



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: 2023

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 sistematico 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 [\[147, 154\]](#), y principalmente en su uso de secuestro de fármacos [\[155\]](#), 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 [\[153\]](#), 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.

Contents

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	26
1.5 Metodología	28
1.5.1 Teoría Molecular	28
1.5.2 Metropolis Monte Carlo	30
1.5.3 Dinámica Molecular	31
2 Films de hidrogeles poliméricos: Adsorción de poliaminas, encapsulado y liberación de fármacos	33
2.1 Introducción	33
2.2 Metodología	36
2.3 Teoría Molecular	37
2.3.1 Formalismo Teórico	37
2.3.2 Solución Bulk	49
2.3.3 Modelo molecular	52
2.4 Validación experimental	53
2.4.1 Crecimiento controlado de películas delgadas de PMAA.	54
2.4.2 Captura y liberación de doxorrubicina en presencia de poliaminas	56
2.5 Resultados	57

2.5.1	Resultados teóricos	57
2.5.2	Espectro UV-Visible	64
2.6	Conclusiones	68
3	Microgeles poliméricos: Respuesta a estímulo y encapsulado/liberación de fármacos	70
3.1	Introducción	70
3.2	Metodología	73
3.2.1	Teoría: Fase Microgel	73
3.2.2	Fase solución	80
3.2.3	Minimización gráfica	81
3.2.4	Incorporación de adsorbatos: Modificación del método teórico .	82
3.3	Resultados y discusión	87
3.3.1	Respuesta al pH y la concentración de sal	87
3.3.2	Respuesta a la Temperatura	92
3.3.3	Efecto del grado de entrecruzamiento	96
3.3.4	Adsorción de drogas	97
3.4	Conclusiones	102
4	Impacto de la funcionalización de la red polimérica en la adsorción de proteínas en nanogeles poliméricos.	104
4.1	Introducción	104
4.2	Teoría Molecular	107
4.2.1	Formalismo teórico	108
4.2.2	Solución Bulk	117
4.2.3	Modelo Molecular: Proteínas	119
4.2.4	Modelo Molecular: Red polimérica	119
4.3	Resultados y discusión	122
4.3.1	Caraterización del nanogel	122
4.3.2	Adsorción de proteínas en nanogeles basados en MAA	127
4.3.3	Adsorción de insulina en nanogeles basados en AH	134
4.4	Conclusiones	137

5 Soluciones coloidales	140
5.1 Introducción	140
5.2 Metodología	142
5.2.1 Potencial termodinámico intramolecular	142
5.2.2 Energía intermolecular: Interacción entre nanogeles.	148
5.2.3 Metropolis-MonteCarlo	150
5.3 Nanogel aislado	151
5.3.1 Energía interna	152
5.3.2 Fluctuación en Volumen	152
5.4 Resultados	156
5.4.1 Simulaciones Montecarlo	156
5.4.2 Respuesta a estímulos: pH, concentración salina y temperatura.	159
5.5 Conclusiones	165
A Definiciones termodinámicas	166
A.1 Entropía de mezcla	166
A.2 Energía química y de mezcla del gel	167
B Generación de configuraciones	169
B.1 Configuraciones red polimérica nanogel	169
C Resolución numérica: Teoría Molecular	172
C.1 Films poliméricos	172
C.2 Nanogeles estructurados	175
Bibliography	178

List of Figures

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.	22
1.2	Esquema de funcionamiento de nanogeles como transportadores de medicamentos. Se aprovecha los diferentes ambientes que hay en el cuerpo humano para el diseño de hidrogeles que liberen...	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.	36
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.	52
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.	55
2.4	Esquema que muestra la carga de doxorrubicina en el film de hidrogel de PMAA y su liberación en presencia de espermidina.	56

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 [196]. No hay doxorrubicina en estas soluciones. . . .	58
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.	60
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.	61
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 $NaCl$	62
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). . . .	63

- 2.10 Carga de doxorrubicina en films de PMAA y liberación de las mismas en agua, representada como el cambio en la absorbancia ($a \lambda = 490 nm$) 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) 64
- 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 ($a \lambda = 490 nm$) 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) 65
- 2.12 (A) Representación esquemática de la recarga/liberación de Doxo después de la adsorción de poliaminas. (B) El cambio en la absorbancia ($a \lambda = 490 nm$) 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). 67
- 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. 74

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).	81
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.	86
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.	87
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).	89
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.	91
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).	92

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.	94
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. , en la T_{PT}</i>); x_{MAA^-} es proporcional a la carga total del polímero; N_{seg} es el mismo para todos los microgeles.	95
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.	96
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 NI-PAm. 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.	98
3.12 Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubicina (A) y doxorrubícina (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).	99
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.	100

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 daunorrubicina (A) y doxorrubicina (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). ¹⁰¹	101
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)	121
4.2 A: Los nanogeles están 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 functionalizadas con unidades sensibles al pH. B: Gráfico del grado de carga ideal dependiente del pH de la unidad funcional aislada en solución diluida.	122
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 $10^{-3} M$	123

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.	125
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.	128
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.	129
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.	131
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 $10^{-6} M$	133
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 $[Insulina] = 10^{-6} M$	135

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. . . .	136
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.	151
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	154
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	156
5.5 Densidad de probabilidad de tamaño para 3 diferentes soluciones. Se considera un factor de empaquetamiento de $\zeta = 1.0, 0.5$ y 0.01 para cada una de las soluciones. El radio de un nanogel aislado es de 57.2 nm. Las condiciones bulk para el potencial intramolecular, Ω_{NG} , corresponden a pH 4.65, temperatura $25^{\circ}C$ y 1 mM en [KCl].	157
5.6 Densidad de distribución radial para las tres soluciones de nanogeles. Las curvas correponden a los tres factores de empaquetamiento estudiados: 1.0, 0.5 y 0.01. Las condiciones del bulk de la solución son pH 4.65, $[KCl] = 1$ mM y $25^{\circ}C$. En el inset se muestra la curva correspondiente a $\zeta = 0.01$	160
5.7 Variación de radio medio de la solución de nanogeles en función del pH de trabajo. Temperatura $25^{\circ}C$ concentración salina 1 mM en KCl . Cada curva correponde a un grado de empaquetamiento. En puntos el sistema aislado o dilución infinita.	160

5.8	Grado de carga medio, $\langle f \rangle$, de la solución de nanogeles en función del pH del medio. Se consideran tres densidades dadas por el factor de empaquetamiento: $\zeta = 1.0, 0.5$ y 0.01 . La temperatura del sistema es 25°C y la concentración de sal 1 mM .	162
5.9	R medio en función de la concentración de sal, para diferentes grados en empaquetamiento. El pH de la solución es 4.65 , la temperatura 25°C , en línea sólidas se presentan valores de $\zeta = 1.0, 0.5$ y 0.01 , a trazos se muestra un nanogel aislado.	163
5.10	Tamaño medio de la solución de nanogeles como función de la temperatura del bulk. pH 4.65 , $[KCl] 1\text{m M}$ y $\zeta = 0.5$	164
B.1	Estrucutra base para la generación de configuraciones de nanogeles	169
B.2	Diferentes radios originados con el potencial armonico de retriccción.	171

List of Tables

2.1	Modelo de grano grueso. Los valores de pKa asignados a las diferentes unidades de grano grueso se obtuvieron todos de la literatura [2, 7, 35], y los volúmenes moleculares corresponden a los valores de Van der Waals. Valores entre paréntesis () indican la carga de las especies químicas ionizadas.	54
3.1	Propiedades moleculares de las diferentes especies químicas consideradas. (*Para la especie desprotonada).	79
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 $[KCl] = 10^{-2}M$	82
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.)	86
3.4	pka aparente de la fig. 3.4 para un gel MG100-35 a $25^{\circ}C$	88

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 [62]: <i>Cys[*]</i> 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 [62]. 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 [73, 133], se describe utilizando las unidades de grano grueso Hem1 y Hem2. El complejo contiene dos de cada una de estas unidades.	120
5.1 Tabla con los valores de radio óptimo para las condiciones bulk de pH = 4.65, temperatura = 25°C, y [KCl] = 1 mM.	158

Chapter 1

Introducción

1.1 Hidrogeles poliméricos: Aplicaciones biomédicas.

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 [228], desde su uso en la creación de espumas y adhesivos [39, 215], hasta su aplicación en la industria cosmética y de pinturas, ofreciendo características singulares a productos que enriquecen nuestra vida diaria [69]. En la industria alimentaria, los hidrogeles poliméricos actúan como aditivos esenciales, contribuyendo a la textura, preservación y seguridad de los alimentos que consumimos [103].

Los hidrogeles se pueden utilizar para mejorar la retención de agua y nutrientes en el suelo, lo que puede ayudar a aumentar la productividad de los cultivos y reducir la necesidad de riego [REFs] . Además, estos materiales se pueden utilizar para proteger las plantas de las sequías y las plagas. En el ámbito de la remediación ambiental, los hidrogeles se pueden utilizar para absorber y retener contaminantes [REFs] , lo que puede ayudar a limpiar el agua, el suelo y el aire. Además, los hidrogeles se pueden utilizar para transportar y liberar agentes remediadores, acelerando el proceso de

limpieza [REFs] . En general, los hidrogeles poliméricos son materiales versátiles con un amplio potencial de aplicación. Su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones los convierte en una herramienta valiosa para una variedad de industrias.

Sin embargo, uno de los terrenos más emocionantes 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, amigables con el ambiente 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 personalizados 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 entregamos y administramos medicamentos, sino que también puede tener un impacto positivo en la calidad de vida de las personas. 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 hidrogeles permite que se eliminen del cuerpo de manera natural, evitando la necesidad de cirugías para su extracción.

En estas últimas aplicaciones médicas, en particular, los films y geles poliméricos han sido pioneros en su uso y han tenido un creciente interés. Los films y geles poliméricos son materiales que han sido ampliamente estudiados y utilizados en diversas aplicaciones, incluyendo la medicina. 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 les dan cualidades extraordinarias y son las responsables de sus múltiples aplicaciones.

Los films poliméricos son capas delgadas y planas de material polimérico que

pueden tener diferentes espesores. Mientras que los microgeles son partículas tridimensionales de polímeros entrecruzados que, al igual que los films, tienen la capacidad de adsorber grandes cantidades de agua o solventes. Los nanogeles son estructuras similares a los microgeles, pero su tamaño se encuentra en la escala nanométrica.

Los films y geles poliméricos tienen la ventaja de poder modificarlos y manipularlos, lo que les permite adaptarse a diferentes necesidades y funciones. Como resultado, los hidrogeles de polímeros son actualmente candidatos prometedores para el desarrollo de una variedad de biomateriales con aplicaciones en biosensores [77, 224], ingeniería de tejidos [130, 206], regeneración ósea [18], materiales biomiméticos [61, 217], entre muchas otras aplicaciones biomédicas [45]. Por ejemplo, los hidrogeles se pueden utilizar para crear parches transdérmicos que liberan fármacos de manera controlada y sostenida [REFs] .

En conclusión, hidrogeles poliméricos tienen un gran potencial para revolucionar una amplia gama de industrias, desde la cosmética y alimentaria 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 respuesta a estímulos de los films y/o 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 o deshincharse en respuesta a cambios en el pH de la solución en la que se encuentran [195]. Esta respuesta al pH viene acompañada con una regulación de carga, con lo que se percibe en la mayoría de los casos una respuesta a la concentración salina [REFs] . Análogamente, los hidrogeles compuestos por cadenas de polímeros termosensibles experimentan una transición de fase de volumen. Esta respuesta viene caracterizada por una temperatura característica [149, 150]. Este comportamiento se origina

porque tales polímeros son insolubles en agua por encima de cierta temperatura de solución crítica más baja (LCST por sus siglas en inglés) [88]. En particular, los hidrogeles compuestos por poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) poseen una LCST de alrededor de 32°C [182].

En la figura 1.1 se muestran los diferentes monómeros que pueden contener las cadenas poliméricas que componen la red de los nanogeles. Los primeros tres muestran respuesta al pH y a la concentración salina (alilamina, ácido metacrílico y ácido acrílico), la última molécula es la N-isopropilacrilamida (NIPAm) la cual presenta respuesta a la temperatura.

Los monómeros presentados en la figura 1.1 tienen la particularidad de formar redes tridimensionales biodegradables y biocompatibles [REFs] , lo que los vuelve atractivos para el diseño de biomateriales. Además, el monómero del polímero termosensible, NIPAm, al poseer una temperatura de transición de volumen alrededor de la temperatura corporal, sus hidrogeles han generado un gran interés para aplicaciones biomédicas [63].

Es posible conseguir estrategias para controlar la temperatura de transición de estos hidrogeles, las cuales incluyen la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [31, 68, 118, 124]. Este último enfoque produce hidrogeles de respuesta múltiple que son susceptibles a cambios en la temperatura, el pH y la concentración de sal. Los microgeles de NIPAm y AA han sido ampliamente estudiados, y se ha demostrado que su temperatura de transición depende del pH de la solución y la concentración de sal [21, 27, 83, 136]. También se han investigado microgeles de copolímeros de NIPAm y MAA [46, 58, 70], y se ha demostrado que su temperatura de transición también depende de la fracción de monómero ionizable en las cadenas de polímero [27, 66, 70, 83, 106, 136, 213].

La naturaleza con base en incipientemente hidrofílica de los nanogeles son 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 los hidrogeles puede proteger a las proteínas de la desnaturización y la agregación durante cuando se liberan de los hidrogeles [14, 22, 179], mientras permanecen activas y estructuradas cuando se liberan de los hidrogeles [208]. En la administración oral de fármacos, los hidrogeles

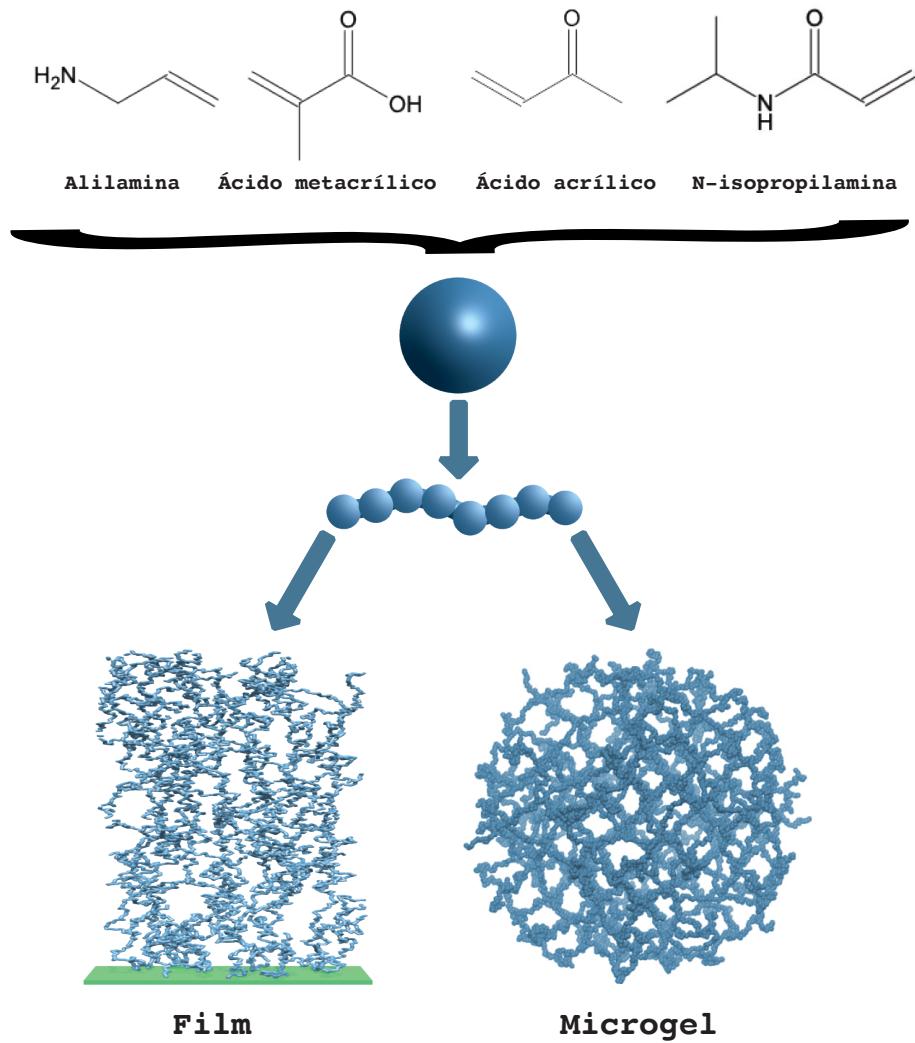


Figura 1.1: Moléculas que conforman los diferentes monómeros de las redes poliméricas que dan respuesta a los hidrogeles. Con respuesta al pH y concentración de sal: alilamina (base), ácido metacrílico y ácido acrílico. con respuesta a la temperatura: N-isopropilacrilamida. Estas moléculas son las utilizadas para los hidrogeles usados en esta tesis.

con respuesta de pH se han investigado en gran medida como vehículos funcionales que pueden encapsular y administrar proteínas, evitando su degradación por el entorno gastrointestinal [99, 168?]. Además, su escaso tamaño les permite responder rápidamente luego de recibir el estímulo [201].

Nanogeles con respuesta al pH se han considerado para la administración oral

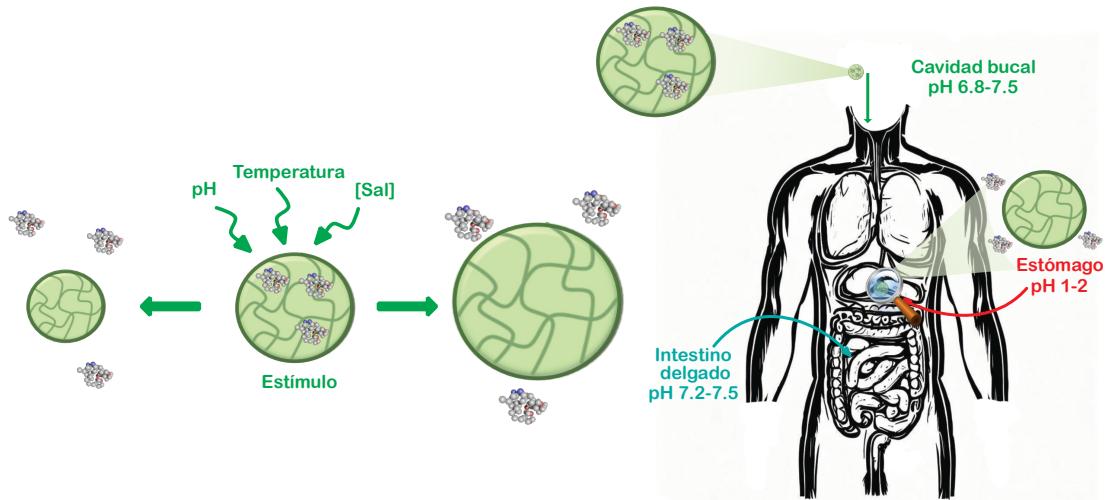


Figura 1.2: Esquema de funcionamiento de nanogeles como transportadores de medicamentos. Se aprovecha los diferentes ambientes que hay en el cuerpo humano para el diseño de hidrogeles que liberen...

de fármacos. En este ámbito, los cambios de pH que ocurren 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 levemente 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 [161]. Esto se ve esquematizado en la figura 1.2 en la cual se muestra cómo la respuesta a estímulo de los nanogeles funciona como agente liberador de drogas. Lado izquierdo de la figura. A la derecha de la figura, se muestran los diferentes ambientes del tracto digestivo, en cuanto a valores de pH, con los cuales se pueden aprovechar los nanogeles con respuesta al pH.

Por otro lado, el microambiente local alrededor del tejido canceroso puede presentar un pH más ácido en comparación con las condiciones fisiológicas habituales [57, 105, 202], por lo que los nanogeles con respuesta al pH están siendo evaluados para la administración de medicamentos en el tratamiento del cáncer en el futuro.

[86, 151]. Por ejemplo, se han utilizado nanogeles de quitina para la administración de doxorubicina en diferentes tipos de cáncer, incluyendo pulmón, mama, hígado y próstata [80].

Por otro lado, los nanogeles de polímeros termosensibles pueden ser utilizados para la administración localizada de anestésicos [?]. Como vehículos para el suministro de drogas, los 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.

Recientemente se investigaron dispositivos basados en microgeles de poli(NIPAm-co-MAA) para la encapsulación/liberación del fármaco quimioterapéutico Doxorrubicia [59, 129, 156]. Estos autores mostraron el uso de microgeles para la liberación controlada de sustancias bioactivas con carga opuesta. La incorporación del comonomero ácido proporciona un mecanismo controlado por el pH para la captura/liberación de moléculas con carga opuesta, lo que hace que los microgeles de respuesta múltiple sean atractivos para el diseño de sistemas funcionales de administración de fármacos [48].

En síntesis, el rango de las potenciales aplicaciones biomédicas de los nanogeles es extenso e incluye desarrollos, más específicamente en medicina, 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 [?]. En el tratamiento de la diabetes, se investigan nanogeles sensibles a la glucosa [?] y nuevos métodos de administración de insulina basados en nanogeles.

Estas son algunas razones por las cuales los nanogeles poliméricos son hoy en día una de las primeras opciones consideradas al diseñar biomateriales con funciones específicas [175, 197]. El estímulo que dispara la respuesta de los nanogeles puede ser suministrado por un gradiente en la composición fisiológica, ya sea natural o inducido por un estado patológico. La versatilidad de estos materiales difícilmente puede ser alcanzada con otro tipo de nanopartículas, incapaces de responder a cambios en las condiciones del medio que pueden ser relativamente moderados.

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 dicho desafío de tal manera de comprender la fisicoquímica, relevante, que involucra a los hidrogeles poliméricos, films y micro/nanogeles, con su capacidad de responder a estímulos y como consecuencia ser utilizados para el desarrollo de dispositivos para el encapsulado y liberación de medicamentos.

En la siguiente sección se plantean los objetivos de la tesis en el marco de lo desarrollado en la misma.

1.3 Objetivos

En la búsqueda de estudiar el uso de los hidrogeles poliméricos como transportadores de medicamentos, se plantearon diferentes objetivos de tal forma de comprender la fisicoquímica que envuelve a todos estos sistemas.

En primera instancia, en el capítulo 2, se estudió y se muestra el uso de films poliméricos basados en ácido poli(metacrilato) (PMAA) como capturadores de poliaminas, las cuales funcionan como disparadores para la liberación de doxorubicina. En este trabajo se *desarrolló un modelo mecano-estadístico utilizando Teoría Molecular (TM)* para describir la respuesta a cambios de pH y concentración de sal.

En el capítulo 3, se incorporaron co-monómeros de NIPAm de modo **de extender dicho modelo para investigar el comportamiento de microgeles de copolímeros con respuesta a múltiples estímulos**. En particular se estudiaron microgeles poliméricos compuestos por poli-(NIPAM-co-MAA) que poseen respuesta multi-estímulo (pH, concentración salina y temperatura) y su potencial uso como encapsuladores de drogas anti-cáncerígenas como la daunorubicina y la doxorubicina. Para dicho estudio se derivó una nueva teoría termodinámica que permitía el estudio de estos microgeles considerandolos como una fase homogénea.

En el capítulo 4 se estudiaron **los mecanismos de adsorción de diferentes biomoléculas en los microgeles en función de las condiciones del medio y la estructura/composición química de las cadenas poliméricas**. Los nanogeles basados en MAA y AH son utilizados para comprender cómo la estructura de la red polimérica modifica la adsorción de proteínas como lo son el citocromo c, mioglobina

y la insulina.

En este capítulo se **combinaron simulaciones de TM y Dinámica Molecular (DM)**, esta última para la obtención de las configuraciones que dan origen a las estructuras de las redes poliméricas.

Finalmente, en el capítulo 5 se incorpora simulaciones de Monte Carlo para estudiar el comportamiento de nanogeles en soluciones relativamente concentradas. Se retoma el modelo estudiado en el capítulo 3, en donde se consideraba un sistema aislado, y se estudia cómo los diferentes estímulos, cambios en el pH, concentración salina y temperatura, son modificados con la concentración de partículas en la solución.

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

1.4 Antecedentes

Los objetivos planteados en la presente tesis se basan en el desarrollo de una teoría molecular con la cual poder describir la termodinámica que envuelve a los hidrogeles poliméricos. 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.

Se han descrito y aplicado teorías y simulaciones moleculares en varios niveles de resolución para investigar el comportamiento de los microgeles poliméricos sensibles a estímulos. En particular, Quesada-Pérez et al. [163] 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. [9] emplearon simulaciones de grano grueso para el modelado de geles polielectrolíticos. En este enfoque computacional se basaron en interacciones partícula-partícula entre unidades de polímero.

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 abordado el efecto de la temperatura y la calidad del solvente [4, 9, 81, 135, 162].

Recientemente, estudios con simulaciones han considerado la respuesta al pH de microgeles compuestos de polímeros reguladores de carga [71, 121, 171, 186, 188]. 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 [32, 158].

Polotsky et al. [158] basa su teoría en equilibrios osmóticos y teniendo en cuenta explícitamente el equilibrio de ionización dentro de sus microgeles. Llegando a predecir patrones complejos en la dependencia de las dimensiones de las partículas de microgel, es decir, sus parámetros de control.

En este sentido, mediante el uso de teoría a nivel molecular, se ha logrado estudiar la termodinámica de hidrogeles de cadenas de poliácido entrecruzadas, incluyendo películas delgadas depositadas en superficies [113, 139] y películas ancladas en superficies [116].

En estos trabajos, Longo et al. [115] ha investigado el rol que cumple los cambios en el pH y la concentración de sal, respectivamente. 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 [49, 65, 112, 115, 140, 199], 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 [200, 216]. Estos resultados se lograron mediante la formulación de una energía libre general que incluye todas las contribuciones relevantes de estos sistemas poliméricos: el equilibrio ácido-base, la pérdida entrópica de confinamiento molecular, los grados de libertad conformacionales de la red y las proteínas (o adsorbatos en general), y las interacciones electrostáticas, de Van der Waals y estéricas.

En estos trabajos se ha buscado comprender cómo la adsorción en estas películas de hidrogel depende del pH y la concentración de sal, tanto en soluciones de proteínas individuales como en mezclas [65, 112, 200]. En este método, 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 [117, 200].

En este contexto, esta tesis busca avanzar en el entendimiento de la fisicoquímica que subyace en la actuación de los hidrogeles poliméricos como biomateriales y su interacción con proteínas y otras biomoléculas. Además, esta investigación busca explorar nuevas estrategias de funcionalización de estos hidrogeles para controlar su respuesta e interacción.

Para lograrlo, utilizaremos simulaciones moleculares por computadora, las cuales nos brindan acceso a información esencial que a menudo no está disponible en el laboratorio. Al mismo tiempo, el conocimiento adquirido tiene como objetivo guiar el diseño en el laboratorio de hidrogeles poliméricos con propiedades óptimas para aplicaciones específicas en el campo de los biomateriales.

1.5 Metodología

1.5.1 Teoría Molecular

La teoría es un enfoque de funcional de la densidad en el cual los campos de interacción se determinan de manera autoconsistente al considerar modelos muy detallados para cada uno de los componentes moleculares del sistema.

Obtenemos información estructural detallada, así como propiedades termodinámicas. En particular, es posible mostrar el fuerte acoplamiento que existe entre el estado termodinámico y la estructura del sistema. De esta manera, se puede estudiar cómo las variaciones en las condiciones de la solución, por ejemplo, la fuerza iónica y el pH, entre otros, cambian las propiedades termodinámicas. Para tal fin se usa una descripción molecular de grano grueso de las diferentes especies químicas que componen el sistema. Dicha descripción incluye forma, tamaño, distribución de carga (si los hubiese) y estado de protonación de cada componente molecular en los casos que corresponda.

La teoría se deriva al escribir la energía libre del sistema como un funcional de las densidades de las especies en solución, las conformaciones (en esta tesis de la red polimérica) y el potencial electrostático, considerando explícitamente los equilibrios ácido-base. Conocer la energía libre total del sistema es la que nos permite explicar

toda la fisicoquímica del mismo. La minimización de esta energía respecto a la funcional de las densidades permiten obtener el estado de menor energía que estabiliza al sistema.

Para ejemplificar, consideremos un sistema con una red polimérica que se encuentra en equilibrio termodinámico con una solución bulk de la cual se conoce su temperatura y composición: pH, concentración salina y adsorbatos.

Con estas consideraciones es posible describir el sistema con un potencial termodinámico compuesto por diferentes contribuciones, entre las cuales está una energía libre química (F_{qca}) dada por los equilibrios ácido-base de las especies titulables (unidades presentes, si las hay, en la red polimérica y/o adsorbato o viceversa). Si consideramos nuestra red polimérica como punto de referencia del sistema, obtenemos una entropía de mezcla (S_{mez}) dada por las especies móviles: moléculas de agua, iones de sal, adsorbatos. Para la red polimérica existe una entropía de mezcla, pero esta está dada por las diferentes configuraciones a las que pueden acceder las cadenas poliméricas que conforman la red, en particular la denominamos $S_{conf,red}$. Otro tipo de interacciones que se incluyen en este ejemplo son las interacciones entre las demás especies libres. Energías proporcionadas por las interacciones del tipo electrostático (U_{elec}) e interacciones estéricas (U_{est}). En esta última se consideran las restricciones sobre el volumen: todo el espacio debe estar ocupado y no pueden existir superposiciones entre especies. Para completar el equilibrio termodinámico es indispensable la energía libre como resultado del equilibrio químico de las especies libres: $\sum_{\gamma} N_{\gamma} \mu_{\gamma}$, en donde γ recorre todas las especies libres: moléculas de agua, y sus respectivos iones (hidronio e hidroxido), adsorbato e iones provenientes de la disolución de la sal.

Todas las contribuciones mencionadas anteriormente, son funcionales de otras funciones, como son el grado de carga, las densidades locales de cada especie, potencial electrostático y una presión osmótica. En conjunto, lo que se obtiene es un potencial termodinámico que es un funcional de funciones. La minimización de este potencial energético nos permite escribirlo en función de potenciales de interacción locales. En cada capítulo daremos la derivación detallada y quiénes son y cómo es posible llegar a estos potenciales.

Finalmente, la resolución numérica de estos potenciales se hace con el método

de Newton-Krylov [29] implementado en código FORTRAN escritos en el grupo de investigación. La metodología de la resolución numérica de los sistemas de estudio es detallada en el anexo B.

1.5.2 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 funciona generando una secuencia de puntos en el espacio de la muestra, comenzando en un punto aleatorio. En cada paso, se genera un nuevo punto a partir de una distribución propuesta. Si la probabilidad de la nueva muestra es mayor que la probabilidad de la muestra actual, la nueva muestra se acepta. De lo contrario, la nueva muestra se rechaza y se mantiene la muestra actual. Este algoritmo fue propuesto por Nicholas Metropolis, Walter Wolfgang Gibbs, Geoffrey Hastings, y Ronald L. Tanner en 1953. [132] El proceso Metropolis-Monte Carlo consiste en los siguientes pasos:

- Inicialización: Se comienza con una configuración inicial del sistema que puede ser generada aleatoriamente o de alguna otra manera relevante para el problema en cuestión.
- Perturbación: Se genera una nueva configuración perturbando la configuración del estado actual. Esto puede realizarse mediante cambios aleatorios pequeños en las posiciones, orientaciones u otras propiedades de las partículas o componentes del sistema.
- Cálculo de la Energía: Se calcula la energía del sistema para la nueva configuración y la configuración actual. La energía puede incluir términos potenciales, cinéticos y/o interacciones entre componentes.
- Comparación de Energías: Se compara la energía de la nueva configuración con la energía de la configuración anterior a la perturbación. Si la energía disminuye, la nueva configuración se acepta automáticamente. Si la energía aumenta, se calcula una probabilidad de aceptación basada en la diferencia de

energía y una temperatura ficticia. Esta probabilidad introduce una componente estocástica en el proceso, permitiendo la exploración de configuraciones de mayor energía.

- Decisión de Aceptación: Se genera un número aleatorio y se compara con la probabilidad de aceptación. Si el número aleatorio es menor que la probabilidad de aceptación, la nueva configuración se acepta; de lo contrario, se mantiene la configuración actual.
- Iteración: Los pasos 2-5 se repiten muchas veces para generar una secuencia de configuraciones. Estas configuraciones forman una muestra estadística del espacio configuracional, lo que permite el análisis de propiedades del sistema.
- Análisis: Utilizando la secuencia de configuraciones generadas, se pueden calcular propiedades macroscópicas del sistema, como promedios de energía, densidades, funciones de distribución, entre otras.

El algoritmo Metropolis-Hastings es un método general que puede ser utilizado para mapeo de muestras de una amplia variedad de distribuciones de probabilidad. Es un método eficiente y robusto, y se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo física, química, biología, economía, y finanzas.[\[193\]](#)

1.5.3 Dinámica Molecular

La dinámica molecular (MD) es una técnica computacional que permite estudiar el comportamiento de las moléculas a través del tiempo. Esta técnica simula el movimiento de los átomos que componen las moléculas, y permite observar cómo las moléculas interactúan entre sí y con su entorno. GROMACS es un software de código abierto que se utiliza para realizar simulaciones de dinámica molecular. [\[110\]](#) El paquete de simulación GROMACS es ampliamente utilizado para llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular en sistemas biológicos, químicos y materiales. Su capacidad para modelar la interacción entre partículas y representar fuerzas realistas permite el estudio de sistemas complejos y la obtención de resultados cuantitativos y cualitativos significativos.

Esta metodología se ha usado en conjunto de la teoría molecular, en particular las simulaciones de DM se han utilizado para la generación de configuraciones de la red polimérica de los hidrogeles de estudio. Se describe la confección de las configuraciones para un nanogel polimérico en el anexo B.

Chapter 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 [75, 196]. 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 [134].

En el entorno de las células sanas, las poliaminas se encuentran en concentraciones micromolares a unos pocos milimolares [159, 174]. 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 [173]. La producción de putrescina comienza cuando la enzima ornitina decarboxilasa (ODC) la cataliza [35, 148, 196]. Su mayor actividad es la responsable de las concentraciones elevadas de poliaminas [7, 143, 196]. Concentraciones anómalas de poliaminas pueden indicar la presencia de una célula tumoral [55, 146], pero también un exceso de disponibilidad de poliaminas puede aumentar la velocidad a la que los tumores se propagan y metastatizan [196]. Al mismo tiempo, dicho exceso puede inhibir los mecanismos inmunitarios que las células tienen para evitar la propagación del tumor [79, 196]. De hecho, los pacientes con niveles elevados de poliaminas generalmente tienen un pronóstico más desfavorable [76, 196]. 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 [16, 17, 38, 196]. 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 [209]. 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 [108, 120, 160, 226]. 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 [86]. Nuestra contribución aborda una pregunta fundamental: ¿Es posible aprovechar las propiedades sensibles al entorno de los hidrogeles de poliácido 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 [145]. Es uno de los fármacos anti-neoplásicos más potentes y tiene la ventaja experimental de que se puede monitorear mediante fluorescencia y/o absorbancia [189]. 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 [34]. Además, debido a que tiene carga positiva, la doxorrubicina puede encapsularse en nanogeles aniónicos [108] o inmovilizarse en superficies nanohíbridas cargadas negativamente [89].

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 fisicoquímico 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.

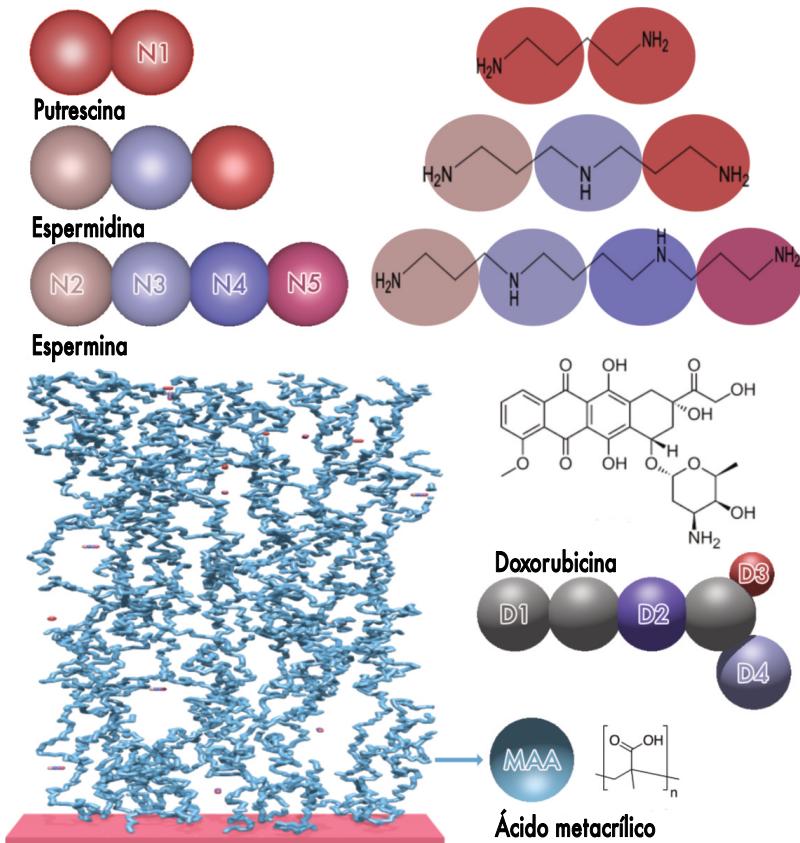


Figura 2.1: Esquema del modelo de film polimérico compuesto por cadenas de MAA. Se muestra además las poliaminas investigadas con su respectivo modelo molecular de grano grueso.

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 [65, 117]. 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) [147] 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 traslación (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 electrostática 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 mostrara 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 exemplificar 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 $z \rightarrow \infty$:

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

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:

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

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

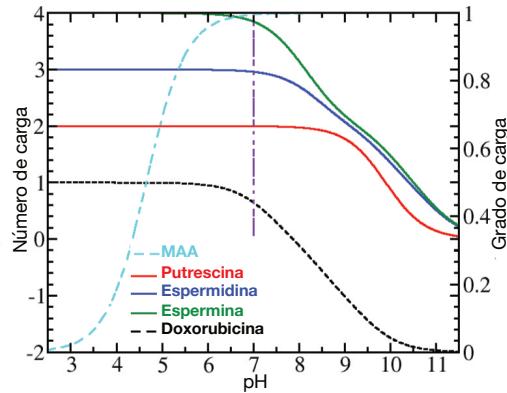


Figura 2.2: Número promedio de carga neta de la doxorrubiciна y las poliaminas en función del pH en soluciones diluidas. El eje derecho muestra el grado de carga de una unidad de ácido metacrílico aislado. La línea vertical punteada indica el pH fisiológico.

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 [2, 7, 35].

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 [71, 101, 128, 164]. 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 [65].

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	pKa	q	v (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
MAA	4.65	(-1)	0.065
<i>H</i> ₂ O	-	0	0.03
<i>H</i> ₃ O ⁺	-	+1	0.03
<i>OH</i> ⁻	-	-1	0.03
<i>Na</i> ⁺	-	+1	0.033
<i>Cl</i> ⁻	-	-1	0.033

Tabla 2.1: Modelo de grano grueso. Los valores de pKa asignados a las diferentes unidades de grano grueso se obtuvieron todos de la literatura [2, 7, 35], 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

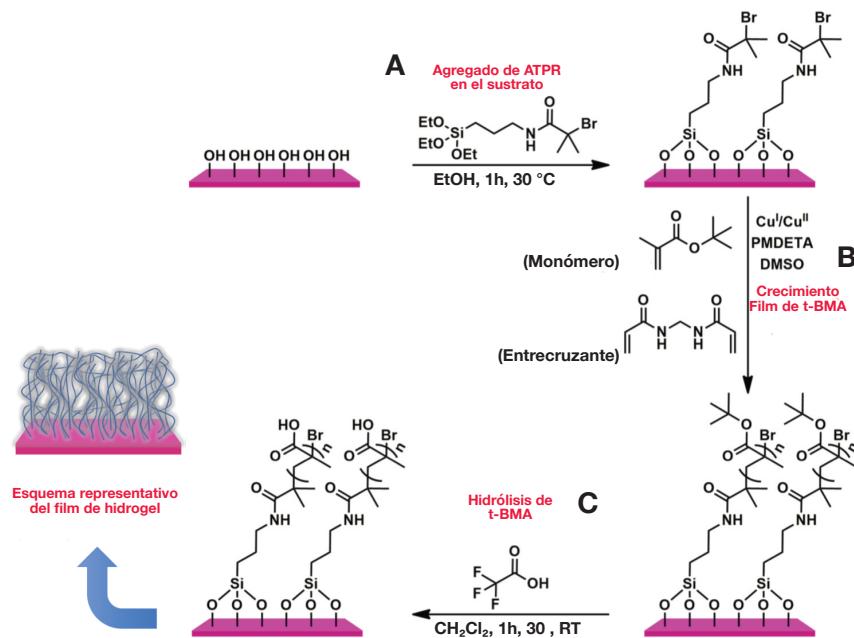


Figura 2.3: Pasos de la síntesis de la película delgada de PMAA, representados como: A) Iniciador ATRP en sustratos; B) Crecimiento de la película de t-BMA; C) Hidrólisis del t-BMA.

vidrio 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 [220]) 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 Ramè-Hart modelo 290) utilizando agua fue de alrededor de 63.6°±0.1° sin cambios con el tiempo, ligeramente menor que el del portaobjetos de vidrio (64.7°± 0.2°).

2) *Crecimiento de la película de ter-butil metacrilato.* Las polymerizaciones de ATRP se llevaron a cabo de acuerdo con la referencia [28]. 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.

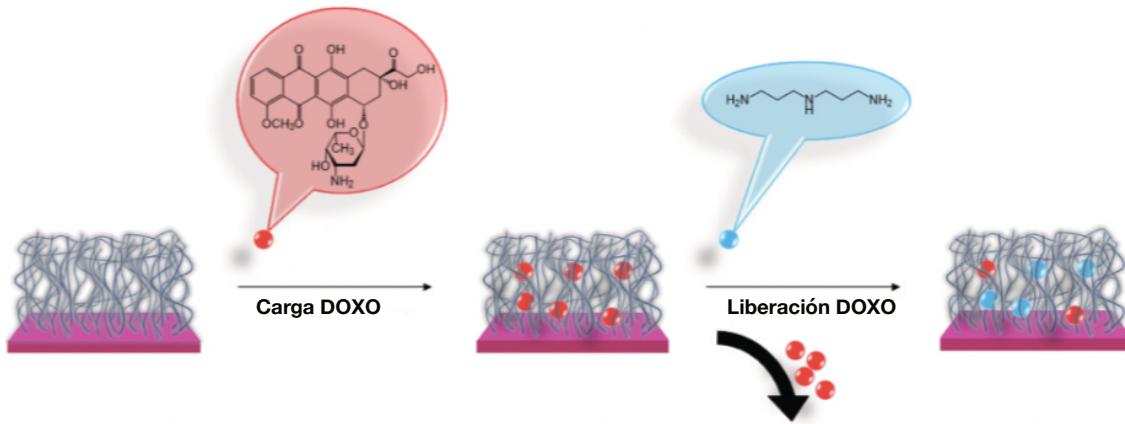


Figura 2.4: Esquema que muestra la carga de doxorrubiciна en el film de hidrogel de PMAA y su liberación en presencia de espermidina.

2.4.2 Captura y liberación de doxorrubiciна en presencia de poliaminas

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

10^{-2} M en agua ultrapura *Milli-Q* ($18.2 M\Omega \text{ cm}$) 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.

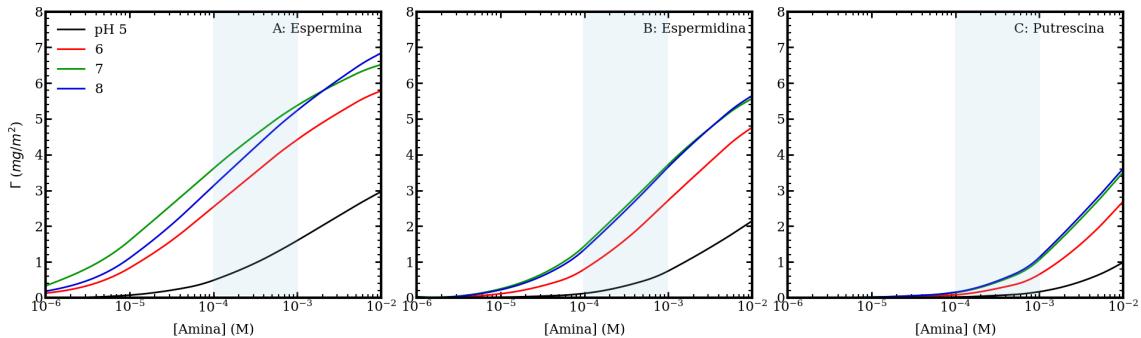


Figura 2.5: Gráfico de la adsorción, Γ , de espermina (A), espermidina (B) y putrescina (C) en función de su concentración en la solución bulk. Las diversas curvas en cada panel corresponden a diferentes valores de pH (alrededor de 7) y condiciones de sal fisiológica, $[NaCl] = 100$ mM. Las regiones sombreadas indican el rango de concentraciones saludables de poliaminas [196]. 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 [100, 166, 170, 184, 202, 207], 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 [196]. 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. [176] 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. [183] 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.

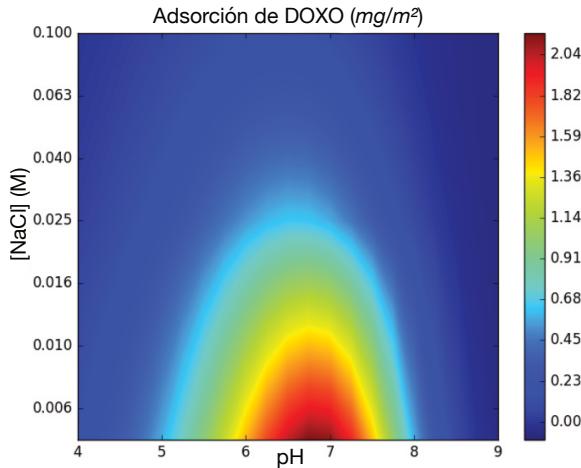


Figura 2.6: Mapa de color que muestra la adsorción de la doxorrubicina (ver ecuación 2.46) en función de la composición de la solución, es decir, el pH y $[NaCl]$; la concentración del fármaco en la solución es $[Doxo] = 1 \text{ mM}$.

A continuación, consideramos la capacidad de las películas de hidrogel de PMAA para incorporar doxorrubicina (Doxo). Los hidrogeles de cadenas de poliácido entrecruzadas son sensibles a cambios en la fuerza iónica de la solución o la concentración de sal [223]. 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 doxorrubicina en condiciones de laboratorio típicas, abarcando un amplio rango de pH y $[NaCl]$.

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 doxorrubicina 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 doxorrubicina 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

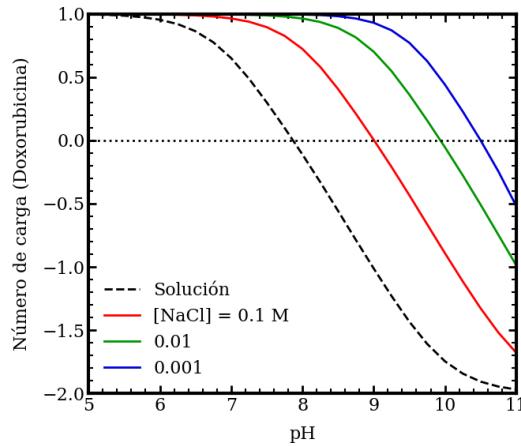


Figura 2.7: Gráfico que muestra el número de carga de la doxorrubicina dentro de la red de PMAA en función del pH, para diferentes concentraciones de sal (líneas sólidas), así como la carga promedio de la molécula en la solución bulk (línea discontinua); $[Doxo] = 1 \text{ mM}$.

la adsorción impulsada electrostáticamente ocurre en valores de pH cercanos al pI. 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 [26, 111, 138, 139, 158]. 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,

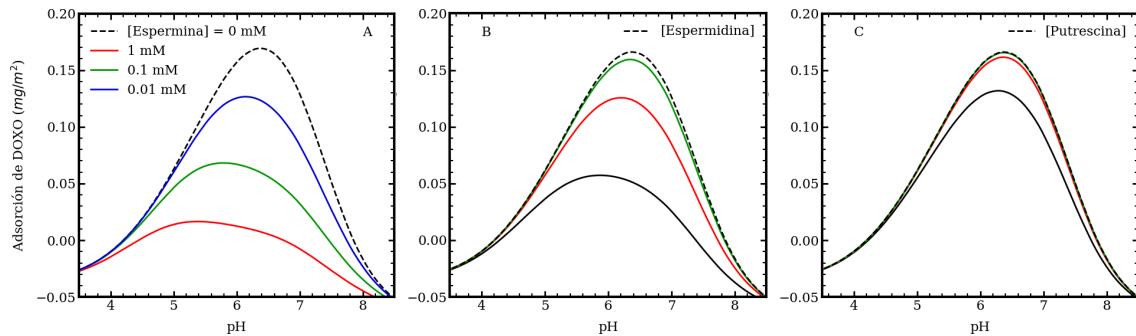


Figura 2.8: Gráfico de la adsorción de la doxorrubiciна (ver ecuación 2.46) en función del pH para soluciones que contienen espermina (A), espermidina (B) y putrescina (C). En cada panel, las diversas curvas sólidas corresponden a soluciones con diferentes concentraciones de poliamina, mientras que la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

consideraremos una concentración de sal fisiológica de 100 mM, pero ampliamos el rango de valores de pH para describir las condiciones que podrían ocurrir alrededor de tejidos enfermos ácidos. La adsorción de doxorrubiciна 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 doxorrubiciна 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 doxorrubiciна:

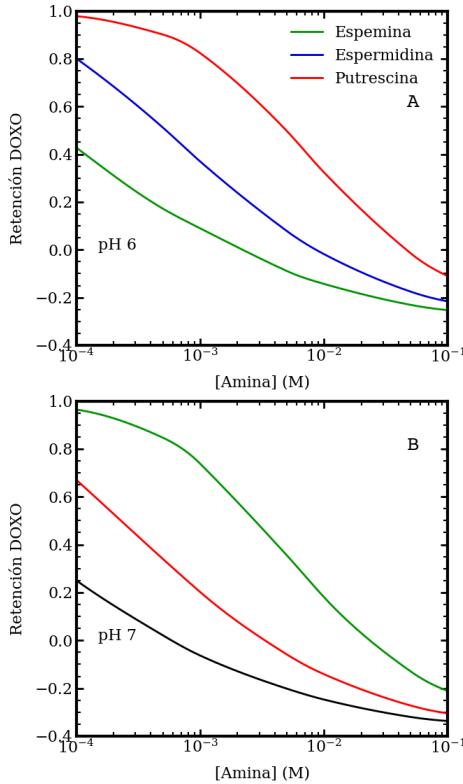


Figura 2.9: Gráfico que muestra la retención de Doxo, Γ_{ret} (ver ecuación 2.47), en función de la concentración de aminas para soluciones con 100 mM de $NaCl$ y un pH de 6 (panel superior) y pH de 7 (panel inferior).

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

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

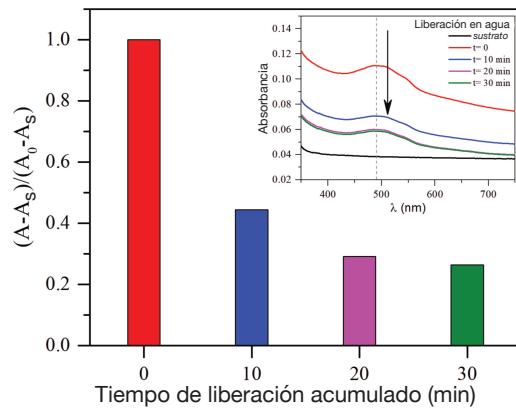


Figura 2.10: Carga de doxorrubicina en films de PMAA y liberación de las mismas en agua, representada como el cambio en la absorbancia ($a \lambda = 490 \text{ nm}$) en relación con la carga inicial en diferentes tiempos de liberación. Inset: Gráfico de los espectros UV-Vis de los films después de 24 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)

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

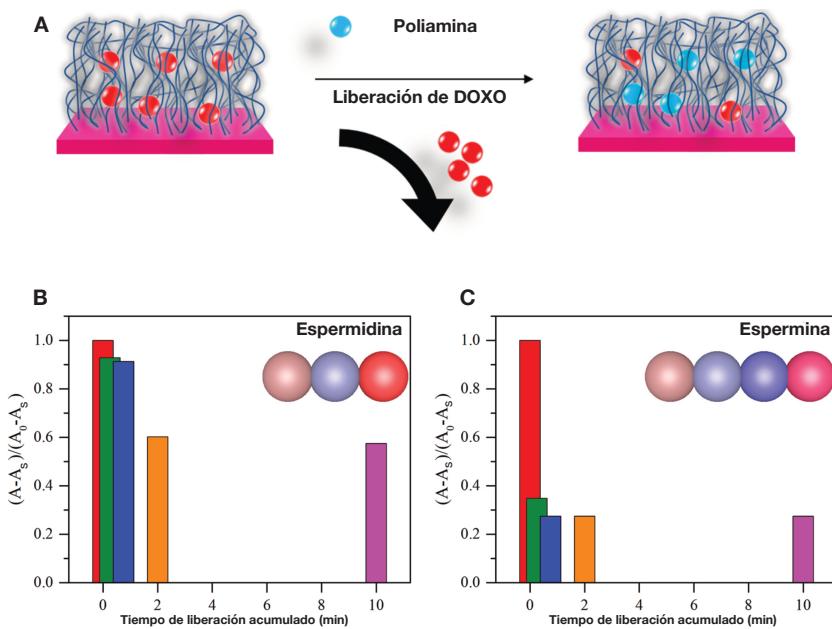


Figura 2.11: (A) Representación esquemática de la liberación de Doxo mediante la adsorción de poliaminas. Carga y liberación de doxorrubicina en los films de PMAA en soluciones de espermina (B) y espermidina (C), representadas como el cambio en la absorbancia ($\lambda = 490\text{ nm}$) en relación con 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 doxorrubicina 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. [183].

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 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

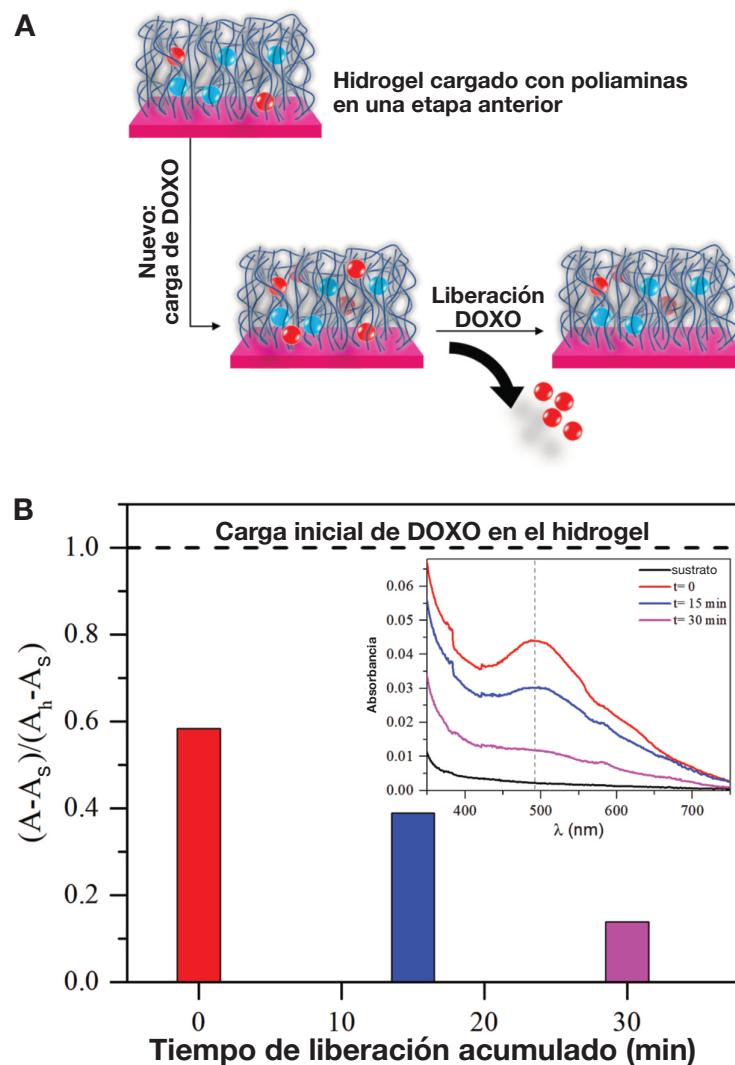


Figura 2.12: (A) Representación esquemática de la recarga/liberación de Doxo después de la adsorción de poliaminas. (B) El cambio en la absorbancia (a $\lambda = 490$ nm) en relación con la carga inicial de Doxo en el film de hidrogel (línea discontinua). A_s : Absorbancia del sustrato de vidrio; A_h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

posibilidad de recargar el fármaco, lo que sugiere una interacción diferente, dependiendo de la 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.

Chapter 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 [123, 157]. 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 [195, 227]. 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 [195].

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}) [149, 150]. 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) [88]. 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) [149], cuyo colapso de volumen ocurre por encima de 32°C, que es la LCST del polímero lineal [182].

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 [63]. Las estrategias para controlar la VPTT de los microgeles incluyen la síntesis de nuevos monómeros termosensibles [31, 124], así como la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [68, 118]. Este último enfoque produce microgeles multiresponsivos que son susceptibles a cambios en la temperatura, pH y concentración de sal [51, 195]. Los microgeles de N-isopropilacrilamida (NIPAm) y ácido acrílico (AA) han sido ampliamente estudiados [21, 27, 83, 136]; también se han investigado microgeles de copolímeros de NIPAm y ácido metacrílico (MAA) [46, 58, 70]. 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 [27, 66, 70, 83, 106, 136, 213]. 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 [48].

Las aplicaciones basadas en microgeles de polímero están volviéndose cada vez más diversas y de mayor importancia en diferentes áreas de la tecnología [157]. Nanocompuestos 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 [10, 91, 192]. Estos microgeles también se pueden aplicar en el desarrollo de emulsiones sensibles al pH, salinidad y temperatura [30, 141, 142, 185], o como plantillas para el ensamblaje de nanomateriales [213]. 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 [45]. Culver et al. [43] 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 [59, 129, 156].

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 [46, 58, 59, 70, 93, 94, 198]. También se han estudiado teóricamente mediante simulaciones moleculares de grano grueso para investigar el comportamiento de microgeles de polímeros sensibles a estímulos [9, 104, 163]. Estos trabajos se han centrado principalmente en el swelling y otras propiedades de partículas que tienen una red de polímero permanentemente cargada

[4, 40, 41, 81, 82, 96–98, 107, 135, 162, 165, 169], y algunos han abordado el efecto de la temperatura y la calidad del solvente [4, 9, 81, 135, 162, 165]. Recientemente, algunos estudios utilizando simulaciones han considerado la respuesta al pH de los microgeles compuestos por polímeros reguladores de carga [71, 121, 172, 186, 188]. 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 [32, 158].

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} .

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

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.

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

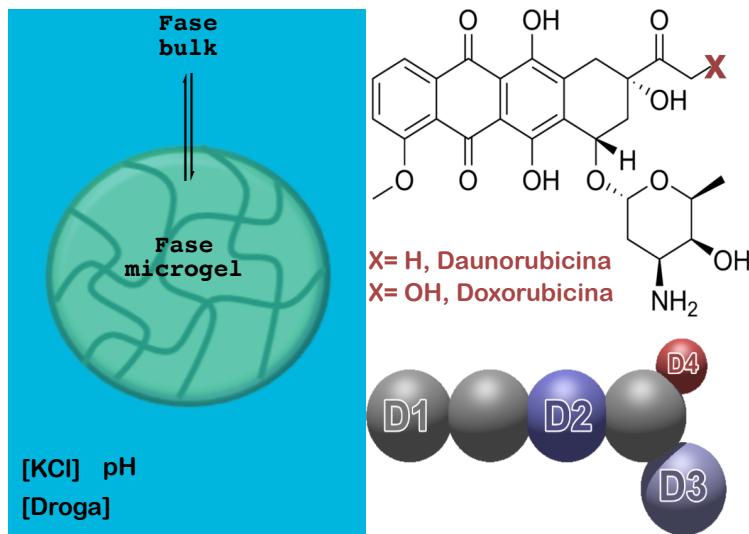


Figura 3.1: Microgel polimérico en solución. En el mismo se observan las dos fases que componen al sistema, la fase microgel y la fase solución. A la derecha se muestra la droga utilizada, así como el modelo usado para incorporar la información química que las definen.

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 $\mu_{MAA^-}^0$ 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 [135] 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:

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

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. [5], 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 $g_{k1} \equiv 0$ [5]

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 subíndice 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	$q (e)$	$v (\text{nm}^3)$
$H_2O(w)$			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

Tabla 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

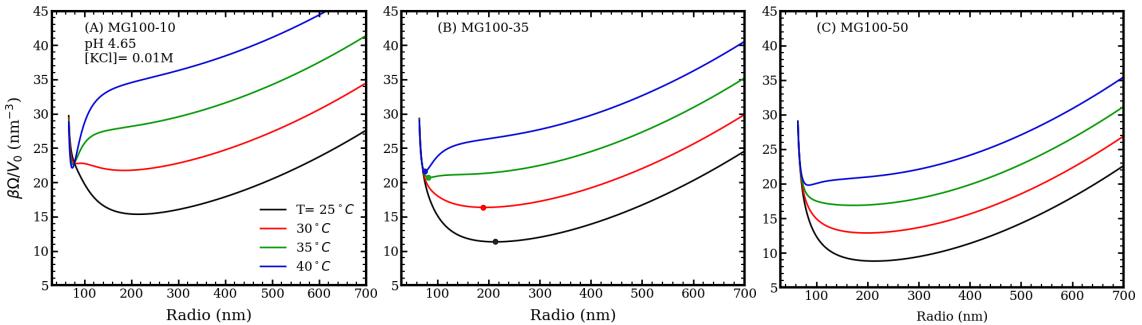


Figura 3.2: Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, pH de 4.65 y $[KCl] = 10^{-2} M$. Cada panel corresponde a un microgel MG100 diferente (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) con 10% (A), 35% (B) y 50% (C) MAA. Las curvas presentan el potencial termodinámico 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

Tabla 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

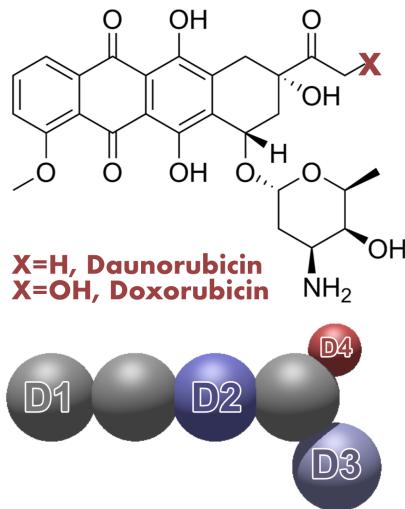


Figura 3.3: Estructura química (arriba) y modelo de grano grueso (abajo) aplicado para describir daunorrubicina y doxorrubicina. Los segmentos de grano grueso $D1 - D4$ se describen en la tabla 3.3.

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

Tabla 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 [155].

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Respuesta al pH y la concentración de sal

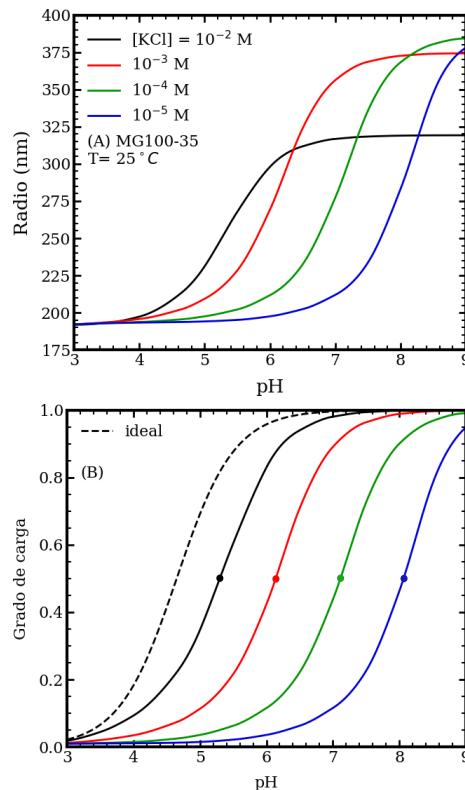


Figura 3.4: Tamaño de microgel (A) y grado de carga (B) en función del pH para soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal y $T = 25^\circ\text{C}$. Las cadenas de polímero en el microgel MG100-35 tiene $n_{ch} = 100$ segmentos de largo y 35% MAA. La curva punteada en el panel B es la disociación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

Tabla 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 pKa aparente aumenta. El precio a pagar es aumentar la energía química libre, cuya contribución se minimiza cuando el grado de protonación es el ideal.

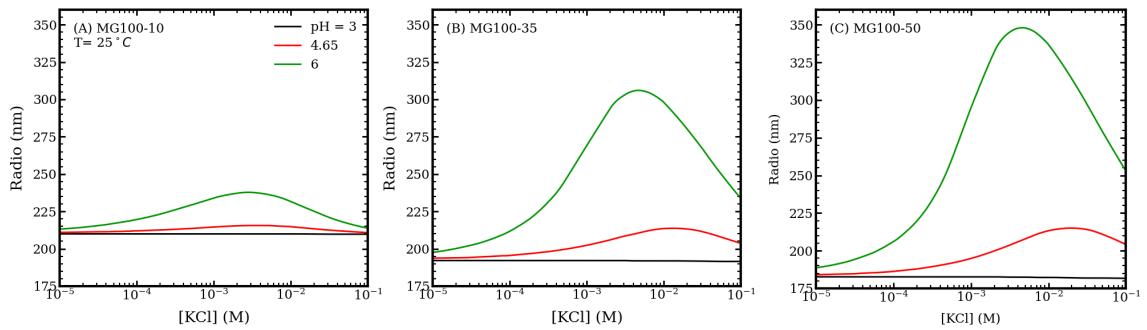


Figura 3.5: Gráfico del tamaño del microgel en función de la concentración de sal para diferentes soluciones de pH y $T = 25^\circ C$. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen fracciones MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

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. [213] 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 reentrant. 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 [60, 78, 122, 229], lo cual ha sido confirmado por resultados experimentales [216]. 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 [25, 92]. También se ha predicho que el espesor de las películas de poliácidos débiles entrecruzados mostrará este comportamiento de expansión reentrante [114].

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 [82]. 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 hinchaón a colapso para microgeles sensibles al pH y la temperatura [158]. Polotsky et al. [158] 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. [32] 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

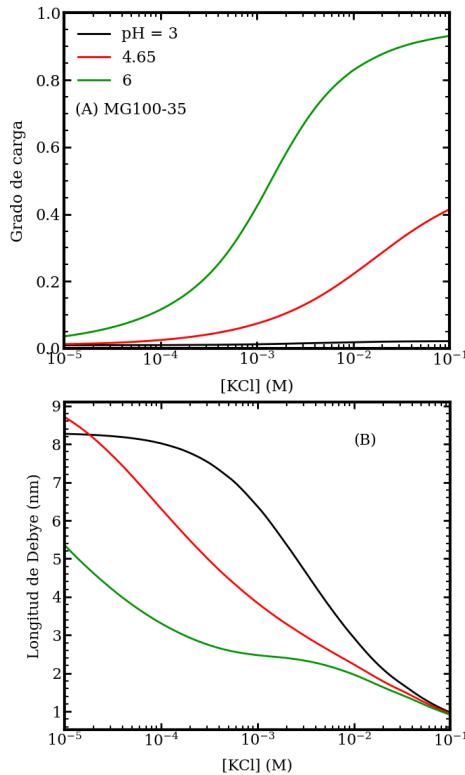


Figura 3.6: Curvas del grado de carga MAA (A) y la longitud de Debye (B) dentro de los microgeles MG100-35 en función de la concentración de sal para diferentes valores de pH. Estos resultados corresponden a las mismas condiciones de la figura 3.5B.

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 congjugación de cargas poliméricas y contraiones debe estar equilibrada. Claudio et al. [40] 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

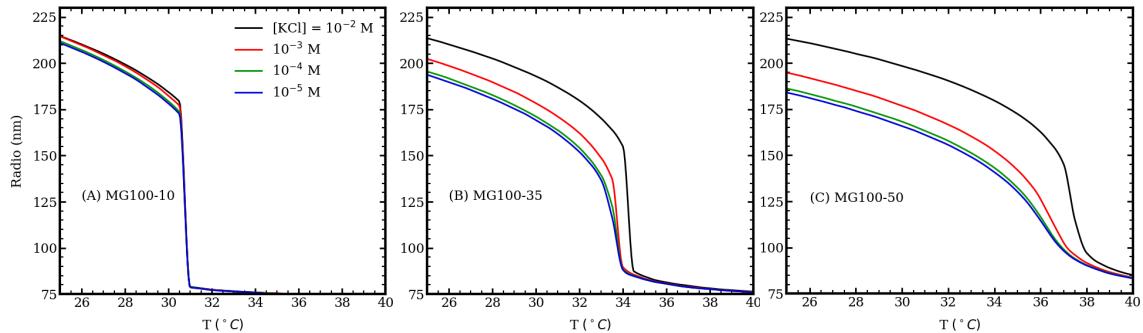


Figura 3.7: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sal en solución y pH 4.65. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen diferentes fracciones de MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

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 polímero), 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 [180]. 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.

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 [93], lo que también se ha observado experimentalmente para los microgeles P(NIPAm-AA) [32]. 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 [102].

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 [118]. En este caso, la carga del polímero permanece constante, mientras que

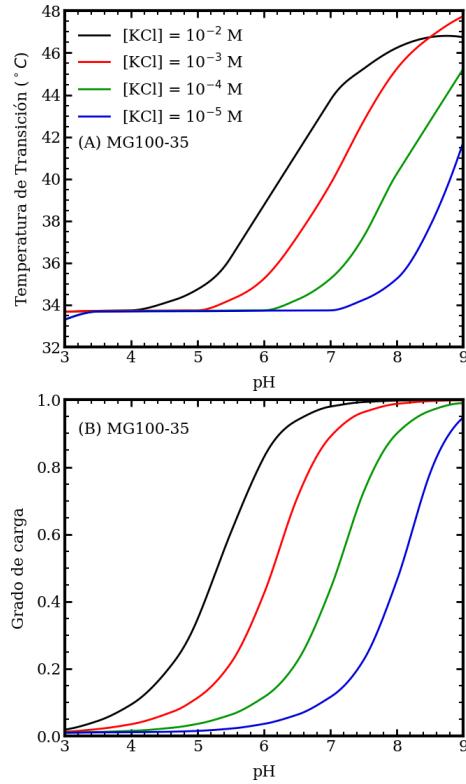


Figura 3.8: Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{PT} (A) y la fracción de MAA cargado a esta temperatura (B) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Este microgel P(NIPAm-MAA) tiene una longitud de cadena de $n_{ch} = 100$ y un 35% de MAA.

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:

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

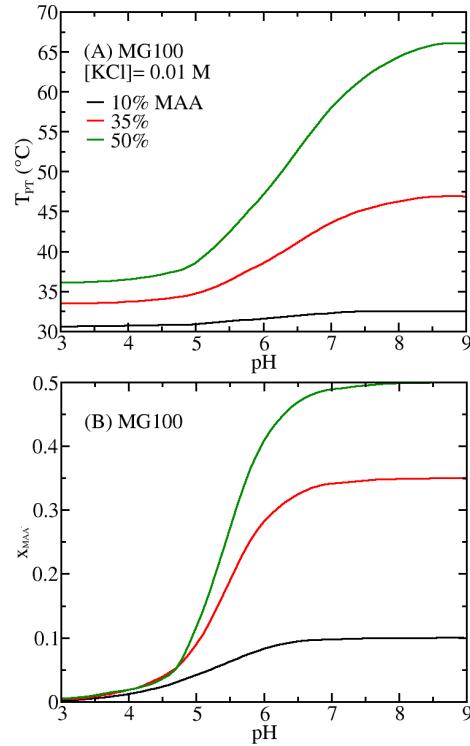


Figura 3.9: (A) Gráfico de temperatura de transición T_{PT} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01$ M; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}}$ en función 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.

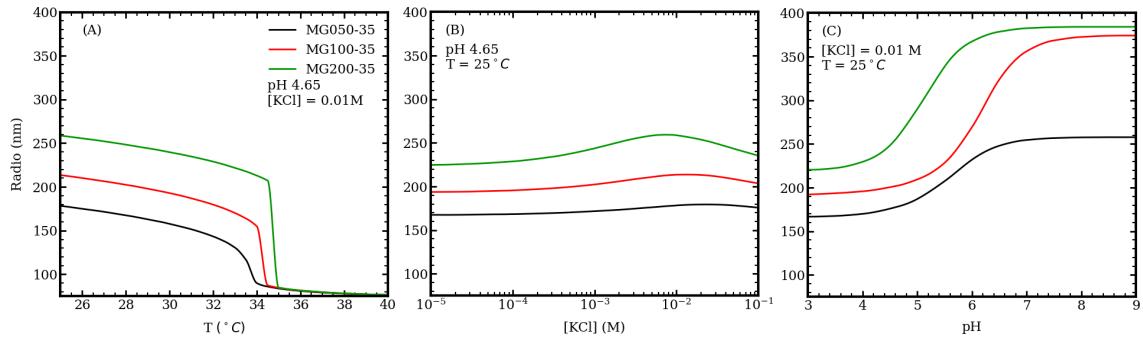


Figura 3.10: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura, la concentración de sal y el pH (paneles A, B y C respectivamente). Diferentes curvas corresponden a microgeles con segmentos de 50 (MG050), 100 (MG100) y 200 (MG200) por cadena de polímero, todos con 35% MAA.

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 [90]. 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 [109] y Wu and Zhou [214], 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. [106] 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 nanoestructurados (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

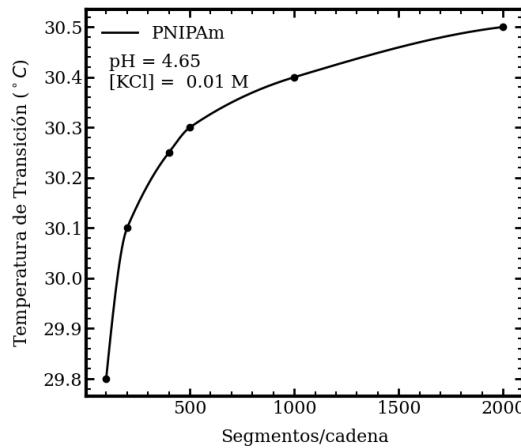


Figura 3.11: Gráfico de la variación de la temperatura de transición como función de los segmentos por cadena que componen la red polimérica. El polímero que compone el microgel esta compuesto puramente por NIPAm. La concentración de sal es de 0.01 M y el pH de 4.65. La red polimérica esta compuesta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

deseado.

Por ejemplo, se sabe que el pH extracelular del tejido tumoral es más bajo que el del tejido sano [56], lo que hace que los microgeles con respuesta al pH sean idóneos para la administración local de medicamentos contra el cáncer [44].

Peppas et al. [152] 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 [33, 47, 191, 204].

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 [15, 34, 42, 145]. Estas drogas se pueden seguir utilizando fluorescencia y absorbancia, lo que las hace atractivas desde el punto de vista de la investigación [3, 155, 189]. Además, estos fármacos tienen carga eléctrica positiva, lo que puede facilitar su encapsulación en microgeles de polímeros aniónicos [108]. Serpe et al. [189] han estudiado la captación y liberación

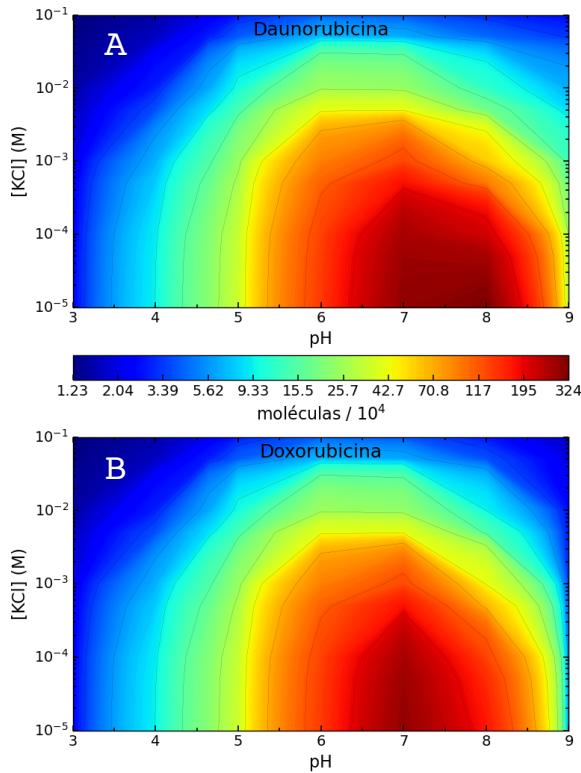


Figura 3.12: Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubricina (A) y doxorrubricina (B) adsorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es 1 mM y $T = 25^\circ\text{C}$. el microgel de P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch}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

termicamente activadas de Doxo a partir de películas capa por capa de microgeles de P(NIPAm-AA) y poli(clorhidrato de alilamina). Más recientemente, utilizando resonancia magnética nuclear de lapso de tiempo, Martinez-Moro et al. [129] 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

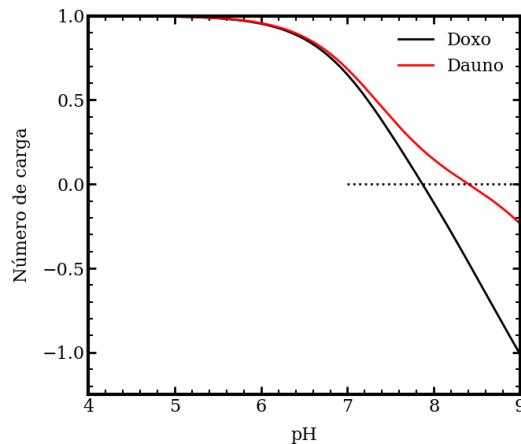


Figura 3.13: Número de carga de las drogas estudiadas: Doxorubicina y Daunorubicina. La intersección con la línea punteada muestra el punto isoeléctrico de las mismas. Pasado este punto se da una inversión en la carga de las drogas lo que conlleva a una repulsión electrostática con los segmentos de MAA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

de iones de potasio para neutralizar la carga negativa de la red del polímero (Pérez-Chávez et al. [155]). 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

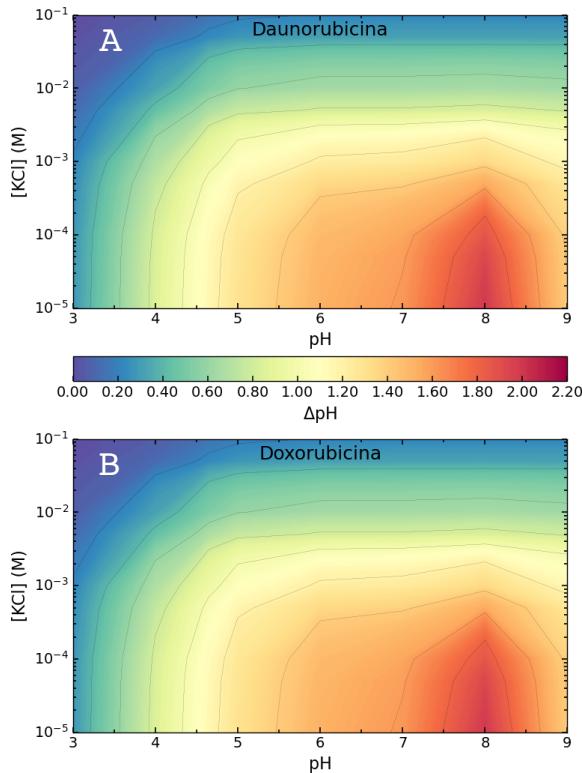


Figura 3.14: Mapas de color que muestran el cambio en el pH dentro del microgel, $\Delta pH = pH - pH_{GEL}$ en función de sal y el pH de la solución para daunorrubricina (A) y doxorrubricina (B). Estos cambios son reportados para las mismas condiciones de la figura 3.12, es decir: la concentración de 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).

otras palabras, hay una adsorción considerable de moléculas con carga negativa 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 daunorubricina, 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 daunorrubicina.

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 [52]. El inicio de esta transición impulsada por el pH se puede caracterizar adecuadamente utilizando el pK_a 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.

Chapter 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 bio-nanotecnología [222]. 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 [74]. 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 [36, 119]. Estos nanotransportadores pueden aumentar el tiempo de circulación mientras confieren propiedades que ayudan a evadir los sistemas inmunitarios o digestivos [54]. 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 [6], el pH [190], la concentración de sal [177] y una variedad de otros estímulos externos [84, 157, 221]. 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 [225] o tejidos heridos o inflamados con temperaturas más altas [218]. 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 [8, 50, 137, 203]. La capacidad de los nanogeles para liberar medicamentos de manera controlada en entornos específicos también puede ayudar a prevenir la resistencia a los medicamentos [137].

Una fracción significativa y creciente de los nuevos medicamentos desarrollados para tratar diferentes enfermedades son proteínas [126]. La estabilidad de estas proteínas es un problema práctico, ya que son fácilmente desnaturalizadas por cambios en el pH o la temperatura [53]. 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 [125, 152]. 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 exten-

didamente. 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 [85, 95, 190, 194]. Por ejemplo, Smith y Lyon [194] 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 [65, 144]. Además, los microgeles poliméricos sensibles al pH se evalúan en la búsqueda de medios más efectivos y menos invasivos para la administración de insulina [120, 212], lo que tiene una importancia inmensa en la investigación biomédica actual [37].

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 [13, 120, 178]. 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 ca-

pacidad 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 nanogeles 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:

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

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:

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

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.

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

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 permittividad 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:

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

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:

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

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 nanogel 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 [24]: 2B4Z para el citocromo c [133], IZNI para la insulina [23] y 3RGK para la mioglobina [73].

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 [62]. 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 [72], 5.5 (5.3 [64]), 7.15 (7.2 [19]) 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 para

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	

Tabla 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 [62]: *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 [62]. 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 [73, 133], se describe utilizando las unidades de grano grueso Hem1 y Hem2. El complejo contiene dos de cada una de estas unidades.

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

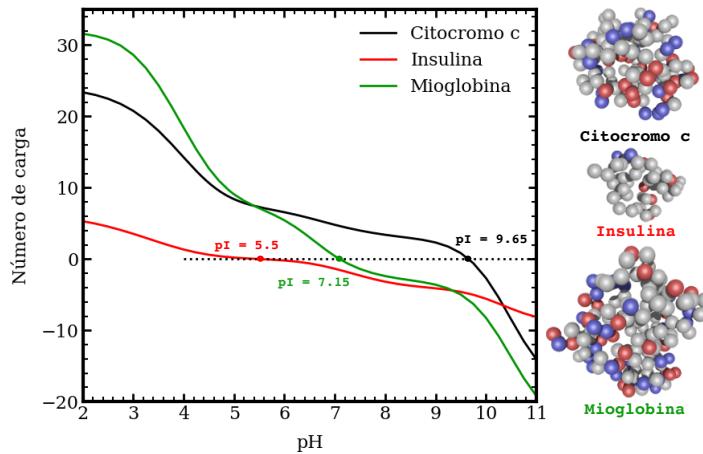


Figura 4.1: Izquierda: Número de carga de las proteínas en una solución diluida en función del pH (curvas sólidas); los círculos llenos marcan el punto isoeléctrico, donde la carga neta de la proteína es cero. La representación de grano grueso de las proteínas se ilustra a la derecha, donde los residuos 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 [110].

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) donde

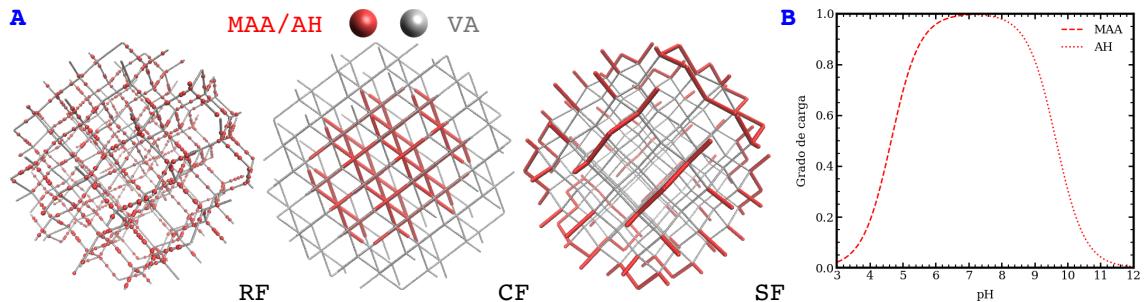


Figura 4.2: A: Los nanogeles están formados por cadenas de copolímeros entre-cruzadas con un segmento de carga neutral (VA: alcohol vinílico) y una unidad funcional (ya sea MAA: ácido metacrílico o AH: alilamina). Este esquema ilustra las tres distribuciones de los co-monómeros consideradas; de izquierda 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.

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 Caracterización 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 .

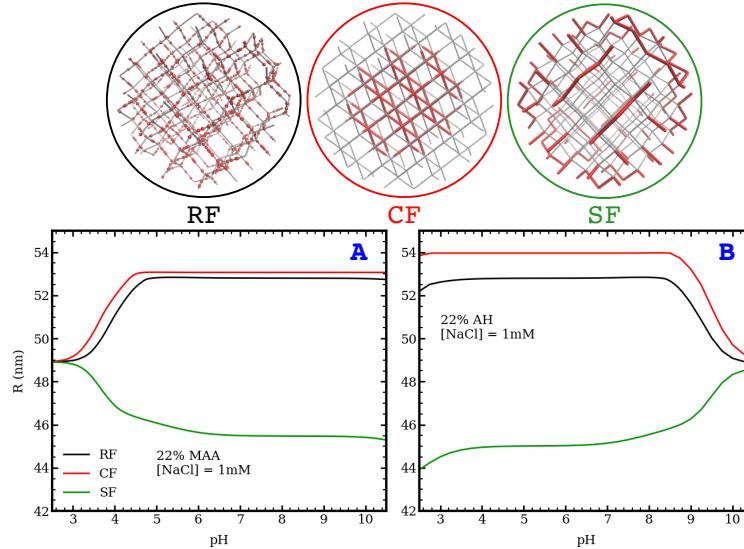


Figura 4.3: Radio promedio, R , en función del pH para nanogeles de copolímero MAA-VA (panel A) y AH-VA (panel B). Se consideran tres estructuras diferentes en cada caso donde las unidades funcionales (MAA/AH) se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la red polimérica (RF), ocupan el centro de la 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.

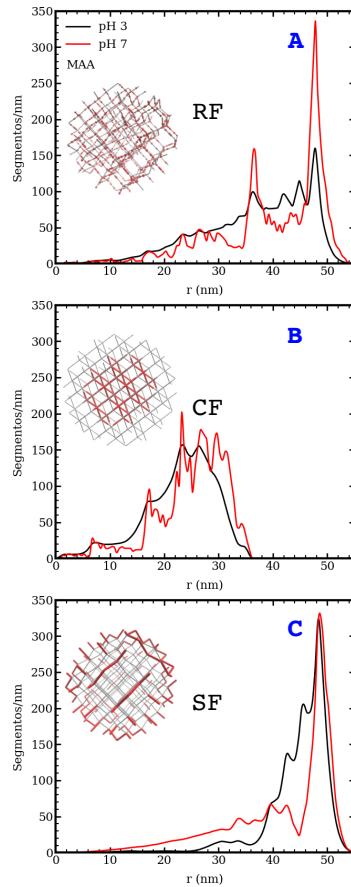


Figura 4.4: Distribución radial de segmentos MAA, $\lambda_{MAA}(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a un nanogel de MAA-VA diferente que tienen una funcionalización de red particular y 22% MAA. Estos grupos funcionales están completamente protonados (sin carga) a pH 3 y completamente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

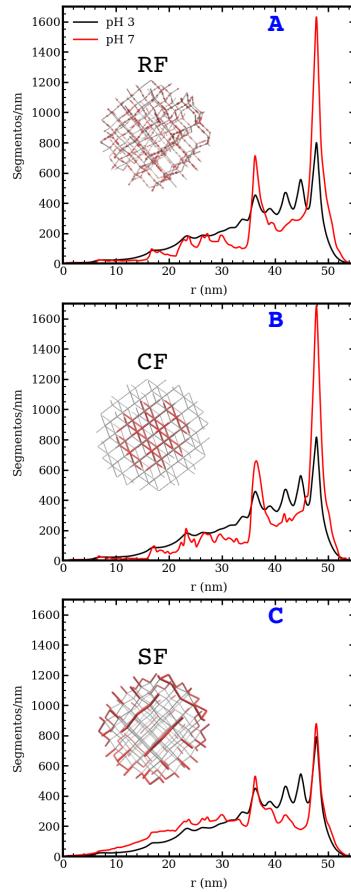


Figura 4.5: Distribución radial de todos los segmentos que componen la estructura del nanogel a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a una funcionalización diferente de la red polimérica.

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,

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

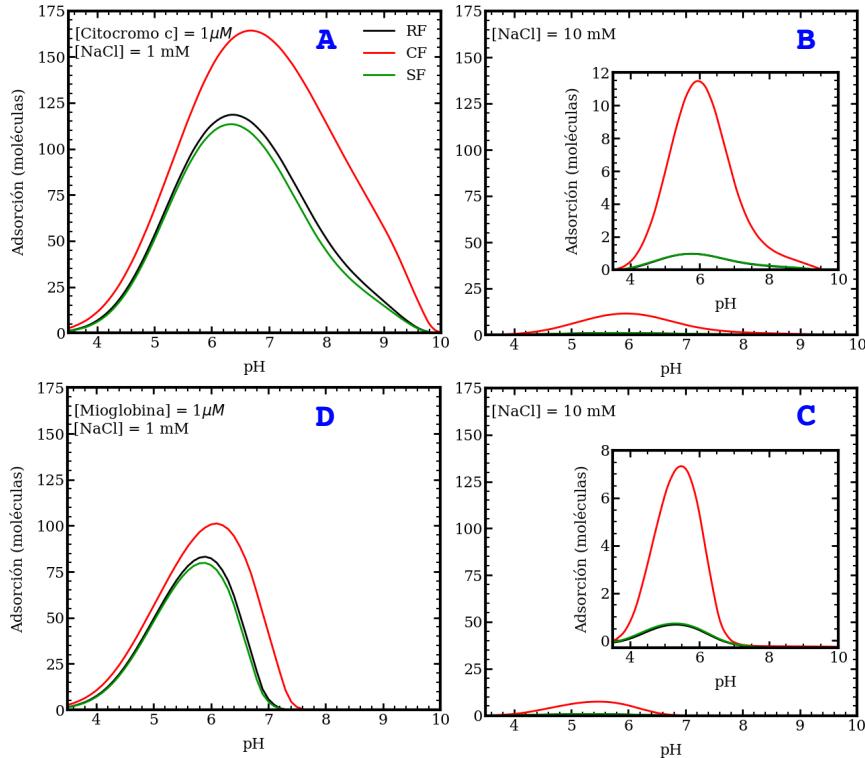


Figura 4.6: Gráficos de la adsorción en exceso Γ de citocromo c (paneles A y B) y mioglobina (paneles C y D) a nanogeles MAA-VA en función del pH. La concentración de sal es 10^{-3} M en los paneles de la izquierda (A y C) y 10^{-2} M en los paneles de la derecha (B y D); En los paneles B y C Se muestra 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).

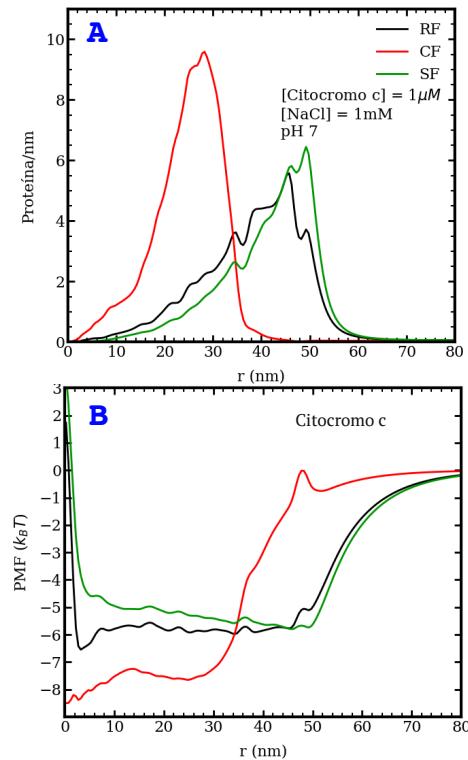


Figura 4.7: Panel A: Gráfico de la distribución radial de las moléculas de citocromo c, $\langle N(r) \rangle$, en función de su posición, para los nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones. Estas partículas tienen 22% MAA, el pH es 7, la concentración de proteína es de $10^{-6} M$ y la concentración 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.

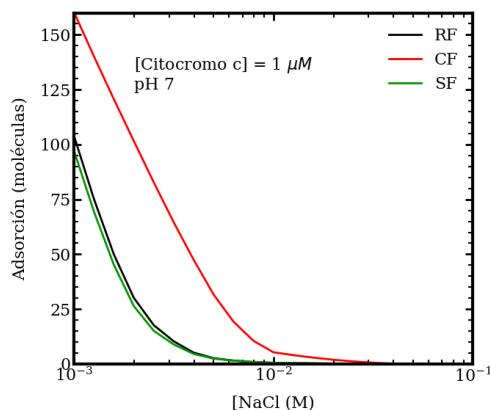


Figura 4.8: Gráfico de la adsorción en exceso Γ del citocromo c en función de la concentración de sal a pH 7 para nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones de red que contienen un 22% de MAA; la concentración de proteína es de $10^{-6} M$.

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 [20, 67, 211, 219].

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

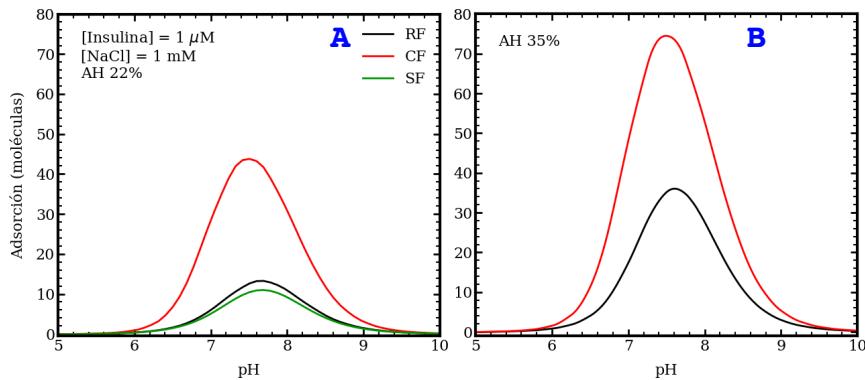


Figura 4.9: Gráficos de las moléculas de insulina adsorbidas, Γ , en función del pH para nanogeles AH-VA con diferentes funcionalizaciones. El contenido de AH es del 22% para las redes poliméricas del panel A y del 35% para las del panel B (este último grado de funcionalización no se alcanza para el 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 estan 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 fun-

cionalización 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).

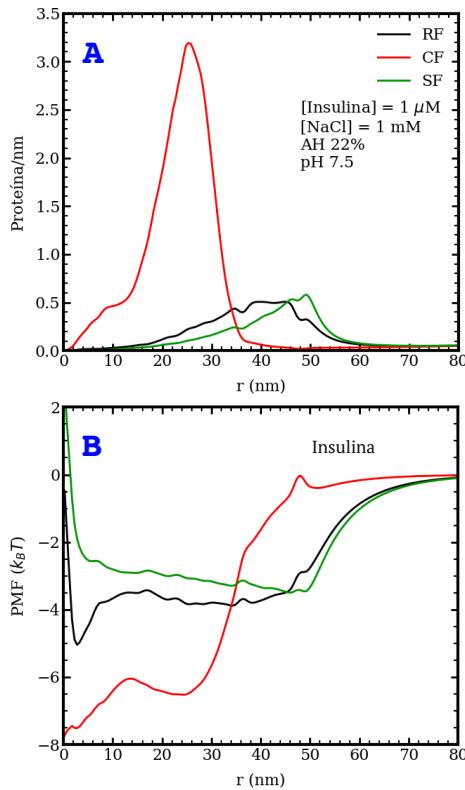


Figura 4.10: A: Gráfico de la distribución local de moléculas de insulina, $\langle N(r) \rangle$, en función de la posición para nanogeles AH-VA con un 22% de segmentos sensibles al pH en diferentes configuraciones de red. El pH es 7.5, la concentración de insulina es de 10^{-6} M y la de NaCl es de 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.

Chapter 5

Soluciones coloidales

5.1 Introducción

Los nanogeles son materiales que combinan las propiedades de los polímeros y de los coloides. Son partículas blandas, deformables y penetrables con una estructura formada por una red polimérica. [123] En solución, pueden absorber el solvente y encontrarse en un estado swelling [87, 153] La flexibilidad y la capacidad de responder a estímulos externos como la temperatura, la presión, el pH, la fuerza iónica y la presencia de diferentes analitos, los convierten en objetos de interés en diferentes aplicaciones tales como biosensores [77, 224], ingeniería de tejidos [130, 206], regeneración ósea [18], materiales biomiméticos [61, 217], entre muchas otras aplicaciones biomédicas [45].

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 [195, 227]. De la misma forma, nanogeles compuestos polímeros termosensibles experimentan una transición de fase volumétrica cuando se calientan por encima de una temperatura característica [149, 150]. 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) [88]. La incorporación de co-monómeros termosensibles y con respuesta al pH, a la red polimérica, permiten

la obtención de nanogeles multi-responsivos los cuales son atractivos para el diseño de sistemas inteligentes que funcionen en diferentes áreas de la tecnología [157].

Recientes avances en la síntesis han abierto el acceso a sistemas con arquitecturas y composiciones complejas, lo que permite adaptar estas partículas con propiedades específicas. Simultáneamente, enfoques teóricos y de simulación de vanguardia ofrecen una comprensión más profunda del comportamiento y la estructura de nanogeles y microgeles bajo influencias externas y confinamiento [153, 187, 205]. Estudios teóricos sobre soluciones coloidales muestran a los nano/microgeles como partículas esféricas que interactúan únicamente con un potencial de núcleo duro, es decir, esferas duras [87]. Encontrándose como variable termodinámica de relevancia la fracción de volumen, lo que subraya la importancia de comprender y manipular estas interacciones en el diseño y aplicación de nanogeles y microgeles. Por otro lado Alziyadi and Denton [11] utilizaron simulaciones de dinámica molecular con una teoría de Posisson-Boltzmann para estudiar microgeles cargados superficialmente. En estos sistemas se incluyeron potenciales que permiten la deformación de los microgeles. En otros estudios, [181, 187], 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 macroscópica. La complejidad de la respuesta a estímulo de estas partículas, a su vez, genera una mayor complejidad en cualquier dispersión compuesta por ellas [123]. Las soluciones de nanogeles muestran un comportamiento mucho más rico que el de sistemas modelados como esferas duras tradicionales y pueden ajustarse mediante cambios en las variables que afectan el tamaño de las partículas o la solvatación. Las características coloidales como las poliméricas de los nano/microgeles en dispersiones contribuyen a su fenomenología. Estos dos aspectos complementarios de las suspensiones de microgeles ofrecen una amplia gama de posibilidades para su uso en el desarrollo de nuevas tecnologías. Comprender la termodinámica de su respuesta a estímulo de estas soluciones se convierte en un estudio crucial.

En capítulos anteriores se investigó la respuesta a estímulo de sistemas poliméricos aislados. En particular 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. En este nuevo capítulo damos un paso más adelante mostrando un estudio sistemático de soluciones coloidales compuestos por nanogeles de poli-(N-isopropilacrilamida) (P(NIPAm-co-MAA)). Para este propósito se hará uso de una metodología basada en algoritmos MonteCarlo en las cuales se combinan potenciales de interacción partícula-partícula y un potencial termodinámico desarrollado en [153]. En este trabajo Pérez-Chávez et al. [153] describen la química y física detrás de todos los fenómenos del swelling de sus 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 una temperatura característica de transición. Por otro lado los potenciales entre partículas, Hertz-Yukawa, consideran la naturaleza de los nanogeles: su capacidad de deformarse, moderado por el potencial de Hertz y adquisición de carga eléctrica, regulando la interacción por el potencial de Yukawa. Se estudia la respuesta a estímulo de pH, temperatura, y concentración salina de nanogeles y como esta se ve modificada por la concentración de partículas.

5.2 Metodología

Se realizó un estudio sistemático de la composición de soluciones de nanogeles, variando la concentración salina, el pH y la concentración de partículas. Además, se estudiaron estas soluciones a diversas temperaturas para observar el efecto de la temperatura sobre los monómeros de NIPAm dentro de la red polimérica que compone a cada nanogel.

5.2.1 Potencial termodinámico intramolecular

La energía interna de cada nanogel se calcula en base al potencial termodinámico que tiene en cuenta toda la fisicoquímica relevante del nanogel. En particular, se consideran 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 estéricos.

Para obtener este potencial termodinámico, es necesario considerar 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 estan presentes las moléculas de agua, hidronio e hidróxido, así como también los iones de prevenientes de la sal del medio. 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, el nanogel 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 química libre que describe la protonación de equilibrio de las unidades de MAA.

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

donde ϕ_{MAA} es la fracción de volumen que ocupan estos segmentos, 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 $\mu_{MAA^-}^0$ y μ_{MAAH}^0 para las especies desprotonadas (cargadas) y protonadas, respectivamente. Se define segmento como las unidades químicas que componen las cadenas de la red polimérica (MAA y NIPAm).

La energía libre elástica que explica 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 , lo 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 de MAA, respectivamente. El potencial electrostático dentro de la fase de nanogel es ψ_{NG} . Fuera de esta fase el potencial 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 son:

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

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

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 temperatura de transición crítica. 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 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. [5], 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 $g_{k1} \equiv 0$ [5]

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. 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.

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

Esta contribución muestra el equilibrio químico entre el nanogel 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,

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

Con todo esto la forma explícita del potencial termodinámico es:

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

En donde π_{NG} es la presión osmótica de la fase nanogel, introducido 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, minimizamos Ω_{NG}

respecto a estas cantidades, y sujeto a las restricciones ecuaciones 5.8 y 5.7; dicho procedimiento conduce a:

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

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

donde $a_\gamma = e^{\beta\mu_\gamma - \beta\mu_\gamma^0}$ es la actividad de la especie γ . La constante de equilibrio termodinámico 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 el grupo de investigación. En resumen, es posible calcular la variación de $\Omega_{NG}(R)$ en función del radio del nanogel R , y con ello 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 [153]

5.2.2 Energía intermolecular: Interacción entre nanogeles.

El segundo aporte energético que se considera en este trabajo es la interacción de pares, es decir, la interacción entre nanogeles dentro de la solución. Dadas las características de nuestro sistema: partículas blandas que pueden comprimirse/expandirse, así como también la capacidad de adquirir carga, se ha considerado un potencial combinado: Hertz-Yukawa. El primero cuantifica las interacciones elásticas efectivas entre cada par de partículas. Permite la deformación de los

nanogeles, cualidad intrínseca de nuestras partículas. Por otro lado, el potencial de Yukawa se fundamenta en una teoría de interacciones electrostáticas dependientes del medio en donde se encuentran.

Estos potenciales fueron previamente utilizados en [210]. Weyer and Denton [210] estudiaron la hinchazón y las propiedades estructurales de suspensiones de microgeles iónicos. De forma explícita se define el potencial de Yukawa como:

$$\beta u_{ij}^Y(r) = q_i q_j \frac{e^{\kappa(a_i + a_j)}}{(1 + \kappa a_i)(1 + \kappa a_j)} \frac{e^{-\kappa r}}{r} \quad (5.21)$$

En donde q_i y q_j son las cargas netas que poseen los nanogeles i y j respectivamente. Del mismo modo se define el radio de cada partícula como a_i . El valor κ corresponde a la constante de apantallamiento de Debye y r es definido como la distancia entre los centros de masa de cada nanogel.

El potencial de Hertz se define:

$$\begin{aligned} \beta u_{ij}^H(r) &= \left(\frac{1-r}{a_i + a_j} \right)^{5/2} \times b_{ij} \\ b_{ij} &= \frac{6}{5\pi} \frac{N_{chains}}{\frac{4}{3}\pi R_0^3} \end{aligned} \quad (5.22)$$

En donde b_{ij} es la constante de interacción entre la partícula i y j la cual tiene en cuenta el número de cadenas que compone al nanogel: N_{chains} , y el radio seco del mismo, R_0 .

Finalmente obtenemos:

$$U_{inter}(r) = \begin{cases} U_H + U_Y & \text{if } r \leq a_i + a_j \\ U_Y & \text{if } r > a_i + a_j \end{cases} \quad (5.23)$$

en donde se define:

$$U_H = \sum_{i \neq j}^{Np} \beta u_{ij}^H \quad (5.24)$$

$$U_Y = \sum_{i \neq j}^{Np} \beta u_{ij}^Y \quad (5.25)$$

siendo U_H y U_Y la sumas sobre todos los pares de partículas i j que interactúan en la solución.

5.2.3 Metropolis-MonteCarlo

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 cada paso de la simulación, un estado del sistema es tomado y se intenta cambiar por una nueva configuración. Es decir, se pondera la probabilidad de que el sistema cambie a este nuevo estado. La ponderación de este cambio se realiza a través de la energía correspondiente al estado inicial y el estado nuevo al que se desea acceder. Este proceso se repite cierta cantidad de veces, este número es dependiente de la energía del sistema. Al finalizar, es posible obtener resultados estadísticamente significativos los cuales se utilizan para estimar propiedades macroscópicas del sistema. En este capítulo, se trata de una solución de nanogeles en el cual un cambio de configuración consiste en el movimiento y aumento/disminución de tamaño 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:

$$P = \min\{e^{-(\Delta U_{inter} + \Delta \Omega_{intra})}, 1\} \quad (5.26)$$

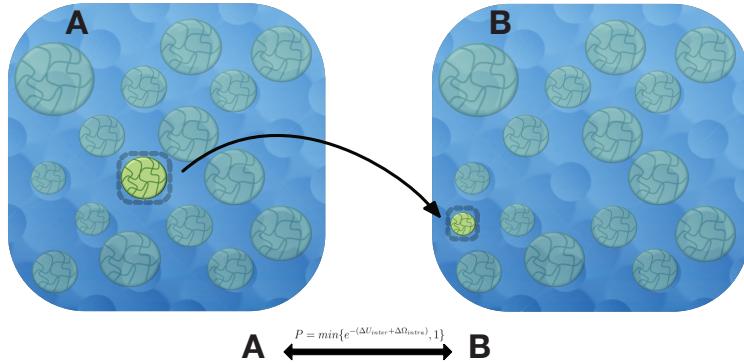


Figura 5.1: Esquema de un paso en el algoritmo de Metropolis-MonteCarlo. El paso de un estado **A** a uno **B** esta mediado por el cambio de energía entre ambas configuraciones.

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

5.3 Nanogel aislado

En esta primera instancia caracterizamos a nuestro nanogel en dilución infinita. El cálculo de su potencial termodinámico y como puede usarse para estudiar las fluctuaciones en volumen de estos sistemas aislados. La respuesta a estímulo se estudió más detallada en la referencia [153]. En donde además de ver los cambios en el pH, temperatura, y concentración de sal se estudia como son modificadas sus propiedades con la estructura del microgel.

5.3.1 Energía interna

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 . 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.

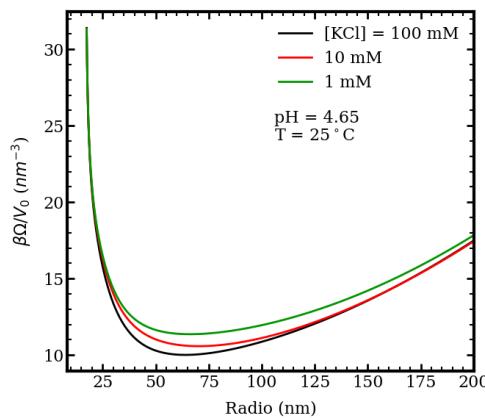


Figura 5.2: Energía libre de un nanogel aislado en función del tamaño del mismo. Las curvas corresponden a diferentes condiciones de pH. La concentración salina es 1 mM y la temperatura 25°C .

5.3.2 Fluctuación en Volumen

Las fluctuaciones en volumen son la variación aleatoria del volumen de un sistema. En esta instancia, se muestran las fluctuaciones en volumen esperadas para un sistema aislado. Estas fluctuaciones son de gran utilidad dado que pueden ser extrapolables a soluciones más concentradas. La fluctuación en volumen es una medida de la inestabilidad del volumen de un sistema termodinámico. A mayor fluctuación, mayor es la inestabilidad. La fórmula para la fluctuación en volumen de un sistema termodinámico se ha descrito como:

$$\frac{\Delta V}{V} = \sqrt{\frac{k_B T}{V}} \kappa_T \quad (5.27)$$

en donde ΔV es la fluctuación en volumen, V es el volumen del sistema, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura del sistema y κ_T es la constante de incompresibilidad isotérmica.

La constante de compresibilidad isotérmica, κ_T , es una medida de la rigidez del sistema. A mayor κ_T , mayor rigidez del sistema. 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:

$$\begin{aligned} \kappa_T &= -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \\ &= \frac{1}{V} \left(\frac{\partial^2 \Omega_{NG}}{\partial V^2} \right)_T^{-1} \\ &= 12\pi R_{eq} \left(\frac{\partial^2 \Omega_{NG}}{\partial R^2} \right)_{T,R=R_{eq}}^{-1} \end{aligned} \quad (5.28)$$

en la cual R_{eq} hace referencia al radio de equilibrio, es decir al mínimo de las curvas de la energía Ω , 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 en tamaño de un nanogel aislado en función del pH del bulk 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 PNI-PAm 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, ya que los monómeros de

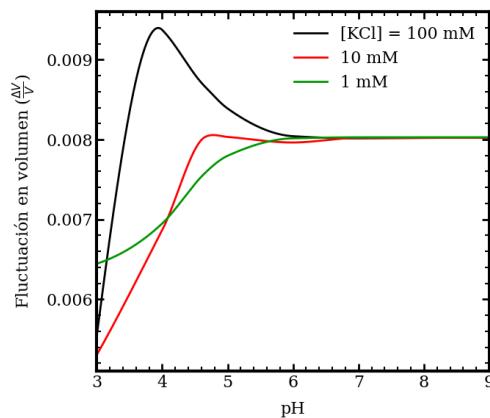


Figura 5.3: Gráfico de la fluctuación en volumen de un nanogel aislado. El nanogel esta compuesto por 2×10^5 segmentos (monómeros) repartidos en 200 cadenas de 1000 cadenas cada una

MAA que componen la red polimérica se encuentran desprotonados (estamos por debajo del pK_a intrínseco del MAA). En estas condiciones, un cambio en el tamaño del nanogel conlleva 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. La entrada o salida de iones conlleva un cambio en la cantidad de carga dentro del nanogel, con lo cual se esperaría un aumento en el grado de carga de los monómeros. Sin embargo, estas condiciones son desfavorables para bajos valores de pH, por lo que las fluctuaciones son las más bajas en estas condiciones. 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 contraiones 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, el nanogel se encuentra completamente desprotonado,

cargado eléctricamente. La salida o entrada de iones, que podría provocar un cambio en la carga del nanogel, es más favorable que a bajos pH. Por ello, se observa una fluctuación mayor, pero menor que a valores intermedios de pH, en los que la desprotonación es incompleta y el nanogel puede expandirse o contraerse. En cambio, a condiciones de pH alto solo es posible una expansión del nanogel, ya que no hay efecto de los contraíones de sal.

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 una al valor del pKa del MAA aislado, 4.65. Para el pH 3, el grado de carga eléctrica del nanogel es prácticamente nulo, por lo cual las fluctuaciones que se observan son por efecto de la temperatura. Bajo este pH, se ve que no hay cambios apreciables a medida que se aumenta la temperatura del sistema. El nanogel es estable a todas las temperaturas de trabajo, incluso cerca de la temperatura de transición del PNIPAm, alrededor de los 32°C. En este punto, el nanogel adopta un estado colapsado y no hay ninguna fuerza impulsora que promueva un pequeño cambio en su volumen.

A pH 4.65 y 7, el sistema posee carga eléctrica. Por tanto, al agregarle energía al sistema (aumento de temperatura), las fluctuaciones aumentan. Esto ocurre hasta llegar a la temperatura característica de transición volumétrica del PNIPAm. Después de este punto, hay un colapso en la estructura del nanogel, siendo las interacciones entre los segmentos de NIPAm las predominantes y estabilizando un tamaño específico del nanogel. La probabilidad de que se dé un cambio en el volumen es muy baja y, por tanto, se observa un decaimiento de las fluctuaciones. En particular, las fluctuaciones son mayores a pH 4.65 dado que el nanogel posee menor proporción de segmentos de MAA cargados. A pH 7, todos están completamente cargados. A pH 4.65 se permite un equilibrio entre segmentos protonados/desprotonados con la entrada de contraíones de sal y, de esta forma, permitir una expansión/contracción del nanogel.

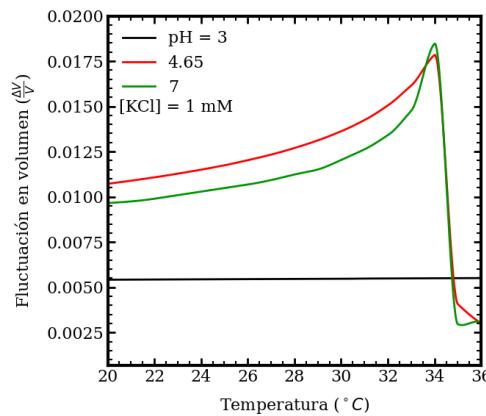


Figura 5.4: Gráfico de la fluctuación en volumen de un nanogel aislado. El nanogel esta compuesto por 2×10^5 segmentos (monómeros) repartidos en 200 cadenas de 1000 cadenas cada una

5.4 Resultados

En esta sección mostraremos los resultados obtenidos en el estudio sistemático de soluciones de nanogeles compuestos por segmentos de N-isopropilamina (NIPAm) y ácido metacrílico (MAA). La red polimérica, P(NIPAm-co-MAA), posee un 35% de MAA. A 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.

5.4.1 Simulaciones Montecarlo

En esta sección mostraremos los resultados de las 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 500 nanogeles.

En la sección anterior, sección 5.3.2, se menciona que las fluctuaciones de un nanogel aislado son pequeñas, por lo que en principio se esperarían cambios pequeños en una distribución de tamaños. Sin embargo, al considerar estas partículas en solución se pone en juego una nueva contribución energética: interacciones interparticulares. Estas vienen reguladas por los potenciales presentados en la ecuación

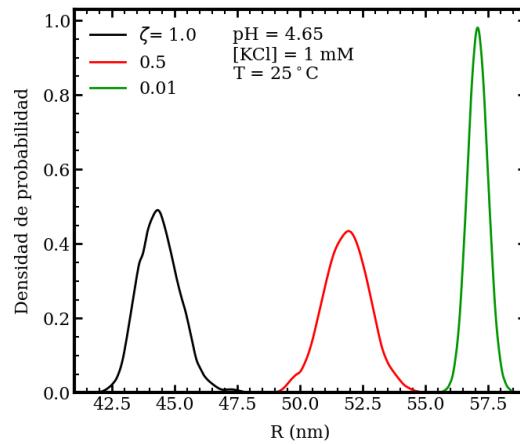


Figura 5.5: Densidad de probabilidad de tamaño para 3 diferentes soluciones. Se considera un factor de empaquetamiento de $\zeta = 1.0, 0.5$ y 0.01 para cada una de las soluciones. El radio de un nanogel aislado es de 57.2 nm. Las condiciones bulk para el potencial intramolecular, Ω_{NG} , corresponden a pH 4.65, temperatura 25°C y 1 mM en [KCl].

5.23. Estos nuevos potenciales proporcionan al sistema la capacidad de aumentar las fluctuaciones en tamaño de los 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 la solución son pH 4.76, temperatura 25°C y una concentración de sal de 1 mM en [KCl]. Cada curva representa una diferente fracción en volumen y/o diferente factor de empaquetamiento. Este factor se define como:

$$\zeta = \frac{4}{3}\pi r^3 N_p \frac{1}{V} \quad (5.29)$$

En donde V corresponde al volumen de la caja de simulación, N_p el número de partículas de la solución y r es un valor de referencia. Para todas las simulaciones se ha considerado $r = 2D_0$, en donde D_0 es el diámetro de un nanogel seco. Es decir, solo se considera el volumen molecular de todos los segmentos que lo componen. Con un número de partículas y el valor de r fijos, sabemos que un valor de ζ grande corresponde a un volumen más pequeño. Es decir, una solución más concentrada. De forma similar, para un ζ pequeño obtenemos una solución más diluida.

Se puede observar en la figura 5.5 que a soluciones más concentradas hay una mayor dispersión en los tamaños de cada partícula. La cercanía de las partículas en estas soluciones permite que interactúen más poniéndose en juego una mayor variabilidad de tamaños que logren minimizar la energá del sistema. Para las soluciones diluidas, $\zeta = 0.01$, los nanogeles tienden a estabilizarse a un único valor de radio. La baja probabilidad de interacción entre partículas resulta en un sistema aislado y, por tanto, la fluctuación en su volumen será menor. También en esta solución más diluida vemos que el máximo de la distribución tienda al radio de mínima energía dado en la curva 5.2 a concentración de 1 mM en [KCl]. Es decir, se tiende a un sistema aislado.

En la tabla 5.1 se muestran los valores de R correspondientes al pico máximo de probabilidad. Se observa que a mayor concentración de nanogeles, su radio medio disminuye, y a medida que diluimos más la solución, el radio medio se acerca al radio que minimiza el potencial termodinámico de un nanogel aislado. 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-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, este aumento es costosamente menor que el originado por los potenciales de Hertz-Yukawa.

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 tienen a aumentar su radio hasta minimizar la energía interna.

ζ	R_0 (nm)
1.0	44.5
0.5	52.0
0.01	57.1
Aislado	57.2

Tabla 5.1: Tabla con los valores de radio óptimo para las condiciones bulk de pH = 4.65, temperatura = 25°C, y [KCl] = 1 mM.

Los resultados monstrados con anterioridad muestran que la capacidad de fluc-

tuación de tamaño de los nanogeles es fuertemente afectada por su capacidad de interactuar con otro nanogel vecino, lo cual está influenciado por la concentración de la solución. En ese sentido, la figura 5.6 muestra la densidad de 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 1 mM. En el inset se muestra la solución con $\zeta = 0.01$. Se puede observar que los perfiles para las soluciones más concentradas corresponden al comportamiento de un sistema líquido. Para estos casos, $\zeta = 1.0$ y 0.5, notamos un primer pico correspondiente a los primeros vecinos. Este primer máximo se encuentra a una distancia aproximada del diámetro de un nanogel de equilibrio, en esas condiciones de bulk de solución. Ver tabla 5.1.

Los siguientes máximos observables hacen referencia a la segunda capa de “hidratación” a mayor distancia y una menor magnitud respecto de la primera. Para el sistema más diluido, $\zeta = 0.01$, su comportamiento se asemeja más a un sistema gaseoso, en la cual la distribución radial es uniforme y no hay cambios apreciables a lo largo de la coordenada r . Estos resultados constatan nuestras suposiciones de la mayor interacción de pares en las soluciones concentradas, mientras que en soluciones diluidas no hay suficientes nanogeles vecinos para que tengan un efecto importante en la fluctuación de tamaño.

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

Teniendo en cuenta que las soluciones de nuestros nanogeles están influenciadas por su concentración, veremos cómo estas soluciones influyen en su 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.

En la figura 5.7 se muestra el cambio del tamaño más probable, obtenido de los máximos de las curvas presentadas en la figura 5.5, en función del pH de la solución. Para tal fin se han considerado tres tipos de concentraciones, o grado de empaquetamiento $\zeta = 1.0, 0.5$ y 0.01 .

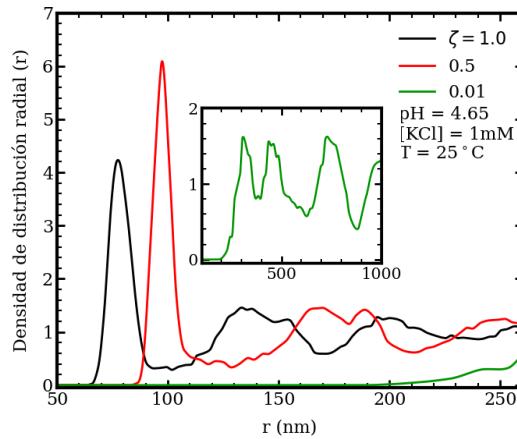


Figura 5.6: Densidad de distribución radial para las tres soluciones de nanogeles. Las curvas corresponden a los tres factores de empaquetamiento estudiados: 1.0, 0.5 y 0.01. Las condiciones del bulk de la solución son pH 4.65, $[KCl] = 1 \text{ mM}$ y 25°C . En el inset se muestra la curva correspondiente a $\zeta = 0.01$

La temperatura del sistema es de 25°C y la $[KCl] = 1 \text{ mM}$. Bajo estas condiciones solo se observa la respuesta de los segmentos de MAA.

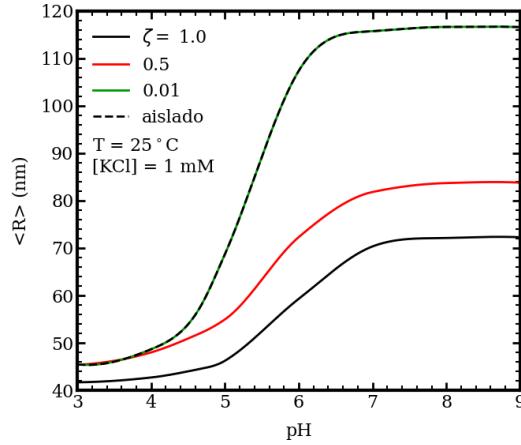


Figura 5.7: Variación de radio medio de la solución de nanogeles en función del pH de trabajo. Temperatura 25°C concentración salina 1 mM en KCl . Cada curva corresponde a un grado de empaquetamiento. En puntos el sistema aislado o dilución infinita.

En la figura se presentan en la curva a trazos el comportamiento de un sistema a dilución infinita. Como se puede observar, el tamaño más probable de los nanogeles aumenta con el pH. Esto se debe a que el pH afecta la carga de los segmentos de

MAA, que son, en parte, responsables de la estabilidad de los nanogeles. A pH más altos, los segmentos de MAA tienen adquieren una carga más negativa, lo que los hace que los segmentos se repelan entre sí logrando expandir el nanogel. Este comportamiento ha sido reportado en [153], en donde las repulsiones electrostáticas son disminuidas al alejar los centros de carga de la estructura del nanogel.

Se puede observar que a mayor concentración, $\zeta = 1.0$, el aumento de tamaño originado por el cambio en el pH es menor respecto a las soluciones más diluidas, $\zeta = 0.01$. En soluciones más concentradas, los nanogeles se encuentran más cercanos entre sí, por lo que un aumento del radio significa una mayor interacción entre ellos y, en consecuencia, un aumento en la energía del sistema. Tal como se observó en la figura 5.5, a soluciones más concentradas los nanogeles disminuyen su tamaño para reducir las interacciones de a pares entre ellos. Este efecto es menor a pH bajos, en donde cada nanogel posee sus grupos MAA protonados (sin carga), por tanto la interacción dada por el potencial de Yukawa es cercana a cero. El grado de carga medio, $\langle f \rangle$, de las soluciones aquí estudiadas se muestran en la figura 5.8. El bajo/nulo grado de carga a pH 3 permite, a una concentración alta, $\zeta = 1.0$, que las partículas aumenten su tamaño sin presentar repulsiones electrostáticas entre nanogeles vecinos. En consecuencia, la variación, respecto al sistema aislado, es de unos pocos nanómetros. De hecho, puede notarse cómo a condiciones medias y bajas de ζ , estos poseen el mismo valor de medio de radio($\langle R \rangle$). En el otro extremo, cuando el nanogel se encuentra completamente cargado (todos los segmentos de MAA desprotonados, ver figura 5.8), además del potencial de Hertz, el potencial de Yukawa toma mucha relevancia. Hay una repulsión entre partículas cargadas con el mismo signo. El impacto de este nuevo potencial se refleja en una diferencia de más de 40 nm en el radio medio de estas soluciones. Comparece $\zeta = 1.0$ y 0.01.

En la transición de estos extremos de pH, vemos como el aumento del pH y, por tanto, el aumento de carga eléctrica del nanogel, origina un aumento en el tamaño. Este aumento es más pronunciado a concentraciones diluidas, $\zeta = 0.01$, en donde el nanogel expande su estructura para relajar las repulsiones internas con un menor costo energético por la interacción con otro nanogel. En las soluciones más concentradas, $\zeta = 1.0$ y 0.5, el aumento de tamaño es menor debido a la energía extra de la interacción de a pares. Otro efecto que se observa es el desplazamiento del punto de

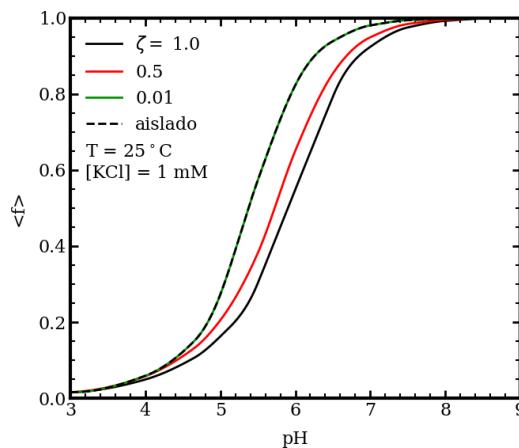


Figura 5.8: Grado de carga medio, $\langle f \rangle$, de la solución de nanogeles en función del pH del medio. Se consideran tres densidades dadas por el factor de empaquetamiento: $\zeta = 1.0$, 0.5 y 0.01 . La temperatura del sistema es 25°C y la concentración de sal 1 mM .

inflexión de estas curvas a valores más altos de pH. Se asocia el punto de inflexión con el pKa aparente, que se define como el pH en el cual se alcanza un $\langle f \rangle = 0.5$. Ver figura 5.8.

Las partículas, en un sistema aislado, al cargarse eléctricamente aumentan su tamaño para disminuir sus repulsiones internas. En las soluciones, la presencia de más nanogeles pone en juego un costo energético extra al aumento de tamaño, la interacción dada por los potenciales de Hertz y Yukawa. En consecuencia, los segmentos de MAA no se desprotonan (adquieren carga positiva). Para lograr la desprotonación se requiere mayor energía para desplazar el equilibrio químico ácido-base. Lo que se observa en un desplazamiento a mayores valores de pH.

La figura 5.9 muestra el tamaño medio de las soluciones de nanogeles como función de la concentración salina. El pH es de 4.65 y la temperatura es de 25°C . Las curvas sólidas corresponden a las tres factores de empaquetamiento, de trabajo: $\zeta = 1.0$, 0.5 y 0.01 . En línea a trazos se incorpora el comportamiento de un nanogel aislado.

Para las tres soluciones se observa una transición reentrante, es decir, una respuesta no monótona al aumento de la concentración salina.

Este fenómeno se explica, en primera instancia, por los monómeros cargados

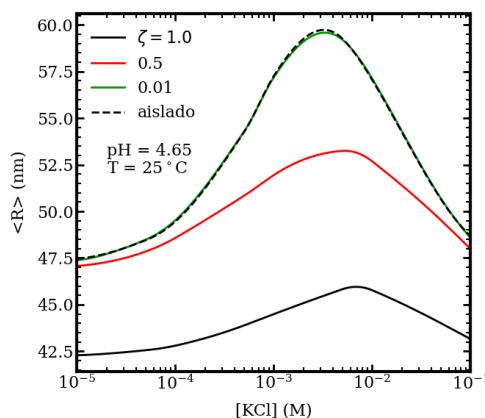


Figura 5.9: R medio en función de la concentración de sal, para diferentes grados en empaquetamiento. El pH de la solución es 4.65, la temperatura 25°C, en líneas sólidas se presentan valores de $\zeta = 1.0, 0.5$ y 0.01 , a trazos se muestra un nanogel aislado.

eléctricamente que componen el nanogel. La baja adsorción de iones de sal, resulta en un pobre apantallamiento en repulsiones de los segmentos de MAA. En consecuencia, los nanogels aumentan su tamaño para minimizar la energía libre química y así evitar las repulsiones. Al aumentar la concentración salina aumenta la adsorción de contraiones, hay mayor apantallamiento y las repulsiones electrostáticas son ahora de menor alcance. Esto permite una relajación en las cadenas de nanogel, observándose una disminución en su radio.

Nuevamente se observa un comportamiento diferente para las tres diferentes soluciones. Mayor vecindad de nanogeles, ver figura 5.6, hacen que interactúen entre ellos, aumentando la energía libre del sistema. Esta energía se incrementa aún más si los nanogeles aumentan mucho su tamaño, como salvoconducto para relajar sus repulsiones internas. Por lo que se observa un aumento de menor magnitud por parte de las soluciones más concentradas. A medida que se diluye lo suficiente la solución, nos acercamos al comportamiento ideal, es decir, un nanogel aislado.

La figura 5.10 muestra la respuesta a la temperatura de las soluciones estudiadas. Las condiciones del bulk corresponden a pH 4.65 y 1 mM [KCl], las diferentes curvas corresponden a diferentes factores de empaquetamiento: $\zeta = 1.0, 0.5, 0.01$. En primera instancia, y en todos los casos, se observa la transición de un estado swelling a uno colapsado por efecto de la temperatura sobre los segmentos de NIPAm. Este

comportamiento se debe a superar la temperatura crítica de disolución (LCST) del PNIPAm. Efecto reportado en [153].

A diferencia de los resultados anteriores, en los cuales se observaba una diferencia con la concentración de la solución, no se reporta un cambio en la temperatura en la cual se da la transición de un estado swelling a colapsado. Al disminuir el tamaño de cada partícula por efecto de la hidrofobicidad de los segmentos del NIPAm, también se reducen las interacciones entre nanogeles. Este efecto es igual para cada solución, con lo cual el estado colapso es el mismo para todas ellas. El radio medio en el estado colapsado de las soluciones es tan bajo que no se ven efectos con la concentración en la condiciones aquí mostradas.

Por otro lado a bajas temperaturas, estado swelling del gel, en donde no hay efecto alguno por parte de los segmentos de NIPAm, se obtienen tres radios medios para cada solución. El radio promedio aumenta a medida que disminuye la concentración de nanogeles. Este efecto es el reportado en la figura 5.5, en donde la mayor interacción entre nanogeles para soluciones más concentradas son las responsables de un menor tamaño medio de partícula.

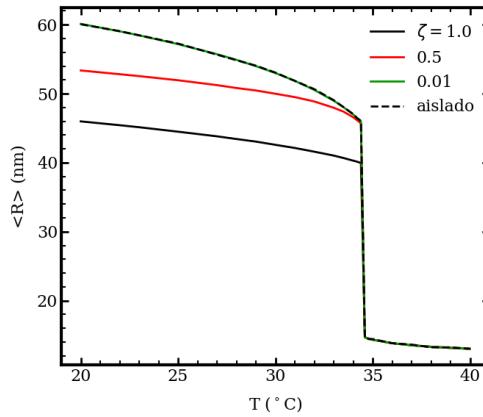


Figura 5.10: Tamaño medio de la solución de nanogeles como función de la temperatura del bulk. pH 4.65, $[KCl]$ 1m M y $\zeta = 0.5$

5.5 Conclusiones

En este capítulo se investigó el comportamiento de soluciones compuestas por nanogeles poliméricos a diferentes grados de empaquetamiento, es decir, a diferentes concentraciones. Se desarrolló un modelo con el cual aplicó la metodología de 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-co-MAA). Se consideraron tres estímulos diferentes: cambios en el pH, la temperatura y la concentración de sal. Además del efecto de la concentración de nanogeles en la solución.

Por debajo de la temperatura de transición del PNIPAm y a pH igual al pKa intrínseco del segmento de MAA, bajo grado de carga, se pudo observar el efecto de la concentración de nanogeles en solución. Los resultados obtenidos muestran que a medida que se aumenta la concentración de partículas, estas disminuyen en su radio promedio. Esto se atribuye a las interacciones entre nanogeles. Para disminuir estas interacciones, cada nanogel disminuye su tamaño.

Los perfiles de las soluciones más concentradas concuerdan con sistemas de fluidos líquidos, mientras que para la menor concentración se obtiene un sistema que se asemeja a un gas. En consecuencia, las propiedades de esta solución se desvían mínimamente del sistema a dilución infinita. La disminución del tamaño para minimizar las interacciones entre partículas es el responsable de los cambios en la respuesta a los estímulos de pH, temperatura y concentración de sal. El comportamiento es cualitativamente similar a un sistema con dilución infinita, pero de menor magnitud.

En particular, la respuesta a cambios de pH también conlleva un aumento en el pKa aparente de la solución. Parámetro importante al momento de caracterizar una solución. Otra particularidad que se mostró es el efecto de la temperatura. A diferencia de observar un cambio en la temperatura de transición, del mismo modo que del pKa aparente de las soluciones, se encontró que las tres soluciones estudiadas confluyan a un mismo radio medio y a una misma temperatura de transición. Los nanogeles en estado colapsado no logran interactuar con otras partículas vecinas, en consecuencia no hay efecto del grado de empaquetamiento en estas condiciones.

Appendix A

Definiciones termodinámicas

A.1 Entropía de mezcla

Consideremos un sistema en la cual solo hay traslaciones. En un sistema gran canónico la función de partición viene dada por ([agregar cita libro Hill](#)):

$$Q = \frac{q^N}{N!} \quad , \text{ donde } q = \frac{V z_n}{\Lambda^3} \quad (\text{A.1})$$

En donde z_n corresponde al parámetro de interacción entre las distintas moléculas. Λ es $\frac{\hbar}{(2\pi m k T)^{1/2}}$ y $N!$ es un factor de corrección para no repetir interacciones.

La energía asociada a la mezcla (entropía en fin...?) se expresa de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}
\beta F_{mix} &= -\ln Q = -\ln \frac{1}{N!} \left(\frac{VZ_n}{\Lambda^3} \right)^N \\
&= N \ln N - N - N \ln \left(\frac{VZ_n}{\Lambda^3} \right) \\
&= N \left[\ln \frac{N\Lambda^3}{VZ_n} - 1 \right] = N \left[\ln \frac{N\Lambda^3 v_w}{VZ_n v_w} - 1 \right] \\
&= N \left[\ln \rho v_w + \ln \frac{\Lambda^3}{Z_n v_w} - 1 \right] \\
&= N \left[\ln \rho v_w + \ln \mu^0 - 1 \right], \quad \mu^0 = \frac{\Lambda^3}{Z_n v_w}
\end{aligned} \tag{A.2}$$

Es posible definir $f_{mix} = F_{mix}$ obteniendo:

$$\beta f_{mix} = \rho(r) \left[\ln \rho(r) v_w + \ln \mu^0 - 1 \right] \tag{A.3}$$

La expresión anterior es válida para un diferencial de volumen, es decir, que para obtener la energía total obtenemos:

$$\beta F_{mix} = \int_V d^3r \beta f_{mix} = \int_V d^3r \rho(r) \left[\ln \rho(r) v_w + \ln \mu^0 - 1 \right] \tag{A.4}$$

A.2 Energía química y de mezcla del gel

El segundo término de la ecuación **energia** consiste en la energía química debido a la protonación de los segmentos ácidos del gel; además se considera la entropía de mezcla de las cadenas del mismo.

Separandolos se obtiene:

$$\int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} \left[f(r) \beta \mu_{MAA^-}^0 - (1 - f(r)) \beta \mu_{MAAH}^0 \right] \tag{A.5}$$

$$\int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} [f(r)(\ln f(r) + (1-f(r))(\ln(1-f(r)))] \quad (\text{A.6})$$

En donde en la A.5 $\int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}}$ multiplicado por $f(r)$ o $1 - f(r)$ corresponden a N_{MAA-} y N_{MAAH} respectivamente. Falta hablar sobre el cambio de ensamble...es decir: $F = W - N\mu$. Luego se tiene el la energía dada por potencial electrostático... y finalmente los constraints... o restricciones a cumplirse por el sistema...

Appendix B

Generación de configuraciones

B.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.

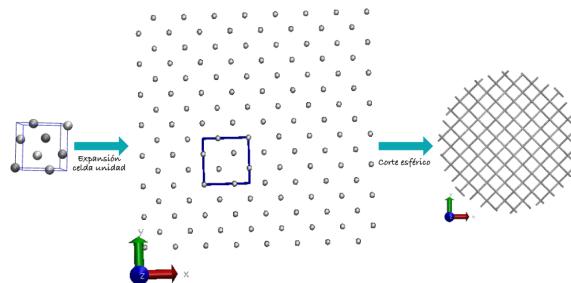


Figura B.1: Estructura base para la generación de configuraciones de nanogeles

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 [110]. Para describir las interacciones no enlazadas entre los segmentos de la red, utilizamos un potencial de Leonard-Jones puramente repulsivo con un desplazamiento.

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

Donde $\epsilon = 1k_B T$ y $\sigma = 0.5\text{nm}$, 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 con fondo plano. 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. Una fuerza armónica actúa sobre la partícula para moverla hacia la región con fondo plano del potencial si la partícula se encuentra fuera de esta región esférica de radio r_{fb} . No hay fuerza que actúe sobre la partícula restringida dentro de la región con fondo plano del potencial (dentro de la esfera). De manera simplificada, la energía potencial asociada con esta fuerza externa tiene la siguiente forma:

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

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 [1].

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 $k_{fb} = 50\frac{\varepsilon}{\sigma^2}$.

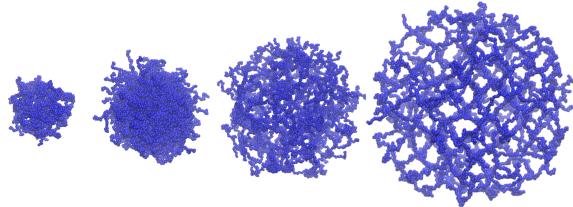


Figura B.2: Diferentes radios originados con el potencial armonico de retriccción.

Nuevamente, enfatizamos que, para obtener conformaciones más compactas de la red polimérica, aplicamos el potencial con fondo plano a todos los entrecruzamientos de la red, mientras que para las conformaciones elongadas, la restricción solo se aplica a los entrecruzamientos más superficiales.

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.

Appendix C

Resolución numérica: Teoría Molecular

C.1 Films poliméricos

La obtención de resultados a partir de la teoría planteada en estas secciones requiere la solución numérica de ecuaciones integro-diferenciales. Para tal propósito es conveniente pasar de un sistema continuo a uno discreto. La discretización del sistema se realiza en capaz de espesor δ . La suma sobre cada uno de estas capas reemplazan a las integrales a lo largo del eje z .

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

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

Esta expresión nos permite resolverla en cada una de las capaz i_z , cuya posición 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 per se en la teoría).

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

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

El grado de disociación:

$$\frac{f_j(i_z)}{1 - f_j(i_z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_j \psi(i_z)] \quad (\text{C.3})$$

en donde j hace referencia a los segmentos de *MAA* del film y los segmentos titulables τ del adsorbato. Y en la que nuevamente se tiene cuenta que el exponente -1 o $+1$ discrimina si el segmento j es ácido o básico

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

$$\langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle = \sum_{\alpha} P(\alpha) \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \quad (\text{C.4})$$

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

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \ln f(i_z) \right] \\ & \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta q_{MAA} \psi(i_z) \right] \\ & \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta v_{MAA} \pi(i_z) \right] \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

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:

$$\rho_{ads}(\theta, i_z) v_w = \tilde{a}_{ads} \prod_{\tau} \exp \left[-A \delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\tau}(\theta, i_z, j_z) \ln f_{\tau}(j_z) \right] \\ \prod_{\lambda} \exp \left[-A \delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\lambda}(\theta, i_z, j_z) [v_{\lambda} \beta \pi(j_z) + q_{\lambda} \psi(j_z)] \right] \quad (C.6)$$

Finalmente discretizando la ecuación de Poisson, para el potencial electrostático, obtenemos:

$$\epsilon \frac{\psi(i_z + 1) + \Psi(i_z - 1) + 2\psi(i_z)}{\delta^2} = \langle \rho_q(i_z) \rangle \quad (C.7)$$

en esta expresión se ha reemplazado la derivada segunda el potencial por su diferencia finita. Además la densidad discreta de carga se define:

$$\langle \rho_q(i_z) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_z) \langle \rho_{ads, \tau}(i_z) \rangle q_{\tau} + f(i_z) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_z) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (C.8)$$

Así como fueron definidas las condiciones de contorno en la ecuación 2.34 es necesario 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:

$$\frac{\psi(1) - \psi(0)}{\delta} = 0 \quad (C.9)$$

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 C.1 y C.7. 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.

C.2 Nanogeles estructurados

Para obtener resultados de la minimización de la energía, las ecuaciones integro-diferenciales no lineales descritas anteriormente (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:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(i_r) \rangle v_{\lambda} + \sum_i \langle \phi_i(i_r) \rangle \quad (\text{C.10})$$

Lo que nos da una ecuación para cada capa i_r , en donde cada posición es descrita 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 $\rho_{\gamma}(n_r) \approx \rho_{\gamma}^b$, $\rho_{pro}(\theta, n_r) \approx \rho_{pro}^b(\theta)$ and $\psi(n_r) \approx \psi^b = 0$.

Con estas consideraciones podemos reescribir:

$$\frac{f(j_r)}{1 - f(j_r)} = \left(\frac{a_{H^+}}{k_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta q_{MAA} - \psi(i_r)} \quad (\text{C.11})$$

For the free species:

$$\rho_\gamma(i_r)v_w = a_\gamma \exp[-\beta\psi(i_r)q_\gamma] \exp[-\beta\pi(i_r)v_w] \quad (\text{C.12})$$

Para las especies libres, su densidad local se escribe ahora:

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, i_r)v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_\tau(\theta, i_r, j_r) \ln f_\tau(j_r) \right] \\ & \times \prod_{\lambda} \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_\lambda(\theta, i_r, j_r) (\beta\pi(j_r)v_\lambda + \beta\psi(j_r)q_\lambda) \right] \end{aligned} \quad (\text{C.13})$$

La probabilidad de las configuraciones de la red polimérica $P(\alpha)$:

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \prod_{r_j} \prod_i \exp \left[-\beta\pi(r_j) \tilde{\phi}_r^i(\alpha, r_j) \right] \\ & \times \prod_{r_j} \exp \left[-\beta\psi(r_j) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} q_{MAA} \right] \\ & \times \prod_{r_j} \exp \left[-\ln(f(r_j)) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (\text{C.14})$$

donde:

$$\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_i) = \int_{r_i-\delta/2}^{r_i+\delta/2} dr \phi_r^{MAA}(\alpha, r) \quad (\text{C.15})$$

La ecuación de Poisson se escribe:

$$\epsilon \frac{\psi(i_r + 1) - 2\psi(i_r) + \psi(i_r - 1)}{\delta^2} + 2\epsilon \frac{\psi(i_r + 1) - \psi(i_r)}{(i_r - 0.5)\delta^2} = -\langle \rho_q(i_r) \rangle \quad (\text{C.16})$$

en donde la densidad de carga se define:

$$\langle \rho_q(i_r) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_r) \langle \rho_{pro,\tau}(i_r) \rangle q_{\tau} + f(i_r) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (\text{C.17})$$

Nuestras condiciones de contorno se reescriben:

$$\frac{\psi(1) - \psi(0)}{\delta} = 0 \quad (\text{C.18})$$

Como se definió en el capítulo donde hablamos sobre los films poliméricos, capítulo 2, 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 C.10) y (C.16. C.7. 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.

Bibliography

- [1] Gromacs - restraints. <https://manual.gromacs.org/current/reference-manual/functions/restraints.html>.
- [2] National Center for Biotechnology Information. PubChem database. Doxorubicin, CID=3170. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>.
- [3] 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}.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.

- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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>.
- [11] 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.
- [12] Nasim Annabi, Ali Tamayol, Jorge Alfredo Uquillas, Mohsen Akbari, Luiz E Bertassoni, Chaenyung Cha, Gulden Camci-Unal, Mehmet R Dokmeci, Nicholas A Peppas, and Ali Khademhosseini. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials*, 26(1):85–124, 2014. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201303233>.
- [13] 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.

- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Shewan M Aziz, Mark N Gillespie, Peter A Crooks, Sharman 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.
- [17] U Bachrach. Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids*, 26(4):307–309, 2004. doi: 10.1007/s00726-004-0076-6.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
 - [24] 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.
 - [25] 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>.
 - [26] Oleg V. Borisov, Ekaterina B. Zhulina, Frans A. M. Leermakers, Matthias Ballauff, editor=”Müller Axel H. E. Müller, Axel H. E.”, and Oleg Borisov. *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.
 - [27] 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.
 - [28] 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>.
 - [29] Peter N Brown and Youcef Saad. Convergence theory of nonlinear newton-krylov algorithms. *SIAM Journal on Optimization*, 4(2):297–330, 1994. doi: 10.1137/0804017.

- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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>.
- [34] 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>.
- [35] 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.
- [36] 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.

- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] Mahrokh Dadsetan, K. Efua Taylor, Chun Yong, Željko 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>.
- [45] 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>.
- [46] 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.
- [47] 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>.
- [48] 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>.
- [49] 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.
- [50] Omid C Farokhzad, Jianjun Cheng, Benjamin A Teply, Ines Sherifi, Sangyong 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.

- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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>.
- [59] 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.
- [60] 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>.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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>.
- [64] 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.
- [65] 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.

- [66] 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.
- [67] Katja Henzler, Björn 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.
- [68] 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.
- [69] Linda S Hirst. *Fundamentals of soft matter science*. CRC press, 2019.
- [70] 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.
- [71] 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>.
- [72] 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.
- [73] 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.

- [74] 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.
- [75] 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.
- [76] Masato Ikeda, Tatsuyuki Yoshii, Toshihiro Matsui, Tatsuya Tamida, 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.
- [77] 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.
- [78] 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>.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.

- [82] 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.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] 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>.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] Mohamad Kazempour, Hassan Namazi, Abolfazl Akbarzadeh, and Roya Kabiri. 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>.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] 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>.
- [93] Jochen Kleinen and Walter Richtering. Defined complexes of negatively charged multisensitive poly(N- isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels and poly(diallydimethylammonium chloride). *Macromolecules*, 41(5): 1785–1790, 2008. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma7023683.
- [94] 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.
- [95] 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.

- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] 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.
- [99] 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.
- [100] Tomas Koltai. Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Onco. Targets. 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/>.
- [101] 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.
- [102] 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.
- [103] 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.

- [104] 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.
- [105] Ray N Lawson and Mohammed Saeed Chughtai. Breast cancer and body temperature. *Canadian medical association journal*, 88(2):68, 1963.
- [106] 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.
- [107] 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.
- [108] 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>.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] 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>.

- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] 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>.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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>.
- [119] 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.

- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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>.
- [123] 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.
- [124] 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 comonomers. *Soft Matter*, 15(47):9700–9709, 2019. ISSN 1744-683X. doi: 10.1039/C9SM01180C. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C9SM01180C>.
- [125] 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.
- [126] 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.

- [127] Martin Malmsten, Helena Bysell, and Per Hansson. Biomacromolecules in microgels—opportunities and challenges for drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(6):435–444, 2010. doi: 10.1016/j.cocis.2010.05.016.
- [128] 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.
- [129] 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>.
- [130] 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.
- [131] David Julian McClements. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 240:31–59, 2017. doi: 10.1016/j.cis.2016.12.005.
- [132] N Metropolis. Rosenbluth,. n.; teller, a. h.; teller. *E. J. Chem. Phys.*, 21(1087):14, 1953. doi: 10.1063/1.1699114.
- [133] Nurit Mirkin, Jean Jaconicic, 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.
- [134] 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.
- [135] 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.
- [136] 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.
- [137] 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.
- [138] Anastasiia Murmiliuk, 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.
- [139] 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.
- [140] 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.
- [141] 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.

- [142] 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.
- [143] 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.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] 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>.
- [147] Neéstor A Peérez-Chaávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Using polymer hydrogels for glyphosate sequestration from aqueous solutions: molecular theory study of adsorption to polyallylamine films. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02727.
- [148] 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.
- [149] 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.

- [150] 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.
- [151] 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.
- [152] 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.
- [153] Néstor A Pérez-Chávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Thermodynamic theory of multiresponsive microgel swelling. doi: 10.1021/acs.macromol.0c02885.
- [154] 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.
- [155] 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.
- [156] 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>.
- [157] 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.

- [158] 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.
- [159] Carl W. Porter and Raymond J. Bergeron. Spermidine requirement for cell proliferation in eukaryotic cells: Structural specificity and quantitation. *Science.*, 219(4588):1083–1085, 1983. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.6823570.
- [160] 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>.
- [161] 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.
- [162] 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.
- [163] 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.
- [164] 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.
- [165] 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.
- [166] 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>.
- [167] Atta Rasool, Sadia Ata, and Atif Islam. Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application. *Carbohydrate polymers*, 203:423–429, 2019. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.09.083.
- [168] 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.
- [169] 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>.
- [170] 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.
- [171] 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.
- [172] 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.

- [173] 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.
- [174] 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.
- [175] 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.
- [176] Hiroaki Sai, Aykut Erbas, Adam Dannenhoffer, Dongxu Huang, Adam Weingarten, Erica Siismets, Kyujin Jang, Karen Qu, Liam C. Palmer, Monica Olvera de la Cruz, and Samuel I. Stupp. Chromophore amphiphile–polyelectrolyte 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>.
- [177] Dursun Saraydin 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.
- [178] Muhammad Sohail Sarwar, Qingrong Huang, Abdul Ghaffar, Muhammad 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.
- [179] 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.

- [180] 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.
- [181] Frank Scheffold. Pathways and challenges towards a complete characterization of microgels. *Nature Communications*, 11(1):4315, 2020. doi: 10.1038/s41467-020-17774-5.
- [182] 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.
- [183] 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.
- [184] 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.
- [185] 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.
- [186] 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.

- [187] 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.
- [188] 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.
- [189] 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.
- [190] Anuvansh Sharma, Karthik Raghunathan, Helene Solhaug, Jibin Antony, Jørgen Stenvik, Asbjørn Magne Nilsen, Mari-Ann Einarsrud, and Sulalit Bandyopadhyay. 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.
- [191] 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>.
- [192] 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.
- [193] Gurkan Sin and Antonio Espuña. Applications of monte carlo method in chemical, biochemical and environmental engineering, 2020.
- [194] Michael H Smith and L Andrew Lyon. Tunable encapsulation of proteins

- within charged microgels. *Macromolecules*, 44(20):8154–8160, 2011. doi: 10.1021/ma201365p.
- [195] 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.
- [196] 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.
- [197] 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.
- [198] 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.
- [199] I Szleifer. Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach. *Biophysical journal*, 72(2):595–612, 1997.
- [200] 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.
- [201] Toyoichi Tanaka and David J Fillmore. Kinetics of swelling of gels. *The Journal of Chemical Physics*, 70(3):1214–1218, 1979. doi: 10.1063/1.437602.
- [202] Ian F Tannock and Daniela Rotin. Acid ph in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer research*, 49(16):4373–4384, 1989.

- [203] Vladimir P Torchilin. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 24:1–16, 2007. doi: 10.1007/s11095-006-9132-0.
- [204] Madeline Torres-Lugo, Marcos García, 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>.
- [205] 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.
- [206] 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.
- [207] 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.
- [208] Tina Vermonden, Roberta Censi, and Wim E Hennink. Hydrogels for protein delivery. *Chemical reviews*, 112(5):2853–2888, 2012. doi: 10.1021/cr200157d.
- [209] 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>.
- [210] 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.
- [211] Alexander Wittemann and Matthias Ballauff. Interaction of proteins with linear polyelectrolytes and spherical polyelectrolyte brushes in aqueous so-

- lution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(45):5269–5275, 2006. doi: 10.1039/B609879G.
- [212] 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.
- [213] 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.
- [214] Chi Wu and Shuiqin Zhou. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous? *Macromolecules*, 30(3):574–576, 1997. doi: 10.1021/ma960499a.
- [215] 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.
- [216] Tao Wu, Peng Gong, Igal Szleifer, Petr Vlc̄ek, 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.
- [217] 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.
- [218] 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.

- [219] 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.
- [220] 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>.
- [221] 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.
- [222] 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.
- [223] 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.
- [224] Xi Zhang, Ying Guan, and Yongjun Zhang. Ultrathin hydrogel films for rapid optical biosensing. *Biomacromolecules*, 13(1):92–97, 2012. doi: 10.1021/bm2012696.
- [225] Xinyu Zhang, Minyi Zhao, Nan Cao, Wei Qin, Meng Zhao, Jun Wu, and Dongjun 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.

- [226] 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>.
- [227] 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.
- [228] 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.
- [229] 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>.