\theta, n_r) \approx \rho_{pro}^b(\theta)$ y $\psi(n_r) \approx \psi^b = 0$.

Con estas consideraciones podemos reescribir:

$$\frac{f(j_r)}{1 - f(j_r)} = \left(\frac{a_{H^+}}{k_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta q_{MAA} - \psi(i_r)} \quad (\text{B.12})$$

Para las especies libres, sin considerar la proteína ecuación 4.20:

$$\rho_\gamma(i_r)v_w = a_\gamma \exp[-\beta\psi(i_r)q_\gamma] \exp[-\beta\pi(i_r)v_w] \quad (\text{B.13})$$

La densidad local de la proteína se escribe, ecuación 4.22:

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, i_r)v_w &= \tilde{a}_{pro} \prod_\tau \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_\tau(\theta, i_r, j_r) \ln f_\tau(j_r) \right] \\ &\times \prod_\lambda \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_\lambda(\theta, i_r, j_r) (\beta\pi(j_r)v_\lambda + \beta\psi(j_r)q_\lambda) \right] \end{aligned} \quad (\text{B.14})$$

La probabilidad de las configuraciones de la red polimérica $P(\alpha)$:

$$\begin{aligned} P(\alpha) &= \frac{1}{Q} \prod_{r_j} \prod_i \exp \left[-\beta\pi(r_j) \tilde{\phi}_r^i(\alpha, r_j) \right] \\ &\times \prod_{r_j} \exp \left[-\beta\psi(r_j) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} q_{MAA} \right] \\ &\times \prod_{r_j} \exp \left[-\ln(f(r_j)) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (\text{B.15})$$

donde:

$$\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_i) = \int_{r_i - \delta/2}^{r_i + \delta/2} dr \phi_r^{MAA}(\alpha, r) \quad (\text{B.16})$$

La ecuación de Poisson se escribe:

$$\epsilon \frac{\psi(i_r + 1) - 2\psi(i_r) + \psi(i_r - 1)}{\delta^2} + 2\epsilon \frac{\psi(i_r + 1) - \psi(i_r)}{(i_r - 0,5)\delta^2} = -\langle \rho_q(i_r) \rangle \quad (\text{B.17})$$

en donde la densidad de carga se define:

$$\langle \rho_q(i_r) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_r) \langle \rho_{pro,\tau}(i_r) \rangle q_{\tau} + f(i_r) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (\text{B.18})$$

Nuestras condiciones de contorno se reescriben:

$$\frac{\psi(1) - \psi(0)}{\delta} = 0 \quad (\text{B.19})$$

Definiendo el pH, concentración de sal y proteína. temperatura, es posible calcular las variables restantes $\pi(i_r)$ y $\psi(i_r)$ para cada capa i_r . Variables que pueden ser obtenidas al resolver en cada capa las ecuaciones B.11 y B.17 y B.8. De esta forma el número de ecuaciones totales a resolver es $2n_r$ (dos por cada capa). Este sistema de ecuaciones es resuelto usando el método de Newton con Jacobiano libre, implementado en códigos FORTRAN desarrollados en el grupo de trabajo.

Bibliografía

- [1] Néstor A Pérez-Chávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Using polymer hydrogels for glyphosate sequestration from aqueous solutions: molecular theory study of adsorption to polyallylamine films. *Langmuir*, 34(42):12560–12568, 2018. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02727.
- [2] Néstor A Pérez-Chávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Molecular theory of glyphosate adsorption to pH-responsive polymer layers. *Adsorption*, 25:1307–1316, 2019. doi: 10.1007/s10450-019-00091-9.
- [3] Néstor A Pérez-Chávez, Victor Nosthas Aguiar, Juan A Allegretto, Alberto G Albesa, Juan M Giussi, and Gabriel S Longo. Triggering doxorubicin release from responsive hydrogel films by polyamine uptake. *Soft Matter*, 16(32):7492–7502, 2020. doi: 10.1039/D0SM00951B.
- [4] Néstor A Pérez-Chávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Thermodynamic theory of multiresponsive microgel swelling. *Macromolecules*, 54(6):2936–2947, 2021. doi: 10.1021/acs.macromol.0c02885.
- [5] Kuniyasu Soda. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1):95, 2011. doi: 10.1186/1756-9966-30-95.
- [6] E Agostinelli, MPM Marques, R Calheiros, FPSC Gil, G Tempera, N Viceconte, V Battaglia, S Grancara, and A Toninello. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*, 38(2):393–403, 2010. doi: 10.1007/s00726-009-0396-7.

- [7] Robert A. Casero and Patrick M. Woster. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J. Med. Chem.*, 52(15):4551–4573, 2009. ISSN 00222623. doi: 10.1021/jm900187v.
- [8] National Center for Biotechnology Information. PubChem database. Doxorubicin, CID=3170. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>.
- [9] Gerald R Grimsley, J Martin Scholtz, and C Nick Pace. A summary of the measured pk values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Science*, 18(1):247–251, 2009. doi: 10.1002/pro.19.
- [10] Nurit Mirkin, Jean Jaconcic, Vivian Stojanoff, and Abel Moreno. High resolution x-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(1):83–92, 2008. doi: 10.1002/prot.21452.
- [11] Stevan R Hubbard, Wayne A Hendrickson, David G Lambright, and Steven G Boxer. X-ray crystal structure of a recombinant human myoglobin mutant at 2· 8 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 213(2):215–218, 1990. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80181-0.
- [12] Zhongmeng Zhu, Zhioran Yang, Yan Xia, and Han Jiang. A review of debonding behavior of soft material adhesive systems. *Mechanics of Soft Materials*, 4(1):7, 2022. doi: 10.1007/s42558-022-00045-2.
- [13] Gaojian Wu, Pengcheng Xie, Huaguang Yang, Kaifang Dang, Yuxuan Xu, Mohini Sain, Lih-Sheng Turng, and Weimin Yang. A review of thermoplastic polymer foams for functional applications. *Journal of Materials Science*, 56: 11579–11604, 2021. doi: 10.1007/s10853-021-06034-6.
- [14] Suman Chowdhury, Atanu Rakshit, Animesh Acharjee, and Bidyut Saha. Novel amphiphiles and their applications for different purposes with special emphasis on polymeric surfactants. *ChemistrySelect*, 4(23):6978–6995, 2019. doi: 10.1002/slct.201901160.
- [15] Linda S Hirst. *Fundamentals of soft matter science*. CRC press, 2019.

- [16] Man-hin Kwok, Guanqing Sun, and To Ngai. Microgel particles at interfaces: phenomena, principles, and opportunities in food sciences. *Langmuir*, 35(12): 4205–4217, 2019. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b04009.
- [17] HA Abd El-Rehim, El-Sayed A Hegazy, and HL Abd El-Mohdy. Radiation synthesis of hydrogels to enhance sandy soils water retention and increase plant performance. *Journal of applied polymer science*, 93(3):1360–1371, 2004. doi: 10.1002/app.20571.
- [18] Tithi Mehrotra, Subhabrata Dev, Aditi Banerjee, Abhijit Chatterjee, Rachana Singh, and Srijan Aggarwal. Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (5):105920, 2021. doi: 10.1016/j.jece.2021.105920.
- [19] Aya Samir, Fatma H Ashour, AA Abdel Hakim, and Mohamed Bassyouni. Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. *Npj Materials Degradation*, 6(1):68, 2022. doi: 10.1038/s41529-022-00277-7.
- [20] Xi Zhang, Ying Guan, and Yongjun Zhang. Ultrathin hydrogel films for rapid optical biosensing. *Biomacromolecules*, 13(1):92–97, 2012. doi: 10.1021/bm2012696.
- [21] Molla R Islam, Yongfeng Gao, Xue Li, and Michael J Serpe. Responsive polymers for biosensing and protein delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (17):2444–2451, 2014. doi: 10.1039/C3TB21657H.
- [22] Pietro Matricardi, Chiara Di Meo, Tommasina Coviello, Wim E Hennink, and Franco Alhaique. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 65 (9):1172–1187, 2013. doi: 10.1016/j.addr.2013.04.002.
- [23] Sandra Van Vlierberghe, Peter Dubrule, and Etienne Schacht. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*, 12(5):1387–1408, 2011. doi: 10.1021/bm200083n.

- [24] Xin Bai, Mingzhu Gao, Sahla Syed, Jerry Zhuang, Xiaoyang Xu, and Xue-Qing Zhang. Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive materials*, 3(4): 401–417, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.05.006.
- [25] Jordan J Green and Jennifer H Elisseeff. Mimicking biological functionality with polymers for biomedical applications. *Nature*, 540(7633):386–394, 2016. doi: 10.1038/nature21005.
- [26] Weitai Wu, Nivedita Mitra, Elsa CY Yan, and Shuiqin Zhou. Multifunctional hybrid nanogel for integration of optical glucose sensing and self-regulated insulin release at physiological ph. *ACS nano*, 4(8):4831–4839, 2010. doi: 10.1021/nn1008319.
- [27] Andrew C. Daly, Lindsay Riley, Tatiana Segura, and Jason A. Burdick. Hydrogel microparticles for biomedical applications. *Nat. Rev. Mater.*, 5(1): 20–43, 2020. ISSN 20588437. doi: 10.1038/s41578-019-0148-6. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-019-0148-6>.
- [28] S Indulekha, P Arunkumar, D Bahadur, and R Srivastava. Thermoresponsive polymeric gel as an on-demand transdermal drug delivery system for pain management. *Materials Science and Engineering: C*, 62:113–122, 2016. doi: 10.1016/j.msec.2016.01.021.
- [29] Wakiko Asayama, Shin-ichi Sawada, Hideki Taguchi, and Kazunari Akiyoshi. Comparison of refolding activities between nanogel artificial chaperone and groel systems. *International journal of biological macromolecules*, 42(3):241–246, 2008. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.11.003.
- [30] Shin-ichi Sawada and Kazunari Akiyoshi. Nano-encapsulation of lipase by self-assembled nanogels: induction of high enzyme activity and thermal stabilization. *Macromolecular Bioscience*, 10(4):353–358, 2010. doi: 10.1002/mabi.200900304.
- [31] John M Beierle, Keiichi Yoshimatsu, Beverly Chou, Michael AA Mathews, Benjamin K Lesel, and Kenneth J Shea. Polymer nanoparticle hydrogels with autonomous affinity switching for the protection of proteins from thermal

- stress. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(35):9275–9279, 2014. doi: 10.1002/anie.201404881.
- [32] Tina Vermonden, Roberta Censi, and Wim E Hennink. Hydrogels for protein delivery. *Chemical reviews*, 112(5):2853–2888, 2012. doi: 10.1021/cr200157d.
- [33] Martin J Snowden, Babur Z Chowdhry, Brian Vincent, and Gayle E Morris. Colloidal copolymer microgels of n-isopropylacrylamide and acrylic acid: ph, ionic strength and temperature effects. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 92(24):5013–5016, 1996. doi: 10.1039/C1SM05216K.
- [34] Gabriel S Longo, Néstor A Pérez-Chávez, and Igal Szleifer. How protonation modulates the interaction between proteins and ph-responsive hydrogel films. *Current opinion in colloid & interface science*, 41:27–39, 2019. doi: 10.1016/j.cocis.2018.11.009.
- [35] R. H. Pelton and P. Chibante. Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces*, 20(3):247–256, 1986. ISSN 01666622. doi: 10.1016/0166-6622(86)80274-8.
- [36] Robert Pelton. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 85(1):1–33, 2000. ISSN 00018686. doi: 10.1016/S0001-8686(99)00023-8.
- [37] Haruma Kawaguchi. On going to a new era of microgel exhibiting volume phase transition. *Gels*, 6(3):1–24, 2020. ISSN 23102861. doi: 10.3390/gels6030026.
- [38] H. G. Schild. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.*, 17(2):163–249, 1992. ISSN 00796700. doi: 10.1016/0079-6700(92)90023-R.
- [39] Martin Malmsten, Helena Bysell, and Per Hansson. Biomacromolecules in microgelsopportunities and challenges for drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(6):435–444, 2010. doi: 10.1016/j.cocis.2010.05.016.
- [40] Jwala Renukuntla, Aswani Dutt Vadlapudi, Ashaben Patel, Sai HS Boddu, and Ashim K Mitra. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides

- and proteins. *International journal of pharmaceutics*, 447(1-2):75–93, 2013. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.030.
- [41] Michael C Koetting and Nicholas A Peppas. ph-responsive poly (itaconic acid-co-n-vinylpyrrolidone) hydrogels with reduced ionic strength loading solutions offer improved oral delivery potential for high isoelectric point-exhibiting therapeutic proteins. *International journal of pharmaceutics*, 471(1-2):83–91, 2014. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.023.
- [42] Maimoona Qindeel, Naveed Ahmed, Fakhara Sabir, Samiullah Khan, and Asim Ur-Rehman. Development of novel ph-sensitive nanoparticles loaded hydrogel for transdermal drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 45 (4):629–641, 2019. doi: 10.1080/03639045.2019.1569031.
- [43] Ray N Lawson and Mohammed Saeed Chughtai. Breast cancer and body temperature. *Canadian medical association journal*, 88(2):68, 1963.
- [44] Ian F Tannock and Daniela Rotin. Acid ph in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer research*, 49(16):4373–4384, 1989.
- [45] Leo E Gerweck, Shashirekha Vijayappa, and Sergey Kozin. Tumor ph controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Molecular cancer therapeutics*, 5(5):1275–1279, 2006. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0024.
- [46] Jinrong Peng, Tingting Qi, Jinfeng Liao, Bingyang Chu, Qian Yang, Wenting Li, Ying Qu, Feng Luo, and Zhiyong Qian. Controlled release of cisplatin from ph-thermal dual responsive nanogels. *Biomaterials*, 34(34):8726–8740, 2013. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.092.
- [47] Manju Kanamala, William R Wilson, Mimi Yang, Brian D Palmer, and Zimei Wu. Mechanisms and biomaterials in ph-responsive tumour targeted drug delivery: A review. *Biomaterials*, 85:152–167, 2016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.061.
- [48] R Jayakumar, Amrita Nair, N Sanoj Rejinold, S Maya, and SV Nair. Doxorubicin-loaded ph-responsive chitin nanogels for drug delivery to cancer

- cells. *Carbohydrate Polymers*, 87(3):2352–2356, 2012. doi: 10.1016/j.carbpol. 2011.10.040.
- [49] Ying Guan and Yongjun Zhang. Pnipam microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3d assemblies. *Soft Matter*, 7:6375–6384, 2011. doi: 10.1039/C0SM01541E. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C0SM01541E>.
- [50] Tong Cai, Manuel Marquez, and Zhibing Hu. Monodisperse thermoresponsive microgels of poly(ethylene glycol) analogue-based biopolymers. *Langmuir*, 23 (17):8663–8666, 2007. doi: 10.1021/la700923r. URL <https://doi.org/10.1021/la700923r>. PMID: 17658862.
- [51] Micaela Alejandra Macchione, María Florencia Sacarelli, Ana Racca, Catalina Biglione, Graciela Panzetta-Dutari, and Miriam C Strumia. Dual-responsive nanogels based on oligo (ethylene glycol) methacrylates and acidic co-monomers. *Soft Matter*, 15(47):9700–9709, 2019. ISSN 1744-683X. doi: 10.1039/C9SM01180C. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C9SM01180C>.
- [52] Yoshiharu Hirose, Takayuki Amiya, Yoshitsugu Hirokawa, and Toyoichi Tanaka. Phase Transition of Submicron Gel Beads. *Macromolecules*, 20(6):1342–1344, 1987. ISSN 15205835. doi: 10.1021/ma00172a029.
- [53] Carlos G. Lopez, Thomas Lohmeier, John E. Wong, and Walter Richtering. Electrostatic expansion of polyelectrolyte microgels: Effect of solvent quality and added salt. *J. Colloid Interface Sci.*, 558:200–210, 2020. ISSN 10957103. doi: 10.1016/j.jcis.2019.07.042. URL <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.07.042>.
- [54] Gayle E. Morris, Brian Vincent, and Martin J. Snowden. Adsorption of lead ions onto n-isopropylacrylamide and acrylic acid copolymer microgels. *J. Colloid Interface Sci.*, 190(1):198–205, 1997. ISSN 00219797. doi: 10.1006/jcis. 1997.4843.
- [55] Clinton D. Jones and L. Andrew Lyon. Synthesis and Characterization of Multiresponsive Core-Shell Microgels. *Macromolecules*, 33(22):8301–8306, 2000. ISSN 13871811. doi: 10.1016/j.micromeso.2006.03.006.

- [56] Melanie Bradley, Jose Ramos, and Brian Vincent. Equilibrium and kinetic aspects of the uptake of poly(ethylene oxide) by copolymer microgel particles of N-isopropylacrylamide and acrylic acid. *Langmuir*, 21(4):1209–1215, 2005. ISSN 07437463. doi: 10.1021/la047966z.
- [57] Robina Begum, Zahoor H. Farooqi, and Shanza Rauf Khan. Poly(N-isopropylacrylamide-acrylic acid) copolymer microgels for various applications: A review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 65(16):841–852, 2016. ISSN 1563535X. doi: 10.1080/00914037.2016.1180607.
- [58] Peter John Dowding, Brian Vincent, and Elizabeth Williams. Preparation and swelling properties of poly(NIPAM) 'minigel' particles prepared by inverse suspension polymerization. *J. Colloid Interface Sci.*, 221(2):268–272, 2000. ISSN 00219797. doi: 10.1006/jcis.1999.6593.
- [59] Todd Hoare and Robert Pelton. Highly pH and Temperature Responsive Microgels Functionalized with Vinylacetic Acid. *Macromolecules*, 37(7):2544–2550, 2004. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma035658m.
- [60] Juan M Giussi, Manuel I Velasco, Gabriel S Longo, Rodolfo H Acosta, and Omar Azzaroni. Unusual temperature-induced swelling of ionizable poly(N-isopropylacrylamide)-based microgels: Experimental and theoretical insights into its molecular origin. *Soft Matter*, 11(45):8879–8886, 2015. ISSN 1744-683X. doi: 10.1039/C5SM01853F. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C5SM01853F>.
- [61] Chia-Fen Lee, Chia-Cheng Lin, and Wen-Yen Chiu. Thermosensitive and control release behavior of poly (n-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) latex particles. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46(17):5734–5741, 2008. doi: 10.1002/pola.22887.
- [62] John E. Wong, Ana M.D. Ez-Pascual, and Walter Richtering. Layer-by-layer assembly of polyelectrolyte multilayers on thermoresponsive P(NiPAM-co-MAA) microgel: Effect of ionic strength and molecular weight. *Macromolecules*, 42(4):1229–1238, 2009. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma802072c.

- [63] N. Hamzavi, A. D. Drozdov, Y. Gu, and E. Birgersson. Modeling Equilibrium Swelling of a Dual pH- and Temperature-Responsive Core/Shell Hydrogel. *Int. J. Appl. Mech.*, 8(3):1–25, 2016. ISSN 1758826X. doi: 10.1142/S1758825116500393.
- [64] Juan Martín Giussi, Marta Martinez, Agustín Iborra, María Lorena Cortez, Desire Di Silvio, Irantzu Llarena, Gabriel S. Longo, Omar Azzaroni, and Sergio Enrique Moya. A study of the complex interaction between poly allylamine hydrochloride and negatively charged poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels. *Soft Matter*, 16(4):881–890, 2020. ISSN 1744-683X. doi: 10.1039/c9sm02070e.
- [65] Marta Martinez-Moro, Jacek Jenczyk, Juan M. Giussi, Stefan Jurga, and Sergio E. Moya. Kinetics of the thermal response of poly(N-isopropylacrylamide co methacrylic acid) hydrogel microparticles under different environmental stimuli: A time-lapse NMR study. *J. Colloid Interface Sci.*, 580:439–448, 2020. ISSN 10957103. doi: 10.1016/j.jcis.2020.07.049. URL <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.049>.
- [66] Dmitry V Pergushov, Larisa V Sigolaeva, Nadezhda G Balabushevich, Timur Z Sharifullin, Michael Noyong, and Walter Richtering. Loading of doxorubicin into surface-attached stimuli-responsive microgels and its subsequent release under different conditions. *Polymer*, page 123227, 2020. ISSN 0032-3861. doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123227>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386120310521>.
- [67] ei Liu, Jin Zeng, Xubo Zhao, Kun Tian, and Peng Liu. Independent temperature and ph dual-responsive pmaa/pnipam microgels as drug delivery system: Effect of swelling behavior of the core and shell materials in fabrication process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 526:48 – 55, 2017. ISSN 0927-7757. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.11.007>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777571630944X>.
- [68] Zhiqiang Jiang, Xiaoyan Dong, Xin Yan, Yang Liu, Lin Zhang, and Yan Sun.

- Nanogels of dual inhibitor-modified hyaluronic acid function as a potent inhibitor of amyloid β -protein aggregation and cytotoxicity. *Scientific reports*, 8(1):3505, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-21933-6.
- [69] Christine M Nolan, Michael J Serpe, and L Andrew Lyon. Thermally modulated insulin release from microgel thin films. *Biomacromolecules*, 5(5):1940–1946, 2004. doi: 10.1021/bm049750h.
- [70] Kruti S Soni, Swapnil S Desale, and Tatiana K Bronich. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*, 240:109–126, 2016. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009.
- [71] Fakhara Sabir, Muhammad Imran Asad, Maimoona Qindeel, Iqra Afzal, Muhammad Junaid Dar, Kifayat Ullah Shah, Alam Zeb, Gul Majid Khan, Naveed Ahmed, and Fakhar-ud Din. Polymeric nanogels as versatile nanoplatforms for biomedical applications. *Journal of nanomaterials*, 2019, 2019. doi: 10.1155/2019/1526186.
- [72] Gabriel S Longo, Monica Olvera De La Cruz, and I Szleifer. Molecular theory of weak polyelectrolyte thin films. *Soft Matter*, 8(5):1344–1354, 2012. doi: 10.1039/C1SM06708G.
- [73] Rikkert Nap, Peng Gong, and Igal Szleifer. Weak polyelectrolytes tethered to surfaces: effect of geometry, acid–base equilibrium and electrical permittivity. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 44(18):2638–2662, 2006. doi: 10.1002/polb.20896.
- [74] Gabriel S Longo, Monica Olvera de la Cruz, and Igal Szleifer. Non-monotonic swelling of surface grafted hydrogels induced by ph and/or salt concentration. *The Journal of chemical physics*, 141(12):124909, 2014. doi: 10.1063/1.4896562.
- [75] Gabriel S Longo, Monica Olvera de la Cruz, and Igal Szleifer. Equilibrium adsorption of hexahistidine on ph-responsive hydrogel nanofilms. *Langmuir*, 30(50):15335–15344, 2014. doi: 10.1021/la5040382.

- [76] Claudio F Narambuena, Gabriel S Longo, and Igal Szleifer. Lysozyme adsorption in pH-responsive hydrogel thin-films: the non-trivial role of acid–base equilibrium. *Soft Matter*, 11(33):6669–6679, 2015. doi: 10.1039/C5SM00980D.
- [77] Gabriel S Longo and Igal Szleifer. Adsorption and protonation of peptides and proteins in pH responsive gels. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(32):323001, 2016. doi: 10.1088/0022-3727/49/32/323001.
- [78] Annika Hagemann, Juan M Giussi, and Gabriel S Longo. Use of pH gradients in responsive polymer hydrogels for the separation and localization of proteins from binary mixtures. *Macromolecules*, 51(20):8205–8216, 2018. doi: 10.1021/acs.macromol.8b01876.
- [79] I Szleifer. Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach. *Biophysical journal*, 72(2):595–612, 1997.
- [80] Fang Fang, Javier Satulovsky, and Igal Szleifer. Kinetics of protein adsorption and desorption on surfaces with grafted polymers. *Biophysical journal*, 89(3):1516–1533, 2005. doi: 10.1529/biophysj.104.055079.
- [81] Mario Tagliazucchi, Omar Azzaroni, and Igal Szleifer. Responsive polymers end-tethered in solid-state nanochannels: when nanoconfinement really matters. *Journal of the American Chemical Society*, 132(35):12404–12411, 2010. doi: 10.1021/ja104152g.
- [82] Tao Wu, Peng Gong, Igal Szleifer, Petr Vlcek, Vladimír Šubr, and Jan Genzer. Behavior of surface-anchored poly (acrylic acid) brushes with grafting density gradients on solid substrates: 1. experiment. *Macromolecules*, 40(24):8756–8764, 2007. doi: 10.1021/ma0710176.
- [83] Manuel Quesada-Pérez, José Alberto Maroto-Centeno, Jacqueline Forcada, and Roque Hidalgo-Alvarez. Gel swelling theories: the classical formalism and recent approaches. *Soft Matter*, 7(22):10536–10547, 2011. doi: 10.1039/C1SM06031G.

- [84] Silvia Ahualli, José Alberto Maroto-Centeno, Aintzane Pikabea, Jacqueline Forcada, and Manuel Quesada-Pérez. Coarse-grained simulation study of dual-stimuli-responsive nanogels. *Colloid and Polymer Science*, 294(4):735–741, 2016. doi: 10.1007/s00396-016-3832-8.
- [85] Prateek K. Jha, Jos W. Zwanikken, Franois A. Detcheverry, Juan J. De Pablo, and Monica Olvera De La Cruz. Study of volume phase transitions in polymeric nanogels by theoretically informed coarse-grained simulations. *Soft Matter*, 7(13):5965–5975, 2011. ISSN 1744683X. doi: 10.1039/c1sm05264k.
- [86] Manuel Quesada-Pérez and Alberto Martín-Molina. Monte Carlo simulation of thermo-responsive charged nanogels in salt-free solutions. *Soft Matter*, 9(29):7086–7094, 2013. ISSN 1744683X. doi: 10.1039/c3sm00093a.
- [87] Arturo Moncho-Jordá and Joachim Dzubiella. Swelling of ionic microgel particles in the presence of excluded-volume interactions: A density functional approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(7):5372–5385, 2016. ISSN 14639076. doi: 10.1039/c5cp07794j.
- [88] Irene Adroher-Benítez, Alberto Martín-Molina, Silvia Ahualli, Manuel Quesada-Pérez, Gerardo Odriozola, and Arturo Moncho-Jordá. Competition between excluded-volume and electrostatic interactions for nanogel swelling: Effects of the counterion valence and nanogel charge. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19(9):6838–6848, 2017. ISSN 14639076. doi: 10.1039/c6cp08683g.
- [89] Ricarda Schroeder, Andrey A. Rudov, L. Andrew Lyon, Walter Richtering, Andrij Pich, and Igor I. Potemkin. Electrostatic Interactions and Osmotic Pressure of Counterions Control the pH-Dependent Swelling and Collapse of Polyampholyte Microgels with Random Distribution of Ionizable Groups. *Macromolecules*, 48(16):5914–5927, 2015. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.5b01305.
- [90] Oleg Rud, Tobias Richter, Oleg Borisov, Christian Holm, and Peter Košovan. A self-consistent mean-field model for polyelectrolyte gels. *Soft Matter*, 13(18):3264–3274, 2017. ISSN 17446848. doi: 10.1039/c6sm02825j.

- [91] David Sean, Jonas Landsgesell, and Christian Holm. Computer Simulations of Static and Dynamical Properties of Weak Polyelectrolyte Nanogels in Salty Solutions. *Gels*, 4(1):2, 2018. ISSN 2310-2861. doi: 10.3390/gels4010002.
- [92] Cornelius Hofzumahaus, Pascal Hebbeker, and Stefanie Schneider. Monte Carlo simulations of weak polyelectrolyte microgels: pH-dependence of conformation and ionization. *Soft Matter*, 14:4087–4100, 2018. ISSN 1744-683X. doi: 10.1039/C7SM02528A. URL <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2018/SM/C7SM02528A>.
- [93] Dongdong Lu, Mingning Zhu, Wenkai Wang, Shanglin Wu, Brian R. Saunders, Daman J. Adlam, Judith A. Hoyland, Cornelius Hofzumahaus, Stefanie Schneider, and Katharina Landfester. Do the properties of gels constructed by interlinking triply-responsive microgels follow from those of the building blocks? *Soft Matter*, 15(4):527–536, 2019. ISSN 17446848. doi: 10.1039/C8SM01510D.
- [94] D. Capriles-González, B. Sierra-Martín, A. Fernández-Nieves, and A. Fernández-Barbero. Coupled deswelling of multiresponse microgels. *J. Phys. Chem. B*, 112(39):12195–12200, 2008. ISSN 15206106. doi: 10.1021/jp8003773.
- [95] Alexey A Polotsky, Felix A Plamper, and Oleg V Borisov. Collapse-to-swelling transitions in ph-and thermoresponsive microgels in aqueous dispersions: The thermodynamic theory. *Macromolecules*, 46(21):8702–8709, 2013. doi: 10.1021/ma401402e.
- [96] Kazuei Igarashi and Keiko Kashiwagi. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42(1):39–51, 2010. ISSN 13572725. doi: 10.1016/j.biocel.2009.07.009.
- [97] Christophe Moinard, Luc Cynober, and Jean-Pascal de Bandt. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2):184–197, 2005. doi: 10.1016/j.clnu.2004.11.001.
- [98] Carl W. Porter and Raymond J. Bergeron. Spermidine requirement for cell pro-

- liferation in eukaryotic cells: Structural specificity and quantitation. *Science.*, 219(4588):1083–1085, 1983. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.6823570.
- [99] Diane H Russell. Clinical relevance of polyamines as biochemical markers of tumor kinetics. *Clinical Chemistry*, 23(1):22–27, 1977. doi: 10.1093/clinchem/23.1.22.
- [100] D. H. Russell, C. C. Levy, S. C. Schimpff, and I. A. Hawk. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res.*, 31(11):1555–1558, 1971. ISSN 00085472.
- [101] Anthony E. Pegg and Anthony J. Michael. Spermine synthase. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(1):113–121, 2010. ISSN 1420682X. doi: 10.1007/s00018-009-0165-5.
- [102] Shannon L. Nowotarski, Patrick M. Woster, and Robert A. Casero. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev. Mol. Med.*, 15:1–21, 2013. ISSN 14623994. doi: 10.1017/erm.2013.3.
- [103] Myung Hee Park and Kazuei Igarashi. Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases www.biomolther.org. *Invit. Rev. Biomol Ther.*, 21(19):1–9, 2013. ISSN 19769148. doi: 10.4062/biomolther.2012.097. URL <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2012.097>.
- [104] Eugene W. Gerner and Frank L. Meyskens. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer*, 4(10):781–792, 2004. ISSN 1474175X. doi: 10.1038/nrc1454.
- [105] Maria Adela Jasnis, Slobodanka Klein, Martin Monte, Lilia Davel, Eugenia Sacerdote de Lustig, and Israel D Algranati. Polyamines prevent dfmo-mediated inhibition of angiogenesis. *Cancer Letters*, 79(1):39–43, 1994. doi: 10.1016/0304-3835(94)90060-4.
- [106] Masato Ikeda, Tatsuyuki Yoshii, Toshihiro Matsui, Tatsuya Tanida, Harunobu Komatsu, and Itaru Hamachi. Montmorillonite- supramolecular hydrogel hybrid for fluorocolorimetric sensing of polyamines. *Journal of the American Chemical Society*, 133(6):1670–1673, 2011. doi: 10.1021/ja109692z.

- [107] Shewan M Aziz, Mark N Gillespie, Peter A Crooks, Sharmen F Tofiq, Clifford P Tsuboi, Jack W Olson, and Michael P Gosland. The potential of a novel polyamine transport inhibitor in cancer chemotherapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(1):185–192, 1996.
- [108] Yan Chen, Reitha S Weeks, Mark R Burns, David W Boorman, Andres Klein-Szanto, and Thomas G O'Brien. Combination therapy with 2-difluoromethylornithine and a polyamine transport inhibitor against murine squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 118(9):2344–2349, 2006. doi: 10.1002/ijc.21621.
- [109] U Bachrach. Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids*, 26(4):307–309, 2004. doi: 10.1007/s00726-004-0076-6.
- [110] Yitong Wang, Luxuan Guo, Shuli Dong, Jiwei Cui, and Jingcheng Hao. Microgels in biomaterials and nanomedicines. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 266:1–20, 2019. ISSN 00018686. doi: 10.1016/j.cis.2019.01.005. URL <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.01.005>.
- [111] Anthony M Lowman, M Morishita, M Kajita, T Nagai, and Nicholas A Peppas. Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(9):933–937, 1999. doi: 10.1021/jf980337n.
- [112] Xin Zhao and Zhongni Wang. A pH-sensitive microemulsion-filled gellan gum hydrogel encapsulated apigenin: Characterization and in vitro release kinetics. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 178(October 2018):245–252, 2019. ISSN 18734367. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.015. URL <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.015>.
- [113] Maimoona Qindeel, Naveed Ahmed, Fakhara Sabir, Samiullah Khan, and Asim Ur-Rehman. Development of novel pH-sensitive nanoparticles loaded hydrogel for transdermal drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 0(0):–000, 2019. ISSN 15205762. doi: 10.1080/03639045.2019.1569031. URL <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2019.1569031>.

- [114] Shuting Li, Liefeng Hu, Dapeng Li, Xin Wang, Panpan Zhang, Jun Wang, Guoqing Yan, and Rupei Tang. Carboxymethyl chitosan-based nanogels via acid-labile ortho ester linkages mediated enhanced drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, 129:477–487, 2019. ISSN 18790003. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.072. URL <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.072>.
- [115] C. Panis, A. C.S.A. Herrera, V. J. Victorino, F. C. Campos, L. F. Freitas, T. De Rossi, A. N. Colado Simão, A. L. Cecchini, and R. Cecchini. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 133(1):89–97, 2012. ISSN 01676806. doi: 10.1007/s10549-011-1693-x.
- [116] Michael J. Serpe, Kristen A. Yarmey, Christine M. Nolan, and L. Andrew Lyon. Doxorubicin uptake and release from microgel thin films. *Biomacromolecules*, 6(1):408–413, 2005. ISSN 15257797. doi: 10.1021/bm049455x.
- [117] Cristina Carvalho, Renato X Santos, Susana Cardoso, Sonia Correia, Paulo J Oliveira, Maria S Santos Moreira, and Paula I. Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.*, 16(25):3267–3285, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788803312>. URL <http://www.eurekaselect.com/node/69601/article>.
- [118] Mohamad Kazempour, Hassan Namazi, Abolfazl Akbarzadeh, and Roya Kabi-ri. Synthesis and characterization of PEG-functionalized graphene oxide as an effective pH-sensitive drug carrier. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, 47(1):90–94, 2019. ISSN 2169141X. doi: 10.1080/21691401.2018.1543196. URL <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1543196>.
- [119] Bernward A. Mann, Christian Holm, and Kurt Kremer. Swelling of polyelectrolyte networks. *J. Chem. Phys.*, 122(15):154903, 2005. ISSN 00219606. doi: 10.1063/1.1882275.
- [120] Manuel Quesada-Pérez, José Alberto Maroto-Centeno, and Alberto Martín-Molina. Effect of the counterion valence on the behavior of thermo-sensitive gels and microgels: A Monte Carlo simulation study. *Macromolecules*, 45(21):8872–8879, 2012. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma3014959.

- [121] Peter Košovan, Tobias Richter, and Christian Holm. Modeling of polyelectrolyte gels in equilibrium with salt solutions. *Macromolecules*, 48(20):7698–7708, 2015. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.5b01428.
- [122] Basit Yameen, Anke Kaltbeitzel, Andreas Langner, Hatice Duran, Frank Müller, Ulrich Gösele, Omar Azzaroni, and Wolfgang Knoll. Facile large-scale fabrication of proton conducting channels. *Journal of the American Chemical Society*, 130(39):13140–13144, 10 2008. doi: 10.1021/ja804683j. URL <https://doi.org/10.1021/ja804683j>.
- [123] Andrew A. Brown, Omar Azzaroni, Luis M. Fidalgo, and Wilhelm T. S. Huck. Polymer brush resist for responsive wettability. *Soft Matter*, 5:2738–2745, 2009. doi: 10.1039/B902179E. URL <http://dx.doi.org/10.1039/B902179E>.
- [124] Peter Vaupel, Friedrich Kallinowski, and Paul Okunieff. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research*, 49(23):6449–6465, 1989.
- [125] N Raghunand, X He, R van Sluis, B Mahoney, B Baggett, C W Taylor, G Paine-Murrieta, D Roe, Z M Bhujwalla, and R J Gillies. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br. J. Cancer*, 80(7):1005–1011, 1999. ISSN 1532-1827. doi: 10.1038/sj.bjc.6690455. URL <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690455>.
- [126] Einar K Rofstad, Berit Mathiesen, Kristil Kindem, and Kanthi Galappathi. Acidic extracellular ph promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Research*, 66(13):6699–6707, 2006. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0983.
- [127] Dirk Schmaljohann. Thermo and ph-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15):1655–1670, 2006. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.020.
- [128] Tomas Koltai. Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Oncotargets Ther.*, 9:6343–6360, oct 2016. ISSN 1178-

6930. doi: 10.2147/OTT.S115438. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27799782><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5074768/>.
- [129] Hiroaki Sai, Aykut Erbas, Adam Dannenhoffer, Dongxu Huang, Adam Weinhardt, Erica Siismets, Kyujin Jang, Karen Qu, Liam C. Palmer, Monica Olvera de la Cruz, and Samuel I. Stupp. Chromophore amphiphilepolyelectrolyte hybrid hydrogels for photocatalytic hydrogen production. *J. Mater. Chem. A*, 8:158–168, 2020. doi: 10.1039/C9TA08974H. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C9TA08974H>.
- [130] Selina Schimka, Nino Lomadze, Maren Rabe, Alexey Kopyshev, Maren Lehmann, Regine Von Klitzing, Artem M. Rumyantsev, Elena Yu Kramarenko, and Svetlana Santer. Photosensitive microgels containing azobenzene surfactants of different charges. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19(1):108–117, 2017. ISSN 14639076. doi: 10.1039/c6cp04555c.
- [131] Jing Zhang and Nicholas A Peppas. Synthesis and Characterization of pH- and Temperature-Sensitive Poly(methacrylic acid)/Poly(N-isopropylacrylamide) Interpenetrating Polymeric Networks. *Glass*, pages 102–107, 2000. doi: 10.1021/ma991398q.
- [132] Oleg V. Borisov, Ekaterina B. Zhulina, Frans A. M. Leermakers, Matthias Ballauff, and Axel H. E. Müller. *Conformations and Solution Properties of Star-Branched Polyelectrolytes*, pages 1–55. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011. ISBN 978-3-642-22486-7. doi: 10.1007/12_2010_104. URL https://doi.org/10.1007/12_2010_104.
- [133] G. S. Longo, M. Olvera de la Cruz, and I. Szleifer. Molecular theory of weak polyelectrolyte gels: The role of pH and salt concentration. *Macromolecules*, 44(1):147–158, 2011. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma102312y. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ma102312y>.
- [134] Anastasiia Murniliuk, Peter Košovan, Miroslav Janata, Karel Procházka, Filip Uhlík, and Miroslav Štěpánek. Local pH and effective pK of a polyelectrolyte chain: Two names for one quantity? *ACS Macro Lett.*, 7(10):1243–1247, 2018. ISSN 21611653. doi: 10.1021/acsmacrolett.8b00484.

- [135] Felix A Plamper and Walter Richtering. Functional microgels and microgel systems. *Accounts of chemical research*, 50(2):131–140, 2017. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00544.
- [136] L Andrew Lyon and Alberto Fernandez-Nieves. The polymer/colloid duality of microgel suspensions. *Annual review of physical chemistry*, 63:25–43, 2012. doi: 10.1146/annurev-physchem-032511-143735.
- [137] Shuiqin Zhou and Benjamin Chu. Synthesis and volume phase transition of poly(methacrylic acid-co-N-isopropylacrylamide) microgel particles in water. *J. Phys. Chem. B*, 102(8):1364–1371, 1998. ISSN 15206106. doi: 10.1021/jp972990p.
- [138] Zahoor H Farooqi, Hafeez Ullah Khan, Syed Mujtaba Shah, and Mohammad Siddiq. Stability of poly (n-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) polymer microgels under various conditions of temperature, ph and salt concentration. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3):329–335, 2017. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.07.031.
- [139] Shanza Rauf Khan, Zahoor H. Farooqi, Muhammad Ajmal, Mohammad Siddiq, and Abbas Khan. Synthesis, Characterization, and Silver Nanoparticles Fabrication in N-isopropylacrylamide-Based Polymer Microgels for Rapid Degradation of p-Nitrophenol. *J. Dispers. Sci. Technol.*, 34(10):1324–1333, 2013. ISSN 01932691. doi: 10.1080/01932691.2012.744690.
- [140] Shan Shi, Qianman Wang, Tao Wang, Shuping Ren, Yu Gao, and Na Wang. Thermo-, pH-, and light-responsive poly(N -isopropylacrylamide- co -methacrylic acid)-au hybrid microgels prepared by the in situ reduction method based on au-thiol chemistry. *J. Phys. Chem. B*, 118(25):7177–7186, 2014. ISSN 15205207. doi: 10.1021/jp5027477.
- [141] Juan A. Allegretto, Juan M. Giussi, Sergio E. Moya, Omar Azzaroni, and Matias Rafti. Synthesis and characterization of thermoresponsive zif-8@pnipam-co-maa microgel composites with enhanced performance as an adsorption/release platform. *RSC Adv.*, 10:2453–2461, 2020. doi: 10.1039/C9RA09729E. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C9RA09729E>.

- [142] To Ngai, Sven Holger Behrens, and Helmut Auweter. Novel emulsions stabilized by pH and temperature sensitive microgels. *Chem. Commun.*, (3):331–333, 2005. ISSN 13597345. doi: 10.1039/b412330a.
- [143] To Ngai, Helmut Auweter, and Sven Holger Behrens. Environmental responsiveness of microgel particles and particle-stabilized emulsions. *Macromolecules*, 39(23):8171–8177, 2006. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma061366k.
- [144] Bastian Brugger and Walter Richtering. Emulsions stabilized by stimuli-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-co- methacrylic acid polymers: Microgels versus low molecular weight polymers. *Langmuir*, 24(15):7769–7777, 2008. ISSN 07437463. doi: 10.1021/la800522h.
- [145] Sabrina Schmidt, Tingting Liu, Stephan Rütten, Kim Ho Phan, Martin Möller, and Walter Richtering. Influence of microgel architecture and oil polarity on stabilization of emulsions by stimuli-sensitive core-shell poly(N -isopropylacrylamide- co -methacrylic acid) microgels: Mickering versus pickering behavior? *Langmuir*, 27(16):9801–9806, 2011. ISSN 07437463. doi: 10.1021/la201823b.
- [146] Heidi R. Culver, Ishna Sharma, Marissa E. Wechsler, Eric V. Anslyn, and Nicholas A. Peppas. Charged poly(N-isopropylacrylamide) nanogels for use as differential protein receptors in a turbidimetric sensor array. *Analyst*, 142(17): 3183–3193, 2017. ISSN 13645528. doi: 10.1039/c7an00787f.
- [147] Jochen Kleinen and Walter Richtering. Defined complexes of negatively charged multisensitive poly(N- isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels and poly(diallyldimethylammonium chloride). *Macromolecules*, 41(5):1785–1790, 2008. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma7023683.
- [148] Jochen Kleinen, Andreas Klee, and Walter Richtering. Influence of architecture on the interaction of negatively charged multisensitive poly(N-isopropylacrylamide)-co-methacrylic acid microgels with oppositely charged polyelectrolyte: Absorption vs adsorption. *Langmuir*, 26(13):11258–11265, 2010. ISSN 07437463. doi: 10.1021/la100579b.

- [149] Wenjuan Su, Man Yang, Kongshuang Zhao, and To Ngai. Influence of Charged Groups on the Structure of Microgel and Volume Phase Transition by Dielectric Analysis. *Macromolecules*, 49(20):7997–8008, 2016. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.6b00809.
- [150] Jonas Landsgesell, Lucie Nová, Oleg Rud, Filip Uhlík, David Sean, Pascal Hebbeker, Christian Holm, and Peter Košovan. Simulations of ionization equilibria in weak polyelectrolyte solutions and gels. *Soft Matter*, 15(6):1155–1185, 2019. ISSN 17446848. doi: 10.1039/c8sm02085j.
- [151] Yan Levin, Alexandre Diehl, A. Fernández-Nieves, and A. Fernández-Barbero. Thermodynamics of ionic microgels. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 65(3):1–6, 2002. ISSN 1063651X. doi: 10.1103/PhysRevE.65.036143.
- [152] Gil C. Claudio, Kurt Kremer, and Christian Holm. Comparison of a hydrogel model to the Poisson-Boltzmann cell model. *J. Chem. Phys.*, 131(9), 2009. ISSN 00219606. doi: 10.1063/1.3207275.
- [153] Thiago Colla, Christos N. Likos, and Yan Levin. Equilibrium properties of charged microgels: A Poisson-Boltzmann-Flory approach. *J. Chem. Phys.*, 141(23):234902, 2014. ISSN 00219606. doi: 10.1063/1.4903746.
- [154] Prateek K Jha, Jos W Zwanikken, and Monica Olvera de la Cruz. Understanding swollen–collapsed and re-entrant transitions in polyelectrolyte nanogels by a modified donnan theory. *Soft Matter*, 8(37):9519–9522, 2012. doi: 10.1039/C2SM26341F.
- [155] Manuel Quesada-Pérez, Silvia Ahualli, and Alberto Martín-Molina. Temperature-sensitive nanogels in the presence of salt: Explicit coarse-grained simulations. *J. Chem. Phys.*, 141(12):124903, 2014. ISSN 00219606. doi: 10.1063/1.4895960.
- [156] Hideki Kobayashi and Roland G. Winkler. Structure of microgels with debye-hückel interactions. *Polymers*, 6(5):1602–1617, 2014. ISSN 20734360. doi: 10.3390/polym6051602.

- [157] Hideki Kobayashi and Roland G. Winkler. Universal conformational properties of polymers in ionic nanogels. *Sci. Rep.*, 6:1–8, 2016. ISSN 20452322. doi: 10.1038/srep19836.
- [158] L. G. Rizzi and Y. Levin. Influence of network topology on the swelling of polyelectrolyte nanogels. *J. Chem. Phys.*, 144(11):1–6, 2016. ISSN 00219606. doi: 10.1063/1.4943981. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.4943981>.
- [159] Hideki Kobayashi, Rene Halver, Godehard Sutmann, and Roland G. Winkler. Polymer conformations in ionic microgels in the presence of salt: Theoretical and mesoscale simulation results. *Polymers*, 9(1):15, 2017. ISSN 20734360. doi: 10.3390/polym9010015.
- [160] Andrey A. Rudov, Arjan P.H. Gelissen, Gudrun Lotze, Andreas Schmid, Thomas Eckert, Andrij Pich, Walter Richtering, and Igor I. Potemkin. Intramicrogel Complexation of Oppositely Charged Compartments As a Route to Quasi-Hollow Structures. *Macromolecules*, 50(11):4435–4445, 2017. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.7b00553.
- [161] F. Afrose, E. Nies, and H. Berghmans. Phase transitions in the system poly(N-isopropylacrylamide)/water and swelling behaviour of the corresponding networks. *J. Mol. Struct.*, 554(1):55–68, 2000. ISSN 00222860. doi: 10.1016/S0022-2860(00)00559-7.
- [162] R Israels, F A M Leermakers, and G J Fleer. On the Theory of Grafted Weak Polyacids. *Macromolecules*, 27(11):3087–3093, may 1994. ISSN 0024-9297. doi: 10.1021/ma00089a028. URL <https://doi.org/10.1021/ma00089a028>.
- [163] Yu. V Lyatskaya, F A M Leermakers, G J Fleer, E B Zhulina, and T M Birshtein. Analytical Self-Consistent-Field Model of Weak Polyacid Brushes. *Macromolecules*, 28(10):3562–3569, 1995. ISSN 0024-9297. doi: 10.1021/ma00114a009. URL <https://doi.org/10.1021/ma00114a009>.
- [164] E B Zhulina, T M Birshtein, and O V Borisov. Theory of Ionizable Polymer Brushes. *Macromolecules*, 28(5):1491–1499, feb 1995. ISSN 0024-9297. doi: 10.1021/ma00109a021. URL <https://doi.org/10.1021/ma00109a021>.

- [165] Peng Gong, Tao Wu, Jan Genzer, and Igal Szleifer. Behavior of Surface-Anchored Poly(acrylic acid) Brushes with Grafting Density Gradients on Solid Substrates: 2. Theory. *Macromolecules*, 40(24):8765–8773, nov 2007. ISSN 0024-9297. doi: 10.1021/ma071018y. URL <https://doi.org/10.1021/ma071018y>.
- [166] O V Borisov and E B Zhulina. Effects of ionic strength and charge annealing in star-branched polyelectrolytes. *Eur. Phys. J. B - Condens. Matter Complex Syst.*, 4(2):205–217, 1998. ISSN 1434-6036. doi: 10.1007/s100510050371. URL <https://doi.org/10.1007/s100510050371>.
- [167] J Klein Wolterink, J van Male, M A Cohen Stuart, L K Koopal, E B Zhulina, and O V Borisov. Annealed Star-Branched Polyelectrolytes in Solution. *Macromolecules*, 35(24):9176–9190, nov 2002. ISSN 0024-9297. doi: 10.1021/ma020781j. URL <https://doi.org/10.1021/ma020781j>.
- [168] Gabriel S Longo, Monica Olvera de la Cruz, and I Szleifer. Non-monotonic swelling of surface grafted hydrogels induced by pH and/or salt concentration. *J. Chem. Phys.*, 141(12):124909, sep 2014. ISSN 0021-9606. doi: 10.1063/1.4896562. URL <https://doi.org/10.1063/1.4896562>.
- [169] Suhad Sbeih, Priti S Mohanty, Michael R Morrow, and Anand Yethiraj. Structural parameters of soft pnipam microgel particles as a function of crosslink density. *Journal of colloid and interface science*, 552:781–793, 2019. doi: 10.1016/j.jcis.2019.05.047.
- [170] Karl Kratz, Thomas Hellweg, and Wolfgang Eimer. Structural changes in PNI-PAM microgel particles as seen by SANS, DLS, and EM techniques. *Polymer*, 42(15):6631–6639, 2001. ISSN 00323861. doi: 10.1016/S0032-3861(01)00099-4.
- [171] Mohammad Saleem Khan, Gul Tiaz Khan, Abbas Khan, and Sabiha Sultana. Preparation and characterization of novel temperature and ph sensitive (nipam-co-maa) polymer microgels and their volume phase change with various salts. *Polymer Korea*, 37(6):794–801, 2013. doi: 10.7317/pk.2013.37.6.794.

- [172] Yong Li and Toyoichi Tanaka. Study of the universality class of the gel network system. *The Journal of chemical physics*, 90(9):5161–5166, 1989. doi: 10.1063/1.456559.
- [173] Chi Wu and Shuiqin Zhou. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous? *Macromolecules*, 30(3):574–576, 1997. doi: 10.1021/ma960499a.
- [174] Leo E. Gerweck and Kala Seetharaman. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.*, 56(6):1194–1198, 1996. ISSN 00085472.
- [175] Mahrokh Dadsetan, K. Efua Taylor, Chun Yong, eljko Bajzer, Lichun Lu, and Michael J. Yaszemski. Controlled release of doxorubicin from ph-responsive microgels. *Acta Biomaterialia*, 9(3):5438 – 5446, 2013. ISSN 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.019>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112004564>.
- [176] Nicholas A Peppas, Kristy M Wood, and James O Blanchette. Hydrogels for oral delivery of therapeutic proteins. *Expert opinion on biological therapy*, 4 (6):881–887, 2004. doi: 10.1517/14712598.4.6.881.
- [177] Madeline Torres-Lugo, Marcos Garca, Rae Record, and Nicholas A Peppas. Physicochemical behavior and cytotoxic effects of p(methacrylic acid-ethylene glycol) nanospheres for oral delivery of proteins. *Journal of Controlled Release*, 80(1):197 – 205, 2002. ISSN 0168-3659. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00027-5). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365902000275>.
- [178] Daniel A. Carr and Nicholas A. Peppas. Assessment of poly(methacrylic acid-co-n-vinyl pyrrolidone) as a carrier for the oral delivery of therapeutic proteins using caco-2 and ht29-mtx cell lines. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A(2):504–512, 2010. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32395>. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.32395>.

- [179] Matilde Durán-Lobato, Brenda Carrillo-Conde, Yasmine Khairandish, and Nicholas A Peppas. Surface-Modified P(HEMA-co-MAA) Nanogel Carriers for Oral Vaccine Delivery: Design, Characterization, and In Vitro Targeting Evaluation. *Biomacromolecules*, 15(7):2725–2734, jul 2014. ISSN 1525-7797. doi: 10.1021/bm500588x. URL <https://doi.org/10.1021/bm500588x>.
- [180] Lindsey A Sharpe, Julia E Vela Ramirez, Olivia M Haddadin, Kathleen A Ross, Balaji Narasimhan, and Nicholas A Peppas. pH-Responsive Microencapsulation Systems for the Oral Delivery of Polyanhydride Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 19(3):793–802, mar 2018. ISSN 1525-7797. doi: 10.1021/acs.biomac.7b01590. URL <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01590>.
- [181] Geneviève Aubel-Sadron and Danielle Londos-Gagliardi. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 66(5):333–352, 1984. doi: 10.1016/0300-9084(84)90018-X.
- [182] MG Come, A Skladanowski, AK Larsen, and G Laurent. Dual mechanism of daunorubicin-induced cell death in both sensitive and mdr-resistant hl-60 cells. *British journal of cancer*, 79(7):1090–1097, 1999. doi: 10.1038/sj.bjc.6690174.
- [183] M Than Htun. Photophysical study on daunorubicin by fluorescence spectroscopy". *Journal of Luminescence*, 129(4):344 – 348, 2009. ISSN 0022-2313. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.10.020>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022231308003013>", author="M. {ThanHtun}.
- [184] A. Fernández-Nieves, A. Fernández-Barbero, B. Vincent, and F. J. De Las Nieves. Charge controlled swelling of microgel particles. *Macromolecules*, 33 (6):2114–2118, 2000. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma991520l.
- [185] Chen Ye and Hong Chi. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Materials Science and Engineering: C*, 83:233–246, 2018. doi: 10.1016/j.msec.2017.10.003.
- [186] D Ibraheem, A Elaissari, and H Fessi. Administration strategies for proteins

- and peptides. *International journal of pharmaceutics*, 477(1-2):578–589, 2014. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.10.059.
- [187] Munusamy Chamundeeswari, John Jeslin, and Madan Lal Verma. Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17:849–865, 2019. doi: 10.1007/s10311-018-00841-1.
- [188] Víctor López-Dávila, Alexander M Seifalian, and Marilena Loizidou. Organic nanocarriers for cancer drug delivery. *Current opinion in pharmacology*, 12(4): 414–419, 2012. doi: 10.1016/j.coph.2012.02.011.
- [189] Geneviève Gaucher, Prashant Satturwar, Marie-Christine Jones, Alexandra Furtos, and Jean-Christophe Leroux. Polymeric micelles for oral drug delivery. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 76(2):147–158, 2010. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.06.007.
- [190] Priyanshi Agnihotri, Shikha Aery, Abhijit Dan, et al. Temperature-and ph-responsive poly (n-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels as a carrier for controlled protein adsorption and release. *Soft Matter*, 17(42):9595–9606, 2021. doi: 10.1039/d1sm01197a.
- [191] Anuvansh Sharma, Karthik Raghunathan, Helene Solhaug, Jibin Antony, Jørgen Stenvik, Asbjørn Magne Nilsen, Mari-Ann Einarsrud, and Sulalit Bandopadhyay. Modulating acrylic acid content of nanogels for drug delivery & biocompatibility studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 607:76–88, 2022. doi: 10.1016/j.jcis.2021.07.139.
- [192] Dursun Saraydın and Yasemin Işıkver. Calculations of the magnitude of responsivities in ph-, temperature-and ion-responsive hydrogels. *Materials Today Communications*, page 103253, 2022. doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.103253.
- [193] Se-Hyeong Jung, Sabine Schneider, Felix Plamper, and Andrij Pich. Responsive supramolecular microgels with redox-triggered cleavable crosslinks. *Macromolecules*, 53(3):1043–1053, 2020. doi: 10.1021/acs.macromol.9b01292.

- [194] Jie Yang, Rui-Mei Jin, Shen-Yan Wang, Xiao-Ting Xie, Wei Hu, Hong-Feng Tang, and Bo Liu. Co-delivery of paclitaxel and doxorubicin using polypeptide-engineered nanogels for combination therapy of tumor. *Nanotechnology*, 33(15): 155101, 2022.
- [195] Xinyu Zhang, Minyi Zhao, Nan Cao, Wei Qin, Meng Zhao, Jun Wu, and Dong-jun Lin. Construction of a tumor microenvironment ph-responsive cleavable pegylated hyaluronic acid nano-drug delivery system for colorectal cancer treatment. *Biomaterials science*, 8(7):1885–1896, 2020. doi: 10.1039/C9BM01927H.
- [196] Weitai Wu, Jing Shen, Probal Banerjee, and Shuiqin Zhou. Core–shell hybrid nanogels for integration of optical temperature-sensing, targeted tumor cell imaging, and combined chemo-photothermal treatment. *Biomaterials*, 31(29): 7555–7566, 2010. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.030.
- [197] Samad Ahadian, Joel A Finbloom, Mohammad Mofidfar, Sibel Emir Diltemiz, Fatemeh Nasrollahi, Elham Davoodi, Vahid Hosseini, Ioanna Mylonaki, Sivakoti Sangabathuni, Hossein Montazerian, et al. Micro and nanoscale technologies in oral drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 157:37–62, 2020. doi: 10.1016/j.addr.2020.07.012.
- [198] Anubhab Mukherjee, Ariana K Waters, Pranav Kalyan, Achal Singh Achrol, Santosh Kesari, and Venkata Mahidhar Yenugonda. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. *International journal of nanomedicine*, 14: 1937, 2019. doi: 10.2147/IJN.S198353.
- [199] Vladimir P Torchilin. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 24:1–16, 2007. doi: 10.1007/s11095-006-9132-0.
- [200] Omid C Farokhzad, Jianjun Cheng, Benjamin A Teply, Ines Sherifi, Sang-yong Jon, Philip W Kantoff, Jerome P Richie, and Robert Langer. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16):6315–6320, 2006. doi: 10.1073/pnas.0601755103.

- [201] Tehreem Mahmood, Areej Shahbaz, Nazim Hussain, Rahat Ali, Hamid Bashir, and Komal Rizwan. Recent advancements in fusion protein technologies in oncotherapy: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, page 123161, 2023. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123161.
- [202] Sven Frokjaer and Daniel E Otzen. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature reviews drug discovery*, 4(4):298–306, 2005. doi: 10.1038/nrd1695.
- [203] Laura J Macdougall, Marissa E Wechsler, Heidi R Culver, Evan H Benke, Adam Broerman, Christopher N Bowman, and Kristi S Anseth. Charged poly (n-isopropylacrylamide) nanogels for the stabilization of high isoelectric point proteins. *ACS biomaterials science & engineering*, 7(9):4282–4292, 2021. doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01690.
- [204] Alexander V. Kabanov and Serguei V. Vinogradov. Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(30):5418–5429, 2009. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200900441>. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200900441>.
- [205] Michael H Smith and L Andrew Lyon. Tunable encapsulation of proteins within charged microgels. *Macromolecules*, 44(20):8154–8160, 2011. doi: 10.1021/ma201365p.
- [206] Daniel Klinger and Katharina Landfester. Dual stimuli-responsive poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid) microgels based on photo-cleavable cross-linkers: ph-dependent swelling and light-induced degradation. *Macromolecules*, 44(24):9758–9772, 2011. doi: 10.1021/ma201706r.
- [207] Michael Oberle, Cemil Yigit, Stefano Angioletti-Uberti, Joachim Dzubiella, and Matthias Ballauff. Competitive protein adsorption to soft polymeric layers: binary mixtures and comparison to theory. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(7):3250–3258, 2015. doi: 10.1021/jp5119986.

- [208] Chun Y Wong, Hani Al-Salami, and Crispin R Dass. Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International journal of pharmaceutics*, 537(1-2):223–244, 2018. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.12.036.
- [209] Kiran Chaturvedi, Kuntal Ganguly, Mallikarjuna N Nadagouda, and Tejraj M Aminabhavi. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery. *Journal of controlled release*, 165(2):129–138, 2013. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.11.005.
- [210] Nahideh Asadi, Azizeh Rahmani Del Bakhshayesh, Soodabeh Davaran, and Abolfazl Akbarzadeh. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Materials Chemistry and Physics*, 242: 122528, 2020. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122528.
- [211] Muhammad Sohail Sarwar, Qingrong Huang, Abdul Ghaffar, Muhammd Amin Abid, Muhammad Sohail Zafar, Zohaib Khurshid, and Muhammad Latif. A smart drug delivery system based on biodegradable chitosan/poly (allylamine hydrochloride) blend films. *Pharmaceutics*, 12(2):131, 2020. doi: 10.3390/pharmaceutics12020131.
- [212] Helen M Berman, John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, Talapady N Bhat, Helge Weissig, Ilya N Shindyalov, and Philip E Bourne. The protein data bank. *Nucleic acids research*, 28(1):235–242, 2000. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [213] Graham Bentley, Eleanor Dodson, GUY Dodson, Dorothy Hodgkin, and DAN Mercola. Structure of insulin in 4-zinc insulin. *Nature*, 261(5556):166–168, 1976. doi: 10.1038/261166a0.
- [214] Svetlana H Hristova and Alexandar M Zhivkov. Isoelectric point of free and adsorbed cytochrome c determined by various methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174:87–94, 2019. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.10.080.
- [215] Tobias Guckeisen, Saman Hosseinpour, and Wolfgang Peukert. Isoelectric points of proteins at the air/liquid interface and in solution. *Langmuir*, 35 (14):5004–5012, 2019. doi: 10.1021/acs.langmuir.9b00311.

- [216] Piotr Batys, Małgorzata Nattich-Rak, and Zbigniew Adamczyk. Myoglobin molecule charging in electrolyte solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(46):26764–26775, 2020. doi: 10.1039/D0CP03771K.
- [217] Erik Lindahl, Berk Hess, and David Van Der Spoel. Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Molecular modeling annual*, 7(8):306–317, 2001. doi: 10.1007/s008940100045.
- [218] Alexander Wittemann and Matthias Ballauff. Interaction of proteins with linear polyelectrolytes and spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(45):5269–5275, 2006. doi: 10.1039/B609879G.
- [219] Alisa L Becker, Katja Henzler, Nicole Welsch, Matthias Ballauff, and Oleg Borisov. Proteins and polyelectrolytes: A charged relationship. *Current opinion in colloid & interface science*, 17(2):90–96, 2012. doi: 10.1016/j.cocis.2011.10.001.
- [220] Katja Henzler, Bjrn Haupt, Karlheinz Lauterbach, Alexander Wittemann, Oleg Borisov, and Matthias Ballauff. Adsorption of β -lactoglobulin on spherical polyelectrolyte brushes: direct proof of counterion release by isothermal titration calorimetry. *Journal of the American Chemical Society*, 132(9):3159–3163, 2010. doi: 10.1021/ja909938c.
- [221] Xiao Xu, Stefano Angioletti-Uberti, Yan Lu, Joachim Dzubiella, and Matthias Ballauff. Interaction of proteins with polyelectrolytes: Comparison of theory to experiment. *Langmuir*, 35(16):5373–5391, 2018. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b01802.
- [222] A. Pikabea, G. E. Aguirre, J. I. Miranda, J. Ramos, and J. Forcada. Understanding of nanogels swelling behavior through a deep insight into their morphology. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 53:2017–2025, 2015. doi: 10.1002/pola.27653.
- [223] Matthias Karg, Andrij Pich, Thomas Hellweg, Todd Hoare, L Andrew Lyon, JJ Crassous, Daisuke Suzuki, Rustam A Gumerov, Stefanie Schneider, Igor I

- Potemkin, et al. Nanogels and microgels: From model colloids to applications, recent developments, and future trends. *Langmuir*, 35(19):6231–6255, 2019. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b04304.
- [224] Y. Y. Win, P. Charoenkanburkang, V. Limprasutr, R. Rodsiri, Y. Pan, V. Buranasudja, and J. A. Luckanagul. In vivo biocompatible self-assembled nanogel based on hyaluronic acid for aqueous solubility and stability enhancement of asiatic acid. *Polymers*, 13:4071, 2021. doi: 10.3390/polym13234071.
- [225] Andrea Scotti, M Friederike Schulte, Carlos G Lopez, Jérôme J Crassous, Steffen Bochenek, and Walter Richtering. How softness matters in soft nanogels and nanogel assemblies. *Chemical Reviews*, 122(13):11675–11700, 2022. doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00035.
- [226] Matthew Urich and Alan R Denton. Swelling, structure, and phase stability of compressible microgels. *Soft matter*, 12(44):9086–9094, 2016. doi: 10.1039/C6SM02056A.
- [227] Mohammed O Alziyadi and Alan R Denton. Osmotic swelling behavior of surface-charged ionic microgels. *The Journal of Chemical Physics*, 159(18), 2023. doi: 10.1063/5.0161027.
- [228] Frank Scheffold. Pathways and challenges towards a complete characterization of microgels. *Nature Communications*, 11(1):4315, 2020. doi: 10.1038/s41467-020-17774-5.
- [229] Katia Bertoldi, Pedro M Reis, Stephen Willshaw, and Tom Mullin. Negative poisson's ratio behavior induced by an elastic instability. *Advanced materials*, 22(3):361–366, 2010. doi: 10.1002/adma.200901956.
- [230] Harry Ku, Hao Wang, N Pattarachaiyakoop, and Mohan Trada. A review on the tensile properties of natural fiber reinforced polymer composites. *Composites Part B: Engineering*, 42(4):856–873, 2011. doi: 10.1016/j.compositesb.2011.01.010.
- [231] Pierre-Gilles De Gennes. *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell university press, 1979.

- [232] Wenbing Hu. *Polymer physics: a molecular approach.* Springer Science & Business Media, 2012.
- [233] Tyler J Weyer and Alan R Denton. Concentration-dependent swelling and structure of ionic microgels: simulation and theory of a coarse-grained model. *Soft Matter*, 14(22):4530–4540, 2018. doi: 10.1039/C8SM00799C.
- [234] AR Denton. Counterion penetration and effective electrostatic interactions in solutions of polyelectrolyte stars and microgels. *Physical Review E*, 67(1): 011804, 2003. doi: 10.1103/PhysRevE.67.011804.
- [235] Herbert B Callen. *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics.* John wiley & sons, 1991.
- [236] Gromacs - restraints. <https://manual.gromacs.org/current/reference-manual/functions/restraints.html>.