



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

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

TESIS PRESENTADA POR NÉSTOR ARIEL PÉREZ CHÁVEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

DIRIGADO POR:

DIRECTOR: DR. GABRIEL S. LONGO
Co-DIRECTOR: DR. ALBERTO G. ALBESA

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 sistemático de los sistemas poliméricos. Se espera que la lectura sea agradable... **muy prologo de libro....**

En el primer capítulo, nos adentramos en el mundo de los materiales blandos, 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 particular 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 [97, 102], y principalmente en su uso de secuestro de fármacos [103], 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 [101], 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	14
1.1 Sistemas poliméricos	14
1.2 Respuesta a estímulo pH, sal y Temperatura	16
1.3 Encapsulado y Liberación de medicamentos	17
1.4 Enfoque teórico	20
1.5 Antecedentes	21
1.6 Metodología	22
1.6.1 Teoría Molecular	22
1.6.2 Monte Carlo	24
1.6.3 Dinámica Molecular	25
1.7 Objetivos	26
2 Films poliméricos	27
2.1 Introducción/Motivación	27
2.2 Teoría Molecular	28
2.3 Solución Bulk	40
2.4 Resultados	43
2.4.1 Respuesta al pH	44
2.4.2 Adsorción	49
2.5 Conclusiones	52
3 Geles poliméricos	53
3.1 Introducción/Motivación	53

3.1.1	Teoría: Fase Microgel	54
3.1.2	Fase solución	61
3.1.3	Minimización gráfica	62
3.1.4	Adsorción de drogas	63
3.2	Resultados y discusión	67
3.2.1	Respuesta al pH y la concentración de sal	67
3.2.2	Respuesta a la Temperatura	73
3.2.3	Efecto del grado de entrecruzamiento	77
3.2.4	Adsorción de drogas	78
3.3	Conclusiones	82
4	Nanogeles estructurados	84
4.1	Introducción/Motivación	84
4.2	Teoría Molecular	85
4.2.1	Red polimérica	86
4.2.2	Solución Bulk	96
4.2.3	Modelo Molecular: Proteínas	97
4.2.4	Modelo Molecular: Nanogel	99
4.3	Resultados y discusión	100
4.3.1	Caraterización del nanogel	100
4.3.2	Adsorción de proteínas en nanogeles basados en MAA	104
4.3.3	Adsorción de insulina en nanogeles basados en AH	109
4.4	Conclusiones	111
5	Soluciones coloidales	120
5.1	Introducción	120
5.2	Método: Simulación Monte Carlo	121
5.2.1	Potencial zeta (ζ)	124
5.3	Resultados	125
.1	Entropía de mezcla	128
.2	Energía química y de mezcla del gel	129
.1	Nanogel network configurations	130
.1	Resolución numérica: films	133

.2 Resolución numérica: Nanogeles estructurados	136
Bibliography	139

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.	17
1.2	Esquema de la teoría molecular... las diferentes contribuciones energéticas son un funcional de funciones de densidad	24
2.1	Grado de carga del gel como función del pH. Grado de carga para un monomero aislado en presentado en curva a rayas, se compara para diferentes concentraciones de sal, a mayor concentración salina más nos acercamos al sistema ideal.	46
2.2	Número de carga de las proteínas cytocromo c y myoglobina como función del pH en el seno de la solución (bulk). La línea a trazos muestra el cambio en el signo de la carga.	48
2.3	pH local del gel como función del pH en el seno de la solución (bulk). Cada curva corresponde a una concentración de sal diferente.	49
2.4	Adsorción de proteínas: cytocromo c y myoglobina en panel A y B respectivamente. La concentración de los adsorbatos es $10\mu M$	51

3.1	Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $cs = 10^{-2}M$. 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 algunas 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 local/global de la curva correspondiente (ver tabla 3.2).	62
3.2	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.	67
3.3	Gráfico de 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 son $n_{ch} = 100$ -long. y tienen 35% MAA. La curva de 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.	68
3.4	Gráfico del tamaño del microgel en función de las concentraciones 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).	70
3.5	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 condiciones de figura 3.4B.	72
3.6	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).	73

3.7 Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{TV} (A) y la fracción de <i>MAA</i> 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 MAA de 35%.	75
3.8 (A) Gráfico de temperatura de transición T_{TV} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01M$; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}}$ en función del pH para las mismas condiciones del panel A (<i>i.e.</i> , en el T_{TV}); x_{MAA^-} es proporcional a la carga total del polímero; N_{seg} es el mismo para todos los microgeles.	76
3.9 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.	77
3.10 Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubicina (A) y doxorrubicina (B) absorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es $1mM$ y $T = 25^\circ C$. el microgel P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35% MAA (MG100-35).	80
3.11 Número de carga de las drogas estudiadas: Doxo y Dauno. La intersección con la línea a puntos 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 cargados de <i>MAA</i> del microgel.	81
3.12 Mapas en 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 3.10, es decir: La concentración de fármaco en solución es $1mM$ y $T = 25^\circ C$. el microgel P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35% MAA (MG100-35).	82

- 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: ácido; azul: básico; gris: residuos de carga neutral). 98
- 4.2 A: La red de nanogeles consiste en 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 comonómeros 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. 100
- 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 $10^{-3} M$ 101
- 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. 114
- 4.5 Distribución radial de todos los segmentos que componen la estructura del nanogel, $\lambda(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a una funcionalización diferente 115

- | | | |
|------|---|-----|
| 4.6 | Gráficos del exceso de adsorción 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 del lado izquierdo (A y C) y $10^{-2} M$ en los paneles del lado derecho (B y D); Se muestra una ampliación de la adsorción. Estos nanogeles tienen 22% MAA; la concentración de proteína es $10^{-6} M$ | 116 |
| 4.7 | Panel A: Gráfico de la distribución radial de las moléculas de citocromo c, $\langle N(r) \rangle$, en función de la posición de los nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones. Estas redes 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. | 117 |
| 4.8 | Plot of the excess adsorption Γ of cytochrome c as a function of salt concentration at pH 7 for MAA-VA nanogels with different network functionalizations having 22% MAA; protein concentration is $10^{-6} M$ | 118 |
| 4.9 | Plots of adsorbed insulin molecules, Γ , as a function of pH for AH-VA nanogels having different functionalizations. The AH content is 22% for the polymer networks of panel A and 35% for those of panel B (this latter degree of functionalization cannot be achieved for the SF nanogel). Other conditions are $10^{-3} M$ NaCl, and $[Insulin] = 10^{-6} M$ | 118 |
| 4.10 | A: Plot of the local distribution of insulin molecules, $\langle N(r) \rangle$, as a function of position for AH-VA nanogels having 22% pH-sensitive segments in different network configurations. pH is 7.5, $10^{-6} M$ insulin and $10^{-3} M$ NaCl. B: Potential of mean force, $PMF(r)$, as a function of position for the same conditions as panel A. | 119 |
| 5.1 | Gráfico del probabilidad de tamaño de la solución de nanogeles en función de la densidad... fracción de volumen ocupada. | 126 |
| 5.2 | Gráfico del probabilidad de tamaño de la solución de nanogeles en función de la densidad... fracción de volumen ocupada. nanogel más flexible... 200 monomeros por cadena. 2e5 monomeros totales. radio medio aislado = 51 nm | 127 |

- 3 Estrucutra base para la generación de configuraciones de nanogeles . 130
4 Diferentes radios originados con el potencial armonico de retriccción. 131

List of Tables

3.1	Propiedades moleculares de las diferentes especies químicas consideradas. (*Para las especies desprotonadas).	60
3.2	Minimización de las curvas de la figura 3.1. Esta tabla resume los radios óptimos de tres microgeles MG100 a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $[KCl] = 10^{-2}M$	63
3.3	Porpediades moleculares para las distintas unidades de grano grueso usadas para el modelado de las drogas Daunorubicina y Doxorubicina. (ver figura 3.2). (* Para unidades ionizables.)	67
3.4	pka's aparente de la fig. 3.3 para un gel MG100-35 a $25^{\circ}C$	69
4.1	Volumen y pKa (si corresponde) de las partículas de grano grueso (residuos de aminoácidos, iones pequeños, moléculas de solvente y segmentos poliméricos) considerados en nuestro modelo molecular. . .	98

Chapter 1

Introducción

1.1 Sistemas poliméricos

En la última década, ha habido un aumento significativo en el interés por los materiales blandos, debido a la amplia variedad y diversidad de materiales e innovaciones que se pueden lograr con ellos. Estos materiales se distinguen por su estructura molecular flexible y adaptable, lo cual les confiere la capacidad de alterar su forma y propiedades de acuerdo con las condiciones externas. Esta adaptabilidad los convierte en protagonistas indispensables en diversas industrias [141]. Desde su uso en la creación de espumas y adhesivos [135] hasta su función prominente como detergentes [24], estos materiales han probado ser efectivos en varios campos. Su aplicación no se detiene ahí, sino que también han marcado presencia en la industria cosmética y de pinturas, ofreciendo características singulares a productos que enriquecen nuestra vida diaria [49]. Incluso en la industria alimentaria, los materiales blandos actúan como aditivos esenciales, contribuyendo a la textura, preservación y seguridad de los alimentos que consumimos [67].

Sin embargo, uno de los terrenos más emocionantes en los que los materiales blandos han causado un impacto significativo es en el ámbito médico y farmacéutico [110]. Estos materiales se han erigido como protagonistas en la búsqueda de transportadores de fármacos más avanzados [6, 86], eficientes, amigables con el ambiente y compatibles con el organismo humano. Las propiedades intrínsecas de los materiales blandos les permiten ser moldeados y adaptados de manera específica para cumplir

con los requisitos únicos de la administración de medicamentos. Esta intersección entre los materiales blandos y la medicina no solo tiene el potencial de revolucionar la forma en que entregamos y absorbemos 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.

En estas últimas aplicaciones médicas, los films y geles poliméricos han sido pioneros en su uso y han tenido un creciente interés. 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. 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 [54, 140], ingeniería de tejidos [85, 130], regeneración ósea [9], materiales biomiméticos [41, 138], entre muchas otras aplicaciones biomédicas.[29]

Un **hidrogel polimérico** es un material reticulado en forma de red tridimensional que tiene una alta capacidad de retención de agua. Está compuesto por polímeros hidrofílicos que absorben y retienen grandes cantidades de agua en su estructura. Los hidrogeles son conocidos por sus propiedades de hinchamiento y absorción de líquidos. Podemos distinguir entre un **film polimérico** el cual consiste en una capa delgada y plana de material polimérico que puede tener diferentes espesores. La matriz de polímeros que la componen se encuentra anclada a la superficie. Los polímeros son cadenas largas de moléculas que pueden ser naturales o sintéticas. Los films poliméricos se utilizan en una variedad de aplicaciones, incluyendo la construcción, la electrónica, y la medicina [REFs] . El film polimérico tiene una alta capacidad de absorción de agua.

Otras partículas que componen el mundo de los hidrogeles son los **microgeles** al igual que los films que definimos anteriormente son redes tridimensionales de

polímeros entrecruzados que pueden adsorber grandes cantidades de agua o solventes, lo que les permite hincharse considerablemente. Estos geles tienen dimensiones en una escala de 1 a 200 micrómetros. Los microgeles encuentran aplicaciones en áreas como la ingeniería de tejidos, la liberación controlada de fármacos, la agricultura y la fabricación de materiales absorbentes. En cambio los **nanogeles** son estructuras similares a los microgeles, pero su tamaño se encuentra en la escala nanométrica. Por definición IUPAC este tamaño debe ser menor a 200 nm [REFs]. Los nanogeles son conocidos por sus propiedades de absorción de agua y su capacidad para encapsular moléculas en su interior. Debido a su pequeño tamaño y propiedades únicas, los nanogeles son ampliamente investigados para aplicaciones biomédicas y de entrega de fármacos. El entorno acuoso dentro de los hidrogeles puede proteger a las proteínas de la desnaturización y agregación, mientras que estas se mantienen activas y estructuradas cuando se liberan de los hidrogeles. En la administración oral de medicamentos, los hidrogeles con respuesta al pH han sido ampliamente investigados como vehículos funcionales que pueden encapsular y liberar proteínas, evitando su degradación en el entorno gastrointestinal. Este comportamiento de respuesta es generalmente reversible y depende de la composición química de la red polimérica.

1.2 Respuesta a estímulo pH, sal y Temperatura

Los microgeles, 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 [123].

El pH en el cual se marca el inicio y caracteriza esta transición es el pKa aparente del microgel, que depende de la concentración de sal de la solución y frecuentemente difiere del pKa intrííseco del monómero ácido. Estos microgeles también ajustan su tamaño en respuesta a cambios en la concentración de sal de la solución [123].

Análogamente, los microgeles de algunos polímeros termosensibles experimentan una transición de fase de volumen (VPT por sus siglas en inglés) cuando se calientan por encima de una temperatura característica (VPTT o T_{pt}) [98, 99]. Este comportamiento se origina porque tales polímeros son insolubles en agua por encima

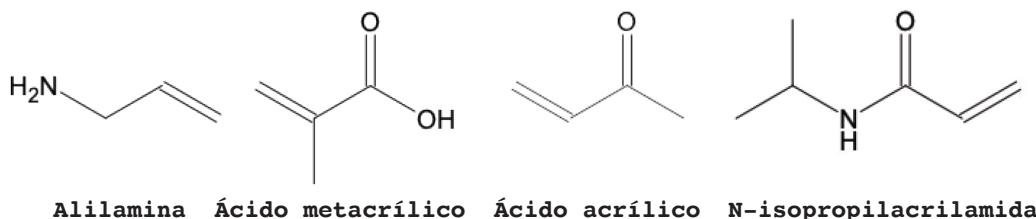


Figura 1.1: Moléculas que conforman los diferentes monómeros de las redes poliméricas que dan respuesta a los hidrogeles. Con respuesta al pH y concentración de sal: alilamina (base), ácido metacrílico y ácido acrílico. con respuesta a la temperatura: N-isopropilacrilamida. Estas moléculas son las utilizadas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

de cierta temperatura de solución crítica más baja (LCST) [61]. Normalmente, la LCST del polímero y la VPTT de la red son aproximadamente idénticas. Este es el caso de las partículas de microgel de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) [98], cuyo volumen colapsa por encima de 32°C, siendo le mismo para el polímero lineal [116].

Al tener un VPTT alrededor de la temperatura corporal, los microgeles de PNIPAm han generado un gran interés para aplicaciones biomédicas [43]. Las estrategias para controlar el VPTT de los microgeles incluyen la síntesis de nuevos monómeros termosensibles [20, 82], así como la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [48, 79]. Este último enfoque produce microgeles de respuesta múltiple que son susceptibles a cambios en la temperatura, el pH y la concentración de sal [34, 123]. Los microgeles de NIPAm y AA han sido ampliamente estudiados [12, 17, 59, 90]; También se han investigado microgeles de copolímeros de NIPAm y MAA [30, 38, 50]. El VPTT de estos microgeles de respuesta múltiple depende del pH de la solución y la concentración de sal, y la fracción de monómero ionizable en las cadenas de polímero [17, 46, 50, 59, 70, 90, 133].

1.3 Encapsulado y Liberación de medicamentos

El interés en hidrogeles en especial aquellos con diámetros menores a 200 nm ha crecido rotudamente debido a su tiempo más prolongado de circulación en el sistema circulatorio. La naturaleza incipientemente hidrofílica de estas estructuras, 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 desnaturalización y la agregación [7, 13, 114], mientras permanecen activas y estructuradas cuando se liberan de los hidrogeles [131]. En la administración oral de fármacos, los hidrogeles con respuesta de pH se han investigado en gran medida como vehículos funcionales que pueden encapsular y administrar proteínas, evitando su degradación en el entorno gastrointestinal [65, 83, 111]. Además, su escaso tamaño les permite responder rápidamente luego de recibir el estímulo [127]. Por todas estas razones, los nanogeles poliméricos son hoy en día una de las primeras opciones consideradas al diseñar biomateriales con funciones específicas [113, 124]. 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. El desafío en la actualidad es aprender a controlar esta respuesta para canalizarla en diferentes aplicaciones.

Por citar, Brugger and Richtering [19] encontraron que el pH durante la síntesis tiene un impacto significativo en la composición y, por lo tanto, en las propiedades del microgel y su capacidad para ser utilizado como un estabilizador sensible a estímulos. Resultados similares fueron estudiados por otros autores en donde se destaca el uso de emulsiones sensibles al pH, la sal y la temperatura [93, 94, 117] o como plantillas para el ensamblaje de nanomateriales [133]. Haciendo de estos sistema no solo valiosos en el encapsulado y liberación de medicamentos, sino también como secuestradores de diferentes adsorbatos.

Del mismo modo Culver et al. [27] han utilizado nanogeles de poli(NIPAm-co-MAA) funcionalizados para la unión y detección de diferentes proteínas. Recientemente se investigaron dispositivos basados en microgeles de poli(NIPAm-co-MAA) para la encapsulación/liberación del fármaco quimioterapéutico Doxorrubicina [39, 84, 105]. Estos autores mostraron que el uso de microgeles para la liberación contralada de sustancias bioactivas con carga opuesta. La incorporación del comonómero

ácido proporciona un mecanismo controlado por el pH para la captación/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 [32].

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.

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.

En muchos casos, la vía oral es preferible para la administración de fármacos, ya que es menos invasiva y presenta otras ventajas que mejoran la calidad de vida de los pacientes. En este ámbito, los nanogeles con respuesta al pH son de particular interés debido a 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). 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 [107]. Por otro lado, el microambiente alrededor del tejido canceroso puede presentar un pH más ácido en comparación con las condiciones fisiológicas habituales [37, 69, 128], por lo que los nanogeles con respuesta al pH están siendo evaluados para la administración de medicamentos en el tratamiento del cáncer [60, 100]. Por ejemplo, se han utilizado nanogeles

de quitina para la administración de doxorubicina en diferentes tipos de cáncer, incluyendo pulmón, mama, hígado y próstata [56]. Del mismo modo, los nanogeles de polímeros termosensibles tienen un gran potencial para la liberación dirigida tanto a células cancerosas como a tejidos inflamados o lesionados, los cuales presentan una temperatura ligeramente superior a la corporal.

En este contexto, esta tesis tiene como objetivo avanzar en el entendimiento de la fisicoquímica que subyace en la actuación de los geles 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 en nuestros estudios tiene como objetivo guiar el diseño en el laboratorio de geles poliméricos con propiedades óptimas para aplicaciones específicas en el campo de los biomateriales.

1.4 Enfoque teórico

El control de la función y el comportamiento de un biomaterial requiere comprender su interacción con las proteínas. Por ejemplo, las lentes de contacto basadas en ácido poli(metacrílico) (PMAA) con respuesta al pH están expuestas al fluido lagrimal, que contiene cientos de proteínas. La adsorción de algunas de estas proteínas debe evitarse, ya que afecta la comodidad de uso y puede provocar inflamación; sin embargo, la adsorción selectiva de proteínas con propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, como la lisozima, podría ser beneficiosa. La interacción entre proteínas y superficies poliméricas está gobernada por una compleja interacción entre diferentes grados de libertad. La capacidad tanto del adsorbato como del material adsorbente para protonar/deprotonar, regular su carga eléctrica y modificar el entorno cercano, contribuye a esta complejidad.

El comportamiento de los microgeles de poli(NIPAm-co-MAA), incluido su VPT y la interacción con polímeros de carga opuesta, se ha descrito aplicando teorías y simulaciones moleculares en varios niveles de resolución para investigar el compor-

tamiento de los microgeles poliméricos sensibles a estímulos [5, 68]. Quesada-Pérez et al. [109] ha simulado el comportamiento de geles compuestos polielectrolitos y termosensibles utilizando simulaciones de Monte Carlo, logrando explicar el comportamiento de hinchamiento de estas partículas. Ahualli et al. [5] emplearon simulaciones de grano grueso empleadas para geles polielectrolíticos. Este enfoque computacional se basaron en interacciones partícula-partícula entre unidades de polímero.

En estos trabajos se han centrado principalmente en el hinchamiento y otras propiedades de las partículas que tienen una red de polímero permanentemente cargada, y algunos han abordado el efecto de la temperatura y la calidad del solvente [3, 5, 57, 89, 108]. Recientemente, estudios con simulaciones han considerado la respuesta al pH de microgeles compuestos de polímeros reguladores de carga [51, 80, 112, 118, 119]. 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 [21, 106].

Polotsky et al. [106] 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.

1.5 Antecedentes

Para estudiar todos los sistemas que presentaremos en cada capítulo, aplicaremos una teoría molecular. Este enfoque teórico 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. Mediante el uso de teoría a nivel molecular, se ha logrado estudiar la termodinámica de hidrogeles de cadenas de poliácido reticuladas, incluyendo películas delgadas depositadas en superficies [75] y películas grafteadas en superficies [78] en estos trabajos se 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 nanofilmes de hidrogel de cadenas de poliácido entrecruzadas [74, 77, 92] observándose el trabajo no trivial que tiene el pH al momento de protonar/deprotonar a los dis-

tintos adsorbatos. El método que usaremos representa una extensión de las teorías moleculares desarrolladas por Szleifer y colaboradores para investigar la adsorción de proteínas en capas de polímeros [33, 45, 125], y el comportamiento de capas de polielectrolitos débiles [91]. Las predicciones de esta teoría se han demostrado estar en excelente acuerdo cuantitativo con observaciones experimentales para una variedad de sistemas poliméricos [126, 137]. 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. 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. Nuestros estudios resaltan el papel no trivial que desempeña la protonación de los aminoácidos en la adsorción de proteínas.

En esta sección nos valdremos de una red polimérica que da estructura a un film polimérico. Este sistema nos ayudará a introducirnos en la teoría molecular, así como también a eplicar algunos conceptos que nos serán de suma importancia en los próximos capítulos.

1.6 Metodología

1.6.1 Teoría Molecular

La teoría es un enfoque de funcional de 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 sistema. La minimización de esta energía respecto a la funcional de las densidades permiten obtener el estado de menor energía que estabiliza al sistema.

En el esquema de la figura 1.2 se puede observar como se interpreta esta teoría. Para dicho esquema se ha considera un sistema con una red polimérica que posee monómeros titulables, así mismo un adsorbato con unidades químicas titulables. Esto nos proporciona una energía libre química (F_{qca})dada por los equilibrios ácido-base. Además si consideramos nuestra red polimérica como punto de referencia fijo obtenemos una entropía de mezcla (S_{mez}) dada por las especies móviles: moléculas de agua, iones de sal, adsorbatos. Además hay otra entropía de mezcla dada por las diferentes configuraciones a las que puede acceder la red polimérica, es particular la denominamos $S_{conf,net}$. Otro tipo de interacciones que se incluyen en este ejemplo son las interacciones entre todas las especies. Interacciones del tipo electrostático (U_{elec}) e interacciones estéricas (U_{ste}) en donde hay restricciones sobre el volumen, todo el espacio debe estar ocupado y no pueden existir superposiciones entre especies. Estas contribuciones son funcionales de otras funciones como lo 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 semi-gran potencial. Esto debido que hemos considerado como referencia a la red polimérica y no puede desplazarse, sin embargo las especies si crean un equilibrio químico entre el bulk de la solución y las cercanías (y dentro) de nuestra red polimérica.

La minimización de este potencial energético nos permite escribirlo en función de dos potenciales de interacción locales. En cada capítulo daremos la derivación detal-

lada y como es posible llegar a estos potenciales. Finalmente la resolución numérica de estos potenciales se hace con el método de Newton-Krylov [18] implementado en código FORTRAN escritos en el grupo de investigación.

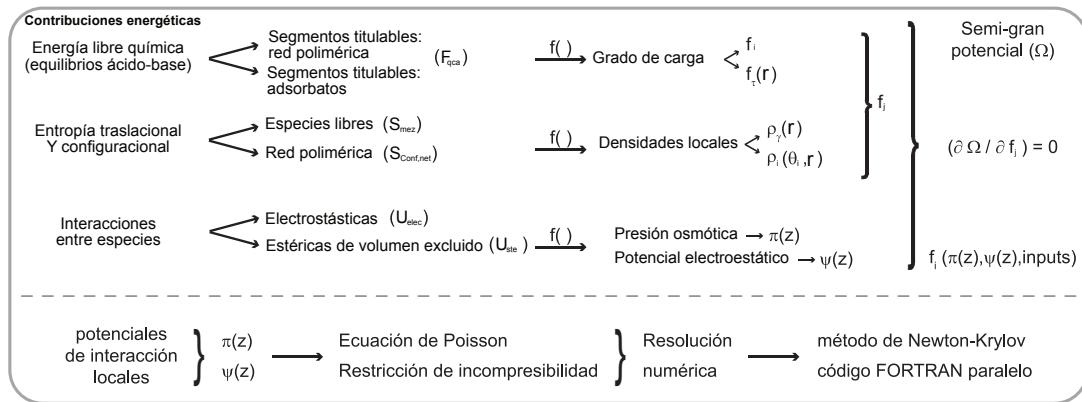


Figura 1.2: Esquema de la teoría molecular... las diferentes contribuciones energéticas son un funcional de funciones de densidad

1.6.2 Monte Carlo

El algoritmo Metropolis-Hastings es un método de muestreo de Monte Carlo en cadena de Markov (MCMC) para obtener muestras de una distribución de probabilidad a partir de la cual es difícil obtener muestras directamente. El algoritmo fue propuesto por Nicholas Metropolis, Walter Wolfgang Gibbs, Geoffrey Hastings, y Ronald L. Tanner en 1953. [87] 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 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 actual. 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 muestrear 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.[\[122\]](#)

1.6.3 Dinamica 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. [73] 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 la usaremos para la generación de configuraciones descrita el en el anexo .2.

1.7 Objetivos

Los **objetivos específicos** del presente plan de trabajo son los siguientes:

1. Desarrollar un modelo mecano-estadístico utilizando TM para describir la respuesta a cambios de pH, temperatura y concentración de sal en microgeles formados por homopolímeros.
2. Extender dicho modelo para investigar el comportamiento de microgeles de copolímeros con respuesta a múltiples estímulos.
3. Estudiar 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.
4. Desarrollar un modelo combinando simulaciones de TM y Dinámica Molecular (DM) para estudiar el comportamiento de estos microgeles en soluciones relativamente concentradas.

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

Chapter 2

Films poliméricos

2.1 Introducción/Motivación

En esta sección nos valdremos de una red polimérica que da estructura de un film polimérico entrecruzado, un hidrogel. Como se mencionó antes los films son materiales ampliamente investigados para aplicaciones biomédicas. [REFs] La respuesta a estímulo y su capacidad para adsorber grandes cantidades de solventes los hace muy atractivos al momento de adsorber drogas/proteínas de interés terapéutico. [REFs] Este sistema además de poder explicar la fisicoquímica que lo envuelve, y poder responder respuestas a comportamientos observados experimentalmente [REFs] fue una introducción en la teoría molecular. La derivación de cada componente energético, la confección de los modelos moleculares así como también la escritura de los códigos forman parte de este primer capítulo. Son el puntapié para poder aplicarlo a los sistemas de micro y nano geles. La importancia de este primer capítulo también radica en el entendimiento de algunos conceptos que serán aplicados a lo largo de esta tesis. La respuesta a pH y sus cambios en ambientes confinados, el ambiente de un hidrogel, y la regulación de carga de las diferentes especies presentes en el sistema son detalladas a continuación.

2.2 Teórica 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 se usamos 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. En esta primera instancia describiremos la fisicoquímica de un film se encuentra en equilibrio con una solución acuosa, la tiene una composición definida externamente. Es decir, el pH, la concentración de sal y la concentración de adsorbatos son variables independientes.

Nuestro film que posee distintos tipos de segmentos: una unidad sensible al pH, en particular consideraremos un film polimérico compuesto por unidades ácida de ácido metacrílico (*MAA*). Este film está se encuentra en equilibrio con una solución con una temperatura, pH y concentración de sal definidas. Además vamos a considerar que en dicha solución hay un adsorbato: una proteína. El uso de una proteína modelo como adsorbato nos beneficia dado que poseen distintos tipos de aminoácidos con lo cual la descripción de la misma puede ser usada para otros adsorbatos. Considerando los aspectos anteriores es posible definir una energía libre:

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

En donde S_{mez} es la entropía de traslación (y de mezcla) de las especies libres en la solución: moléculas de agua (H_2O), y sus respectivos iones: hidronio (H_3O^+), e hidróxido (OH^-), cationes y aniones de sal y nuestra proteína modelo. Aquí, consideramos una sal monovalente, NaCl, la cual está completamente disociada en sus iones cloruro (Cl^-) y sodio (Na^+).

$S_{conf,nw}$ representa la entropía conformacional que resulta de la flexibilidad de la red de polimérica, la cual viene dada por todas las conformaciones diferentes que puede asumir la misma.

$F_{qca,net}$, es la energía química libre que describe el equilibrio entre las especies protonadas y desprotonadas de unidades funcionales (ácidas/básicas), para nuestro

film solo se consideran unidades ácidas.

De manera similar, $F_{qca,net}$ describe la protonación de residuos titulables de la proteína.

U_{elec} y U_{ste} representan, respectivamente, las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas. Las interacciones de Van der Waals son representadas en U_{VdW} .

Las expresiones explicitas 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 nuestra proteína modelo:

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

en donde $\frac{1}{k_B T}$, 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} es densidad local, a un z dado, y potencial químico estándar de la especie γ respectivamente. El subíndice γ toma en cuenta la molécula de agua y sus respectivos iones (hidronio e hidróxido), además de los iones provenientes de la sal (Na^+ y Cl^-).

El segundo término de esta ecuación corresponde a la entropía de mezcla de la proteína. $\rho_{pro}(\theta, z)$ es la densidad local de la proteína en la conformación θ . Es decir θ recorre sobre las configuraciones de la misma. Esta conformaciones incluyen rotaciones espaciales de la proteína. De este modo la densidad local media de la proteína puede expresarse como:

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

La entropía conformational que resulta de la flexibilidad de la red polimérica de nuestro film se representa en $S_{conf,nw}$, esta tiene en cuenta todas las configuraciones de un set $\{\alpha\}$.

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

en donde $P(\alpha)$ denota la probabilidad de que el film se encuentre en la configuración α .

El siguiente término de eq 2.1 describe la energía libre dada por el equilibrio ácido-base de los segmentos de MAA que componen nuestra 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 las capaz z y $z + dz$. $\mu_{MAA^-}^0$ y μ_{MAAH}^0 son los potenciales químico estandar de las especies protonadas y desprotonadas respectivamente. Además se define:

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

en el cual $\rho_i(\alpha, z)$ es el ensamble de densidad promedio local del film. El cual es una variable de entrada que cuantifica la desnidad de segmentos del film que ocupan una capa z cuando la red se encuentra en la conformación α .

El equilibrio químico de las unidades titulables de la proteína es considerada en el siguiente término de la energía libre:

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

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

Que se define como:

$$\langle \rho_{pro,\tau}(z) \rangle = A \sum_{\theta} \int dz' \rho_{pro}(\theta, z') n_{\tau}(\theta, z', z) \quad (2.8)$$

en donde $n_{\tau}(\theta, r', r)$ es un parámetro de entrada que nos da el número de segmentos τ entre las capas z and $z + dz$ cuando el centro de masa de la proteína se encuentra en el a configuración θ y en la posición z' .

Las unidades titulables pueden estar en esta protonado τ, p o desprotonado τ, d , los cuales poseen su potenciales químicos estándar $\mu_{\tau,p}^0$ y $\mu_{\tau,d}^0$ respectivamente. Además definimos el grado de asociación g_{τ} para segmento τ como:

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

en donde $f_{\tau}(r)$ es el grado de disociación de cada segmento τ .

La energía electróstatica se define como:

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

en donde $\Psi(z)$ es el potencial elestróstatico 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 de la proteína. Finalmente q_{MAA} es la carga que adquiere el segmento de MAA al desprotonarse.

En este contexto, la densidad de carga media es:

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

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 travez del siguiente restriccción:

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

en donde v_{γ} , v_{λ} y v_{MAA} son los volumenes moleculares de los segmentos γ de las especies libres, λ en la proteína y los segmentos de MAA del film respectivamente. $\langle \rho_{pro,\lambda}(z) \rangle$ es definimo de la misma forma que en la eq. 2.8. Cabe destacar que el subidice λ considera a todos los segmentos de la proteína, 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 caracter hidrofilico. 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 este punto la energía libre, eq 2.1, puede escribir como una funcional de funciones, esta ultimas están compuesta por 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 proteína, los grados de protonación/disociación y el potencial elestrostático local. Es decir:

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

en donde:

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

de forma más explicita:

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

Nuestro film esta en el equilibrio con el bulk de la solución, la cual posee una composición bien definida (pH, Temperatura, concentración salina, concentración de proteína). Estas cantidades proveen un potencial químico el cual debe estar en equilibrio con nuestro sistema polimérico. En particular estos potenciales corresponden a las especies libres, μ_{γ} , y de la proteína, μ_{pro} . De esta forma al considerar esta condición de equilibrio nuestra energía libre se convierte en un gran potencial termodinámico:

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

N_{γ} y N_{pro} son el número total de moléculas de las especies libres y la proteína respectivamente. En la última linea de la expresión eq. 2.15 se tiene en cuenta los protones asociados que provienen de las especies con segmentos titulables: protína y red polimérica respectivamente.

Adicionalmente las condiciones de equilibrio deben satisfacer la condición de incompresibilidad del sistema: eq 2.11. Esta restricción se incorpora como:

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

en donde $\Pi(z)$ es un multiplicador local de Lagrange. Este multiplicar se traduce o puede ser pensado como un potencial que define la presión osmótica local. Finalmente el potencial obtenido para nuestro sistema se escribe de forma explicita:

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

A continuación se mostrara la optimización de este gran potencial respecto de los funcionales presentados en eq. 2.13.

En particular la optimización respecto a la densidad de las especies libres, ρ_{γ} resulta en:

$$\rho_{\gamma}(z)v_w = a_{\gamma} \exp[-\beta q_{\gamma}\psi(z)] \exp[-\beta v_{\gamma}\pi(z)] \tag{2.18}$$

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

$$a_\gamma = \exp[\beta\mu_\gamma - \beta\mu_\gamma^0] \quad (2.19)$$

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, T, concentración salina) del seno de la solución.

El grado de disociación de los segmentos de *MAA* viene dado por:

$$\frac{f(z)}{1-f(z)} = \frac{K_a^0}{a_{H^+}} \exp[-\beta q_{MAA}\psi(z)] \quad (2.20)$$

en donde se define la constante termodinámica del equilibrio ácido-base para los segmentos de *MAA* como:

$$K_{a,MAA}^0 = \exp[-\beta\mu_{MAAH}^0 - \beta\mu_{MAA^-}^0 - \beta\mu_{H^+}^0] \quad (2.21)$$

Del mismo modo el grado de disociación de los segmentos titulables τ :

$$\frac{f_\tau(z)}{1-f_\tau(z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_\tau\psi(z)] \quad (2.22)$$

la constante termodinámica para el equilibrio de los segmentos τ se define de igual forma que en eq. 2.21. el exponente, ∓ 1 , cambia si se trata de segmentos ácidos o básicos respectivamente.

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

$$P(\alpha) = \frac{1}{Q} \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \ln f(z) \right] \\ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta q_{MAA} \psi(z) \right] \\ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta v_{MAA} \pi(z) \right] \quad (2.23)$$

en donde:

$$Q = \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \ln f(z) \right] \right\} \\ + \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta q_{MAA} \psi(z) \right] \right\} \\ + \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta v_{MAA} \pi(z) \right] \right\} \quad (2.24)$$

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

$$\sum_{\alpha} P(\alpha) = 1 \quad (2.25)$$

La densidad local de nuestra proteína en una conformación θ se deriva de la expresión:

$$\rho_{pro}(\theta, z) v_w = \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[-A \int_0^\infty dz' n_{\tau}(\theta, z, z') \ln f_{\tau}(z') \right] \\ \prod_{\lambda} \exp \left[-A \int_0^\infty dz' n_{\lambda}(\theta, z, z') [v_{\lambda} \beta \pi(z') + q_{\lambda} \psi(z')] \right] \quad (2.26)$$

En esta expresión se ha redefinido el potencial químico estandar de la proteína y si los segmentos son de naturaleza ácida τ, a o básica τ, b :

$$\beta \tilde{\mu}_{pro}^0 = \beta \mu_{pro}^0 + \sum_{\tau,a} C_{n,\tau} \beta \mu_{\tau,d}^0 + \sum_{\tau,b} C_{n,\tau} \beta (\mu_{H^+} - \mu_{\tau,p}^0) \quad (2.27)$$

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

$$C_{n,j} = A \int_0^\infty dz n_j(\theta, z', z), \forall z' \quad (2.28)$$

resultando:

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

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

$$\epsilon \nabla^2 \Psi(z) = - \langle \rho_q(z) \rangle \quad (2.30)$$

En esta expresión en conjunto con la densidad de carga definida en eq. 2.10, nos muestra el acoplamiento local entre las interacciones físicas, la organización molecular, los grados de libertad, conformaciones y equilibrios químicos.

Para la resolución de nuestro sistema, que se encuentre en equilibrio, se han impuesto ciertas restricciones, como la incompresibilidad o equilibrio de potenciales químicos ecuaciones 2.11 y 2.15 respectivamente. Otra restricción que se impone es la electroneutralidad de la solución:

$$\int_0^\infty dz \langle \rho_q(z) \rangle = 0 \quad (2.31)$$

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

$$\begin{aligned} i) \lim_{z \rightarrow \infty} \psi(z) &= 0 \\ ii) \left. \frac{d\psi(z)}{dr} \right|_{z=0} &= 0 \end{aligned} \tag{2.32}$$

Estas condiciones significan que el potencial electrostático se desvanece a medida que nos alejamos de nuestro film polimérico, y que el medio dielectrico en el cual se encuentra el film se extiende desde su superficie de soporte, respectivamente.

En este punto hemos mostrados las expresiones que optimizan a nuestro gran potencial, y cómo cada uno de estos funcionales: $P(\alpha)$, $\rho_\gamma(z)$, $\rho_{pro}(z)$, $f_\tau(z)$, $f(z)$, $\psi(z)$ a su vez terminan siendo definidos por dos potenciales locales: Electrostático $\psi(z)$ y Presión osmótica $\pi(z)$. Como primera conclusión de esta teoría es que es posible calcular y describir la termodinámica del sistema dadas las condiciones de laboratorio: pH, concentración de sal y adsorbatos, temperatura. Utilizando y resolviendo las ecuaciones de incompresibilidad y de electroneutralidad, además de otros parámetros de entrada: volúmenes moleculares, cargas y constantes de disociación. así como la distintas conformación que pueden adquirir cada elemento del sistema, es decir la distribución espacial de cada segmento cada una conformación. Estas parámetros de entrada son provisto al código mediante el uso de un modelo molecular.

La forma de obtener estas variables desconocidas, $\psi(z)$ y $\pi(z)$ es realizando una solución numérica por sustitución en la diferentes ecuaciones en las que interactuan: la densidad de las especies libres eq. 2.18, los grados de disociación de los segmentos del film y de los segmentos titulables de la proteína ecuaciones 2.20 y 2.22 respectivamente, la probabilidad de las conformaciones de la red polimérica ecu. 2.23 y la densidad local de la proteína ecu. 2.26.

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.

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

$$\langle \phi_{pro}(z) \rangle = A \int_0^{\infty} dz' \sum_{\theta} \rho(\theta, z') \sum_{\lambda} n_{\lambda}(\theta, z', z) v_{\lambda} \quad (2.33)$$

Con esta cantidad es posible cuantificar la adsorción de la proteína en el film.

2.3 Solución Bulk

Como mencionamos en la sección anterior, el potencial usado es un potencial gran canonico el cual proviene de un ensamble gran canonico, en el cual el sistema de estudio esta en equilibrio con un “baño térmico”. Traducido a nuestro trabajo significa que el film y sus alrededores se encuentran en constante equilibrio con el bulk de la solución en la que estan bien definidas las variables como pH, temperatura y concentración de sal y/o proteína. Dadas estas condiciones la resolución del bulk de la solución es indispensable para llevar a cabo nuestras simulaciones. Las soluciones nos proporcionan la información de las actividades de las especies mobiles, y con ella sus potenciales químicos. Información que como vimo anteriormente es necesaria para la resolución de las ecuaciones de incompresibilidad y de Poisson.

El procedimiento teórico es en esencia el mismo: escritura de la energía libre (y su respectivo potencial) y minimización respecto de las funcionales que lo componen.

De esta forma el potencial dado por el bulk de la solución se escribe:

$$\begin{aligned}
\beta \frac{\Phi^b}{V} = & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b (\ln (\rho_{\gamma}^b v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
& + \sum_{\theta} \rho_{pro}^b(\theta) (\ln (\rho_{pro}^b(\theta)) - 1 + \beta \mu_{pro}^0) \\
& + \sum_{\tau} \langle \rho_{pro,\tau}^b \rangle [g_{\tau}^b (\ln g_{\tau}^b + \beta \mu_{\tau p}^0) + (1 - g_{\tau}^b) (\ln (1 - g_{\tau}^b) + \beta \mu_{\tau d}^0)] \\
& + \left[\left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}^b \langle \rho_{pro,\tau}^b \rangle q_{\tau} \right) \beta \psi^b - \frac{1}{2} \beta \epsilon (\nabla \psi^b)^2 \right] \\
& + \beta \pi^b \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}^b \rangle v_{\lambda} - 1 \right] \\
& - \sum_{\gamma} (\beta \mu_{\gamma} \rho_{\gamma}^b - \beta \mu_{pro} \langle \rho_{pro}^b \rangle) - \beta \mu_{H^+} \left(\sum_{\tau} \langle \rho_{pro,\tau}^b \rangle g_{\tau} \right)
\end{aligned} \tag{2.34}$$

en donde El superídice b denota el Bulk de la solución. Los ensambles, expresiones entre brackets ($\langle \rho \rangle$)se definen de la misma forma que en la sección anterior. Teniendo las salvedades que no hay dependencia sobre la coordenada z :

$$\langle \rho_{pro}^b \rangle = \sum_{\theta} \rho_{pro}^b(\theta) \tag{2.35}$$

Además se ha considerado las condiciones a $z \rightarrow \infty$:

$$\begin{aligned}
i) \rho_i^b &= \rho_i z \rightarrow \infty \\
ii) \pi^b &= \pi(z \rightarrow \infty) \\
iii) g_{\tau}^b &= g_{\tau}(z \rightarrow \infty)
\end{aligned} \tag{2.36}$$

en donde i hace referencia a las especies libres y la proteína.

en consecuencia para las especies libres γ resulta:

$$\rho_{\gamma}^b v_w = a_{\gamma} \exp [-\beta q_{\gamma} \psi^b - \beta \pi^b v_{\gamma}] \tag{2.37}$$

El grado de disociación de los segmentos τ titulables de la proteína:

$$\frac{f_\tau^b}{1 - f_\tau^b} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,\tau}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_\tau \psi^b] \quad (2.38)$$

finalmente para la densidad de proteína se obtiene:

$$\rho_{pro}(\theta) v_w = \tilde{a}_{pro} \prod_\tau \exp [-cn_\tau \ln f_\tau^b] \prod_\lambda \exp [-cn_\lambda (v_\lambda \beta \pi^b + q_\lambda \psi^b)] \quad (2.39)$$

en donde \tilde{a}_{pro} y cn_τ (y cn_λ) son definidos en las ecuaciones 2.29 y 2.28 respectivamente.

Podemos observar nuevamente que nuestros funcionales quedan en función, valga la redundancia, por la presión osmótica π^b y el potencial electrostático ψ^b . Sin embargo si consideramo las condiciones de contorno dada en la ec. 2.32 para la ecuación de Poisson, vemos que en la solución bulk se debe cumplir: $\psi^b = 0$.

Esto nos muestra que para nuestro baño térmico la principal incógnita es la presión osmótica: π^b . La cual es posible obtenerla por resolución numérica al sustituir las ecuaciones 2.37 , 2.39 y sus respectivas actividades (ecuaciones 2.41 y 2.42) en la nueva condición de incompresibilidad dada por:

$$\sum_\gamma \rho_\gamma^b v_\gamma + \sum_\lambda \langle \rho_{pro,\lambda}^b \rangle v_\lambda = 1 \quad (2.40)$$

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:

$$a_\gamma = \frac{\rho_\gamma^b v_w}{\exp [-\beta \pi^b v_\gamma - \beta q_\gamma \psi^b]} \quad (2.41)$$

y para la proteína:

$$\begin{aligned}\tilde{a}_{pro} = & \rho_{pro}(\theta) v_w \exp [cn_\tau \ln f_\tau^b] \\ & \exp [cn_\lambda (v_\lambda \beta \pi^b + q_\lambda \psi^b)]\end{aligned}\quad (2.42)$$

Hay que tener en cuenta que las densidades en el bulk de la solución son parámetro de entrada en cada cálculo. Una vez que se establecen el pH, la concentración de sal y la concentración de nuestra proteína, estas densidades se determinan completamente (usando la electroneutralidad de la solución del bulk y la autodisociación de equilibrio del agua).

2.4 Resultados

Los hidrogeles (geles poliméricos en general) compuestos por cadenas de protonables son sensibles a los cambios de pH. Esta respuesta se debe al equilibrio químico de protonación/desprotonación de las unidades ácidas o básicas que componen la red. Cuando se varía el pH del entorno en el que se encuentra el gel, se producen cambios en la carga eléctrica de las unidades titulables, lo que a su vez afecta las propiedades del material.

Para comprender en detalle el funcionamiento de esta respuesta, es necesario recordar algunos conceptos fundamentales sobre el comportamiento ácido/base de las moléculas bajo condiciones ideales. El pH, que representa la concentración de iones de hidrógeno en una solución, desempeña un papel crucial en la protonación/desprotonación de los grupos titulables presentes en el gel. En condiciones ácidas, los grupos ácidos se protonan, lo que lleva a un aumento en la carga eléctrica y una mayor retención de agua por parte del gel. Por otro lado, en condiciones alcalinas, los grupos ácidos se desprotonan, disminuyendo la carga eléctrica y resultando en una disminución en la capacidad de retención de agua. Este efecto es el contrario cuando los monómeros son básicos y el pH del medio es alcalino.

Estos conceptos sobre el comportamiento ácido/base son fundamentales para comprender el equilibrio que ocurre cuando los monómeros se confinan en una red polimérica. Al introducir los monómeros ácidos en la red, se establece un equilibrio dinámico entre las formas protonadas y desprotonadas de los grupos proton-

ables. Este equilibrio depende tanto del pH del entorno como de las características intrísecas de los monómeros y la red polimérica. Al comprender y controlar este equilibrio, es posible modular las propiedades físicas y químicas del gel, como su capacidad de hinchamiento, solubilidad, y liberación de fármacos.

Estos principios serán utilizados en los sistemas de estudio que se explorarán en los próximos capítulos, donde se investigará la respuesta de geles poliméricos a diferentes estímulos, incluyendo pH, temperatura y fuerzas externas. El estudio de estos sistemas sensibles permitirá avanzar en el diseño y desarrollo de materiales inteligentes con aplicaciones en campos como la medicina, la bioingeniería y la ciencia de materiales.

2.4.1 Respuesta al pH

Si consideramos una solución diluida de moléculas titulables, estas pueden exhibir dos estados posibles: protonado o desprotonado. En este sentido, se define el grado de disociación, f , el cual proporciona la fracción de moléculas que se encuentran en estado desprotonado:

$$f = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (2.43)$$

Para las moléculas ácidas, su estado protonado no posee carga y es neutro, mientras que su estado desprotonado posee carga. Además, el grado de disociación también nos indica el grado de carga de estas moléculas, f_c . En el caso de moléculas básicas, su estado de carga es contrario al de las moléculas ácidas, por lo tanto, el grado de carga viene dado por: $f_c = 1 - f$

En soluciones diluidas, el grado de disociación f (y el de carga f_c) son completamente determinados por el pH de la solución y el pK_a intrínseco del par ácido/base. Cuando el $pH = pK_a$, la mitad de los grupos titulables se encuentran disociados ($f = 0.5$). Para valores de pH de $1, \pm$ corresponden a estados con un 90% y 10% de disociación, respectivamente. Es decir, cuando el pH se encuentra cerca del pK_a , la transición del 10% al 90% de desprotonación ocurre dentro de dos unidades de pH de la solución ideal. Estas consideraciones de solución ideal se utilizan comúnmente para estimar el grado de carga de las unidades ácidas dentro de cadenas poliméricas.

Sin embargo, este comportamiento es diferente para sistemas en confinamiento. Las unidades protonables que forman parte de una red polimérica son un ejemplo de ello, lo cual modifica significativamente su comportamiento de protonación.

A continuación, describiremos el comportamiento de estos sistemas confinados, es decir, hidrogeles sensibles al pH, haciendo uso de la teoría planteada anteriormente. A diferencia de las soluciones diluidas, las unidades ácidas en una red de polímeros experimentan repulsiones electrostáticas cuando están cargadas. Esto conduce a una disminución significativa en la disociación de estos grupos en comparación con las condiciones ideales, con el objetivo de reducir la fuerza de las repulsiones dentro de la red polimérica.

La figura 2.1 ilustra este comportamiento y muestra el grado medio de carga de los segmentos de un film compuesto por una red de cadenas de ácido polimetacrílico (PMAA) en contacto con soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal.

A un pH dado, es significativamente menos probable que una unidad ácida de la red polimérica se cargue en comparación con las consideraciones ideales. La concentración de sal en la solución resulta ser una variable crítica que modula este comportamiento de regulación de carga.

A una salinidad relativamente alta, la cantidad de contraiones dentro del film aumenta, lo que resulta en el apantallamiento de las interacciones electrostáticas. Estas interacciones se vuelven de corto alcance. Este apantallamiento de repulsiones dentro de la red permite que el polímero aumente su grado de carga. En esta observación inicial, vemos que un aumento en la salinidad genera una protonación que se aproxima al comportamiento ideal.

En condiciones de baja concentración de sal, solo hay suficientes contraiones dentro de la red para neutralizar la carga eléctrica del polímero. Bajo estas condiciones, el efecto de apantallamiento de los iones de sal se debilita y las interacciones electrostáticas efectivamente tienen un mayor alcance. Como resultado, la red se carga menos para prevenir o reducir las repulsiones dentro de la red.

En la figura 2.1, se observa que el grado de carga de los films poliméricos difiere del comportamiento de los monómeros aislados. Esto nos lleva a pensar que las condiciones en este entorno son diferentes a las que se esperarían en la solución. Existe una regulación de carga, lo que sugiere una regulación del pH.

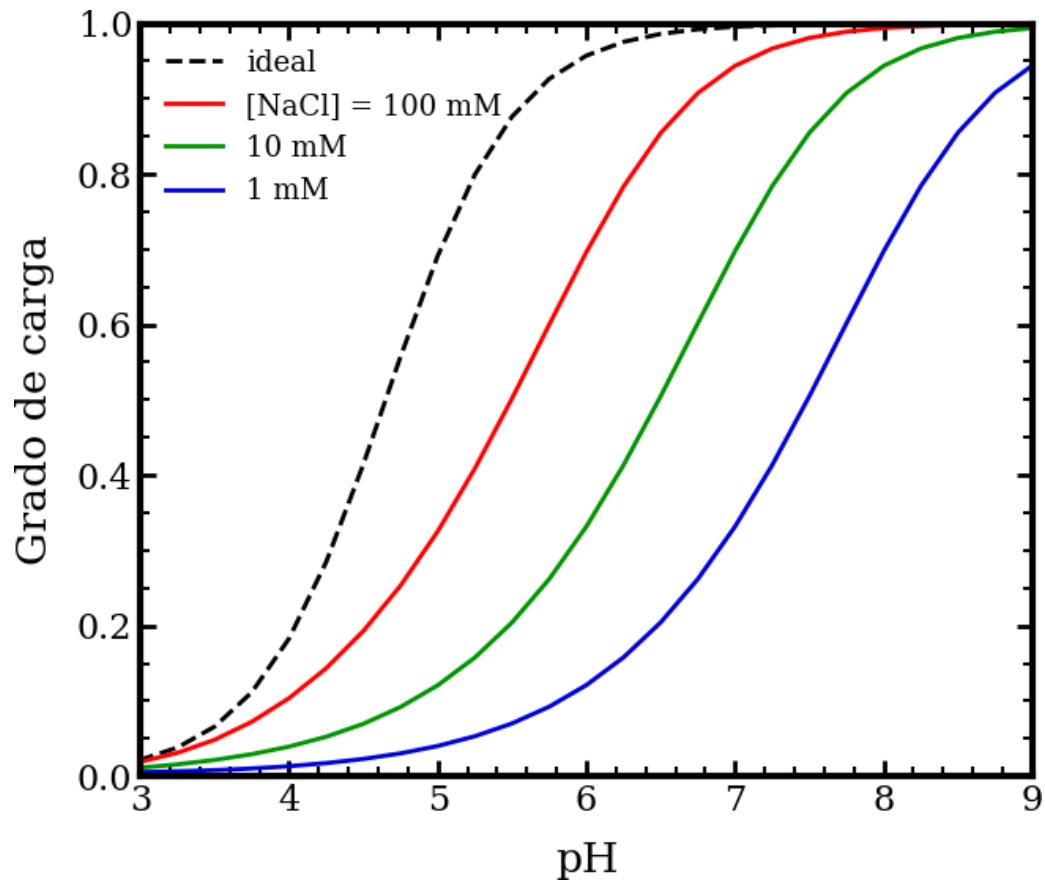


Figura 2.1: Grado de carga del gel como función del pH. Grado de carga para un monomero aislado en presentado en curva a rayas, se compara para diferentes concentraciones de sal, a mayor concentración salina más nos acercamos al sistema ideal.

Definimos así el pH local, que nos proporciona la concentración de protones en una posición espacial z

$$pH(z) = -\log_{10}(H^+) \quad (2.44)$$

Una baja disociación (un alto nivel de protonación) de las unidades ácidas de las unidades de MAA en nuestra red polimérica puede explicarse en términos del pH local dentro del material. Definimos el pH del gel (pH_{gel}) como el promedio del pH local dentro del film. Resultados previos han mostrado que esta cantidad está bien definida [78].

Enfatizamos la importancia de estos dos términos, pH_{gel} y $pH(z)$, por la información que proporcionan: el estado de carga/protonación de las unidades titulables en la red polimérica.

Haciendo uso de la ecuación 2.43, es posible calcular el grado de disociación de la estructura polimérica de nuestro hidrogel. El uso de pH_{gel} es indispensable en condiciones en las que el pH difiere del pH de la solución . El mismo procedimiento se realiza para calcular el estado de protonación local de las unidades titulables de las especies que se adsorben en el film (ver figura 2.2).

Sin embargo, aunque esto parece simplificar el problema de establecer la carga neta de cualquier especie del sistema, en nuestro caso la red polimérica y las proteínas adsorbidas, determinar los cambios en el pH local tiene la misma complejidad que el problema original (es decir, la de determinar la carga del film). El pH local que se establece dentro del material, así como su valor en la interfaz entre el film polimérico y la solución acuosa, es el resultado de la compleja interacción entre la organización molecular, los equilibrios químicos y las interacciones físicas que determinan el equilibrio termodinámico en las condiciones impuestas externamente (pH, concentración de sal). Todas las variables expuestas se describen en la sección 2.2.

Para ejemplificar cómo varí el pH en relación con el pH y la concentración salina dada en el bulk de la solución, se puede observar la figura 2.3, que muestra el pH dentro de nuestro film de cadenas de PMAA PMAA como función del pH. Cada curva hace referencia a una concentración de sal diferente. Se agrega, a rayas, el comportamiento “ideal” en el que el pH del bulk es igual al pH local, en particular

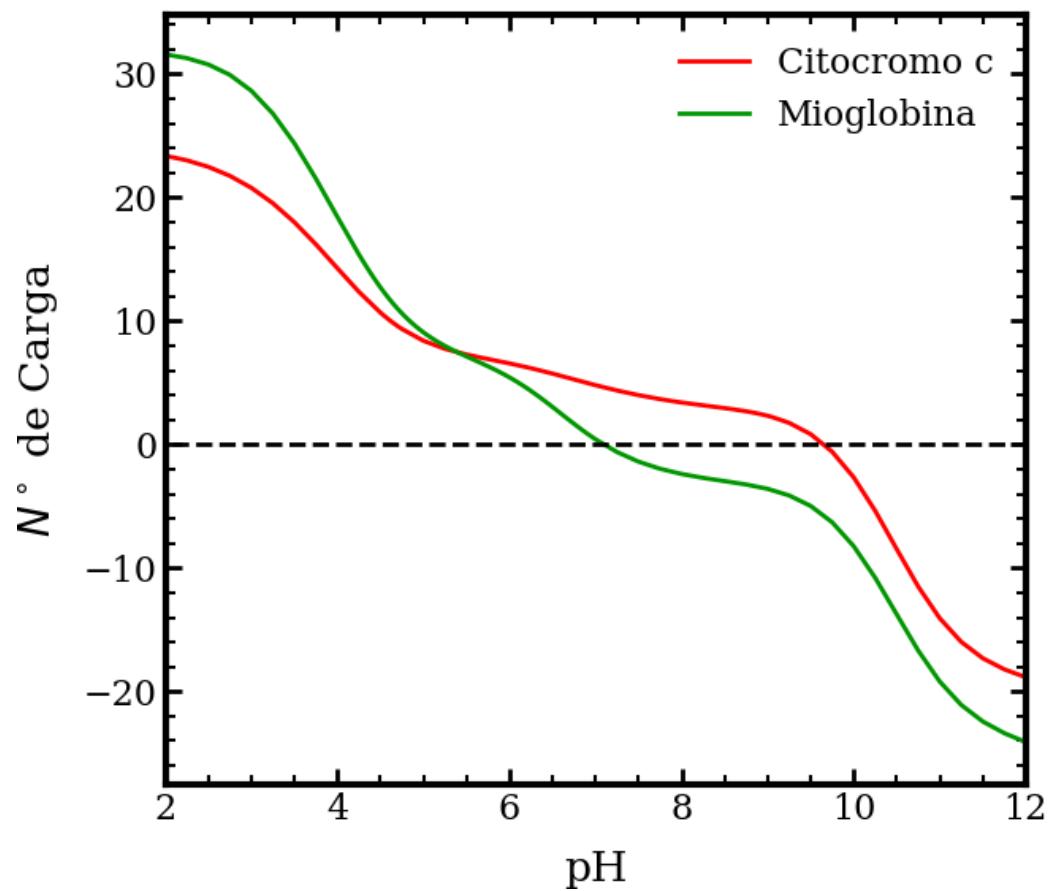


Figura 2.2: Número de carga de las proteínas cytocromo c y myoglobina como función del pH en el seno de la solución (bulk). La línea a trazos muestra el cambio en el signo de la carga.

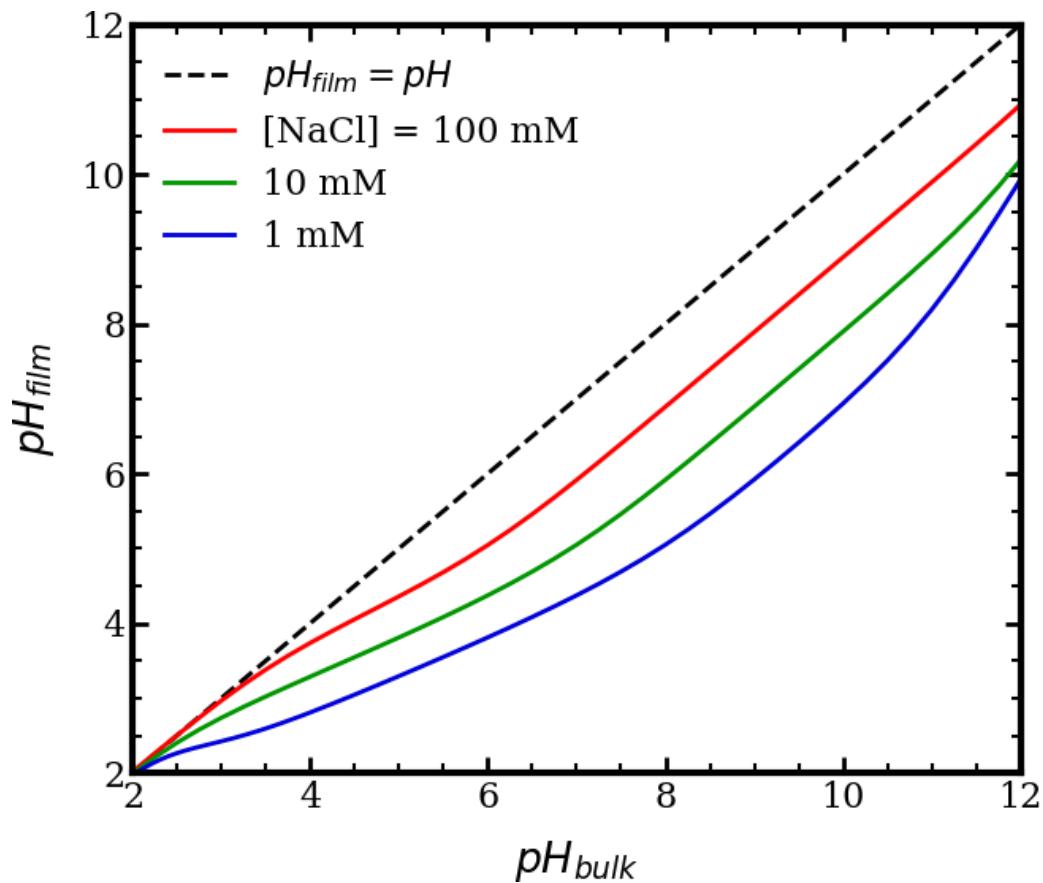


Figura 2.3: pH local del gel como función del pH en el seno de la solución (bulk). Cada curva corresponde a una concentración de sal diferente.

al del film, calculado usando teoría molecular.

2.4.2 Adsorción

El uso estos sistemas de hidrogeles como transportadores de adsorbatos de utilidad terapéutica, involucra el poder cuantificar y cualificar esta adsorción.

Para ello nos valdremos de la teoría molecular ya expuesta y haciendo uso de ciertas proteínas modelo como lo son el citocromo c y la mioglobina. El uso de estas dos proteínas presentan gran estabilidad en un amplio rango de pH, y contar con estudios experimentales en sistemas poliméricos similares.

El uso de hidrogeles como transportadores de adsorbatos con fines terapéuticos ha

despertado un gran interés en la comunidad científica. Sin embargo, para aprovechar al máximo su potencial, es fundamental poder cuantificar y cualificar la adsorción de moléculas y proteínas en estos sistemas.

En este sentido, recurrimos a la teoría molecular previamente expuesta, la cual nos brinda herramientas para comprender y predecir la interacción entre las proteínas y el hidrogel polimérico. Para estos modelos teóricos, seleccionamos proteínas modelo con estabilidad en un amplio rango de pH, como el citocromo c y la mioglobina. Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en sistemas poliméricos similares, lo que nos permite aprovechar la experiencia acumulada de estas investigaciones previas.

Para cuantificar la cantidad de proteína adsorbida en el film de hidrogel, empleamos la siguiente expresión:

$$\Gamma_{\text{pro}} = \int_0^{\infty} dz (\rho_{\text{pro}}(z) - \rho_{\text{pro}}^b) \quad (2.45)$$

En donde $\rho_{\text{pro}}(z)$ y ρ_{pro}^b son las densidades locales y en el bulk de la solución de la proteína, respectivamente. Γ_{pro} proporciona la cantidad de adsorbato por unidad de área en exceso dentro del material, recibiendo también contribuciones de la interfaz de solución de polímero.

Para estas proteínas, la adsorción es una función no monótona del pH de la solución (ver Figura 2.4). A pH bajo, estas proteínas tienen una carga alta y positiva, pero la red de poliácidos (*PMAA*) solo está débilmente ionizada (véanse las Figuras 2.1 y 2.2). A un pH suficientemente alto, por otro lado, el polímero está fuertemente cargado negativamente, pero las proteínas tienen una carga débilmente positiva o incluso negativa. Bajo tales condiciones (muy) ácidas o alcalinas, las interacciones electrostáticas son débilmente atractivas o repulsivas, respectivamente. No hay fuerza impulsora para la adsorción. A valores de pH intermedios, por el contrario, donde tanto la proteína como la red polimérica tienen cargas fuertes y opuestas, se produce una adsorción significativa con un máximo necesario en tales condiciones.

La adsorción de proteínas depende críticamente de la concentración de sal de la solución. Este comportamiento se ilustra en la figura 2.4, que muestra la adsorción de citocromo c y mioglobina en un film compuesto por cadenas poliméricas de *PMAA*.

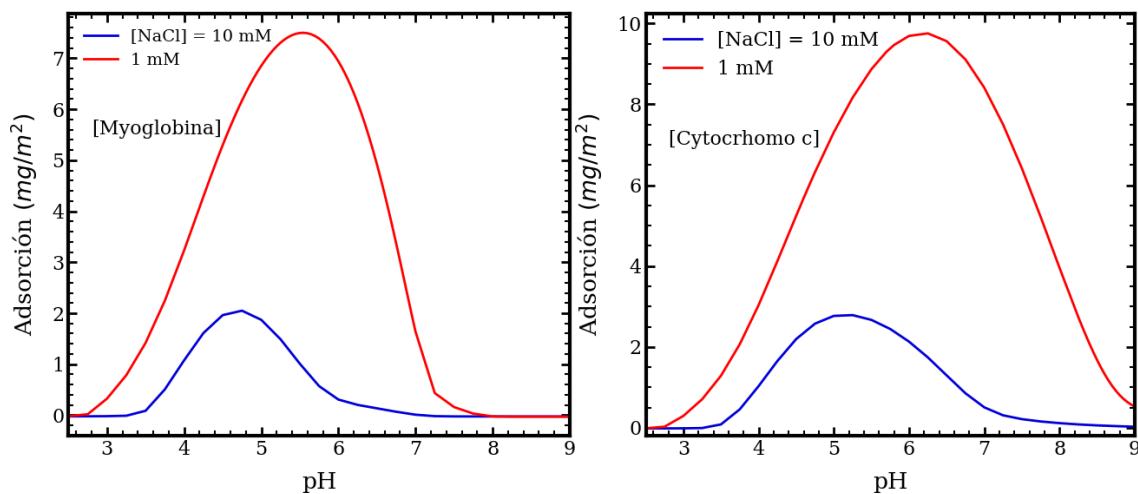


Figura 2.4: Adsorción de proteínas: citocromo c y myoglobina en panel A y B respectivamente. La concentración de los adsorbatos es $10\mu M$

La disminución de las concentraciones de sal mejora la adsorción y amplía el rango de pH de la adsorción. Por ejemplo, ambos paneles de la figura 2.4 muestran una disminución de aproximadamente un orden de magnitud en la adsorción cuando se comparan soluciones de NaCl 1 mM y 10 mM. El pH de máxima adsorción también depende de la salinidad de la solución. Este comportamiento es aún más interesante cuando se considera que una concentración de sal más baja conduce a una red con carga más débil, como describimos anteriormente, fig. 2.1. En otras palabras, a medida que disminuye la concentración de sal, más proteína es adsorbida. Esta última afirmación es cierta en las concentraciones de proteína ($10\mu M$) y sal de la figura 2.4, donde la adsorción solo modifica ligeramente el grado de carga de la red.

Esta dependencia de la adsorción de la concentración de sal tiene tres razones principales: en primer lugar, existe el apantallamiento de las atracciones electrostáticas de la red hacia las proteínas por parte de los iones de sal. Cuanto menor sea la concentración de sal, más débil será el apantallamiento de las interacciones proteína-red, lo que mejora la adsorción.

2.5 Conclusiones

Los hidrogeles de poliméricos sensibles al pH son prometedores candidatos para biomateriales inteligentes y responsivos, lo cual impone la necesidad de comprender su compleja interacción fisicoquímica con las proteínas. Las simulaciones moleculares pueden proporcionar información perspicaz para comprender los mecanismos detrás de la adsorción de proteínas en geles sensibles al pH, lo cual puede ser difícil o imposible de obtener mediante experimentos. En este capítulo se ha tratado de entender y explicar el estado de protonación de la red polimérica de los filmes de hidrogel y el de los diferentes residuos de aminoácidos de las proteínas afectan o modulan su interacción. Hemos demostrado que un comportamiento rico emerge de la capacidad de la proteína para regular su carga eléctrica en el entorno de pH más bajo que ocurre dentro del material. Este comportamiento se puede utilizar para la separación o localización de proteínas dentro de regiones espaciales de tamaño nanométrico dentro del material. Imaginamos, por ejemplo, el desarrollo de materiales multifuncionales basados en hidrogel donde diferentes proteínas son activas en diferentes regiones de la red polimérica. Exploraremos teóricamente estos conceptos en los próximos capítulos cuando los trasladados a los microgeles y nanogels capítulos 3 y 4 respectivamente.

Chapter 3

Geles poliméricos

3.1 Introducción/Motivación

Como hemos mencionado en la introducción de este tesis los micro-nanogeles poliméricos son sistemas poliméricos que presentan una estructura tridimensional en forma de red. Estos geles se forman mediante la reticulación de polímeros (o copolímeros), lo que da lugar a una matriz de polímero tridimensional que puede retener grandes cantidades de agua o solventes. Estos sistemas representan una plataforma versátil y prometedora para diversas aplicaciones biomédicas. Su capacidad para retener agua y solventes, su tamaño nanométrico y su capacidad de funcionalización los convierten en sistemas atractivos para la entrega de fármacos. Este sistema de delivery requiere el entendimiento de la fisicoquímica que engloba todo el proceso. Desde el proceso de encapsulado hasta posibles mecanismos de liberación en los lugares deseados. Con esto nos referimos a entender qué tipo de interacciones existen y predominan y hacen que el proceso se lleve a cabo.

En este capítulo mostramos el desarrollo de una teoría de equilibrio de dos fases y realizamos una investigación sistemática del comportamiento termodinámico de microgeles compuestos de copolímeros aleatorios de NIPAm y un comonomero ácido (MAA). Este modelo describe la química física detrás de todos los fenómenos de hinchamiento del microgel impulsado por el pH, la dependencia no monotónica del tamaño de partícula de la concentración de sal y el colapso de la red al aumentar la temperatura por encima del VPTT. Las predicciones que mostramos brindan 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 el VPT. También investigamos las mejores condiciones para la encapsulación de doxorubicina y daunorrubicina dentro de estos microgeles. Los cálculos acá mostrados son específicos para el ácido metacrílico con $pKa = 4,65$, pero el comportamiento fisicoquímico informado puede describir cualitativamente una variedad de microgeles basados en NIPAm que se han modificado con otros monómeros ácidos que tienen diferente pka y diferente solubilidad a pH bajo.

El nivel de teoría usado en este capítulo corresponde a un sistema de dos fases, del tipo Donnan [95], en el cual la fase polimérica es considera homogenea. La fase solución con la que se encuentra en contacto contiene los iones y adsorbatos los cuales pueden permear en la fase polimérica. En cambio nuestro gel no puede pasar a la fase solución. El sistema termodinamicamente hablando corresponde a un sistema semi-gran canonico que incluye todas los terminos energeticos necesarios para una descripción detallada del mismo. En las siguientes secciones se hará reseña sobre las ecuaciones que describen la fisicoquímica del sistema. La descripción se hará para cada una de las fases. En una tercera parte se mostrará como se ve modificada el potencial termodinámico del sistema cuando se consideran adsorbatos. Los adsorbatos elegidos corresponden a dos drogas Doxorubicina y Daunorubicina. La elección de estas drogas debido a su alto uso en terapias anticancerigenas. Las mismas cuentan con estudios experimentales en microgeles de poli(NIPAm-co-MAA) para la encapsulación/liberación de estos fármacos. [REFs: drogas] Se hará enfasis en la optimización para su encapsulado en estos geles polimericos.

3.1.1 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, lo que da como resultado que el microgel tenga un radio R y 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 potencial

semi gran canónico, 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 (mezcla) de las especies libres en la fase de microgel: moléculas de agua (w), hidronio (H_3O^+) e iones de hidróxido (OH^-), y cationes de sal (+) y aniones (-). Hemos considerado una sal monovalente, KCl , completamente disociada en iones de potasio y cloruro.

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

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

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

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

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

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

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

Esta expresión se describe en [89] y proviene del modelo de elasticidad del caucho, donde N_{seg} es el número total de segmentos en la red de polímero y n_{ch} es el número de segmentos por cadena de polímero o *longitud de cadena*. La constante de elasticidad en esta energía es proporcional al cociente $\frac{N_{seg}}{n_{ch}}$, que representa el número (total) de cadenas de polímero en el microgel. El radio del microgel seco es R_0 , lo que satisface con la expresión:

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

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

U_{elec} y U_{ste} representan respectivamente 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 los segmentos MAA, respectivamente. El potencial electrostático dentro de la fase de microgel es ψ_{MG} . Fuera de esta fase el potencial es nulo $\psi_s = 0$

En donde se impone una restricción de electroneutralidad del microgel, que

puede expresarse como:

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

Las interacciones stericas se incorporan como una segunda restricción al sistema, la cual consiste en que el volumen del microgel está completamente ocupado por los segmentos de la red y las especies quícas 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-disolvente; para este trabajo hemos 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 NIPAm 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. [4], este parámetro de Flory-Huggins se puede expresar como:

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

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 $g_{k1} \equiv 0$ [4]

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 potencial semi-gran canónico 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 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, $N_{H_3O^+} + N_{MAAH} = V \left(\rho_{H_3O^+} + (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \right)$.

La forma explícita del potencial termodinámico es:

$$\begin{aligned}
& \beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = \\
& \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
& + \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA}^0) \\
& \quad + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \\
& + \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch} V} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \\
& + \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi_{MG} \\
& + \beta \pi_{MG} \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} - 1 \right] \\
& + \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \\
& - \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} - \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}}
\end{aligned} \tag{3.16}$$

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, ec. 3.8.

Nuestro potencial termodinámico esta explicitamente 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 ec. 3.8 y ec. 3.7; dicho procedimiento conduce a:

$$\rho_{\gamma} v_w = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_{MG} v_{\gamma} - \beta \psi_{MG} q_{\gamma}) \tag{3.17}$$

$$\frac{f}{1-f} = \frac{K_{MAA}^0}{a_{H^+}} \exp(-\beta \psi_{MG} q_{MAA}) \tag{3.18}$$

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 las especies desprotonadas).

termodinámico que describe la protonación/desprotonación MAA es

$$K_{MAA}^0 = e^{\beta\mu_{MAAH}^0 - \beta\mu_{MAA}^0 - \beta\mu_{H^+}^0} \quad (3.19)$$

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 electroneutralidad de la fase de microgel, ec. 3.8 y ec. 3.7, respectivamente. Para resolver estas ecuaciones utilizamos un método híbrido de Powell sin jacobiano y un código FORTRAN desarrollado internamente. En resumen, es posible calcular la variación de energía potencial respecto 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 3.1.3.

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.

3.1.2 Fase solución

En la solución, el potencial termodinámico es:

$$\begin{aligned} \beta \frac{\Omega_s}{V} = & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s (\ln(\rho_{\gamma}^s v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0 - \beta \mu_{\gamma}) \\ & + \beta \pi_s \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} - 1 \right] \end{aligned} \quad (3.20)$$

el subíndice s indica las densidades en la fase solución. Al escribir la ec. 3.20, 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 última línea de la ecuación 3.20 se ha incorporado la restricción para la incompresibilidad del sistema, 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 como de neutralidad de carga:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s v_{\gamma} = 1 \quad (3.21)$$

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s q_{\gamma} = 0 \quad (3.22)$$

con

$$\rho_{\gamma}^s v_w = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_s v_{\gamma}) \quad (3.23)$$

para $\gamma \in \{w, H_3O^+, OH^-, +, -\}$, donde π_s es la presión osmótica de la fase de solución introducida como un multiplicador de Lagrange por la ecuación 3.21. Al conocer π_s , 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.

3.1.3 Minimización gráfica

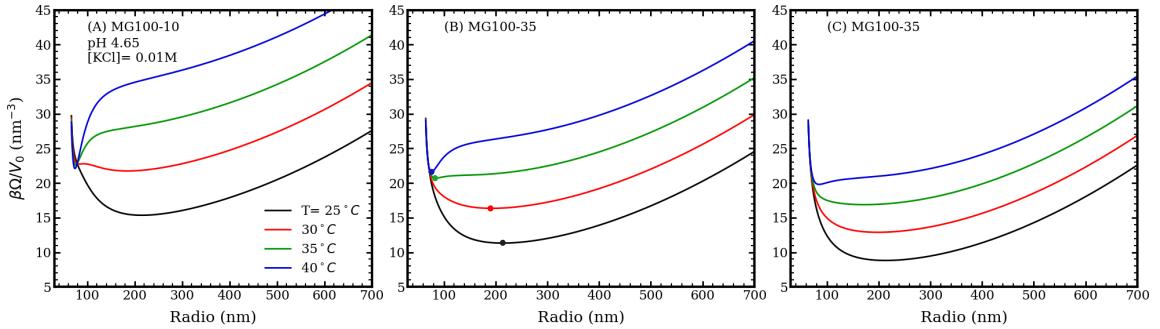


Figura 3.1: Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, $pH 4.65$ y $cs = 10^{-2} M$. Cada panel corresponde a un microgel MG100 diferente (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) con 10% (A), 35% (B) y 50% (C) MAA. Las curvas presentan el potencial termodinámico en exceso de la contribución de la solución, $\Omega = \Omega_{MG} - \Omega_s$, en algunas 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 local/global de la curva correspondiente (ver tabla 3.2).

Como mencionamos en la sección 3.1.1 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 esta primera instancia evaluamos el efecto de aumentar o reducir la cantidad de monómero ácido con respecto a los microgeles de poli(NIPAm-*co*-MAA) que tienen 35% MAA.

Estos microgeles están etiquetados como $\text{MG}n_{ch}\text{-}p_{MAA}$, 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 del mismo. Para cada conjunto de condiciones

(pH, sal y T), obtenemos la energía $\Omega(R) = \Omega_{MG}(R) - \Omega_s(R)$. En esta expresión obtenemos el potencial termodinámico en exceso de la contribución energética de la solución. Con ella podemos encontrar el R_{opt} , siendo este el radio óptimo, tal que la curva tenga un mínimo local (y global). Como ejemplo, este procedimiento se ilustra en la figura 3.1 para microgeles MG100. Los resultados obtenidos de la minimización de las curvas figura 3.1 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 3.1. Esta tabla resume los radios óptimos de tres microgeles MG100 a diferentes temperaturas, $pH\ 4.65$ y $[KCl] = 10^{-2}M$.

3.1.4 Adsorción de drogas

Nuestro objetivo es poder utilizar estos microgeles como dispositivos inteligentes, entre los que se destaca su uso como trasnportadores de medicamentos. Para ello es necesario analizar su factibilidad de su adsorción de algunas drogas terapeúticas. En el presente capítulo realizamos el análisis usando como droga modelo a la Doxorubicina y un derivado de ella: Daunorubicina. Ambas drogas muy fuertemente empleadas en tratamientos anticancerígenos.

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

modinámico de la ec. 3.16 se le adicionan los siguientes términos:

$$\begin{aligned}
 \beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = & \dots \\
 & + \rho_a (\ln(\rho_a v_w) - 1 + \beta \mu_a^0) \\
 & + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} [g_{\tau} (\ln g_{\tau} + \beta \mu_{\tau,p}^0) \\
 & \quad + (1 - g_{\tau}) (\ln(1 - g_{\tau}) + \beta \mu_{\tau,d}^0)] \\
 & + \left(\rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} \right) \beta \psi_{MG} \\
 & - \rho_a \beta \mu_a - \beta \mu_{H^+} \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} g_{\tau}
 \end{aligned} \tag{3.24}$$

en donde 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:

$$K_{a,\tau}^0 = e^{\beta \mu_{\tau,p}^0 - \beta \mu_{\tau,d}^0 - \beta \mu_{H^+}^0} \tag{3.25}$$

La siguiente línea en la ec. 3.24 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 ec. 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 ec. 3.20, que contienen los mismos componentes que ec. 3.24.

De estas últimas dos ecuaciones se puede reescribir como:

Para la fase gel:

$$\begin{aligned}
& \beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = \\
& \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
& + \rho_a (\ln(\rho_a v_w) - 1 + \beta \mu_a^0) \\
& + \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA}^0) \\
& + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \\
& + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} [g_{\tau} (\ln g_{\tau} + \beta \mu_{\tau,p}^0) \\
& + (1-g_{\tau})(\ln(1-g_{\tau}) + \beta \mu_{\tau,d}^0)] \quad (3.26) \\
& + \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch} V} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right] \\
& + \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} \right) \beta \psi_{MG} \\
& + \beta \pi_{MG} \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} - 1 \right] \\
& + \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \\
& - \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} - \rho_a \beta \mu_a - \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} - \beta \mu_{H^+} \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} g_{\tau}
\end{aligned}$$

En las cuales las nuevas restricciones para la fase gel son:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} \quad (3.27)$$

y

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} = 0 \quad (3.28)$$

Para la fase solución:

$$\begin{aligned} \beta \frac{\Omega_s}{V} = & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s (\ln(\rho_{\gamma}^s v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0 - \beta \mu_{\gamma}) \\ & + \rho_a^s (\ln \rho_a^s v_w - 1 + \beta \mu_a^0 - \beta \mu_a) \end{aligned} \quad (3.29)$$

y sus respectivas restricciones:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} \quad (3.30)$$

y

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} = 0 \quad (3.31)$$

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

$$\frac{f_{\tau}}{1 - f_{\tau}} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{\tau}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta \psi_{MG} q_{\tau}} \quad (3.32)$$

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:

$$\begin{aligned} \rho_a v_w = & \frac{\tilde{a}_a}{\prod_{\tau} (1 - f_{\tau})^{n_{\tau}}} \\ & \cdot \exp \left(-\beta \pi_{MG} \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda} \right) \end{aligned} \quad (3.33)$$

donde esta última ecuación requiere una redefinición de la actividad de la proteína \tilde{a}_a . Expresiones similares a la ec. 3.33 y ec. 3.32 se derivan para la fase de solución; y con ellas la obtención de las actividades de los analitos y especies libres.

Consideraremos la absorción de los fármacos quimioterapéuticos Daunorrubic-

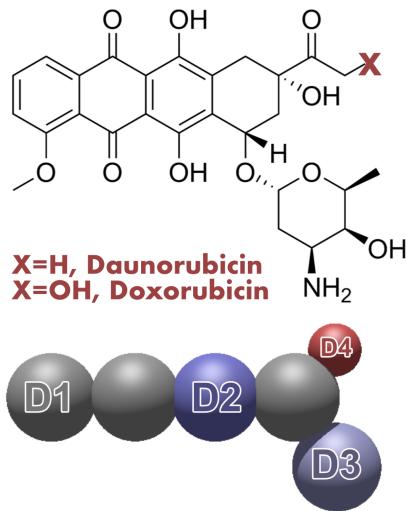


Figura 3.2: Estructura química (arriba) y modelo de grano grueso (abajo) aplicado para describir daunorrubicina y doxorrubicina. Los segmentos de grano grueso $D1 - D4$ se describen en la tabla 3.3.

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

Tabla 3.3: Porpediades moleculares para las distintas unidades de grano grueso usadas para el modelado de las drogas Daunorubicina y Doxorubicina. (ver figura 3.2). (* Para unidades ionizables.)

ina (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 3.2 y la parametrización se presenta en la tabla 3.3 [104].

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Respuesta al pH y la concentración de sal

En esta sección, describiremos el comportamiento de los microgeles en respuesta a cambios en la composición de la solución. Nos enfocaremos en temperaturas por

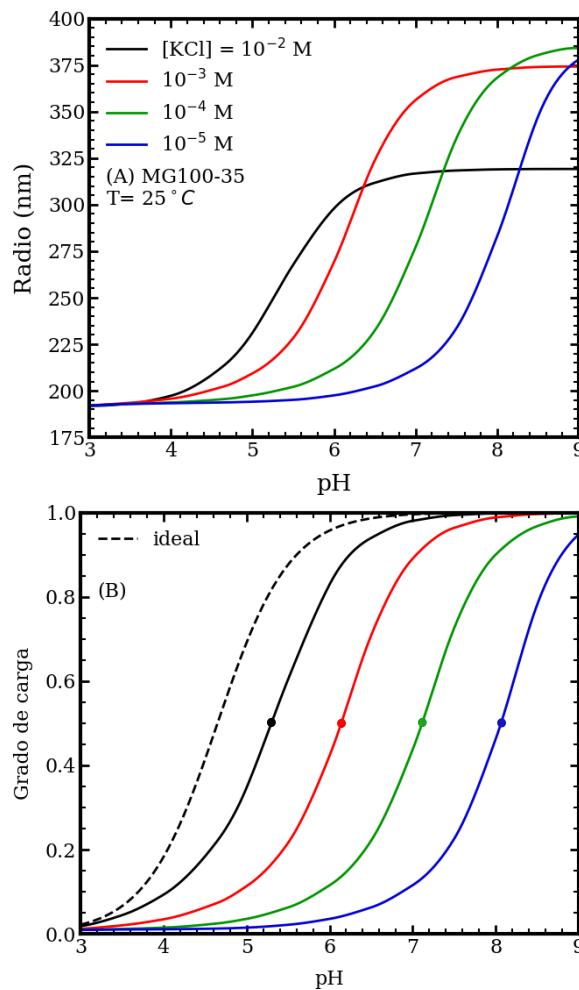


Figura 3.3: Gráfico de tamaño de microgel (A) y grado de carga (B) en función del pH para soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal y $T = 25^\circ C$. Las cadenas de polímero en el microgel MG100-35 son $n_{ch} = 100$ -long. y tienen 35% MAA. La curva de punteada en el panel B es la disociación 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.

debajo de la temperatura crítica del PNIPAm, donde el gel experimenta un colapso. El efecto de la temperatura se evaluará en la sección 3.2.2.

La Figura 3.3A muestra el tamaño del microgel (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 3.3B muestra cómo la fracción de *MAA* cargados (f : grado de carga; ver ec. 3.18) 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 hinchamiento se desplaza a valores de pH más altos cuando se reduce la concentración de sal (ver Figura 3.3A). 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. Hemos discutido este comportamiento en el capítulo 2, en la sección 2.4.1.

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 3.3B), así como la transición de expansión (como se observa en el panel A, marcado con círculos en $pH = pKa$). Los pKa aparentes de la Figura 3.3B 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's aparente de la fig. 3.3 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 alto costo energético 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 3.3B).

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 a que las unidades *MAA* se carguen en 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 ideal.

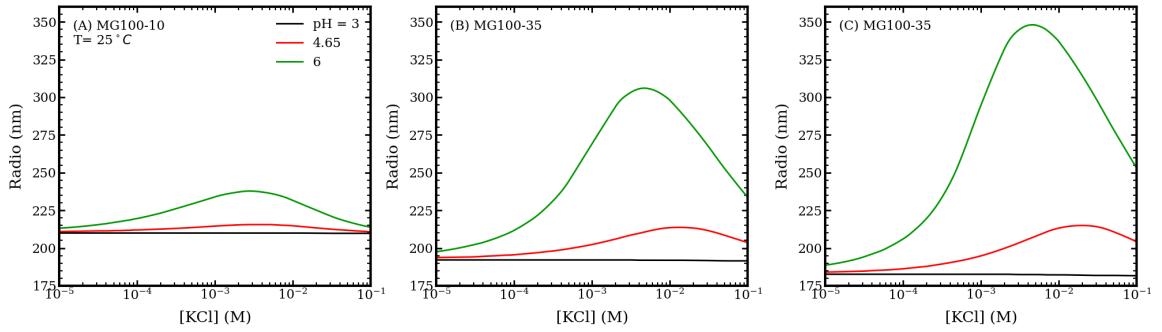


Figura 3.4: Gráfico del tamaño del microgel en función de las concentraciones de sal para diferentes soluciones de pH y $T = 25^\circ C$. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen fracciones MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

La Figura 3.4 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 hinchan 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. [133] para microgeles P(NIPAm-MAA) y concentraciones de KCl en el rango de 0.1 – 0.5 M.

Las curvas de la Figura 3.4 muestran un comportamiento reentrante, en el que el tamaño primero aumenta 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 3.4).

Se han informado transiciones de hinchamiento-deshinchamiento con concentraciones de sal variables en una variedad de sistemas poliméricos reguladores 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 por la teoría del campo medio autoconsistente [40, 55, 81, 142], lo cual ha sido confirmado por resultados experimentales [136]. 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 en la solución [16, 63]. También se ha predicho que el espesor de las películas de poliácidos débiles entrecruzados mostrará este comportamiento de hinchamiento reentrantre [76].

En este mismo sentido, se ha predicho una transicií de deshinchación a hinchamiento impulsada por la concentración de sal para los nanogeles de polielectrolitos fuertes [58]. 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 reentrantre de hinchamiento a colapso para microgeles sensibles al pH y al calor [106]. Polotsky et al. [106] 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 mejora el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas y, por lo tanto, el microgel se deshincha.

Experimentalmente, Capriles-González et al. [21] informaron sobre el hinchamiento 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 a medida que se cargan los iones dentro del gel; las repulsiones electrostáticas entre los monómeros de *MAA* cargados están cada vez más protegidas. 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 favorece el hinchamiento para reducir las repulsiones electrostáticas.

La figura 3.5 ilustra este doble efecto de aumentar la concentración de sal en

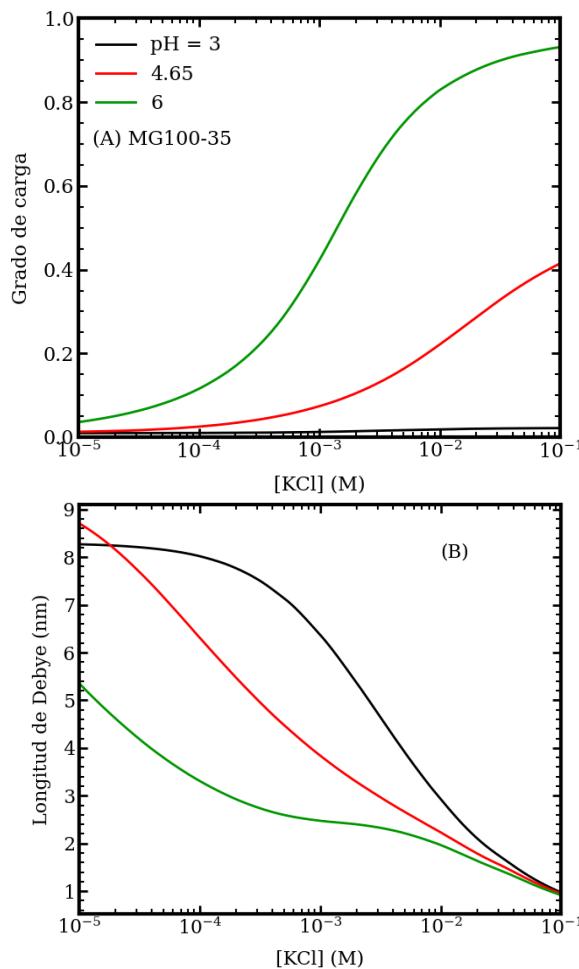


Figura 3.5: Curvas del grado de carga MAA (A) y la longitud de Debye (B) dentro de los microgeles MG100-35 en función de la concentración de sal para diferentes valores de pH. Estos resultados corresponden a las condiciones de figura 3.4B.

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 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 3.5 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 3.4B.

Esta teoría requiere que el interior del microgel sea de carga neutra. La congjugación de cargas y contraiones debe estar equilibrada. Claudio et al. [25] 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. Además, los iones de sal se absorben dentro del microgel para reforzar dicha restricción, lo que permite que los segmentos de *MAA* se desprotonen y se carguen eléctricamente. Describimos este efecto como el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre los grupos de *MAA*, que es un concepto que hemos discutido con anterioridad.

3.2.2 Respuesta a la Temperatura

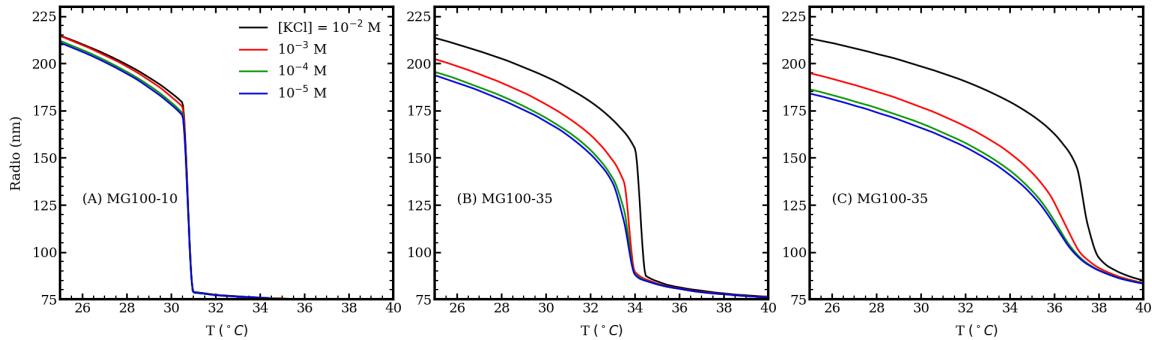


Figura 3.6: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sal en solución y *pH* 4,65. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen diferentes fracciones de *MAA*: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

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 3.6 se muestra el tamaño de tres geles MG-100 como función de la temperatura a distintas concentraciones salinas. A baja temperatura, estos microgeles muestran un estado relativamente hinchado, mientras que a altas temperaturas se produce un estado colapsado (alta densidad de polímero).

Esto último ocurre dado que el NIPAm adquiere un comportamiento hidrofóbico por encima de su temperatura de transición crítica inferior (LCST por sus siglas en inglés), expulsando el solvente de su interior y colapsando su estructura [115]. El tamaño del gel en este estado es robustamente independiente de la concentración salina o el pH y posee un radio muy 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 absorbidos, como fue descrito en la sección 3.2.1. El tamaño y la carga del microgel son funciones monótonamente 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 Volumen (T_{TV}). Comparando los diferentes paneles de la figura 3.6, vemos que aumentar el contenido de *MAA* de los microgeles conduce a una transición más suave alrededor de T_{TV} .

La figura 3.7A muestra que la T_{TV} 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 [64], lo que también se ha observado para los microgeles P(NIPAm-AA) [21]. Se ha definido T_{TV} como el punto de inflexión de las curvas $R(T)$ de la figura 3.6 entre los estados hinchado y colapsado [66].

El panel B de la figura 3.7 muestra el grado de carga de los segmentos de *MAA* en el T_{TV} . Existe una clara correlación entre la dependencia de T_{TV} con el pH y la salinidad, y el estado de carga del microgel en las condiciones VPT. 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, el VPTT de los microgeles basados en PNIPAm permanentemente cargados disminuye con la concentración de sal [79]. En este caso, la carga del polímero permanece constante, mientras que la incorporación de iones de sal solo debilita las repulsiones electrostáticas entre las cargas.

Los resultados de la figura 3.7 muestran que la temperatura de transición está controlada por la cantidad de carga dentro del microgel. De hecho, aumentar el

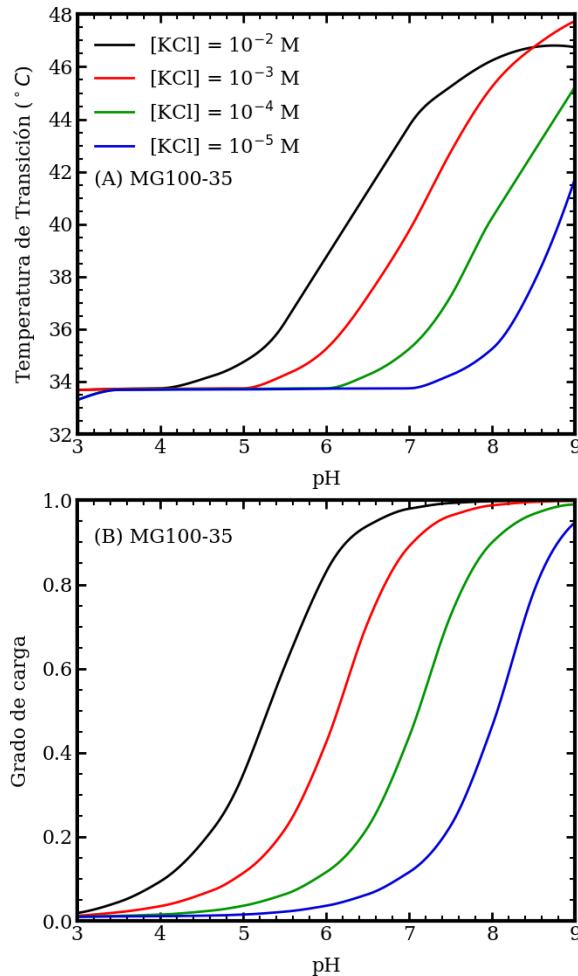


Figura 3.7: Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{TV} (A) y la fracción de MAA cargado a esta temperatura (B) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Este microgele P(NIPAm-MAA) tiene una longitud de cadena de $n_{ch} = 100$ y un MAA de 35%.

contenido de MAA tiene el mismo efecto de desplazar el VPTT a valores más altos, como se observa en la figura 3.8A. 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:

$$x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}} = f x_{MAA} \quad (3.34)$$

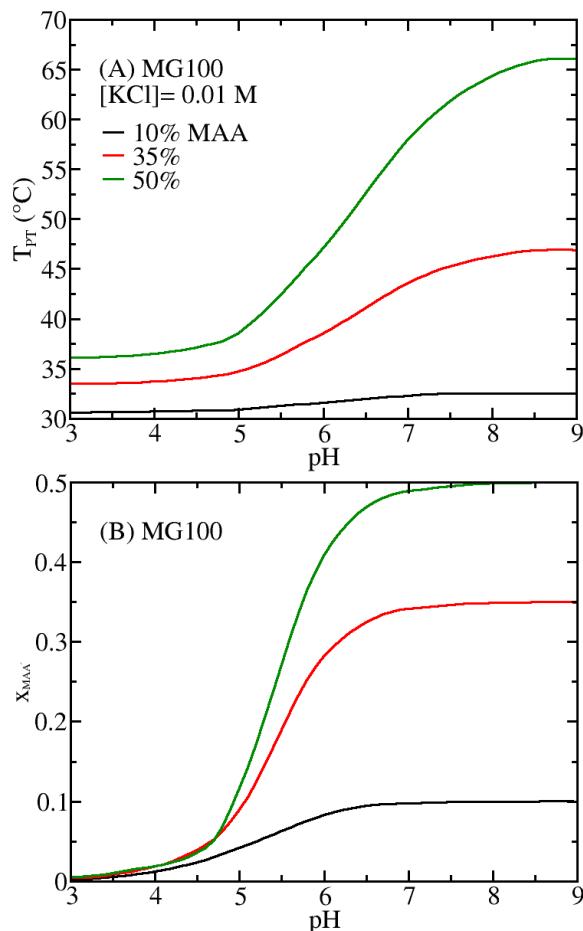


Figura 3.8: (A) Gráfico de temperatura de transición T_{TV} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01M$; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}}$ en función del pH para las mismas condiciones del panel A (*i.e.*, en el T_{TV}); 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 3.1.1. x_{MAA^-} es proporcional a la carga total de la red de microgel, y debido a que todos los microgeles tienen el mismo número total de segmentos, la constante proporcional es la misma para todos los contenidos de MAA considerados. La figura 3.8B muestra que existe una clara correlación entre T_{TV} y la carga total del microgel (dada por x_{MAA^-}) al cambiar el pH o el contenido

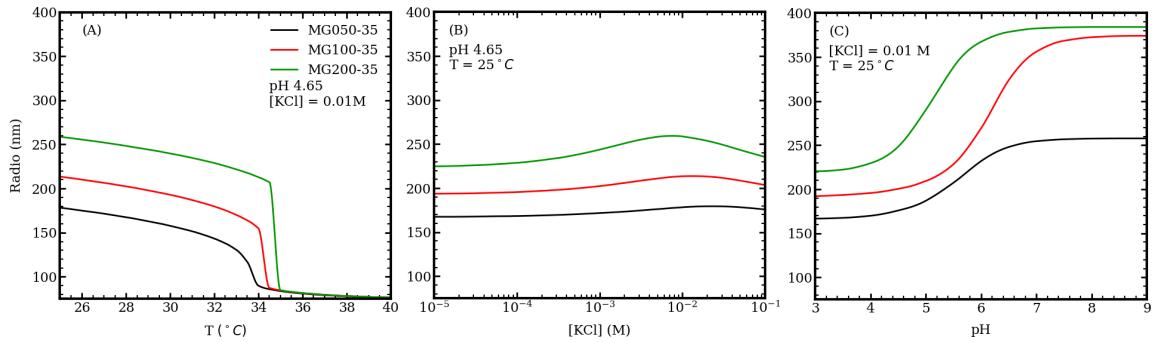


Figura 3.9: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura, la concentración de sal y el pH (paneles A, B y C respectivamente). Diferentes curvas corresponden a microgeles con segmentos de 50 (MG050), 100 (MG100) y 200 (MG200) por cadena de polímero, todos con 35% MAA.

de *MAA* del polímero.

3.2.3 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 nuestro gel. 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 3.9 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. Este comportamiento de los microgeles P(NIPAm-MAA) ha sido confirmado experimentalmente [62]. Cuantitativamente, 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 3.9, 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 3.9A), y además, la temperatura de transición de volumen (T_{TV}) aumenta. Estos resultados son consistentes con los trabajos de Li and Tanaka [72] y Wu and Zhou [134], quienes informaron un cambio en la transición de volumen

de NIPAm de continua a discontinua a medida que disminuye la concentración del entrecruzante en la síntesis.

En la figura 3.9, también se observa que el aumento de la longitud de la cadena (disminución del grado de entrecruzamiento) desplaza la temperatura de transición de volumen (T_{TV}) hacia valores más altos. Esto concuerda con los resultados de la espectroscopía UV realizada por Lee et al. [70] 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 3.16). Al reducir el grado de entrecruzamiento, el microgel se hincha y se vuelve más flexible, lo que permite una mayor carga en la red de polímero. En consecuencia, se requiere una temperatura más alta para inducir el colapso de la red de polímero. Hemos demostrado que la temperatura de transición de volumen (T_{TV}) está fuertemente correlacionada con el grado de carga.

La presencia de unidades ácidas acentúa la dependencia de la T_{TV} con la longitud de la cadena, ya que incorpora el equilibrio de protonación al balance energético. Sin embargo, este comportamiento 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.

3.2.4 Adsorción de drogas

Los microgeles poliméricos se han destacado como transportadores inteligentes 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 hemos mostrados en las secciones anteriores, como cambios de pH, temperatura y concentración de iones, lo que les permite liberar su carga terapéutica de manera selectiva y específica en el sitio deseado.

Por ejemplo, se sabe que el pH extracelular del tejido tumoral es más bajo que

el del tejido sano [36], lo que hace que los microgeles respondan al pH sean idoneos para la administración local de medicamentos contra el cáncer [28].

Peppas *et al.* han estudiado ampliamente los microgeles sensibles al pH basados en *MAA* como transportadores inteligentes que pueden operar utilizando los diferentes niveles de acidez a lo largo del tracto digestivo y prevenir la degradación de fármacos en el estómago [22, 31, 121, 129].

En esta sección, evaluamos la capacidad de los microgeles P(NIPAm-MAA) para incorporar dos fármacos quimioterapéuticos. En particular, investigamos las mejores condiciones para la encapsulación de fármacos en condiciones de laboratorio. Consideramos que la doxorrubicina (Doxo) y la daunorrubicina (Dauno) son dos de las antraciclinas importantes y ampliamente utilizadas en la quimioterapia para tratar una amplia gama de cánceres [8, 23, 26, 96]. Estas drogas se pueden seguir utilizando fluorescencia y adsorbancia, lo que las hace atractivas desde el punto de vista de la investigación [2, 104, 120]. Además, estos fármacos pueden adquirir carga positiva en la mayoría de las condiciones, lo que puede facilitar su encapsulación en microgeles de polímeros aniónicos [71]. Serpe *et al.* [120] han estudiado la captación y liberación 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.* [84] han descrito la interacción entre Doxo y microgeles P(NIPAm-MAA) en diferentes condiciones.

La figura 3.10 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 absorción. Tanto Dauno como Doxo presentan una carga neta de +1 a pH ácido y neutro (ver la figura 3.11).

Como resultado, la absorción de Dauno y Doxo tiene que competir con la absorción de iones de potasio para neutralizar la carga negativa de la red del polímero (Pérez Chávez *et al.* [104]). En la figura 3.5, 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 con la mejora de la absorción observada en la figura 3.10 bajo estas condiciones. Sin embargo, después de la absorción del

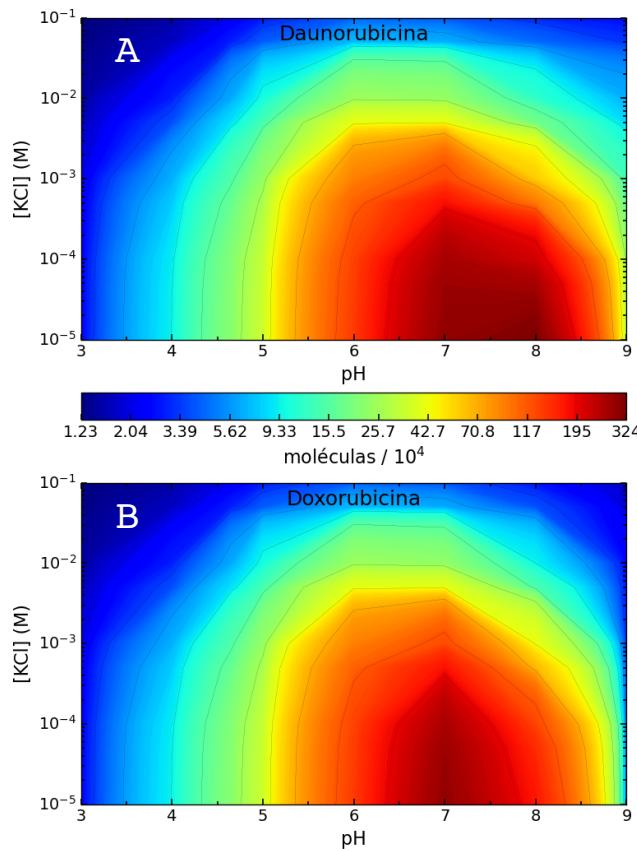


Figura 3.10: Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubicina (A) y doxorrubicina (B) absorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es 1mM y $T = 25^\circ\text{C}$. el microgel P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35% MAA (MG100-35).

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 (1mM).

La fracción de segmentos de MAA cargados negativamente en el polímero aumenta con el pH, lo que explica por qué también aumenta la absorción 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 absorción. Por lo tanto, la absorción de Dauno/Doxo es una función no monótona del pH.

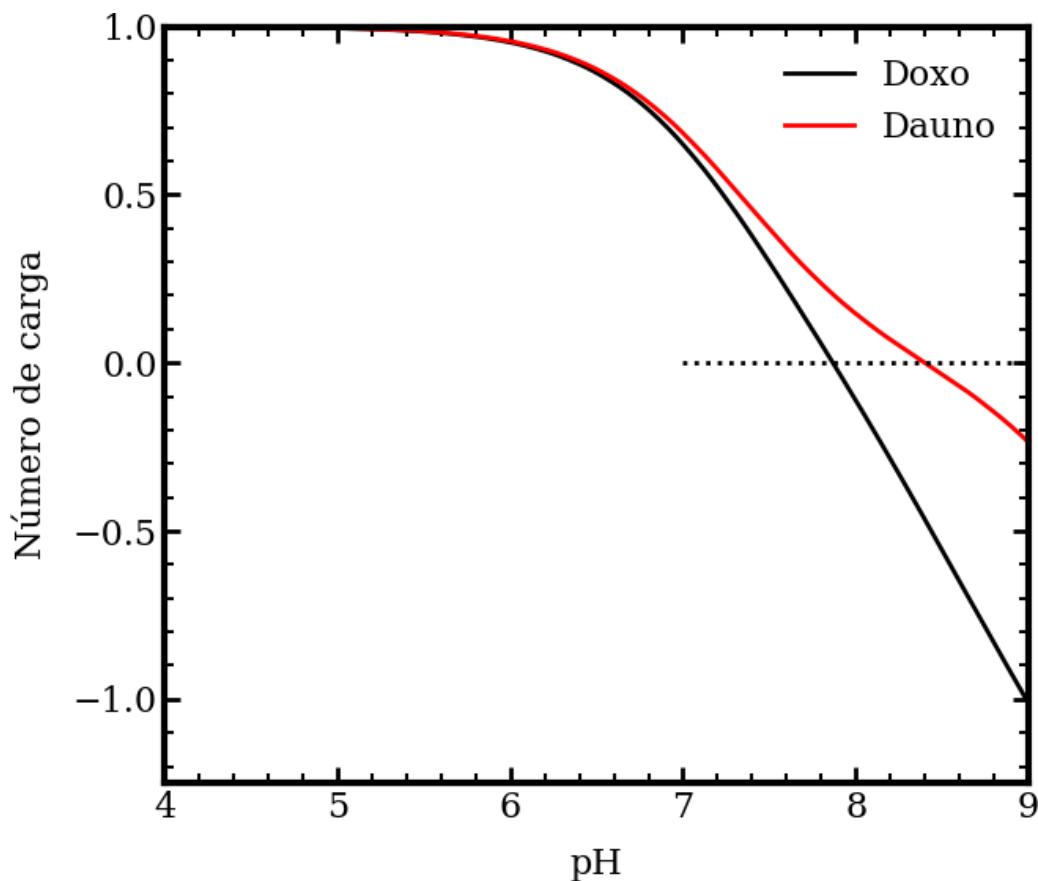


Figura 3.11: Número de carga de las drogas estudiadas: Doxo y Dauno. La intersección con la línea a puntos muestra el punto isoeléctrico de las mismas. Pasado este punto se da una inversión en la carga de las drogas lo que conlleva a una repulsión electrostática con los segmentos cargados de *MAA* del microgel.

En nuestro modelo, los puntos isoeléctricos de Dauno y Doxo son 8.4 y 7.9, respectivamente ver fig. 3.11. La figura 3.10 muestra que la adsorción de ambas moléculas puede ser significativa alrededor y por encima de estos valores de pH. En otras palabras, hay una adsorción considerable de moléculas con carga negativa dentro de la red de nuestro gel con carga similar. 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. 3.12).

El punto isoeléctrico más bajo de la doxorrubicina se debe a la desprotonación de

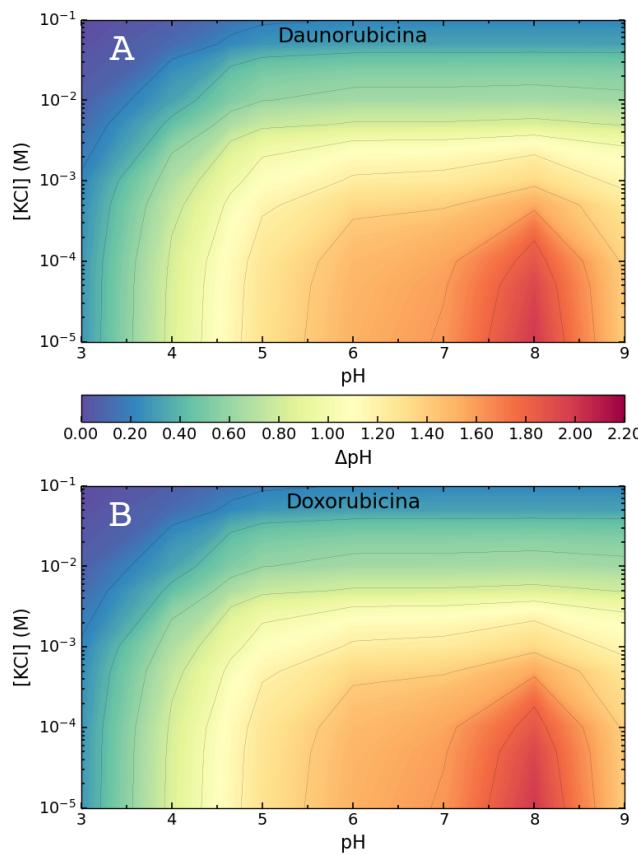


Figura 3.12: Mapas en color que muestran el cambio en el pH dentro del microgel, $\Delta pH = pH - pH_{GEL}$ en función de sal y el pH de la solución para daunorrubricina (A) y doxorrubricina (B). Estos cambios son reportados para las mismas condiciones de 3.10, es decir: La concentración de fármaco en solución es $1mM$ y $T = 25^{\circ}C$. el microgel P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35% MAA (MG100-35).

su grupo hidroxilo sustituyente (véase el segmento D4 en la figura 3.2 y tabla 3.3). Como resultado de esta carga negativa adicional en condiciones alcalinas, el rango de pH de adsorción es ligeramente más amplio para la daunorrubricina.

3.3 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. Estas partículas suaves 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 [35]. El inicio de esta transición impulsada por el pH se puede caracterizar adecuadamente utilizando el pKa aparente de los segmentos de MAA, que se desplaza a valores de pH más altos a medida que disminuye la concentración de sal en la solución.

A pH constante y por debajo de la temperatura de transición de fase inferior crítica (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 hinchamiento como deshinchamiento, dependiendo del rango de concentración de sal. Esta transición de hinchamiento-deshinchamiento inversa 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 de volumen diferente que está asociada a la hidrofobicidad intrínseca del PNIPAm por encima de su LCST. La temperatura de transición de fase de volumen 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 de volumen de los microgeles multiresponsivos.

También hemos evaluado la capacidad de estos microgeles para encapsular dos fármacos quimioterapéuticos típicos con carga positiva. El mejor enfoque para mejorar la partición de estos fármacos en el microgel es reducir la concentración de sal en la solución. Más sorprendente es el hecho de que las mejores 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

Nanogeles estructurados

4.1 Introducción/Motivación

En el capítulo anterior monstramos un modelo de dos fases, con el cual pudimos explicar el comportamiento de microgeles multiestimulos, cambios en el pH, temperatura y concentración de sal. Se logró dar explicación a comportamientos reportados experimentalmente como lo es la transición reentrante que significa un aumento del tamaño de los geles con el aumento de la concentración de sal, llegando a un máximo, para luego disminuir al seguir aumentando la concentración salina. Del mismo modo se pudieron explicar los cambios en el pH y como influye el porcentaje de monómeros protonables a dicha respuesta. La respuesta a la temperatura fue considerada teniendo en cuenta monómeros de NIPAm. Cómo afecta el grado de entrecruzamiento en todos los resultados anteriores, es decir una aproximación en la modificación de la estructura interna de estos geles. Para estos microgeles se usaron drogas modelos, ampliamente utilizadas para tratamientos anticancerígenos, para el estudio de adsorción: es decir de encapsulamiento. Se realizó y mostró un estudio sobre las mejores condiciones para optimizar estos sistemas como transportadores de drogas.

En este capítulo damos un paso más en el estudio de estos sistemas dejamos atrás el modelo homogéneo de gel y damos estructura interna, definida, a nuestros geles. En particular trabajamos con nanogeles. El uso de la teoría molecular aplicada para films poliméricos en el capítulo 2 es utilizada y de esta manera se incorpora la información molecular que le da la estructura a todo el sistema polimérico. Para

lograr esto se necesitó de diferentes configuraciones para nuestra partícula principal de nuestro sistema: nanogel. La generación de estas configuraciones representaron una metodología diferente y un desafío en sí. Vease el anexo .2. La información molecular obtenida con la generación de configuraciones nos permite acceder al comportamiento en el interior del nanogel. En este capítulo presentamos información sobre el reordenamiento interno de los nanogeles como respuesta a cambios en el pH y concentración de sal. Se mostrará estudios de adsorción sobre proteínas modelo, insulina, mioglobina y citocromo c; de cuyos estudios se extrae nueva información, adsorción localizada, con lo cual es posible pensar no solo en el tipo de nanogel sino en el tipo de síntesis necesaria para obtener un diseño que se adecue a las necesidades de transportador que se requiere. Esto ultimo es un nuevo paso en la investigación de estos sistemas poliméricos, información que no era posible obtener con el modelo anterior, cap. 3.

4.2 Teoría Molecular

El estudio de estos nanogeles conlleva un formalismo similar al visto en el capítulo de los films poliméricos, cap. 2. En este formalismo buscamos minimizar una energía libre del sistema. Como se mencionó incorporamos 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 concentració'o 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 componen al entrecruzante en nuestra red se describen como segmentos de carga neutral.

De manera similar en que fueron definidas las ecuaciones 2.1 y 3.1 se escribe el potencial termodinámico que describe nuestra simulación:

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

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, 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 nuestro sistema y la solución bulk que representa un “baño térmico” 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 descrito anteriormente, pero en esta ocasión para la proteína.

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

4.2.1 Red polimérica

A continuación describiremos la forma explícita de cada uno de estos términos, donde los segmentos protonables del nanogel serán considerados como segmentos de ácido metacrílico (MAA). Sin embargo, las mismas ecuaciones se aplican a los nanogeles que tienen segmentos básicos. Las diferencias se encuentran en el uso del signo del grado de disociación.

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

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

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} es la densidad local, en la posición r , 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 (K^+ , Cl^-). $G(r)$ es la constante de simetría de nuestro sistema, en particular para cada para r : $G(r) = 4\pi r^2$. Esta última se ejemplificara de mejor forma en la sección del modelado molecular.

El segundo término de la entropía de mezcla que considera los aportes entrópicos de la proteína. $\rho_{pro}(\theta, r)$ es la densidad local de la proteína en la conformación θ . La protína puede tomar cualquier conformación presenten en su set de conformaciones $\{\theta\}$. La contribución entrópica también incluye la rotación espacial. La densidad media local total de proteína es:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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:

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

where $m_{\tau}(\theta, r', r)dr$ 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 $r + dr$.

Notese 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:

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

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.

Hemos definido el grado de asociación de protones a los segmentos τ como:

1. Para unidades ácidas: $g_{\tau}(r) = 1 - f_{\tau}(r)$ (τ se carga negativamente)
2. Para unidades básicas: $g_{\tau}(r) = f_{\tau}(r)$ (τ se carga positivamente)

en donde $f_{\tau}(r)$ es el grado de disociación para el segmento τ .

La energía electrostática se define:

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

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 . Finalmente q_{MAA} es la de un segmento de MAA .

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

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

El siguiente término en el potencial termodinámico se debe a la repulsión estérica, el cual se puede incorporar a través de la siguiente restricción:

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

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 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. Por lo tanto, esta contribución puede ser ignorada. Esto es posible por los segmentos considerados en la estructura del nanogel, como se mostró en el capítulo anterior, en el modelo de dos fases, se consideró la interacción entre los segmentos de NIPAm como un potencial aparte. Por lo que las interacciones de Van der Waals fueron tenidas en cuenta.

Para completar el gran potencial de ec. 4.1, se tiene en cuenta el intercambio de especies móviles:

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

Los primeros dos términos del lado izquierdo 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 de los segmentos protonables de la proteína y los segmentos *MAA* de la red polimérica que forma el nanogel. Notese que se van de la mano con el grado de asociación g_τ y $1 - f$ para la proteína y la red polimérica respectivamente.

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 nuestra restricción de la incompresibilidad del volumen (ec. 4.12), como un multiplicador de Lagrange $\pi(r)$, este veremos cumple la función de una presión osmótica del sistema.

Como se mencionó al inicio de este capítulo, el siguiente paso es la búsqueda de las condiciones que minimicen la energía total. Esto se logra al derivar respecto de

las densidades locales $\rho_\gamma(r)$, el potencial electrostático $\psi(r)$, el grado de disociación, tanto de los segmentos provenientes de la proteína como del nanogel, $f(r)$, además de la probabilidad de las diferentes conformaciones de la red polimérica $P(\alpha)$

En síntesis podemos escribir $\Omega = \sum P(\alpha) \int G(r) dV \omega$, con ω es el funcional que contempla los funcionales que definen a nuestro gran potencial:

$$\omega = \omega(\rho_\gamma(r), \rho_{pro}(r), \psi(r), f(r), P(\alpha)) \quad (4.15)$$

En particular la expresión obtenida para el grado de disociación, $f_j(r)$ de los segmentos titulables tanto de la proteína como de la red polimérica que compone al nanogel:

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

En donde $a_{H^+} = e^{\beta \Delta \mu_{H^+}} = e^{\beta (\mu_{H^+} - \mu_{H^+}^0)}$ es la actividad del H^+ . El subíndice j se define tal que $j = \{MAA, \tau\}$. El exponente ∓ 1 hace la diferencia sobre segmentos ácidos o b'ásicos respectivamente.

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

$$\begin{aligned} [HA] &\iff [H^+] + [A^-] \\ k_{a,HA}^0 &= \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \\ k_{a,HA}^0 &= \exp(\beta \mu_{HA}^0 - \beta \mu_{A^-}^0 - \beta \mu_{H^+}^0) \end{aligned} \quad (4.17)$$

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

$$\rho_\gamma(r)v_w = a_\gamma \exp(-\beta \psi(r)q_\gamma) \exp(-\beta \pi(r)v_w) \quad (4.18)$$

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

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, r)v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[- \int_0^{\infty} dr' m_{\tau}(\theta, r, r') \ln f_{\tau}(r') \right] \\ & \times \prod_{\lambda} \exp \left[- \int_0^{\infty} dr' m_{\lambda}(\theta, r, r') (\beta \psi(r') q_{\lambda} + \beta \pi(r') v_{\lambda}) \right] \end{aligned} \quad (4.19)$$

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

$$\tilde{a}_{pro} = \exp[\beta \mu_{pro} - \beta \tilde{\mu}_{pro}^0] \quad (4.20)$$

En donde:

$$\beta \tilde{\mu}_{pro}^0 = \beta \mu_{pro}^0 + \sum_{\tau,a} C_{n,\tau} \beta \mu_{\tau,d}^0 + \sum_{\tau,b} C_{n,\tau} \beta (\mu_{H^+} - \mu_{\tau,p}^0) \quad (4.21)$$

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

$$\int_0^{\infty} dr' m_{\lambda}(\theta, r, r') = C_{n,\lambda} \quad \forall r \quad (4.22)$$

La optimización con respecto a la probabilidad de una configuración α de la red de polímeros resulta en:

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[- \sum_i \int_0^{\infty} dr \beta \pi(r) \phi_r^i(\alpha, r) \right] \\ & \times \exp \left[- \int_0^{\infty} dr \beta \psi(r) \frac{\phi_r^{MAA}(\alpha, r)}{v_{MAA}} q_{MAA} \right] \\ & \times \exp \left[- \int_0^{\infty} dr \ln(f(r)) \frac{\phi_r^{MAA}(\alpha, r)}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (4.23)$$

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:

$$\epsilon \nabla^2 \psi(r) = -\langle \rho_q(r) \rangle \quad (4.24)$$

Considerando las simetrías de nuestro problema:

$$\epsilon \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial \Psi(r)}{\partial r} \right) = -\langle \rho_q(r) \rangle \quad (4.25)$$

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

$$\int_0^\infty dr G(r) \langle \rho_q(r) \rangle = 0 \quad (4.26)$$

Esta restricción se satisface imponiendo la condición de contorno adecuada al resolver 4.25. Estas condiciones de contorno son:

$$\lim_{r \rightarrow \infty} \psi(r) = 0 \quad (4.27)$$

$$\left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=0} = 0 \quad (4.28)$$

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 $\pi(r)$ en cada r . Estas funciones locales se calculan resolviendo numéricamente las ecuaciones 4.12 y 4.25 en cada capa r .

4.2.2 Solución Bulk

La composición química de la solución a bulk en encuentra en equilibrio termodinámico con nuestro nanogel. Químicamente hablando nos indica que los potenciales químicos de las especies con móbilidad son iguales en cualquier punto del sistema. El calculo de estos potenciales, y con ello sus actividades nos proveen las soluciones iniciales para la resolución de todo el sistema. En esta sección, expresamos esas actividades en términos de la composición química de la solución bulk.

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

$$\begin{aligned} i) \rho_\gamma^b &= \rho_\gamma(r \rightarrow \infty) \\ ii) \pi^b &= \pi(r \rightarrow \infty) \\ iii) f_\tau^b &= f_\tau(r \rightarrow \infty) \end{aligned} \quad (4.29)$$

Además, las condiciones de contorno expresadas en ec. 4.28 implican que:

$$\psi(r \rightarrow \infty) = 0 \quad (4.30)$$

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

$$\rho_\gamma^b v_w = a_\gamma e^{-\beta \pi^b v_w} \quad (4.31)$$

El grado de disociación f_j de la proteína y los segmentos de la red pueden escribirse como:

$$\frac{f_j^b}{1 - f_j^b} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} \quad (4.32)$$

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

$$\begin{aligned} \rho_{pro}^b(\theta) v_w &= \tilde{a}_{pro} \prod_\tau \exp [-C_{n,\tau} \ln f_\tau^b] \\ &\quad \prod_\lambda \exp [-C_{n,\lambda} (\beta \pi^b v_\lambda + \beta \psi^b q_\lambda)] \end{aligned} \quad (4.33)$$

donde $C_{n,\lambda}$ es el número de composición para el segmento λ , definido en ec. 4.22.

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

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^b v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}^b \rangle v_{\lambda} \quad (4.34)$$

En esta ocasión, dado que $\psi^b = 0$, se observa que los funcionales en el bulk de la solución se encuentran establecidos por el potencial de presión π^b , siendo esta nuestra variable a resolver.

Lo que se puede calcular utilizando las ecuaciones de densidad de las especies libres en solución, ec. 4.31 y la proteína ec. 4.33 en la nueva restricción, 4.34.

4.2.3 Modelo Molecular: Proteínas

Consideramos 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 [15]: 2B4Z para el citocromo c [88], IZNI para la insulina [14] y 3RGK para la mioglobina [53].

Las partículas de grano grueso en este modelo se les 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 [42]. 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; estos casos especiales se describen en el apéndice.

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 [52], 5.5 (5.3 [44]), 7.15 (7.2 [10]) para el pI del citocromo c, insulina y mioglobina respectivamente; los valores entre paréntesis son los pI de las proteínas reportados experimentalmente.

grupo	v(nm^{-3})	pka	grupo	v(nm^{-3})	pka
Ala	0.067		Pro	0.090	
Arg	0.148	12.5(+)	Ser	0.073	
Asn	0.096		Thr	0.093	
Asp	0.091	3.5(−)	Trp	0.163	
Cys	0.086		Tyr	0.141	10.3(−)
Gln	0.114		Val	0.105	
Glu	0.109	4.2(−)	H ₂ O	0.033	
Gly	0.048		OH [−]	0.033	
His	0.118	6.6(+)	H ₃ O ⁺	0.033	
Ile	0.124		Na ⁺	0.043	
Leu	0.124		Cl [−]	0.047	
Lys	0.135	10.5(+)	AH	0.068	9.5(+)
Met	0.124		MAA	0.085	4.65(−)
Phe	0.135		VA	0.085	

Tabla 4.1: Volumen y pKa (si corresponde) de las partículas de grano grueso (residuos de aminoácidos, iones pequeños, moléculas de solvente y segmentos poliméricos) considerados en nuestro modelo molecular.

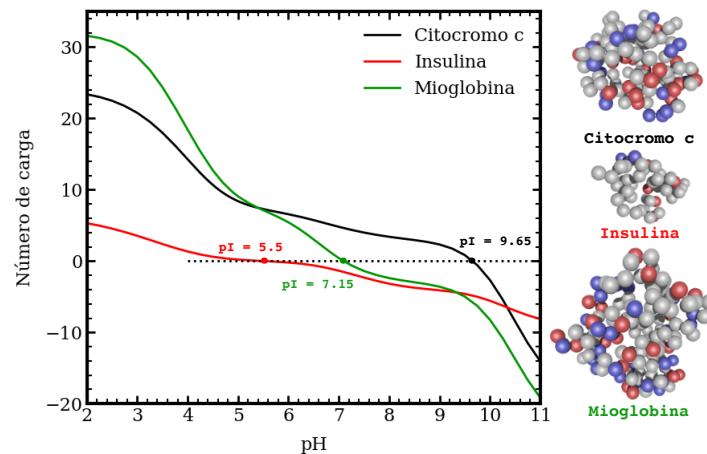


Figura 4.1: Izquierda: Número de carga de las proteínas en una solución diluida en función del pH (curvas sólidas); los círculos llenos marcan el punto isoeléctrico, donde la carga neta de la proteína es cero. La representación de grano grueso de las proteínas se ilustra a la derecha, donde los residuos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

4.2.4 Modelo Molecular: Nanogel

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 4.1 incluye el volumen y el pKa (si la unidad es titulable) utilizados para describir estas unidades simplificadas.

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 traslación tridimensional de la celda unidad en donde 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 resultan quedar colgando 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[73].

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 ??: (i) una estructura *aleatoriamente funcionalizada* (RF) donde los segmentos sensibles al pH se distribuyen aleatoriamente en toda la red, (ii) una estructura *funcionalizada en el núcleo* (CF), donde las unidades sensibles al pH ocupan el centro del nanogel,

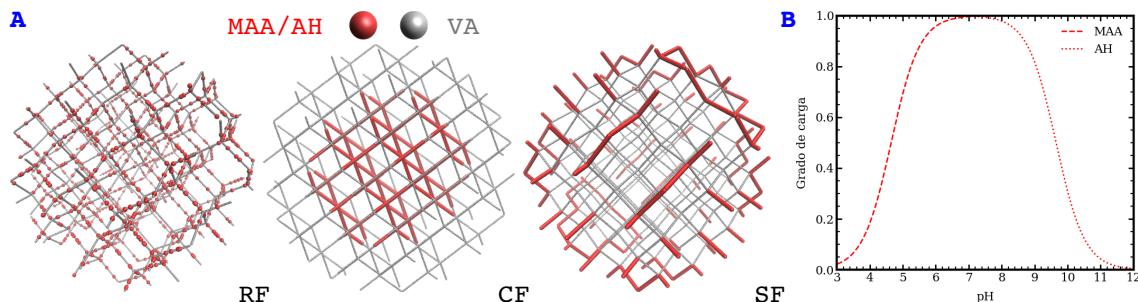


Figura 4.2: A: La red de nanogeles consiste en cadenas de copolímeros entrecruzadas con un segmento de carga neutral (VA: alcohol vinílico) y una unidad funcional (ya sea MAA: ácido metacrílico o AH: alilamina). Este esquema ilustra las tres distribuciones de los comonoméros consideradas; de izquierda 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.

y (iii) una estructura *funcionalizada en la superficie* (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, examinaremos 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:

$$R = \frac{4}{3} \frac{\int_0^\infty dr G(r) r \langle \phi(r) \rangle}{\int_0^\infty dr G(r) \langle \phi(r) \rangle} \quad (4.35)$$

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

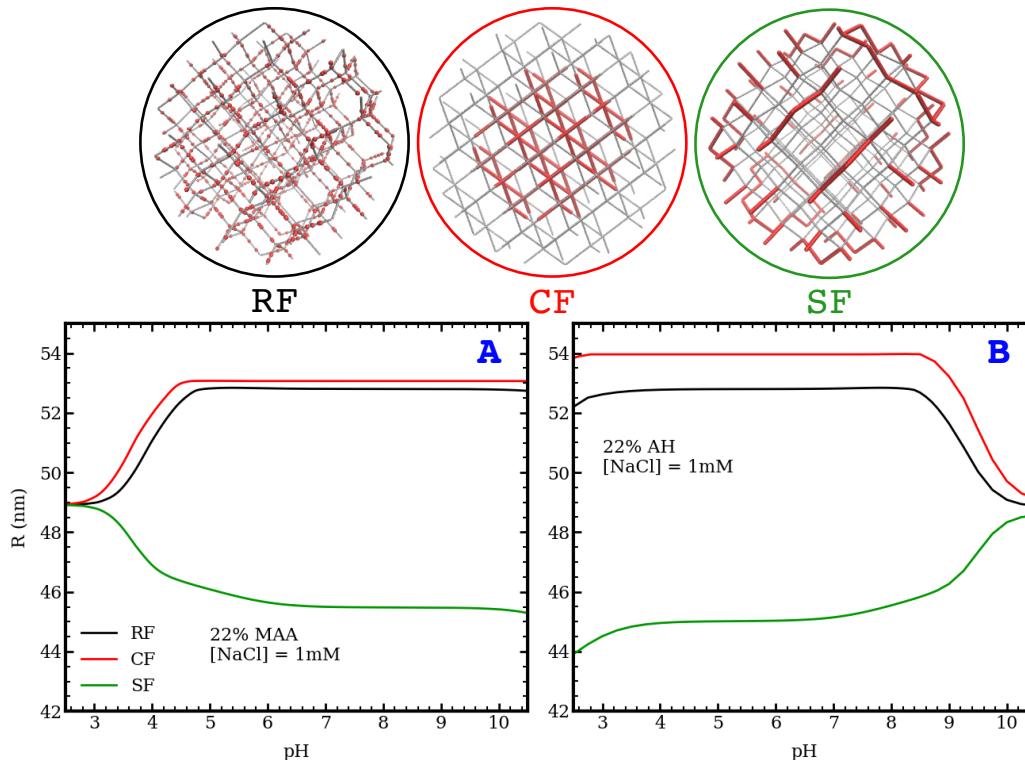


Figura 4.3: Radio promedio, R , en función del pH para nanogeles de copolímero MAA-VA (panel A) y AH-VA (panel B). Se consideran tres estructuras diferentes en cada caso donde las unidades funcionales (MAA/AH) se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la red polimérica (RF), ocupan el centro de la 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 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 nuestras estructuras en diferentes condiciones. Hemos utilizado la distribución radial de los monómeros funcionales para los nanogeles *MAA*. Esta cantidad se define como:

$$\lambda_{MAA}(r) = 4\pi r^2 \langle \phi^{MAA}(r) \rangle \quad (4.36)$$

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 $r + dr$ medidos 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. 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 cambio hacia el interior de la distribución de segmentos de polímero (Figura 4.5C) explica el comportamiento de deshinchamiento 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.

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 nangoles compuestos por *MAA*, lo que explica la hinchazón de la figura 4.3B; mientras tanto, para la estructura tipo SF, el deshinchamiento con la disminución del pH que se ve en la 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 fig. 4.4 presentamos la distribución para dos diferentes valores de pH. Que corresponde 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 de cantidad de segmentos a valores más altos de r .

al cargarse el nanogel. Comportamiento observado en la figura 4.3, en donde hay un aumento del radio del nanogel (RF y CF). En cambio el desplazamiento hacia dentro de los segmentos de la red polimérico al transicionar de un estado cargado a uno descargado en la distribución superficial (SF) explica la disminución del tamaño del gel observada en la figura 4.3B.

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 (ver Figura ??A y B). Esto explica la hinchazón observada en la Figura 4.3B. Por otro lado, para la estructura tipo SF, el deshinchamiento con la disminución del pH que se observa en la Figura 4.3B es consistente con un desplazamiento hacia el interior del nanogel (ver Figura ??C).

Finalmente 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. 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 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. Los resultados de la insulina con *MAA* se omiten debido a su bajo punto isoeléctrico, ya que esta proteína no se adsorbe en nanogeles basados en *MAA*.

Para estos estudios, se considerará un nanogel polimérico centrado en $r = 0$ en contacto con una solución acuosa de proteína, con una concentración definida. El número de proteínas adsorbidas dentro de la capa esférica entre r y $r + dr$ se define como la cantidad en exceso. Definida como:

$$\langle N(r) \rangle dr = 4\pi r^2 (\langle \rho(r) \rangle - \rho_{bulk}) dr \quad (4.37)$$

en donde $\langle \rho(r) \rangle$ y $\rho_{bulk} = \lim_{r \rightarrow \infty} \langle \rho(r) \rangle$ 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 de polímeros,

$$\Gamma = \int_0^\infty \langle N(r) \rangle dr \quad (4.38)$$

La Figura 4.6 muestra la adsorción de soluciones, de proteína única, 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 están compuestos por *MAA*.

Se puede observar que la adsorción de proteínas muestra un comportamiento no

monótono 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. La respuesta de adsorción al pH se puede explicar mediante las interacciones electrostáticas y el comportamiento de protonación de los segmentos de *MAA* y 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, pero por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, estas adquieren carga positiva. En estas condiciones, las interacciones atractivas entre las proteínas y la red polimérica promueven la adsorción de proteínas. Sin embargo, en ambos extremos de la escala de pH, estas interacciones son insignificantes: en pH bajo, el *MAA* está protonado y tiene carga neutra, mientras que en 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, las adsorciones de citocromo c y 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. Demostramos que 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 (compara los paneles

A y C de la Figura 4.4).

Para explicar el mejor rendimiento de los nanogeles MAA funcionalizados en su núcleo en 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 corresponde 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 núcleo 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, y a $r = 25$ nm para 10 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 en 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 es más propenso a adsorberse junto a estas regiones de alta densidad de *MAA* (carga).

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:

$$\text{PMF}(r) = -k_B T \ln \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\rho_{\text{bulk}}} \quad (4.39)$$

donde $\lim_{r \rightarrow \infty} \text{PMF}(r) = 0$, lo que indica que la interacción nanogel-proteína des-

parece cuando están separados.

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 $-8k_BT$ en el rango espacial de $r = 0$ a 30 nm. Esta interacción es relativamente de 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 las de la estructura CF. La energía libre de adsorción es aproximadamente $-6k_BT$, y se mantiene aproximadamente constante dentro del nanogel RF.

Para el nanogel funcionalizado en la superficie, sin embargo, el mínimo del PMF también es de alrededor de $-6k_BT$, 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.

En cambio, aumenta de manera monótona a medida que r disminuye, lo que indica que la proteína se aleja de las cadenas superficiales funcionalizadas y se ubica más profundamente en el nanogel.

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 despreciable o negativa.

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, si es que ocurre. 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 permite 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 [11, 47, 132, 139]

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 (numéricamente hablando 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, decidimos investigar 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 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 monótona 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 funcionalización 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 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).

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 $r = 25\text{ nm}$ 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 (síntesis del nanogel) proporciona una herramienta para controlar la distribución de proteínas dentro del nanogel.

4.4 Conclusiones

Este capítulo investigamos la adsorción de proteínas en nanogeles de poliméricos con diferentes funcionalizaciones espaciales sensibles al pH. Se desarrolla y aplica nuestra 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 basados en 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 nanogeles distribuidos al azar como los funcionalizados en el núcleo se hinchan 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 deshincha 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 diferentes estructuras de nanogeles basados en MAA, y se encontró que la adsorción de proteínas es una función no monótona 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 objetivo. 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 de sal, donde es menos probable que permanezcan en 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 la determinación de la respuesta del nanogel a las variaciones de pH y la adsorción de proteínas en estos nanogeles. Esta información es valiosa para el diseño de nanogeles sensibles al pH como vehículos para la encapsulación, el transporte y la administración de proteínas.

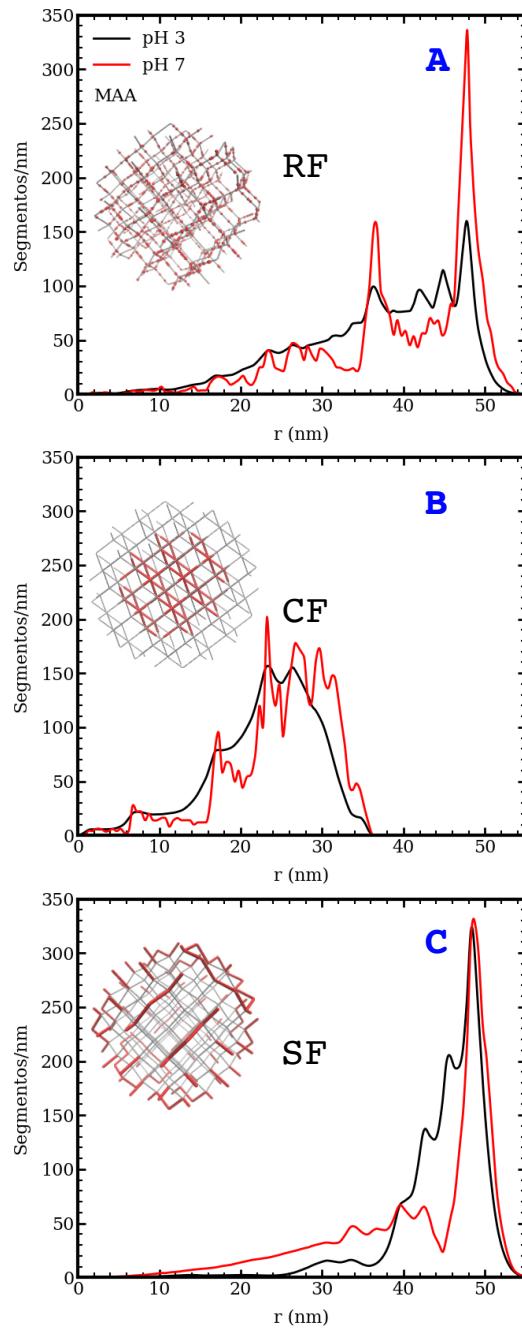


Figura 4.4: Distribución radial de segmentos MAA, $\lambda_{MAA}(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a un nanogel de MAA-VA diferente que tienen una funcionalización de red particular y 22% MAA. Estos grupos funcionales están completamente protonados (sin carga) a pH 3 y completamente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

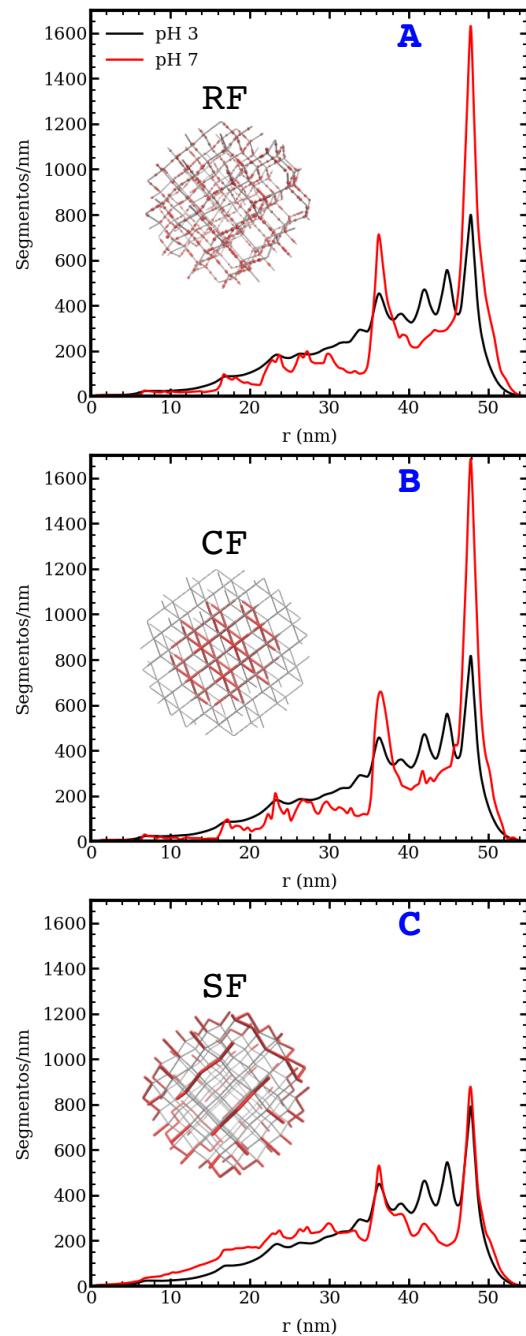


Figura 4.5: Distribución radial de todos los segmentos que componen la estructura del nanogel, $\lambda(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3} M$ NaCl; cada panel corresponde a una funcionalización diferente

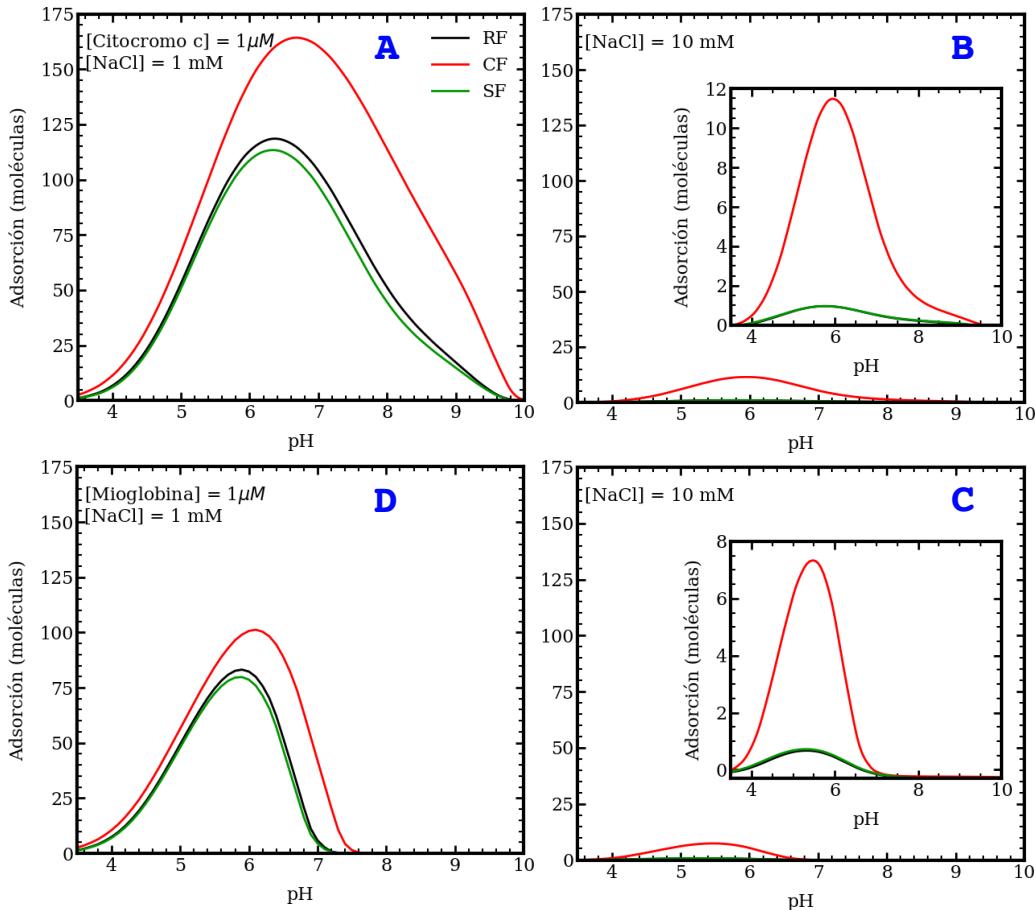


Figura 4.6: Gráficos del exceso de adsorción Γ de citocromo c (paneles A y B) y mioglobina (paneles C y D) a nanogeles MAA-VA en función del pH. La concentración de sal es $10^{-3} M$ en los paneles del lado izquierdo (A y C) y $10^{-2} M$ en los paneles del lado derecho (B y D); Se muestra una ampliación de la adsorción. Estos nanogeles tienen 22% MAA; la concentración de proteína es $10^{-6} M$.

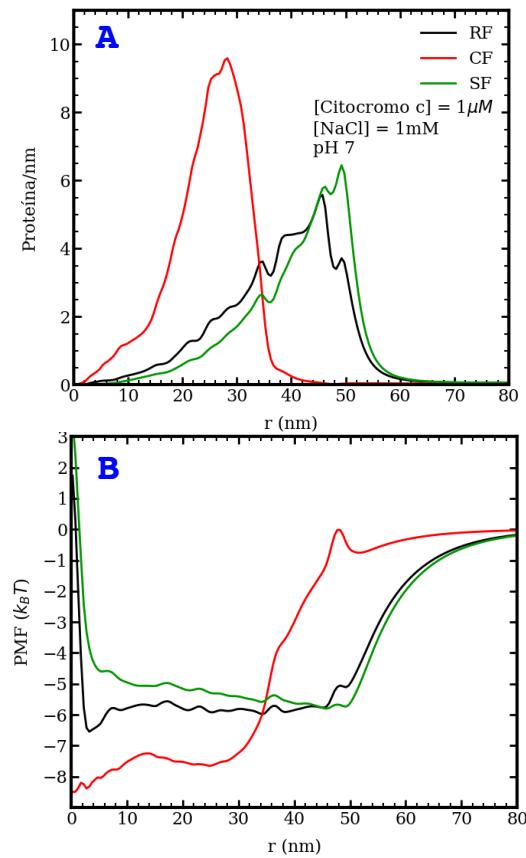


Figura 4.7: Panel A: Gráfico de la distribución radial de las moléculas de citocromo c, $\langle N(r) \rangle$, en función de la posición de los nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones. Estas redes tienen 22% MAA, el pH es 7, la concentración de proteína es de $10^{-6} M$ y la concentración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

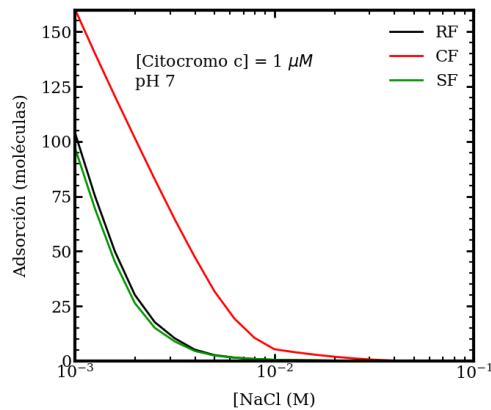


Figura 4.8: Plot of the excess adsorption Γ of cytochrome c as a function of salt concentration at pH 7 for MAA-VA nanogels with different network functionalizations having 22% MAA; protein concentration is $10^{-6} M$.

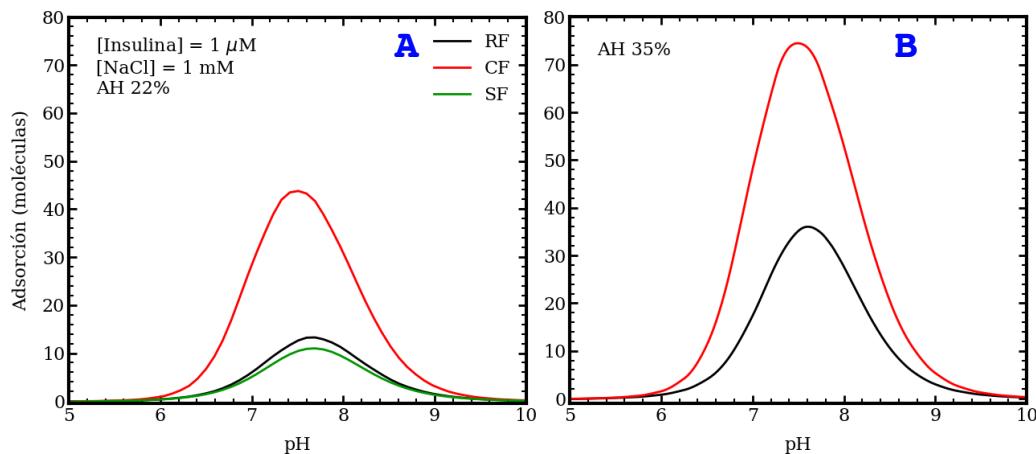


Figura 4.9: Plots of adsorbed insulin molecules, Γ , as a function of pH for AH-VA nanogels having different functionalizations. The AH content is 22% for the polymer networks of panel A and 35% for those of panel B (this latter degree of functionalization cannot be achieved for the SF nanogel). Other conditions are $10^{-3} M$ NaCl, and $[Insulin] = 10^{-6} M$.

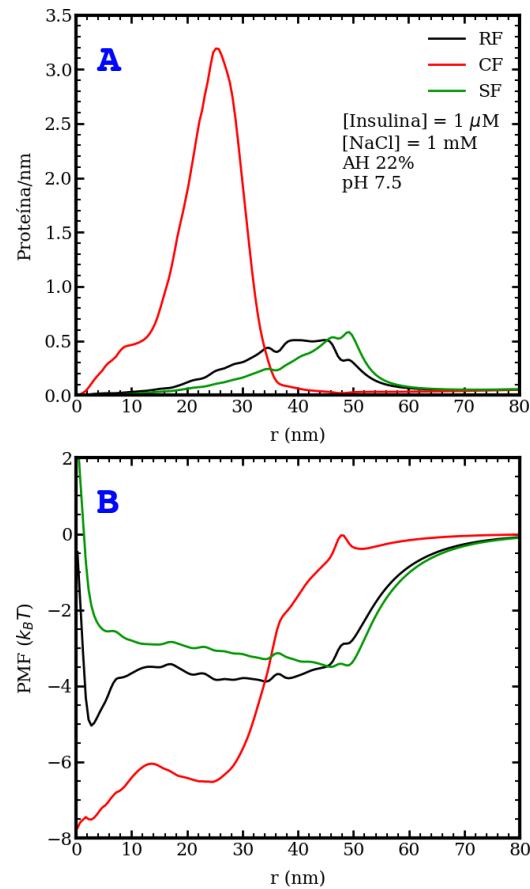


Figura 4.10: A: Plot of the local distribution of insulin molecules, $\langle N(r) \rangle$, as a function of position for AH-VA nanogels having 22% pH-sensitive segments in different network configurations. pH is 7.5, 10^{-6} M insulin and 10^{-3} M NaCl. B: Potential of mean force, $PMF(r)$, as a function of position for the same conditions as panel A.

Chapter 5

Soluciones coloidales

5.1 Introducción

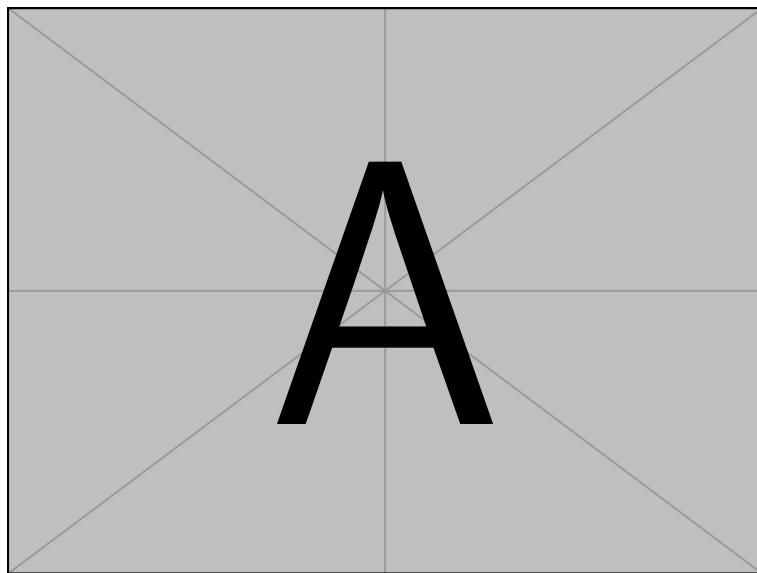
En los últimos capítulos, hemos hecho hincapié en la importancia y el potencial uso de los geles poliméricos. Dado el tema de investigación de esta tesis nos hemos enfocado especialmente en su aplicación para el secuestro de proteínas y/o fármacos de interés terapéutico. En este sentido, en los dos últimos capítulos hemos presentado dos tipos de modelos que permiten estudiar la fisicoquímica de un nano/microgel aislado en solución. En el capítulo 3 hemos hecho referencia a un modelo robusto, un modelo de dos fases, con el cual logramos explicar la respuesta de los microgeles con respuesta a múltiples estímulos. Como los cambios en pH, temperatura o concentración de sal afectan a la capacidad de adsorber y liberar distintas moléculas, así como sus cambios de tamaño y carga. En el siguiente capítulo,⁴ se ha complejizado nuestro modelo para investigar cómo la estructura interna afecta la respuesta de estos geles. Al hacer esto obtuvimos nueva información que no era accesible con el modelo anterior: localización de la adsorción y reordenamiento de la estructura interna de los geles debido a estímulos externos. Con el modelado propuesto en capítulo 4 se ha podido demostrar que el diseño de la estructura de los nanogeles, pensar en distintas estrategias de síntesis, son factores importantes para optimizar los procesos de encapsulación y liberación de proteínas. Siendo este uno de los primeros pasos, a nivel experimental, para el diseño de trasnportadores de drogas.

Para poder acercanos más a estos modelos experimentales damos un paso hacia

las soluciones de nanogeles. En los capítulos previos se han considerado geles aislados, o en un dilución infinita. En este último capítulo, indagaremos la fisicoquímica de las soluciones de nanogeles. Como se ven afectados los comportamientos individuales, ya reportados en los capítulos anteriores, ahora en función de la cantidad de ellos en solución, es decir que tan concentrados se encuentren la solución. En esta primera aproximación usamos como método de estudio simulaciones del tipo MonteCarlo y como referencia se utiliza el modelo y teoría del sistema de dos fases presentado en el capítulo 3. En la siguiente sección mostraremos cómo lo incorporamos y hablamos de “modelo de referencia”.

5.2 Método: Simulación Monte Carlo

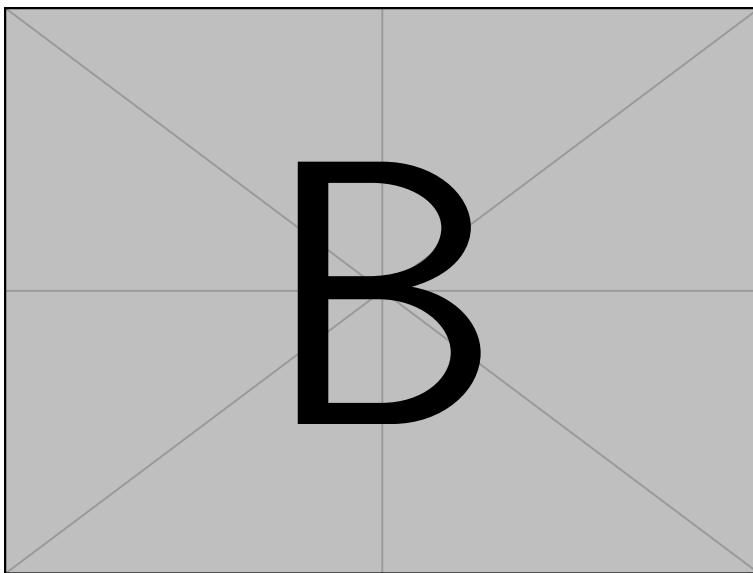
La simulación de sistemas de nanogeles en solución es una herramienta invaluable para comprender su comportamiento y sus propiedades termodinámicas. En este estudio, se empleó el método Monte Carlo, en particular el algoritmo de Metropolis-Monte Carlo, para modelar la solución de nanogeles. El método de Metropolis-Monte Carlo [REFs] se fundamenta en la generación aleatoria de números y la evaluación de distintos estados o configuraciones del sistema en estudio. En cada paso de la simulación, se selecciona de manera aleatoria una configuración y se calcula su energía o probabilidad según un modelo predefinido. Este modelo debe poder describir las interacciones entre los componentes del sistema, en nuestro caso son las partículas de nanogeles y el solvente. La simulación Monte Carlo, mediante el algoritmo de Metropolis-Monte Carlo nos ofrece una perspectiva única para explorar las propiedades de los nanogeles en solución y su comportamiento en diferentes condiciones. En el caso específico de nuestra solución de nanogeles, una configuración consiste en el movimiento y aumento de tamaño de una partícula (nanogel) seleccionada al azar. [agregar esquema de paso de simulación.](#)



En este sentido la probabilidad de aceptar o no dichos cambios en el sistema viene dada por:

$$P(s) = \min\{e^{-(\Delta U_{inter}^s + \Delta U_{intra}^s)}, 1\} \quad (5.1)$$

En donde $P(s)$ indica la probabilidad de aceptación del estado s , este estado consta de un cambio en el tamaño y posición de una nanogel. ΔU_{intra}^s corresponde al cambio en la energía interna de cada nanogel, debido a un cambio en su tamaño, la energía de estos estados es obtenida usando una teoría termodinámica detallada en el capítulo 3. El modelo de dos fases nos permite obtener la información termodinámica necesaria para explicar el comportamiento de una nanogel aislado. El costo energético de adsorber solvente, con sus respectivo iones, energía elástica, entropías de mezcla, entre otros (discutidos en el cap. 3). En particular la energía que se toma de referencia corresponden a las de la figura 3.1 que nos muestra como cambia la energía del microgel (para esta figura) en función de su tamaño. Los resultados que mostraremos más adelante corresponden a nanogeles, tamaño menor a 200 nm. La energía interna de estos geles puede verse en la . La cual corresponde a un nanogel con 2×10^5 monómeros totales repartidos en 1000 cadenas. [figura de \$\Omega/V\$ vs R](#)



Por otro lado la energía intermolecular, ΔU_{inter} , viene dada por la interacción de a pares de todos los nanogeles en solución. Para esta interacción de a pares se ha utilizado un potencial combinado: Hertz-Yukawa. Este potencial fue previamente utilizado en [REFs: weyer2018concentration] , en los cuales [REFs: weyer2018concentration] estudiaron la hinchazón y las propiedades estructurales de suspensiones de microgeles iónicos su teoría incluye las interacciones elásticas efectivas de Hertz y una teoría de interacciones electrostáticas efectivas dependientes de la densidad (Yukawa). (un poco más de los potenciales) Porque los podemos usar para nuestro sistema.. Estamos trabajamos con materiales blandos que son deformables, por tanto es posible modelarlos usando un potencial de Hertz, en el cual se considera la superposición de las partículas involucradas. Yukawa por su parte es un potencial del tipo columbico mediado por el medio dielectrico en el que se encuentra. Se ven involucradas las cargas que envuelven a cada nanogel considerando la longitud de Debye. Podemos resumir nuestro potencial total de trabajo como:

$$U_{inter}(r) = \begin{cases} U_H + U_Y & \text{if } r \leq a_i + a_j \\ U_Y & \text{if } r > a_i + a_j \end{cases} \quad (5.2)$$

en donde r es la distancia entre dos nanogeles, definida como la distancia de sus centros. a_i y a_j representan los radios de el nanogel i y j respectivamente. Por ello la

condición $r \leq a_i + a_j$ representa la superposición de estas partículas, deformándose y entrando en juego el potencial de Hertz. Para mayores distancia a la suma de los radios de cada nanogel se pone en juego el potencial de Yukawa. Para el cual se define:

$$\beta u_Y(r) = q_i q_j \frac{e^{\kappa(a_i+a_j)}}{(1+\kappa a_i)(1+\kappa a_j)} \frac{e^{-\kappa r}}{r} \quad (5.3)$$

En donde q_i y q_j son las cargas netas que poseen los nanogeles i y j respectivamente. El valor κ corresponde a la constante de apantallamiento de Debye. El potencial de Hertz, U_H , se define como:

$$\beta u_H(r) = \left(\frac{1-r}{a_i + a_j} \right)^{5/2} \times b_{12} \quad (5.4)$$

En donde b_{12} es la constante de interacción entre las partículas la cual depende de las propiedades elásticas del nanogel a través del módulo de Young Λ y el radio de Poisson ν . [REFs: landau] La teoría de escalado en sistemas de redes poliméricas predice que en buenos solventes [REFs] que el módulo de Young escala linealmente con la temperatura y la densidad de los entrecruzamientos (o número de cadenas): $\Lambda \approx TN_{ch}/v$. Cuanto más densos sean los entrecruzamientos, más rígido será el gel. Con lo cual podemos definir $b_{12}^* = \beta b_{12}$ el cual nos independiza de la temperatura y solo tenemos la dependencia con el número de cadenas (N_{ch}) y grado de entrecruzamiento de nuestro nanogel.

5.2.1 Potencial zeta (ζ)

Además de poder observar las fluctuaciones en los cambio de tamaño de los nanogeles es posible el cálculo de ciertas propiedades de las mismas. Entre ellas están el potencial zeta (ζ). Este potencial se define como... El potencial zeta es una medida de la carga eléctrica neta en la superficie de una partícula coloidal, en este caso un nanogel. El potencial zeta afecta la estabilidad de las partículas coloidales, su viscosidad y su interacción con otras partículas. En los nanogeles, el potencial zeta se genera por las cargas eléctricas de las cadenas poliméricas que forman la red

del gel. Las cadenas pueden tener carga positiva o negativa, dependiendo de los grupos funcionales que contengan. De este modo el potencial zeta puede ser positivo, negativo o neutro.

El potencial zeta de un nanogel afecta su estabilidad de varias maneras. Cuando el potencial zeta es positivo, los nanogel se repelen entre sí, lo que hace más estable en solució. Cuando el potencial zeta es negativo, las partículas del nanogel se atraen entre sí, lo que puede hacer que los nanogeles se aglomeren. Las cargas negativas de las superficies de los nanogeles no est n directamente en contacto entre sí. Estas cargas se encuentran separadas por una capa de agua. El agua tiene una carga positiva neta, por lo que las cargas negativas de los nanogeles son atraídas por la capa de agua. Esta atracción es más fuerte que la repulsión entre las cargas negativas, por lo que los nanogeles se aglomeran.

Luego el potencial zeta puede definirse como: [REFs: libro S&C]

$$\zeta(a) \propto \frac{Z_{net}}{a} \frac{1}{1 + ka} \quad (5.5)$$

en donde k es la inversa de la longitud de Debye, a es el radio del nanogel y Z_{net} es la carga neta que se observa del nanogel al considerarlo como un nano-ion [REFs: Denton 2003] . Esta carga se deriva de la interacción electrostática que ocurre con la partícula y los contraiones que lo rodean:

$$Z_{net}(a) = (1 + ka)e^{-ka} \frac{3Z}{k^2 a^2} \left(\cosh(ka) - \frac{\sinh(ka)}{ka} \right) \quad (5.6)$$

en donde Z es definida como la carga originada por el grado de carga de los segmentos cargados que componen al nanogel.

5.3 Resultados

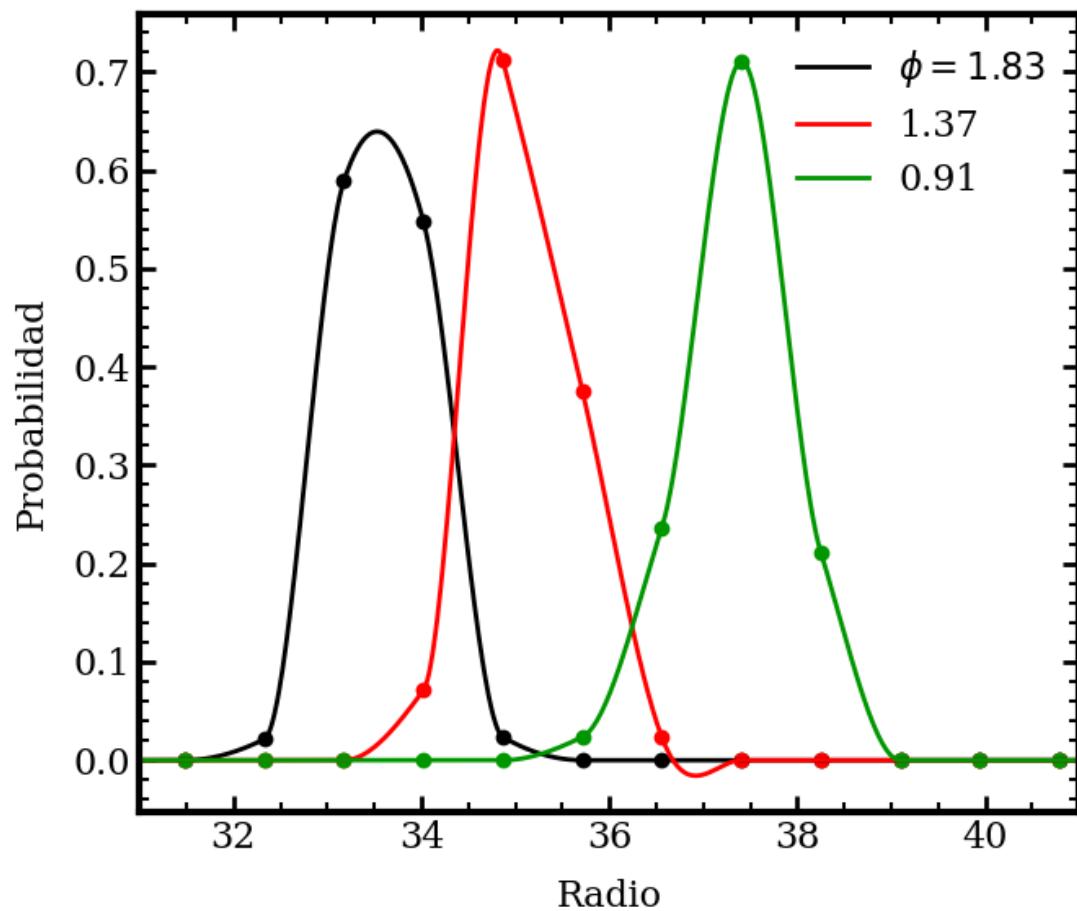


Figura 5.1: Gráfico del probabilidad de tamaño de la solución de nanogeles en función de la densidad... fracción de volumen ocupada.

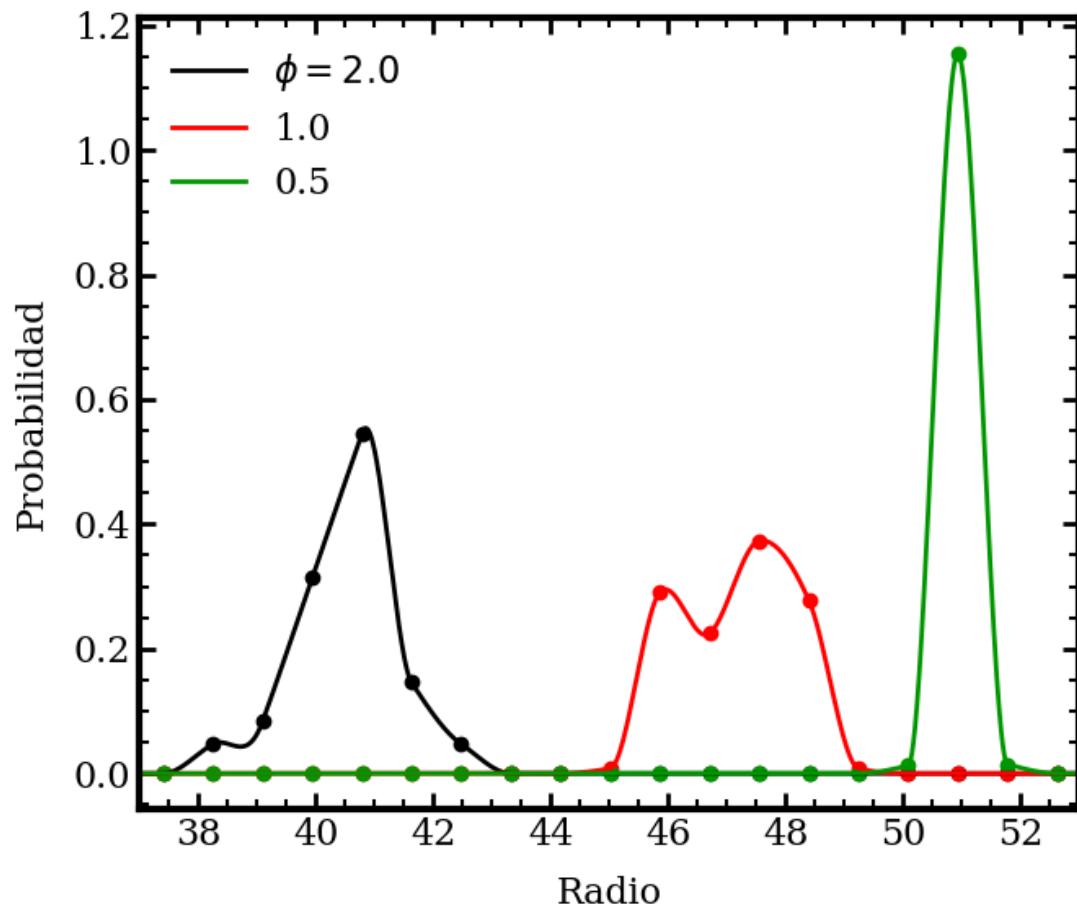


Figura 5.2: Gráfico del probabilidad de tamaño de la solución de nanogeles en función de la densidad... fracción de volumen ocupada. nanogel más flexible... 200 monomeros por cadena. 2e5 monomeros totales. radio medio aislado $= 51$ nm

B:

.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):

$$Q = \frac{q^N}{N!} \quad , \text{ donde } q = \frac{V z_n}{\Lambda^3} \quad (7)$$

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:

$$\begin{aligned} \beta F_{mix} &= -\ln Q = -\ln \frac{1}{N!} \left(\frac{V Z_n}{\Lambda^3} \right)^N \\ &= N \ln N - N - N \ln \left(\frac{V Z_n}{\Lambda^3} \right) \\ &= N \left[\ln \frac{N \Lambda^3}{V Z_n} - 1 \right] = N \left[\ln \frac{N \Lambda^3 v_w}{V Z_n v_w} - 1 \right] \\ &= N \left[\ln \rho v_w + \ln \frac{\Lambda^3}{Z_n v_w} - 1 \right] \\ &= N \left[\ln \rho v_w + \ln \mu^0 - 1 \right], \quad \mu^0 = \frac{\Lambda^3}{Z_n v_w} \end{aligned} \quad (8)$$

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

$$\beta f_{mix} = \rho(r) \left[\ln \rho(r) v_w + \ln \mu^0 - 1 \right] \quad (9)$$

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

$$\beta F_{mix} = \int_V d^3r \beta f_{mix} = \int_V d^3r \rho(r) [\ln \rho(r) v_w + \ln \mu^0 - 1] \quad (10)$$

.2 Energía química y de mezcla del gel

El segundo término de la ecuación **energía** 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:

$$\int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} [f(r)\beta\mu_{MAA^-}^0 - (1-f(r))\beta\mu_{MAAH}^0] \quad (11)$$

$$\int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} [f(r)(\ln f(r) + (1-f(r))(\ln(1-f(r)))] \quad (12)$$

En donde en la 11 $\int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}}$ 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...

.1 Nanogel network configurations

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.

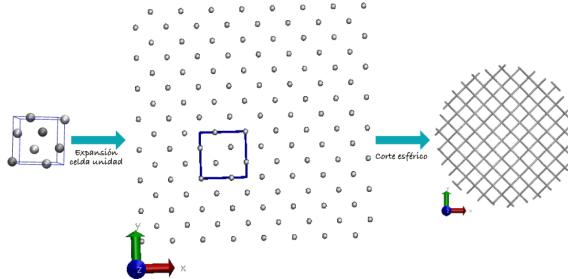


Figura 3: Estructura base para la generación de configuraciones de nanogels

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

$$V_{LJ} = \begin{cases} 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \epsilon & \text{if } r_{ij} < 2^{1/6}\sigma \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases} \quad (13)$$

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:

$$V_{fb}(r_i) = \begin{cases} 0 & \text{if } r_i < r_{fb} \\ \frac{1}{2}k_{fb}(r_i - r_{fb})^2 & \text{otro.} \end{cases} \quad (14)$$

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

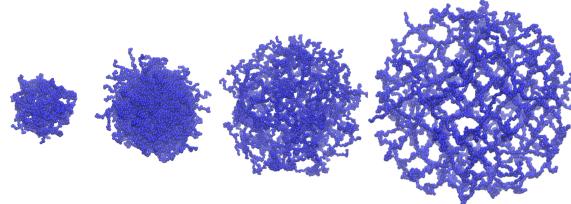


Figura 4: Diferentes radios originados con el potencial armónico de restricción.

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.

A: Resolución numérica

.1 Resolución numérica: films

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 capaz reemplazan a las integrales a lo largo del eje z .

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

$$1 = \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(i_z) \rangle v_{\lambda} + \langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle v_{MAA} \right], \text{ with } i_z = 1, 2, 3.., n_z \quad (15)$$

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, convergan a sus valores en el baño térmico (el bulk de la solución). Es decir: $\rho_{\gamma}(n_z) = \rho_{\gamma}^b$, $\rho_{pro}(\theta, n_z) = \rho_{pro}^b(\theta)$ 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 2.2, obtenemos para la densidad discreta de las especies libres:

$$\rho_{\gamma}(i_z) v_w = a_{\gamma} \exp[-\beta q_{\gamma} \psi(i_z)] \exp[-\beta v_{\gamma} \pi(i_z)] \quad (16)$$

El grado de disociación:

$$\frac{f_j(i_z)}{1 - f_j(i_z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_j \psi(i_z)] \quad (17)$$

en donde j hace referencia a los segmentos de MAA del film y los segmentos titulables τ de la proteína. 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:

$$\langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle = \sum_{\alpha} P(\alpha) \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \quad (18)$$

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

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \ln f(i_z) \right] \\ & \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta q_{MAA} \psi(i_z) \right] \\ & \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta v_{MAA} \pi(i_z) \right] \end{aligned} \quad (19)$$

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 de la proteína se expresa:

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, i_z) v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[-A\delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\tau}(\theta, i_z, j_z) \ln f_{\tau}(j_z) \right] \\ & \prod_{\lambda} \exp \left[-A\delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\lambda}(\theta, i_z, j_z) [v_{\lambda} \beta \pi(j_z) + q_{\lambda} \psi(j_z)] \right] \end{aligned} \quad (20)$$

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

obtenemos:

$$\epsilon \frac{\psi(i_z + 1) + \Psi(i_z - 1) + 2\psi(i_z)}{\delta^2} = \langle \rho_q(i_z) \rangle \quad (21)$$

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

$$\langle \rho_q(i_z) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_z) \langle \rho_{pro,\tau}(i_z) \rangle q_{\tau} + f(i_z) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_z) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (22)$$

Así como fueron definidas las condiciones de contorno en la ecuación 2.32 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:

$$\frac{\psi(1) - \psi(0)}{\delta} = 0 \quad (23)$$

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 proteína. 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 15 y 21. 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.

.2 Resolución numérica: 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:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(i_r) \rangle v_{\lambda} + \sum_i \langle \phi_i(i_r) \rangle \quad (24)$$

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:

$$\frac{f(j_r)}{1 - f(j_r)} = \left(\frac{a_{H^+}}{k_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta q_{MAA} - \psi(i_r)} \quad (25)$$

For the free species:

$$\rho_{\gamma}(i_r) v_w = a_{\gamma} \exp[-\beta \psi(i_r) q_{\gamma}] \exp[-\beta \pi(i_r) v_w] \quad (26)$$

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

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, i_r) v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_{\tau}(\theta, i_r, j_r) \ln f_{\tau}(j_r) \right] \\ & \times \prod_{\lambda} \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_{\lambda}(\theta, i_r, j_r) (\beta \pi(j_r) v_{\lambda} + \beta \psi(j_r) q_{\lambda}) \right] \end{aligned} \quad (27)$$

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

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \prod_{r_j} \prod_i \exp \left[-\beta \pi(r_j) \tilde{\phi}_r^i(\alpha, r_j) \right] \\ & \times \prod_{r_j} \exp \left[-\beta \psi(r_j) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} q_{MAA} \right] \\ & \times \prod_{r_j} \exp \left[-\ln(f(r_j)) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (28)$$

donde:

$$\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_i) = \int_{r_i-\delta/2}^{r_i+\delta/2} dr \phi_r^{MAA}(\alpha, r) \quad (29)$$

La ecuación de Poisson se escribe:

$$\epsilon \frac{\psi(i_r + 1) - 2\psi(i_r) + \psi(i_r - 1)}{\delta^2} + 2\epsilon \frac{\psi(i_r + 1) - \psi(i_r)}{(i_r - 0.5)\delta^2} = -\langle \rho_q(i_r) \rangle \quad (30)$$

en donde la densidad de carga se define:

$$\langle \rho_q(i_r) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_r) \langle \rho_{pro,\tau}(i_r) \rangle q_{\tau} + f(i_r) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (31)$$

Nuestras condiciones de contorno se reescriben:

$$\frac{\psi(1) - \psi(0)}{\delta} = 0 \quad (32)$$

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 24) y (30. 21. 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] 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}.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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>.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.

- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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>.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.

- [22] 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>.
- [23] 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>.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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>.

- [29] 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>.
- [30] 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.
- [31] 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>.
- [32] 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>.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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>.
- [39] 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.
- [40] 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>.
- [41] 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.

- [42] 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.
- [43] 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>.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] Linda S Hirst. *Fundamentals of soft matter science*. CRC press, 2019.
- [50] 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.

- [51] 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>.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 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>.
- [56] R Jayakumar, Amrita Nair, N Sanoj Rejinald, 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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>.
- [64] 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.
- [65] 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.

- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] Ray N Lawson and Mohammed Saeed Chughtai. Breast cancer and body temperature. *Canadian medical association journal*, 88(2):68, 1963.
- [70] 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.
- [71] 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>.
- [72] 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.
- [73] 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.

- [74] 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.
- [75] 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.
- [76] 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>.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] 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>.
- [80] 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.
- [81] 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>.
- [82] 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>.
- [83] 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.
- [84] 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>.
- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] N Metropolis. Rosenbluth,. n.; teller, a. h.; teller. *E. J. Chem. Phys.*, 21(1087):14, 1953. doi: 10.1063/1.1699114.
- [88] Nurit Mirkin, Jean Jaconcic, Vivian Stojanoff, and Abel Moreno. High resolution x-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its

- application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(1):83–92, 2008. doi: 10.1002/prot.21452.
- [89] 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.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [95] J Th Overbeek. The donnan equilibrium. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.*, 6(1):57–84, 1956.
- [96] 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.
- [97] Néstor A Pérez-Chávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Using polymer hydrogels for glyphosate sequestration from aqueous solutions: molecular theory study of adsorption to polyallylamine films. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02727.
- [98] 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.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] Néstor A Pérez-Chávez, Alberto G Albesa, and Gabriel S Longo. Thermodynamic theory of multiresponsive microgel swelling. doi: 10.1021/acs.macromol.0c02885.
- [102] 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.
- [103] 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.
- [104] Néstor Ariel 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. ISSN 1744-6848. doi: 10.1039/D0SM00951B. URL <http://dx.doi.org/10.1039/D0SM00951B>.
- [105] 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>.
 - [106] 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.
 - [107] 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.
 - [108] 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.
 - [109] 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.
 - [110] 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.
 - [111] 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.
- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] Ricarda Schroeder, Andrey A. Rudov, L. Andrew Lyon, Walter Richtering, Andrij Pich, and Igor I. Potemkin. Electrostatic Interactions and Os-

- motic 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.
- [119] 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.
- [120] 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.
- [121] 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>.
- [122] Gurkan Sin and Antonio Espuña. Applications of monte carlo method in chemical, biochemical and environmental engineering, 2020.
- [123] 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.
- [124] 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.
- [125] I Szleifer. Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: a theoretical approach. *Biophysical journal*, 72(2):595–612, 1997.

- [126] 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.
- [127] 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.
- [128] Ian F Tannock and Daniela Rotin. Acid ph in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer research*, 49(16):4373–4384, 1989.
- [129] Madeline Torres-Lugo, Marcos García, Rae Record, and Nicholas A Pеппас. Physicochemical behavior and cytotoxic effects of p(methacrylic acid-g-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>.
- [130] Sandra Van Vlierberghe, Peter Dubruel, and Etienne Schacht. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*, 12(5):1387–1408, 2011. doi: 10.1021/bm200083n.
- [131] Tina Vermonden, Roberta Censi, and Wim E Hennink. Hydrogels for protein delivery. *Chemical reviews*, 112(5):2853–2888, 2012. doi: 10.1021/cr200157d.
- [132] Alexander Wittemann and Matthias Ballauff. Interaction of proteins with linear polyelectrolytes and spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(45):5269–5275, 2006. doi: 10.1039/B609879G.
- [133] 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.

- [134] Chi Wu and Shuiqin Zhou. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous? *Macromolecules*, 30(3):574–576, 1997. doi: 10.1021/ma960499a.
- [135] 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.
- [136] Tao Wu, Peng Gong, Igal Szleifer, Petr Vlček, 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, nov 2007. ISSN 0024-9297. doi: 10.1021/ma0710176. URL <https://doi.org/10.1021/ma0710176>.
- [137] 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.
- [138] 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.
- [139] 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.
- [140] Xi Zhang, Ying Guan, and Yongjun Zhang. Ultrathin hydrogel films for rapid optical biosensing. *Biomacromolecules*, 13(1):92–97, 2012. doi: 10.1021/bm2012696.
- [141] Zhongmeng Zhu, Zhioran Yang, Yan Xia, and Han Jiang. A review of debond-

- ing behavior of soft material adhesive systems. *Mechanics of Soft Materials*, 4(1):7, 2022. doi: 10.1007/s42558-022-00045-2.
- [142] 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>.