

UNIVERSIDAD DE ALGÚN SITIO

ESCUELA DE INGENIERÍA Y CIENCIAS

EJEMPLO DE UNA TESIS

TESIS PRESENTADA POR JUAN ANTONIO NAVARRO PÉREZ
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

2023

Departamento de Sistemas Computacionales

Contents

1	Introducci'ón	4
1.1	Materia Blanda	4
1.1.1	Objetivos	6
1.1.2	Films polimricos	7
1.1.3	Subsection 2	7
1.2	Main Section 2	7
2	Metodología	11
2.1	Teroría Molecular	11
2.2	Modelado	14
2.2.1	Generación de configuraciones	14
3	Films poliméricos	16
3.0.1	pH y algo más...	16
3.0.2	Adsorción	22
4	Geles poliméricos	25
4.1	Modelo sencillo: 2 fases	25
4.1.1	Fase Microgel	28
4.1.2	Fase solución	33
4.1.3	Minimización gráfica	33
4.1.4	Absorción	35
4.2	Resultados y discusión	37
4.2.1	Respuesta al pH y la concentración de sal	37
4.2.2	Respuesta a la Temperatura	42

4.2.3	Efecto del grado de entrecruzamiento	46
4.2.4	Adsorción de drogas	47
5	esfericas	51
5.1	Introduction	51
5.2	Method: Molecular Theory	53
5.2.1	Theoretical Framework	53
5.2.2	Molecular Model: Proteins	55
5.2.3	Molecular model: Nanogel Network	55
5.3	Results and discussion	58
5.3.1	Nanogel response	58
5.3.2	Protein adsorption to MAA-based nanogels	62
5.3.3	Insulin adsorption AH-based nanogels	68
5.4	Conclusions	70
	Bibliography	72

Chapter 1

Introducci'on

1.1 Materia Blanda

Durante la decada pasada el uso de materiales blandos ha sido de mucho interes debido a la cantidad de materiales e innovaciones que se obtienen con ellos.

La versatilidad de estos los han convertido en materiales importantes en una amplia variedad de aplicaciones tecnologicas. Se han utilizado como espumas y adhesivos, son excelente detergentes, están presentes en la industria de los cosmeticos y pinturas, además de ser ampliamente usados en aditivos alimentarios . El campo de la medicina, la industria farmaceutica, ha encontrado en estos materiales una oportunidad para la creación de de trasportadores de drogas más eficientes biocompatibles y biodegradables.

En estas ultimas aplicaciones los films y geles poliméricos han sido pioneros en su uso y han tenido un creciente interés. La capacidad de adsorber solventes y la estructura de cadenas entrelazadas proporciona condiciones adecuadas para la adsorcion y proteccion de adsorbatos de inters. [REFs] Estas caractersticas permiten que las drogas/proteinas adsorbidas interactuen con el solvente en el cual son solubles. La proteccion es debido a la restriccin de entrada de otros agentes, adems de evitar el movieminto libre de la droga. Aspecto muy importante si se consideran proteinas y se quiere evitar su desplegamiento. Sin embargo la caracteris ms notoria de estos materiales es su capacidad de responder a diversos estmulos. Muchos estudios han reportado la respuesta a la temperatura de estos materiales, entre los más conoci-

dos se encuentra PNIPAm, Pluronic, elastin-like polypeptides (ELP) and poly(N-vinylcaprolactam) (PNVCL).

Interest in thermoresponsive polymers has steadily grown over many decades, and a great deal of work has been dedicated to developing temperature sensitive macromolecules that can be crafted into new smart materials.

However, the overwhelming majority of previously reported temperature-responsive polymers are based on poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM), despite the fact that a wide range of other thermoresponsive polymers have demonstrated similar promise for the preparation of adaptive materials. Herein, we aim to highlight recent results that involve thermoresponsive systems that have not yet been as fully considered. Many of these (co)polymers represent clear opportunities for advancements in emerging biomedical and materials fields due to their increased biocompatibility and tuneable response. By highlighting recent examples of newly developed thermoresponsive polymer systems, we hope to promote the development of new generations of smart materials.

Este comportamiento responsivo hace de estos materiales excelentes candidatos en el secuestro de particulas, intercambios ionicos lo cual permite el dise'no de transportadores. [here](#)

El diseo de dispositivos inteligentes optimizados para tareas especificas basados en estos sistemas blandos demanda un estricto control sobre sus propiedades fisico-quimicas y la respuesta de estos geles. Por lo tanto, su diseo requiere el desarrollo de modelos que permitan entender y predecir cmo el comportamiento observado resulta de la interrelacin entre la estructura quimica del polmero que lo componen, la organizacin molecular bajo condiciones de confinamiento, las interacciones entre especies y las propiedades del medio en el que se encuentren.

Por ejemplo, en la actualidad desarrollar materiales que respondan a mltiples estmulos (pH y temperatura) de manera predecible y controlable representa un desafo enorme. [\[REFs\]](#)

1. materiales con respuesta a Temperaruta y como cambia su respuesta al modificar la arquitectura... film y gel.
2. para materiales con solo respuesta a pH, como el cambio en la concentraci'3n salina del medio afecta la respuesta de los geles.

3. trabajos experimentales de copolimeros, como se afectan entre ellos la respuesta de cada uno.

...fin de la tesis, estudio te'orico haciendo uso de simulaciones computacionales para el desarrollo de nuevos materiales capaces de responder a estimulo, una caracterizaci'on exhaustiva de sus propiedades fisicoqu'micas.

Descripci'on generica de los obsetivos... uso de la TM y familiarizaci'on de la misma con hidrogeles de homopolimeros, como responden y pueden servir para la captura de moleculas. Uso de estos materiales para fines ambientales... Del mismo modo estudiar microgeles en un modelo sencillo como primera aproximaci'on. Fisi-quimica de geles homogeneos y con respuesta a multi estimulo. Adsorci'on de drogas terapeuticas, condiciones optimcas de encapsulamiento. Complejizaci'on de la teor'ia para modificar parametros de estructura, es decir como afectan los cambios de topologia de estos geles. Adsorci'on de biomoleculas. Nueva inormaci'on sobre la arquitectura de los geles y su relaci'on con la adsorci'on de proteinas. Finalmente, m'etodo estocastico para el estudio de soluciones de geles polimericos. En un modelo sencillo. C'omo la concentraci'on afecta la distribuci'on de tama'no, adsorci'on, etc.

1.1.1 Objetivos

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

1. Desarrollar un modelo mecano-estadstico utilizando TM para describir la respuesta a cambios de pH, temperatura y concentracin de sal en microgeles formados por homopolimeros.
2. Extender dicho modelo para investigar el comportamiento de microgeles de copolimeros con respuesta a mltiples estmulos.
3. Estudiar los mecanismos de adsorcin de diferentes biomolculas en los microgeles en funcin de las condiciones del medio y la estructura/composicin quimica de las cadenas polimricas.
4. Desarrollar un modelo combinando simulaciones de TM y Dinmica Molecular (DM) para estudiar el comportamiento de estos microgeles en soluciones relativamente concentradas.

1.1.2 Films polimricos

Los hidrogeles de cadenas de polmeros reticulados se consideran actualmente para diversas aplicaciones en la investigacin biomdica. Estos materiales pueden parecerse al tejido biol'gico y dise'ñarse para responder a cambios ambientales como variaciones de temperatura, pH, fuerza i'nica y en la concentraci'3n de algunas biomol'culas. Como resultado, los hidrogeles polim'ricos actualmente son candidatos prometedores para el desarrollo de una variedad de biomateriales con aplicaciones para biodeteccin [1,2], ingenier'ia de tejidos [3,4], regeneraci'3n '3sea [5], materiales biomim'eticos [6,7], administraci'3n de f'armacos [8,9] y muchas otras aplicaciones biom'edicas [10]. Estos hidrogeles responden a los cambios de pH porque contienen una cantidad significativa de grupos cidos dbiles.

1.1.3 Subsection 2

Morbi rutrum odio eget arcu adipiscing sodales. Aenean et purus a est pulvinar pellentesque. Cras in elit neque, quis varius elit. Phasellus fringilla, nibh eu tempus venenatis, dolor elit posuere quam, quis adipiscing urna leo nec orci. Sed nec nulla auctor odio aliquet consequat. Ut nec nulla in ante ullamcorper aliquam at sed dolor. Phasellus fermentum magna in augue gravida cursus. Cras sed pretium lorem. Pellentesque eget ornare odio. Proin accumsan, massa viverra cursus pharetra, ipsum nisi lobortis velit, a malesuada dolor lorem eu neque.

1.2 Main Section 2

Sed ullamcorper quam eu nisl interdum at interdum enim egestas. Aliquam placerat justo sed lectus lobortis ut porta nisl porttitor. Vestibulum mi dolor, lacinia molestie gravida at, tempus vitae ligula. Donec eget quam sapien, in viverra eros. Donec pellentesque justo a massa fringilla non vestibulum metus vestibulum. Vestibulum in orci quis felis tempor lacinia. Vivamus ornare ultrices facilisis. Ut hendrerit vulputate. Morbi condimentum venenatis augue, id porta ipsum vulputate in. Curabitur luctus tempus justo. Vestibulum risus lectus, adipiscing nec condimentum quis, condimentum nec nisl. Aliquam dictum sagittis velit sed iaculis. Morbi

tristique augue sit amet nulla pulvinar id facilisis ligula mollis. Nam elit libero, tincidunt ut aliquam at, molestie in quam. Aenean rhoncus vehicula hendrerit.

Existen dos tipos de citas bibliograf'icas: usa `\citep{..}` para citas en *par'entesis* y `\citet{..}` para citas en el *texto*. Por ejemplo, estudios reciente han mostrado nuevos e interesantes modelos que se pueden aplicar para reformular teor'ias f'isicas [?]. Mientras que, el trabajo de ?] fue considerado muy divertido por una significativa fracci'on de la comunidad de investigadores. Tambi'en es posible citar a varios trabajos en una sola referencia [? ?].

Estos comandos para producir citas bibliograficas son provistos por el paquete **natbib**. Para obtener m'as informaci'on, consulta la documentaci'on de ese paquete [?]. Por su parte, en la documentaci'on de **geometry** puedes encontrar detalles adicionales sobre el sistema para ajustar los m'argenes del documento [?]. Lo que sigue es un mont'on de texto sin sentido en lat'in que utilizaremos para llenar algunas p'aginas.

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Integer arcu nisl, consectetur ut, vehicula nec, blandit id, nulla. Vestibulum in odio a odio volutpat sollicitudin. Donec congue porta tellus. Ut quis est sed velit blandit fringilla. Nunc lobortis dui vitae sapien. In tincidunt magna eget purus. Nam lorem quam, vehicula in, dictum et, congue eget, odio. Curabitur gravida mi id dui. Aliquam erat volutpat. Fusce velit turpis, accumsan vel, tincidunt at, aliquet at, sem. Cras viverra eros ac orci. Aenean vestibulum, lorem sed luctus congue, arcu pede ultricies libero, at posuere felis nulla et leo.

Fusce rhoncus lobortis orci. Quisque suscipit dolor. In tincidunt dictum elit. Cras metus. Donec nibh mi, ornare a, ullamcorper in, gravida non, augue. Aliquam erat volutpat. Aliquam commodo tellus sed dolor. Sed urna. Phasellus blandit orci sit amet nulla. Fusce vel eros. Aenean ultrices sodales mi. Aliquam erat volutpat. Fusce orci sem, sollicitudin convallis, auctor a, sollicitudin vitae, dui. Sed massa. Duis luctus lectus ut lacus.

Morbi felis tellus, placerat quis, congue pretium, consectetur at, tortor. Nunc condimentum mattis urna. Donec dolor erat, fringilla ut, auctor ac, vestibulum ut, velit. Aliquam convallis magna ac neque. Praesent varius congue augue. Nulla adipiscing urna faucibus diam. Mauris porta sapien ut justo. Donec suscipit tortor

gravida ligula. Aliquam ac purus et massa scelerisque vehicula. Maecenas a libero. Class aptent taciti sociosqu ad litora torquent per conubia nostra, per inceptos himenaeos. Pellentesque sit amet est eget metus tincidunt semper. Phasellus nec purus. Proin venenatis lectus vel elit. Pellentesque augue quam, tincidunt sed, pretium ut, feugiat id, odio. Aenean eu nibh et quam dignissim facilisis.

Suspendisse adipiscing. Maecenas tincidunt placerat justo. Ut mattis nunc ac orci. Vestibulum quis velit sed massa vulputate posuere. Duis rhoncus lacus. Quisque non lacus et nibh molestie tincidunt. Nulla tortor pede, auctor id, eleifend sit amet, ultrices id, risus. Duis et lectus. Suspendisse interdum, magna ut porta porta, quam tellus suscipit ligula, cursus consectetur purus erat et dolor. Phasellus venenatis, risus malesuada lacinia placerat, lectus tellus lobortis ligula, eu porttitor tellus nibh eu enim. Morbi vel erat in sem pharetra molestie. Duis tellus. In ipsum. Vivamus ac augue sed dui hendrerit pulvinar. In dui erat, molestie ut, lacinia at, sagittis sed, nisi. Maecenas libero. Nam volutpat dictum erat.

Fusce laoreet sapien ut lorem. Mauris sed leo a mi luctus sollicitudin. Donec ornare nisi id dolor. Ut eros metus, tristique quis, ultrices ac, accumsan cursus, est. Pellentesque mollis posuere sapien. Morbi nec augue. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Duis tristique, ipsum in tincidunt gravida, nunc nulla vehicula felis, elementum eleifend nunc elit id magna. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Curabitur rhoncus dui ut sapien.

Sed orci. Nunc nisi lorem, convallis nec, porttitor at, porttitor et, erat. Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Donec luctus, velit quis lacinia pulvinar, risus urna malesuada nisl, vel hendrerit erat enim ac enim. Aliquam sapien dolor, fringilla quis, consequat auctor, sodales id, est. In imperdiet est et dui. Cras libero lacus, feugiat a, auctor ut, vulputate sollicitudin, orci. Ut tellus velit, rutrum tristique, eleifend sit amet, auctor consectetur, sapien. Fusce eget justo. Nam auctor lorem at purus. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Pellentesque pretium enim sed tortor. Sed luctus velit at ligula. Nunc id elit. Curabitur lacus. Mauris placerat nibh sit amet turpis. Fusce varius, justo et ultrices dictum, urna risus rhoncus ipsum, sed ultricies nunc arcu eu risus. Nam vitae purus.

Proin augue. Duis vehicula mauris sollicitudin sapien. Nam tristique lacus nec nisl. Praesent quis enim. Vestibulum vel velit in purus luctus mattis. Mauris ullamcorper tempor lorem. Quisque rutrum. Praesent enim nibh, pellentesque non, lacinia accumsan, euismod a, lorem. Etiam fringilla iaculis mauris. Aenean adipiscing purus in lacus. Maecenas quis nibh. Ut non augue at mauris elementum luctus. Duis varius tincidunt mi. Aliquam justo massa, auctor nec, malesuada interdum, mollis ac, mauris. Maecenas ultricies gravida dui. Aliquam arcu elit, pretium eu, gravida ac, molestie eu, enim. Etiam facilisis orci eget est. Integer eu orci non felis tincidunt consectetur. Sed imperdiet ultrices nibh.

Chapter 2

Metodología

2.1 Teoría Molecular

Para la presente tesis se utiliza una teoría molecular la cual tiene diferentes niveles de desarrollo, como se verá en los capítulos...

Esta teoría aborda el efecto de la distribución espacial de los grupos sensibles al pH en la termodinámica de la adsorción de proteínas en los sistemas poliméricos

This theory was developed in other works see [REFs: nap2006weak,longo2011molecular] and has been useful for the study of systems such as polymeric films with response to pH [REFs: longo2011molecular,longo2019protonation], study of ligand-receptor binding [REFs: longo2005ligand], and adsorption of different proteins [REFs: hagemann2018use,cathcart2022competitive] or other molecules: glyphosate and polyamides [REFs: perez2020triggering, perez2018using]

Este método consiste en minimizar una energía libre generalizada que incluye toda la termodinámica relevante. Simultáneamente, el método permite una descripción molecular de grano grueso de las diferentes especies químicas que componen el sistema. Dicha descripción incluye forma, tamaño, distribución de carga y estado de protonación de cada componente molecular. El sistema en estudio se encuentra en equilibrio con una solución acuosa que tiene una composición definida externamente. Es decir, el pH, la concentración de sal y la concentración de adsorbatos son variables independientes. La red polimérica que da estructura a los geles pueden contener distintos tipos de segmentos: una unidad sensible al pH, ya sea cida (MAA) o básica (AH), seg-

mentos neutros (VA) o bien segmentos termosensibles (NIPAm) Las unidades de que representan los entrecruzamientos de cadena se describen como segmentos de carga neutral. El semi-gran potencial de este sistema contiene las siguientes contribuciones:

$$\begin{aligned} \Omega_{NG} = & -TS_{mez} - TS_{conf,nw} + F_{chem,nw} + F_{chem,pro} \\ & + U_{elec} + U_{ste} + U_{VDW} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} N_{\gamma} \end{aligned} \quad (2.1)$$

donde S_{mez} es la entropía de traslación (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 otros adsorbados presentes: como drogas o proteínas terapéuticas. Aquí, consideramos una sal monovalente, NaCl o KCl, y se asume que está completamente disociada en iones cloruro (Cl^-) y sodio (Na^+) o potasio (K^+) respectivamente.

$S_{conf,nw}$ representa la entropía conformacional que resulta de la flexibilidad de la red de polímeros, que puede asumir muchas conformaciones diferentes. $F_{chem,nw}$, 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, $F_{chem,pro}$ 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 no electrostáticas son representadas en U_{VDW} en las cuales se puede mencionar la interacción NIPAm-agua. Finalmente, la suma de γ expresa el equilibrio químico entre nuestro sistema y la solución que representa el bulk 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, incluidas las proteínas. En este punto, tenga en cuenta que Ω_{NG} es un semi-gran potencial porque el sistema polimérico puede intercambiar cada una de estas moléculas libres con la solución, mientras que la red de polímeros está confinada dentro de nuestro sistema.

Las expresiones explícitas de eq. 5.1 pueden describirse... según el tipo de modelo elegido y la simetría considerada.. véase modelado...

Como primer término tenemos la entropía de mezcla de las especies móviles, es decir no se toma en cuenta el sistema polimérico.

$$\frac{S_{mez}}{\beta} = \sum_{\gamma} \int_S dr G(r) \rho_{\gamma}(r) (\ln(\rho_{\gamma}(r) v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \quad (2.2)$$

en donde $\beta = \frac{1}{kT}$ y $G(r) = 4\pi r^2$ lo cual corresponde a una simetría radial. El subíndice γ tiene en cuenta las moléculas de agua, sus iones y los iones dados por la disociación de la sal.

Otra especie móvil y que no ha sido considerada en la expresión anterior es los adsorbatos. Para ellos se ha considerado su contribución energética como:

$$\frac{1}{\beta} \sum_{\theta} \int_S dr G(r) \rho_{pro}(\theta, r) (\ln(\rho_{pro}(\theta, r) v_w) - 1 + \beta \mu_{pro}^0) \quad (2.3)$$

Subíndice θ puede interpretarse de dos maneras: en primer instancia como un conjunto de configuraciones para un solo adsorbato, también puede considerarse a cada configuración como adsorbatos diferentes, pero con las mismas propiedades químicas. Estamos asumiendo que no hay cambios en el potencial químico μ_{pro}^0 al cambiar sobre θ

Now $S_{conf,nw}$ represents the conformational entropy that results from the flexibility of the polymer network, which can assume many different conformations denoted by the set $\{\alpha\}$.

$$\frac{S_{conf,nw}}{\beta} = \sum_{\alpha} P(\alpha) \ln P(\alpha) \quad (2.4)$$

The next term describes the free energy for the acid-base equilibrium: For the MAA segments:

$$\begin{aligned} \frac{F_{chem,nw}}{\beta} = \int_S dr G(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} [f(r)(\ln f(r) + \beta \mu_{MAA-}^0) \\ + (1 - f(r))(\ln(1 - f(r)) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \end{aligned} \quad (2.5)$$

In the same way the proteins segments equilibrium is writing as:

$$\begin{aligned} \frac{F_{chem,pro}}{\beta} = \int_S dr G(r) \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle [g(r)(\ln g(r) + \beta \mu_{\tau p}^0) \\ + (1 - g(r))(\ln(1 - g(r)) + \beta \mu_{\tau d}^0)] \end{aligned} \quad (2.6)$$

Titratable units are represented by τ subíndice p and d are protonated and depro-

tonated states respectively.

1. for an unit acid case: $g(r) = f(r)$
2. basic case: $g(r) = 1 - f(r)$

The electrostatic contributions of the free energy $\frac{U_{elec}}{\beta}$:

$$\int_S dr G(r) \left[\left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(r) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(r) \langle \rho_{pro,\tau}(r) \rangle q_{\tau} + f(r) \frac{\langle \phi_{MAA}(r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi(r) - \frac{1}{2} \beta \epsilon (\nabla \psi(r))^2 \right] \quad (2.7)$$

where $\psi(r)$ is the position-dependent electrostatic potential, and ϵ the medium permittivity.

Finally the energy due the steric repulsion take account the volume incompressibility **ejemplo para poner la ecuación en dos reglones**

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

2.2 Modelado

Se utiliza un modelo de grano grueso en el cual las unidades consideradas son representativas de las moléculas y contienen la información molecular.

2.2.1 Generación de configuraciones

Modelo RIS

Las distintas configuraciones de las cadenas del polmero son generadas utilizando un modelo de isómeros rotacionales (RIS por sus siglas en inglés) donde cada segmento puede tomar cualquiera de las tres posibles orientaciones isoenergéticas que le corresponden [REFs: Flory] La longitud del segmento entre monómeros es $0.5nm$ y su volumen es $v_{AH} = 0.065nm^3$. Se generaron cadenas con 25, 50 y 100 segmentos. Para

cada uno de estos largos de cadenas se generaron aleatoriamente un total de 10^6 configuraciones distintas. Este número de configuraciones es suficientemente grande como para describir las propiedades del polímero adecuadamente, pero al mismo tiempo permite el cálculo de resultados en un tiempo razonable.

gromacs

Para la generación del modelo, en concreto de las configuraciones, de nuestro migroles se partirá de una celda base, la cual se expandirá en el espacio de tal forma de obtener las dimensiones que necesitamos. La estructura obtenida será truncada/cortada para obtener una esfera que dar origen a la topología inicial del gel.

Las simulaciones de, dinámica molecular, y sus respectivos análisis se harán haciendo uso del Software GROMACS. [REFs: 11] Finalmente todas las configuraciones serán ponderadas dada la energía libre atribuida a cada una. [REFs: 12]

La estructura base que se utilizará es la celda unitaria del diamante ...por qué ??... Dada la arquitectura de los geles, cadenas entrelazadas, es necesario definir los nodos o crosslinks del gel, en nuestro modelo los crosslinks corresponden a la posición de los átomos de carbono en la estructura base (celda de diamante). expansión y el corte esférico, el cual es el punto de partida para la topología de nuestro gel.

Para nuestro esquema, trabajaremos con geles con un radio de corte de 109, en unidades arbitrarias... σ , además se utilizarán cadenas de 25 segmentos cada una¹. Nuestro gel finalmente estará compuesto por aproximadamente 10 mil segmentos (10054).

¹Dado el corte esférico realizado, las cadenas externas poseen menor cantidad

Chapter 3

Films poliméricos

Los films poliméricos o hidrogeles consisten en una red de polímeros entrecruzados altamente hidratados, generalmente biocompatibles, dependiendo de su composición química. El ambiente acuoso dentro de los hidrogeles puede proteger a las proteínas de la desnaturalización y la agregación [11-13], mientras permanecen activas y estructuradas cuando se liberan de los hidrogeles [14]. 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 [15-17].

En este capítulo mostraremos un estudio de estos sistemas poliméricos haciendo uso de la teoría molecular mostrada en el capítulo anterior.

3.0.1 pH y algo más...

pH

Hidrogeles compuestos por cadenas de poliacidos son sensibles a los cambios de pH. Esta respuesta se debe al equilibrio químico de protonación/desprotonación de las unidades ácidas que componen la red. Para entender el funcionamiento de esta respuesta vamos a recordar algunos conceptos sobre el comportamiento ácido/base de moléculas bajo condiciones ideales. Estos conceptos nos servirán para entender el equilibrio que ocurre cuando se confinan los monómeros en una red polimérica. Los mismos principios se estarán utilizando para los sistemas de estudio de los siguientes capítulos.

Si consideramos una solución diluida de moléculas titulables, estas pueden exhibir dos estados posibles: protonado o desprotonado. El grado de disociación, f_d , nos proporciona la fracción de moléculas que se encuentran en estado desprotonado:

$$f_d = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (3.1)$$

Para moléculas consideradas ácidas el estado protonado es neutro y su estado desprotonado posee carga, por lo cual el grado de disociación nos indica el grado de carga de estas moléculas, f_c . Para moléculas básicas el grado de carga viene dado por: $f_c = 1 - f_d$.

En soluciones diluidas el grado de disociación f_d (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 en disociados ($f_d = 0.5$). Para valores de ± 1 corresponden a estados con 90% y 10% de disociación respectivamente. Es decir, cuando el pH aumenta alrededor del pK_a , la transición del 10 al 90 % de desprotonación ocurre dentro de dos unidades de pH de la solución ideal. A menudo, estas consideraciones de solución ideal se utilizan para estimar el grado de carga de las unidades ácidas dentro de la red de polímeros de hidrogel. Sin embargo, este comportamiento es diferente para sistemas en confinamiento, es decir las unidades protonables forman parte de una red polimérica. Lo cual modifica significativamente su comportamiento de protonación

Red polimérica

En esta sección describiremos el comportamiento de el grado de carga de estos hidrogeles sensibles al pH. A diferencia de las soluciones diluidas, las unidades ácidas en una red de polímeros experimentan repulsiones electrostáticas cuando estas se encuentran cargadas. Para reducir la fuerza de las repulsiones dentro de la red, estos grupos se disocian significativamente menos que en condiciones ideales. En la figura 3.1 ilustra este comportamiento y muestra el grado medio de carga de los segmentos de una película de hidrogel de ácido poli(metacrílico) (PMAA), que está en contacto con soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal.

A un pH dado, es significativamente menos probable que se cargue una unidad ácida de la red de lo que se espera según las consideraciones ideales. La concentración de sal de la solución resulta ser una variable crítica que modula este comportamiento

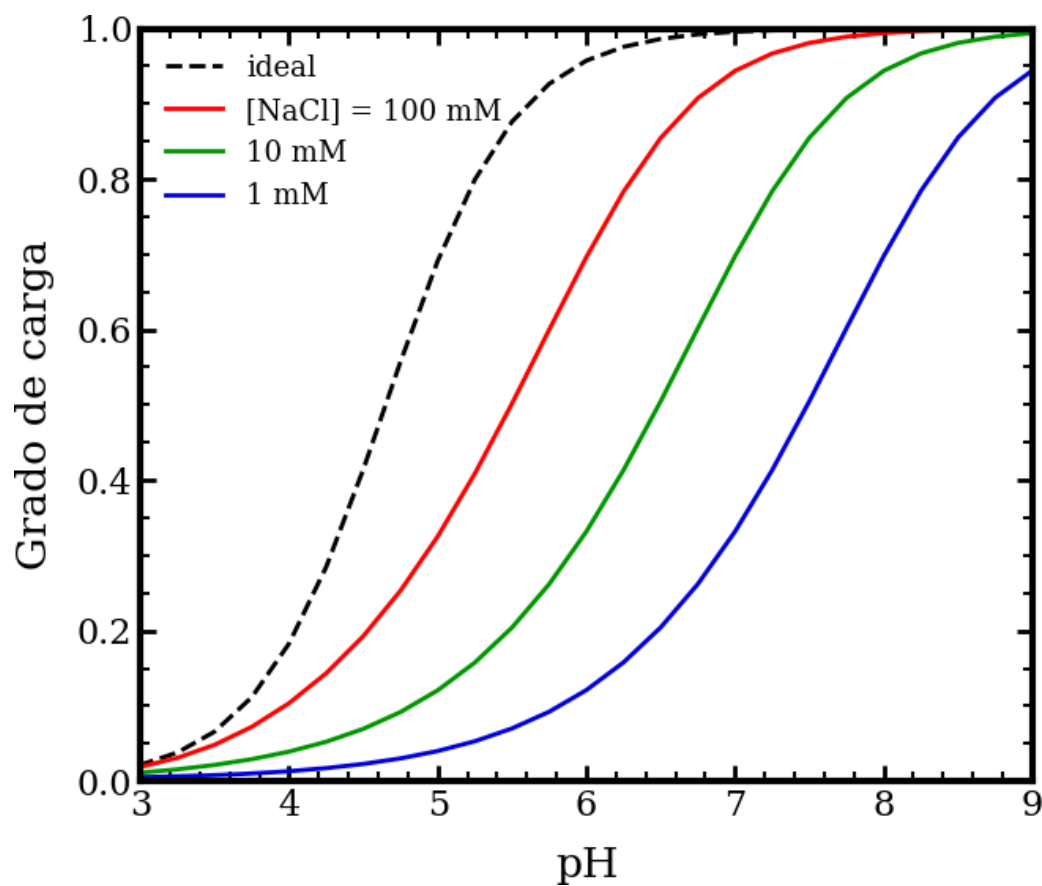


Figura 3.1: Grado de carga del gel como función del pH. Grado de carga para un monomero aislado en presentado en curva a rayas, se compara para diferentes concentraciones de sal, a mayor concentración salina más nos acercamos al sistema ideal.

de regulacin de carga. A una salinidad relativamente alta, se encuentran concentraciones significativas de los contraiones dentro del hidrogel, lo que da como resultado el apantallamiento de interacciones electrostáticas, que volviendose de corto alcance. Esta apantallamiento de repulsiones dentro de la red permite que el polímero aumente su grado de carga para reducir la energía libre descrita por el equilibrio ácido-base de los segmentos de la cadena. El aumento en la salinidad genera una protonación que se aproxima al comportamiento ideal. En condiciones de baja salinidad, por otro lado, aumenta el costo entrópico de confinar iones dentro del hidrogel. Solo se encuentran los suficientes contraiones dentro de la red para neutralizar la carga eléctrica del polímero. Bajo tales condiciones, el efecto de apantallamiento de los iones de sal se debilita y las interacciones electrostáticas se vuelven efectivamente de mayor alcance. Como resultado, la red se carga menos para prevenir o reducir las repulsiones dentro de la red.

Otro aspecto a considerar es el pH local el cual es definido en la posicin espacial \mathbf{r} utilizando la concentración local de protones:

$$pH(r) = -\log_{10}([H^+](r)) \quad (3.2)$$

Una baja disociación (un nivel de protonación alto) de las unidades ácidas del polímero puede explicarse en terminos del pH local dentro del material. Se define el pH_{gel} como el promedio del pH local dentro del film. Resultados previos han mostrado que esta cantidad esta bien definida [REFs]. En esta sección enfatizaremos la importancia de estos dos terminos pH_{gel} y $pH(r)$ por la información que proveen: el estado de carga/protonación de las unidades titulables en la red polimérica.

Haciendo uso de la eq. 3.1 es posible calcular el grado de disociación de la estructura polimérica. El uso del pH_{gel} es indispensable para cuando el pH es distinto al del seno de la solución [REFs]. 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 5.1).

Sin embargo, aunque esto parece simplificar el problema de establecer la carga neta de cualquier especie dentro del material, incluida la red polimérica y las proteínas adsorbidas, determinar los cambios en el pH local tiene la misma complejidad que el problema original (es decir, determinar la carga de la la red). El pH local que se

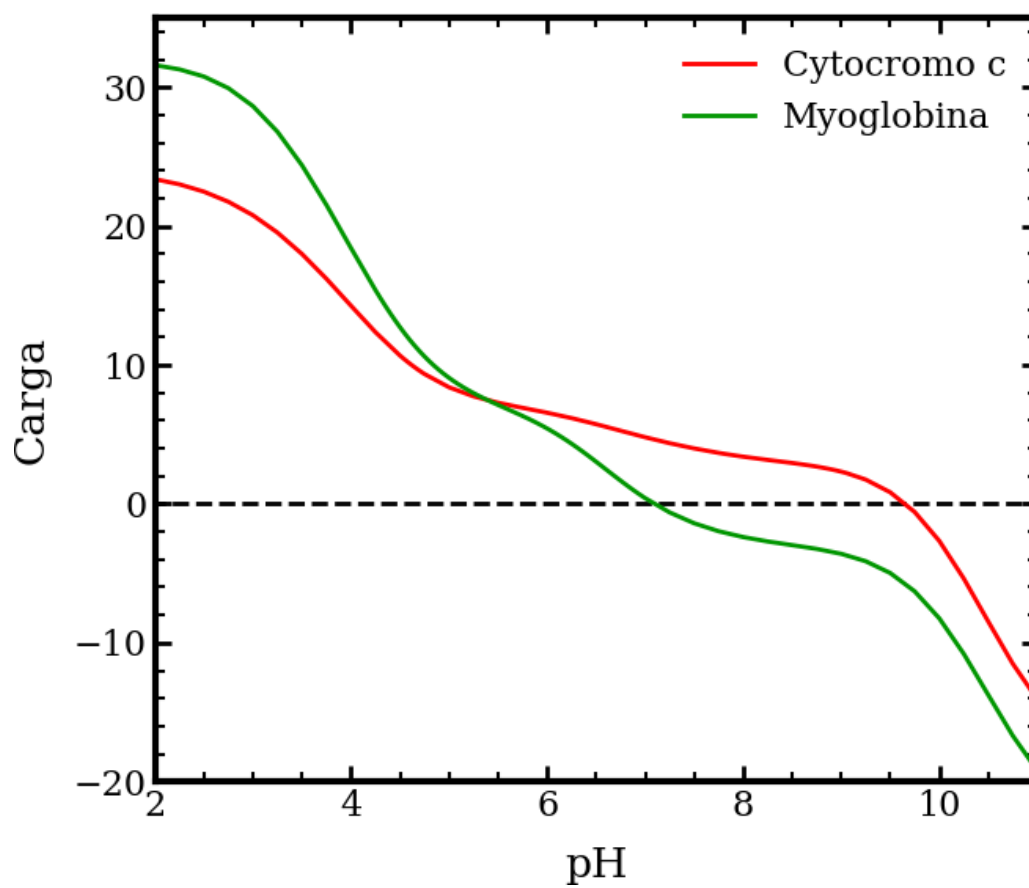


Figura 3.2: Número de carga de las proteínas citocromo c y myoglobina como función del pH en el seno de la solución (bulk). La línea a trazos muestra el cambio en el signo de la carga.

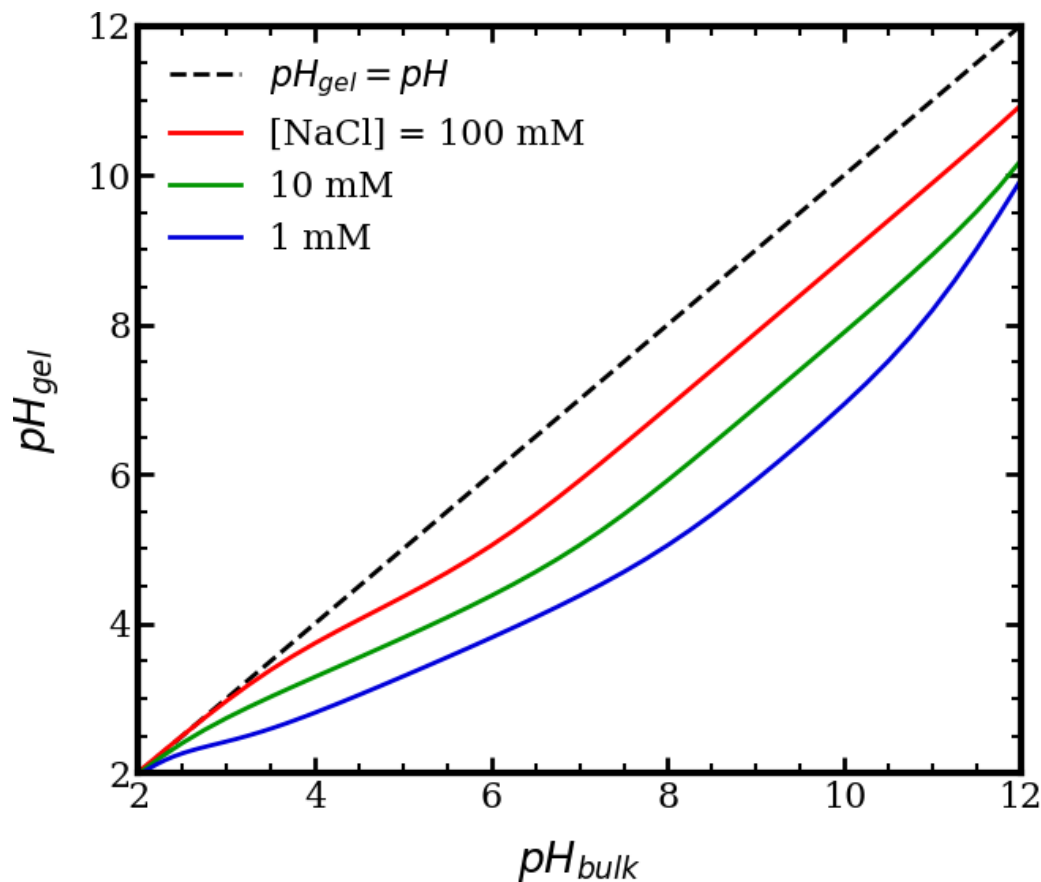


Figura 3.3: pH local del gel como función del pH en el seno de la solución (bulk). Cada curva corresponde a una concentración de sal diferente.

establece dentro del material, así como su valor en la interfaz entre el polímero 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 a las condiciones impuestas externamente (pH, concentración de sal). Por ejemplo, la figura 3.3 muestra el pH dentro de una película de hidrogel de PMAA como una función del pH y la concentración de sal, calculado usando teoría molecular.

3.0.2 Adsorción

Como se mencionó al inicio de este capítulo... poder usar estos sistemas de hidrogeles como carries de adsorbatos de utilidad terapéutica. Para ello nos valdremos de la teoría molecular y haciendolo uso de ciertas proteínas modelo como lo son el citocromo c y la myoglobina. estas dos presentan gran estabilidad en un amplio rango de pH y recientemente se ha investigado la termodinmica de su adsorción en sistemas poliméricos similares. [REFs]

Para cuantificar la cantidad de adsorbato adsorbido en el hidrogel utilizamos la expresión:

$$\Gamma = \int_V dr(\rho(r) - \rho_{bulk}) \quad (3.3)$$

en donde $\rho(r)$ y ρ_{bulk} son las densidades del locales y en el seno de la solución del adsorbato respectivamente, V es el volumen de la solución. Esta adsorción proporciona la masa en un volumen particular por exceso de la contribución del bulk. En particular dentro del hidrogel, Γ proporciona la cantidad de adsorbato en exceso dentro del material, recibiendo también contribuciones de la interfaz de solución de polímero.

Para estas proteínas, la adsorción es una función no monotónica del pH de la solución (ver Figura 3.4). A pH bajo, estas proteínas tienen una carga alta y positiva, pero la red de poliácidos solo est débilmente ionizada (véanse las Figuras 3.1 y 5.1). 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. No hay fuerza impulsora para la adsorción. A valores de pH intermedios, por el contrario, donde tanto la proteína como la red de poliácidos 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 3.4 que muestra la adsorción de citocromo c y mioglobina en una película de hidrogel de PMAA. 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 3.4 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 con anterioridad. En otras palabras, la red de polímero con carga más débil, 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 3.4, 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 la 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. En segundo lugar, a medida que la concentración de sal disminuye, el pH dentro de las gotas de hidrogel (a un pH general dado). Esto implica que las proteínas adsorbidas tienen una carga más positiva tras la adsorción (a medida que disminuye $[NaCl]$). En tercer lugar, la ganancia entrópica de la liberación de contracciones de la red de polímeros es mayor a medida que disminuye la concentración de sal, lo que también favorece la adsorción de proteínas.

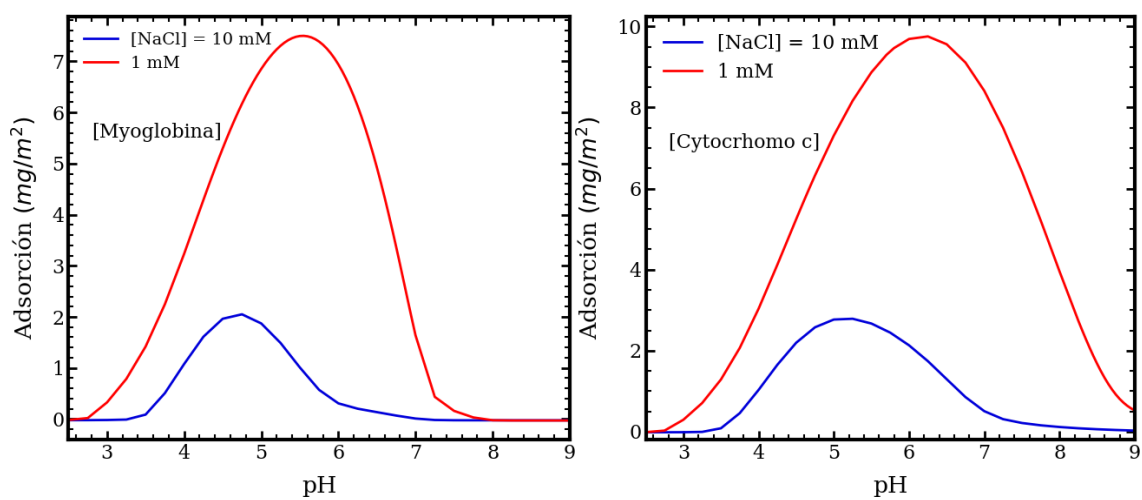


Figura 3.4: Adsorción de proteínas: citocromo c y mioglobina en panel A y B respectivamente. La concentración de los adsorbatos es $10\mu M$

Chapter 4

Geles poliméricos

4.1 Modelo sencillo: 2 fases

Los microgeles son partículas blandas hechas de cadenas de polímeros entrecruzados que pueden mostrar un comportamiento tanto coloidal como macromolecular [62]. Inmersas en soluciones acuosas, estas partículas incorporan y retienen grandes cantidades de agua dentro de su estructura polimérica. Por lo general, sus diámetros van desde decenas de nanómetros (nanogeles) hasta varias micras. Sin embargo, la característica más llamativa de estas partículas es su capacidad para absorber o liberar solventes y cambiar de tamaño en respuesta a una variedad de estímulos externos. Este comportamiento de respuesta es generalmente reversible y depende de la composición química de la red polimérica.

Por ejemplo los microgeles compuestos por cadenas poliméricas que tienen segmentos ácidos como el ácido acrílico o metacrílico (AA y MAA, respectivamente) se hinchan/deshinchan muchas veces en respuesta a cambios en el pH de la solución que los contienen [75]. 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 intrínseco del monómero ácido. Estos microgeles también ajustan su tamaño en respuesta a cambios en la concentración de sal de la solución [75].

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}) [58, 59]. Este comportamiento se origina porque tales polímeros son insolubles en agua por encima de cierta temperatura de solución crítica más baja (LCST) [35]. 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) [58], cuyo volumen colapsa por encima de 32°C , siendo el mismo para el polímero lineal [68].

Al tener un VPTT alrededor de la temperatura corporal, los microgeles de PNIPAm han generado un gran interés para aplicaciones biomédicas [26]. Las estrategias para controlar el VPTT de los microgeles incluyen la síntesis de nuevos monómeros termosensibles [10, 51], así como la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [28, 48]. Este último enfoque produce microgeles de respuesta múltiple que son susceptibles a cambios en la temperatura, el pH y la concentración de sal [21, 75]. Los microgeles de NIPAm y AA han sido ampliamente estudiados [6, 8, 34, 54]; También se han investigado microgeles de copolímeros de NIPAm y MAA [19, 23, 29]. 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 [8, 27, 29, 34, 43, 54, 79]. Además, 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 [46].

Las aplicaciones basadas en microgeles poliméricos son cada vez más diversas y cada vez más importantes en diferentes áreas de la tecnología [62]. Los nanocompuestos hechos de microgeles de poli(NIPAm-co-MAA) que incorporan nanopartículas de oro o plata o redes metal orgánicas (MOF) tienen aplicaciones potenciales en el desarrollo de materiales con actividad catalítica para la degradación de contaminantes industriales [4, 37, 74]. Estos microgeles también se pueden aplicar para el desarrollo de emulsiones sensibles al pH, la sal y la temperatura [9, 55, 56, 69] o como plantillas para el ensamblaje de nanomateriales [79]. Los geles poliméricos de tamaño nano/micro de respuesta múltiple son excelentes candidatos para el desarrollo de aplicaciones biomédicas mínimamente invasivas, incluida la ingeniería de tejidos [18]. Culver et al. [16] 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 Doxorubicina [24, 52, 61].

En este contexto, 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 daunorubicina dentro de estos microgeles. Los cálculos acá mostrados son específicos para el ácido metacrílico con $pK_a = 4,65$, 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 pK_a y diferente solubilidad a pH bajo.

El comportamiento de los microgeles de poli(NIPAm-co-MAA), incluido su VPT y la interacción con polímeros de carga opuesta, se ha descrito utilizando una variedad de técnicas experimentales [19, 23, 24, 29, 39, 40, 76]. También se han aplicado teorías y simulaciones moleculares de grano grueso para investigar el comportamiento de los microgeles poliméricos sensibles a estímulos [3, 42, 65]. 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 [1, 3, 32, 53, 64]. Recientemente, estudios con simulaciones han considerado la respuesta al pH de microgeles compuestos de polímeros reguladores de carga [30, 49, 66, 70, 71]. 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 [11, 63].

4.1.1 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 el semi-gran potencial canónico, Ω_{MG} , que contiene las siguientes contribuciones:

$$\begin{aligned} \Omega_{MG} = & -TS_{mez} + F_{qca,MAA} + F_{ela} \\ & + U_{elec} + U_{ste} + U_{VDW} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} N_{\gamma} \end{aligned} \quad (4.1)$$

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 (-). Aquí consideramos una sal monovalente, KCl , y asumimos que está completamente dissociada en iones de potasio y cloruro. $F_{qca,MAA}$ es la energía química libre que describe la protonación de equilibrio de las unidades de MAA. F_{ela} es la energía libre elástica que explica la libertad conformacional de la red polimérica. U_{elec} y U_{ste} representan respectivamente las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas. U_{VDW} es la contribución que describe las interacciones efectivas polímero-disolvente; incorpora la transición hidrofílica-hidrofóbica de NIPAm al aumentar la temperatura por encima de su LCST. 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.

La forma explícita del potencial termodinámico es:

$$\begin{aligned}
\beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = & \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} (\ln(\rho_{\gamma} v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0) \\
& + \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} [f(\ln f + \beta \mu_{MAA-}^0) \\
& \quad + (1-f)(\ln(1-f) + \beta \mu_{MAAH}^0)] \\
& + \left(\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} \right) \beta \psi_{MG} \\
& - \sum_{\gamma} \rho_{\gamma} \beta \mu_{\gamma} - \beta \mu_{H^+} (1-f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \\
& + \chi(T, \phi_{NIPAm}) \rho_w \phi_{NIPAm} \\
& + \frac{3}{2} \frac{N_{seg}}{n_{ch} V} \left[\left(\frac{R}{R_0} \right)^2 - \ln \frac{R}{R_0} - 1 \right]
\end{aligned} \tag{4.2}$$

donde el primer término (segunda línea) corresponde a la S_{mez} ; $\beta = \frac{1}{k_B T}$ 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, que también se incluye en esta primera contribución; v_w es el volumen de una molécula de agua.

La segunda y tercera línea de la ec. 4.2 (lado derecho) incorporan el equilibrio ácido-base de las unidades MAA, donde ϕ_{MAA} es la fracción de volumen que ocupan estos segmentos, v_{MAA} es la volumen de este segmento, y f es el grado de disociación o la fracción de estas unidades que se cargan. 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. Hay que tener en cuenta que aquí usamos el término segmento para identificar las unidades químicas (monmeros) que componen las cadenas poliméricas (MAA y NIPAm).

La siguiente contribución a la ec. 4.2 es la energía electrostática, 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} .

La siguiente contribución (línea 6 de eq.4.2) refuerza el equilibrio químico entre el microgel y la fase de solución, donde el segundo término representa a los protones unidos a unidades MAA; a saber, $\mu_{H^+} \equiv \mu_{H_3O^+}$ se conjuga con el número total de protones, $N_{H_3O^+} + N_{MAAH} = V \left(\rho_{H_3O^+} + (1 - f) \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} \right)$.

El siguiente término en el potencial termodinámico 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 [2], este parámetro de Flory-Huggins se puede expresar como:

$$\chi(T, \phi_{NIPAm}) = g_0(T) + g_1(T)\phi_{NIPAm} + g_2(T)\phi_{NIPAm}^2 \quad (4.3)$$

con

$$g_k(T) = g_{k0} + \frac{g_{k1}}{T} + g_{k2}T \quad (4.4)$$

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 $g_{k1} \equiv 0$ [2]

El último término en eq. 4.2 es la contribución resultante de la elasticidad de la red de polímero entrecruzado que forma la columna vertebral del microgel. Esta expresión se describe en [53] 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*. Se tiene en cuenta que la constante de resorte en la energía libre elástica 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:

$$\frac{4}{3}\pi R_0^3 = V_0 = N_{seg} \left(x_{MAA} v_{MAA} + x_{NIPAm} v_{NIPAm} \right) \quad (4.5)$$

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 $x_{NIPAm} = 1 - x_{MAA}$.

Deben imponerse dos restricciones físicas al potencial termodinámico dado por la ec. 4.2. El volumen del microgel está completamente ocupado por los segmentos de la red y las especies químicas libres. Esta restricción de incompresibilidad incorpora las repulsiones estéricas (volumen excluido) y se puede expresar como:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} v_{\gamma} + \phi_{MAA} + \phi_{NIPAm} = 1 \quad (4.6)$$

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

$$\phi_{MAA} = N_{seg} \frac{x_{MAA} v_{MAA}}{\frac{4}{3}\pi R^3} \quad (4.7)$$

$$\phi_{NIPAm} = N_{seg} \frac{x_{NIPAm} v_{NIPAm}}{\frac{4}{3}\pi R^3} \quad (4.8)$$

La segunda restricción que se impone es la electroneutralidad del microgel, que puede expresarse como:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma} q_{\gamma} + f \frac{\phi_{MAA}}{v_{MAA}} q_{MAA} = 0 \quad (4.9)$$

Ahora, el potencial termodinámico está explícitamente en función de las densidades de todas las especies, el grado de carga del MAA y el radio del microgel, $\Omega_{MG}(R) \equiv \Omega_{MG}(\{\rho_{\gamma}\}, f, R)$. Para obtener las expresiones de $\{\rho_{\gamma}\}$ y f que sean consistentes con el equilibrio termodinámico, minimizamos Ω_{MG} con respecto a estas cantidades, sujeto a las restricciones ec. 4.6 y ec. 4.9; dicho procedimiento conduce a:

$$\rho_{\gamma} v_{\gamma} = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_{MG} v_{\gamma} - \beta \psi_{MG} q_{\gamma}) \quad (4.10)$$

$$\frac{f}{1-f} = \frac{K_{MAA}^0}{a_{H^+}} \exp(-\beta \psi_{MG} q_{MAA}) \quad (4.11)$$

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

Tabla 4.1: Propiedades moleculares de las diferentes especies químicas consideradas. (*Para las especies desprotonadas).

donde $a_\gamma = e^{\beta\mu_\gamma - \beta\mu_\gamma^0}$ es la actividad de la especie γ , y π_{MG} es la presión osmótica de la fase de microgel, introducido como un multiplicador de Lagrange para imponer la restricción de incompresibilidad, ec. 4.6. La constante de equilibrio termodinámico que describe la protonación/desprotonación MAA es

$$K_{MAA}^0 = e^{\beta\mu_{MAAH}^0 - \beta\mu_{MAA}^0 - \beta\mu_{H^+}^0} \quad (4.12)$$

Esta cantidad se puede calcular directamente a partir del pKa del ácido.

Para un R dado, 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. 4.6 y ec. 4.9, respectivamente. Para resolver estas ecuaciones utilizamos un método híbrido de Powell sin jacobiano y un código FORTRAN desarrollado internamente.

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 4.1. 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.

4.1.2 Fase solución

En la solución, el potencial termodinámico es:

$$\beta \frac{\Omega_s}{V} = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s (\ln(\rho_{\gamma}^s v_w) - 1 + \beta \mu_{\gamma}^0 - \beta \mu_{\gamma}) \quad (4.13)$$

el subíndice s indica las densidades en la fase solución. Al escribir la ec. 4.13, hemos considerado un volumen de referencia igual al del microgel, V , y se ha considerado como cero el potencial electrostático en la fase de 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:

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s v_{\gamma} = 1 \quad (4.14)$$

$$\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}^s q_{\gamma} = 0 \quad (4.15)$$

con

$$\rho_{\gamma}^s v_w = a_{\gamma} \exp(-\beta \pi_s v_{\gamma}) \quad (4.16)$$

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 4.14. Después de conocer π_s , podemos determinar las actividades de todas las especies químicas libres.

4.1.3 Minimización gráfica

En este punto, es posible determinar completamente la energía libre de la fase de microgel para cualquier R dado. Las variables independientes de un 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

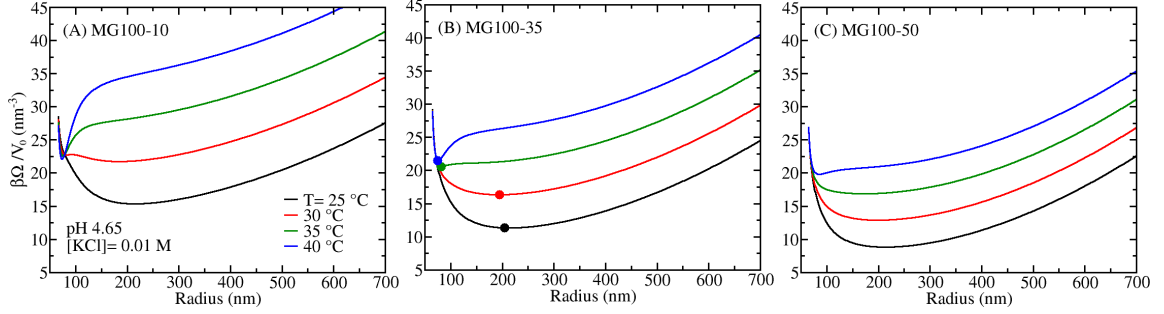


Figura 4.1: Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $cs = 10^{-2}M$. Cada panel corresponde a un microgel MG100 diferente (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) con 10% (A), 35% (B) y 50% (C) MAA. Las curvas presentan el potencial termodinámico en 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 4.2).

cadena n_{ch} y la fracción de segmentos MAA, x_{MAA} , caracterizan completamente el microgel.

Consideramos microgeles con $N_{seg} = 10^7$ segmentos y $n_{ch} = 50, 100$ y 200 , que tienen $x_{MAA} = 0, 1, 0, 35$ o $0, 5$. El objetivo es evaluar 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 $MGn_{ch}-p_{MAA}$, 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), construimos $\Omega(R) = \Omega_{MG}(R) - \Omega_s(R)$, y encontramos 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 4.1 para microgeles MG100. Los resultados obtenidos de la minimización de las curvas figura 4.1 se resumen en la tabla 4.2.

Opt. Radius (nm)(MG100)					
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	dry, R_0
10% MAA	215	184	75	74	65
35% MAA	213	193	84	76	64
50% MAA	213	199	172	85	63

Tabla 4.2: Minimización de las curvas de la figura 4.1. Esta tabla resume los radios óptimos de tres microgeles MG100 a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $[KCl] = 10^{-2}M$.

4.1.4 Absorción

Para describir la absorción de un analito a la fase de microgel, al potencial termodinámico de la ec. 4.2 se le adicionan los siguientes términos:

$$\begin{aligned}
\beta \frac{\Omega_{MG}(R)}{V} = & \dots \\
& + \rho_a (\ln(\rho_a v_w) - 1 + \beta \mu_a^0) \\
& + \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} [g_{\tau} (\ln g_{\tau} + \beta \mu_{\tau}^0) \\
& \quad + (1 - g_{\tau}) (\ln(1 - g_{\tau}) + \beta \mu_{\tau H}^0)] \\
& + \left(\rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} f_{\tau} q_{\tau} \right) \beta \psi_{MG} \\
& - \rho_a \beta \mu_a - \beta \mu_{H^+} \rho_a \sum_{\tau} n_{\tau} g_{\tau}
\end{aligned} \tag{4.17}$$

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

$$K_{\tau}^0 = e^{\beta \mu_{\tau H}^0 - \beta \mu_{\tau}^0 - \beta \mu_{H^+}^0} \tag{4.18}$$

La siguiente línea en la ec. 4.17 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. 4.6 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. 4.13, que contienen los mismos componentes que ec. 4.17.

De la optimización de Ω_{MG} se obtiene:

$$\frac{f_\tau}{1 - f_\tau} = \left(\frac{K_\tau^0}{a_{H^+}} \right)^{\pm 1} e^{-\beta \psi_{MG} q_\tau} \quad (4.19)$$

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

$$\begin{aligned} \rho_a v_w = & \frac{\exp(\beta \mu_a - \beta \mu_a^0)}{\prod_\tau (1 - f_\tau)^{n_\tau}} \\ & \cdot \exp \left(-\beta \pi_{MG} \sum_\lambda n_\lambda v_\lambda \right) \end{aligned} \quad (4.20)$$

donde esta última ecuación requiere una redefinición de μ_a y μ_a^0 . Expresiones similares a la ec. 4.20 y ec. 4.19 se derivan para la fase de solución.

Consideraremos la absorción de los fármacos quimioterapéuticos Daunorrubicina (Dauno) y Doxorrubicina (Doxo) a los microgeles P(NIPAm-MAA) en diferentes condiciones. El modelo molecular aplicado para describir estos analitos se ilustra en la figura 4.2 y la parametrización se presenta en la tabla 4.3 [60].

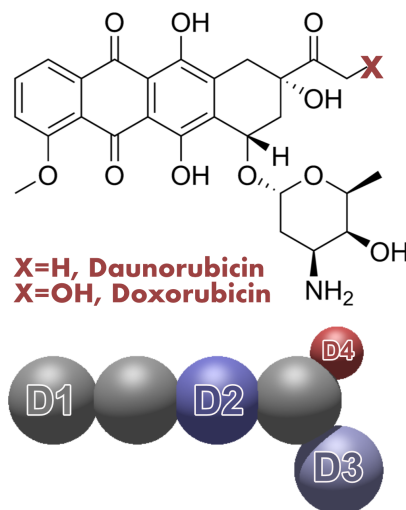


Figura 4.2: Estructura química (arriba) y modelo de grano grueso (abajo) aplicado para describir daunorrubicina y doxorubicina. Los segmentos de grano grueso $D1 - D4$ se describen en la tabla 4.3.

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

Tabla 4.3: Propiedades moleculares para las distintas unidades de grano grueso usadas para el modelado de las drogas Daunorubicina y Doxorubicina. (ver figura 4.2). (* Para unidades ionizables.)

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 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 concentramos en temperaturas por debajo de la LCST del PNIPAm; el efecto de la temperatura se evaluará en 4.2.2.

La Figura 4.3A muestra el tamaño del microgel (radio, R) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Los microgeles de P(NIPAm-MAA) se hinchan al aumentar el pH. A medida que aumenta el pH, un número creciente de unidades

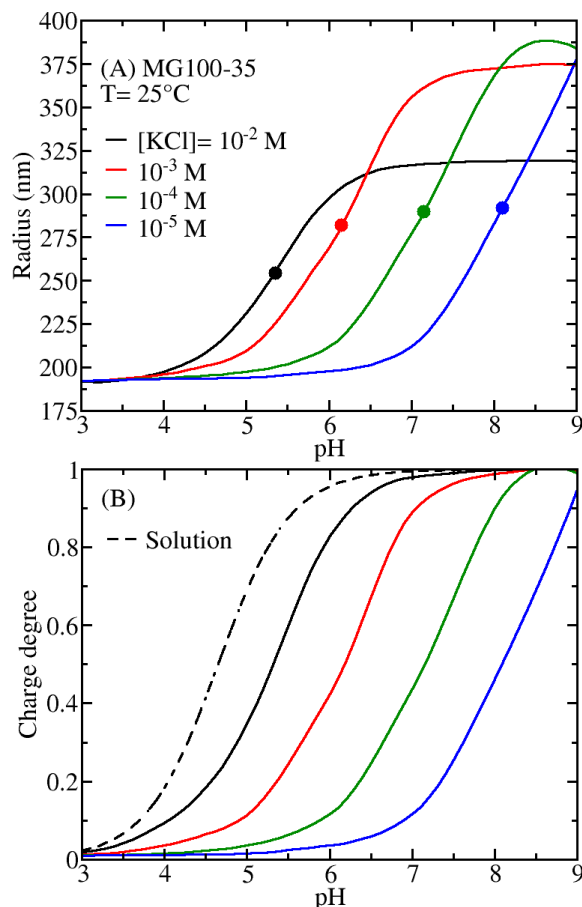


Figura 4.3: Gráfico de tamaño de microgel (A) y grado de carga (B) en función del pH para soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal y $T = 25^\circ\text{C}$. Las cadenas de polímero en el microgel MG100-35 son $n_{ch} = 100$ -long. y tienen 35% MAA. La curva de punteada en el panel B es la disociación ideal del ácido metacrílico ($pK_a = 4.65$). Los círculos de color en las curvas del panel A marcan el pKa aparente del microgel.

MAA se desprotonan y en consecuencia se cargan. Figura 4.3B muestra cómo la fracción de MAA cargados (f : grado de carga; ver ec. 4.11) depende del pH de la solución. La hinchazón del microgel observada en el panel A a medida que aumenta el pH es la respuesta a las crecientes repulsiones dentro de la red que resultan del aumento de la carga eléctrica en el polímero que se ve en el panel B.

El inicio de la transición de hinchamiento se desplaza a valores de pH más altos cuando se reduce la concentración de sal (ver fig. 4.3A). Las curvas de disociación

de protones del panel B presentan el mismo desplazamiento a pHs más altos, con respecto al comportamiento ideal de un monómero MAA aislado en solución diluida. El pKa aparente de un microgel es el pH al que se desprotonan la mitad de los segmentos MAA; cuantifica el comportamiento de carga del microgel, fig. 4.3B, pero también la transición de expansión como vemos en el panel A (ver círculos en $pH = pKa$). Los pKa aparentes de la fig. 4.3B se muestran en la tabla 4.4.

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

Tabla 4.4: pKa's aparente de la fig. 4.3 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 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 aproxima al comportamiento ideal o de solución diluida (compare los casos de alta concentración salina con la curva de línea punteada en la fig. 4.3B).

Por el contrario, el efecto de apantallamiento se debilita y las repulsiones electrostáticas dentro de la red son de mayor alcance para soluciones con baja concentración de sal. 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 de 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.

La figura 4.4 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)

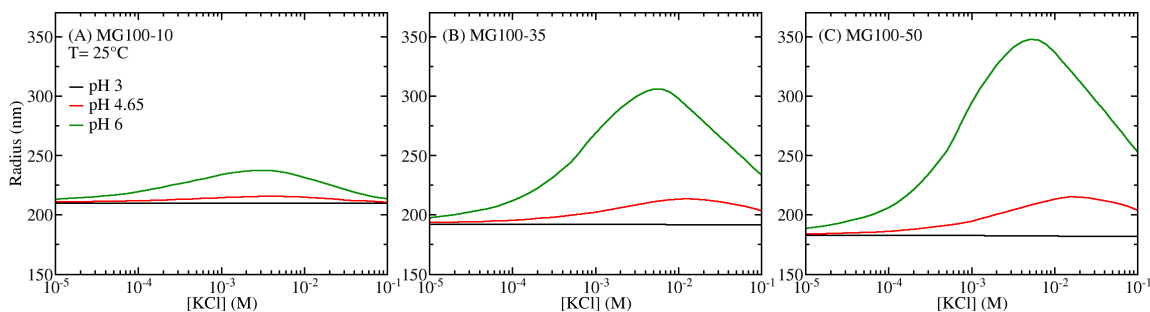


Figura 4.4: Gráfico del tamaño del microgel en función de las concentraciones de sal para diferentes soluciones de pH y $T = 25^\circ\text{C}$. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen fracciones MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

de [79] para microgeles P(NIPAm-MAA) y concentraciones de KCl en el rango de $0.1 - 0.5M$.

Las curvas de la Figura 4.4 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 asintótica cuando la carga del polímero aumenta debido a un mayor contenido de pH o MAA (compare diferentes paneles de figura 4.4).

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 poliacidos 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 [25, 31, 50, 82], que ha sido confirmada por resultados experimentales [81]. De manera similar, los resultados teóricos predicen que el tamaño de los polielectrolitos débiles ramificados en estrella muestra un máximo en función de la concentración de sal en la solución [7, 38]; También se ha predicho que el espesor de las películas de polielectrolitos débiles entrecruzados mostrará este comportamiento de hinchamiento reentrante [47].

Se ha predicho una transición deshinchazón a hinchazón impulsada por la sal para los nanogeles de polielectrolitos fuertes [33]; este comportamiento, en el caso de los polielectrolitos “quencheados”, se atribuyó a los efectos de volumen excluidos de los iones absorbidos a altas concentraciones de sal. Más relevante para nuestro estu-

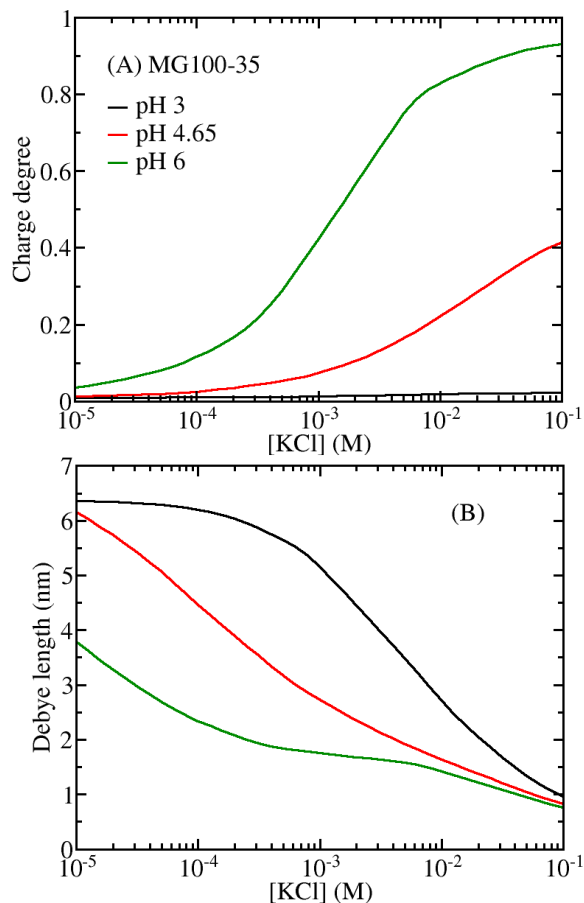


Figura 4.5: Curvas del grado de carga MAA (A) y la longitud de Debye (B) dentro de los microgeles MG100-35 en función de la concentración de sal para diferentes valores de pH. Estos resultados corresponden a las condiciones de figura 4.4B.

dio, se predijo teóricamente una transición de hinchazón a colapso reentrante para microgeles sensibles al pH y al calor [63]. Polotsky et al. [63] explica que el aumento de la concentración de sal primero promueve la disociación de carga de los grupos ácidos débiles hasta que se alcanza la saturación cuando el grado de disociación alcanza el valor ideal. Más allá de este punto, el aumento de la concentración de sal de la solución solo mejora el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas y, por lo tanto, el microgel se deshincha. Experimentalmente, Capriles-González et al. [11] informó el hinchamiento no monotónico de los microgeles de poli(NIPAm-*co*-AA) (P(NIPAm-AA)) en función de la concentración de NaCl usando 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 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 MAA, promovida por el equilibrio ácido-base. La disociación de carga favorece el hinchamiento para reducir las repulsiones electrostáticas.

La figura 4.5 ilustra este doble efecto de aumentar la concentración de sal en la solución, lo que conduce al comportamiento de hinchamiento-deshinchamiento. El panel A muestra que la carga del microgel aumenta monótonamente con 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. Puede observarse en la figura 4.5 que cuando pH 3 la carga dentro de la red de polímero es insignificante, lo que resulta en un hinchamiento apreciable en la figura 4.4B.

Esta teoría requiere que el interior del microgel sea de carga neutra. Claudio et al. [14] demostró que esta es una aproximación razonable cuando el microgel es más grande que $R = 125\text{ nm}$ y tiene un 50% de monómeros cargados. Los microgeles P(NIPAm-MAA) de este trabajo son más grandes que ese tamaño en la mayoría de las condiciones, particularmente cuando el pH está por encima del pK_a 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 MAA se desprotonen y se carguen eléctricamente. Describimos este efecto como el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre los grupos MAA, que es un concepto funcional que permite una interpretación clara de muchas características del comportamiento de estos microgeles.

4.2.2 Respuesta a la Temperatura

En esta sección muestra la respuesta de los microgeles de P(NIPAm-MAA) frente a cambios en la temperatura. En cada panel de la figura 4.6 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

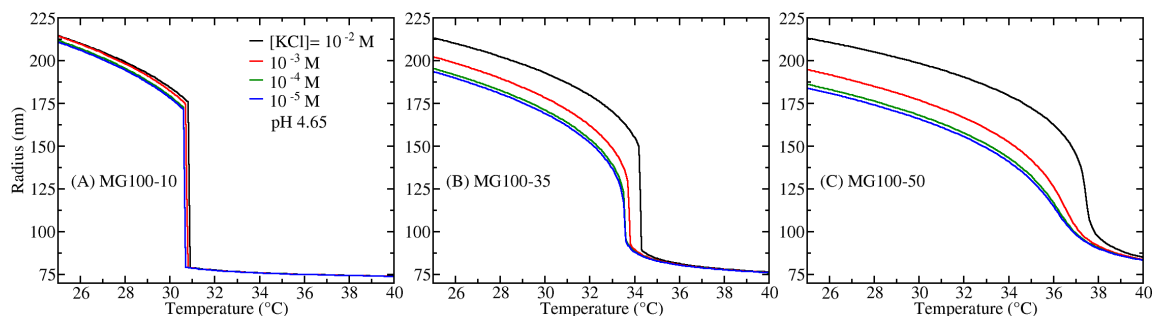


Figura 4.6: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sal en solución y pH 4,65. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen diferentes fracciones de MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

hinchado, mientras que a altas temperaturas se produce un estado colapsado (alta densidad de polímero).

Esto ultimo ocurre dado que el NIPAm adquiere un comportamiento hidrofóbico por arriba de su LCST, expulsando el solvente de su interior y colapsando su estructura [67]. 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 4.2)

Por otro lado, el estado hinchado del gel, es dominado por las repulsiones electrostáticas entre los segmentos de MAA cargados y los contraiones absorbidos, como fue descrito en la sección 4.2.1. El tamaño y la carga del microgel son funciones monótonamente decrecientes de la temperatura. El estado hinchado se caracteriza por un mayor grado de carga. De hecho, el VPT hinchado a colapsado está acompañado por una transición en el grado de carga de los segmentos MAA.

En la mayoría de las condiciones, pero no en todas, la transición entre estos dos estados del microgel es brusca y ocurre en un rango estrecho alrededor de una temperatura bien definida (T_{pt}). Comparando los diferentes paneles de figura 4.6, vemos que aumentar el contenido de MAA de los microgeles conduce a una transición más suave alrededor de T_{pt} .

La figura 4.7A muestra que la T_{pt} aumenta con el pH y la concentración de sal. Estos resultados son consistentes con los experimentos DLS que muestran que el VPTT de los microgeles P(NIPAm-MAA) aumenta con el pH [39], lo que también

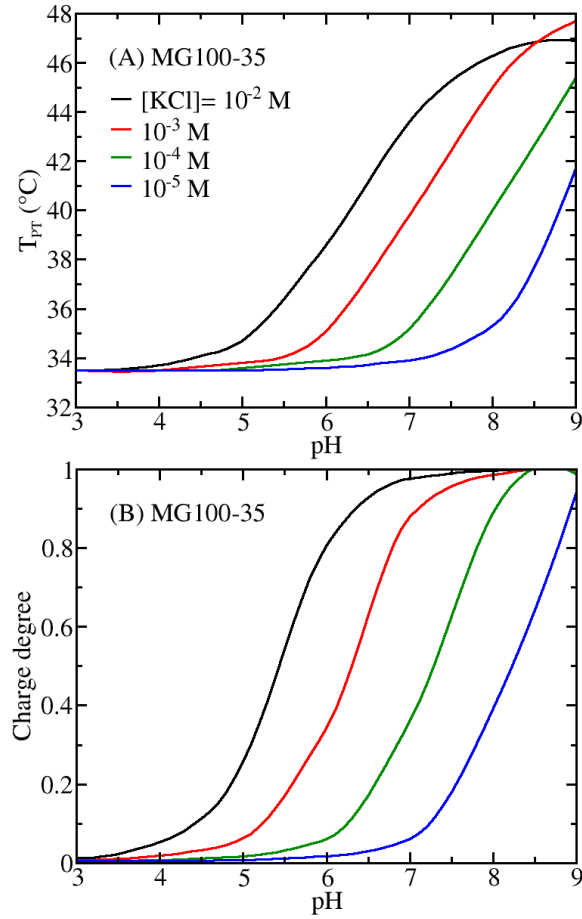


Figura 4.7: Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{PT} (A) y la fracción de MAA cargado a esta temperatura (B) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Este microgel P(NIPAm-MAA) tiene una longitud de cadena de $n_{ch} = 100$ y un MAA de 35%.

se ha observado para los microgeles P(NIPAm-AA) [11]. Hemos definido T_{pt} como el punto de inflexión de las curvas $R(T)$ de figura 4.6 entre los estados hinchado y colapsado [41].

El panel B de la figura 4.7 muestra el grado de carga de los segmentos MAA en el T_{pt} . Existe una clara correlación entre la dependencia de T_{pt} con el pH y la salinidad y el estado de carga del microgel en las condiciones VPT. La temperatura de transición aumenta con el pH y la concentración de sal, al igual que la carga de la red de polímeros.

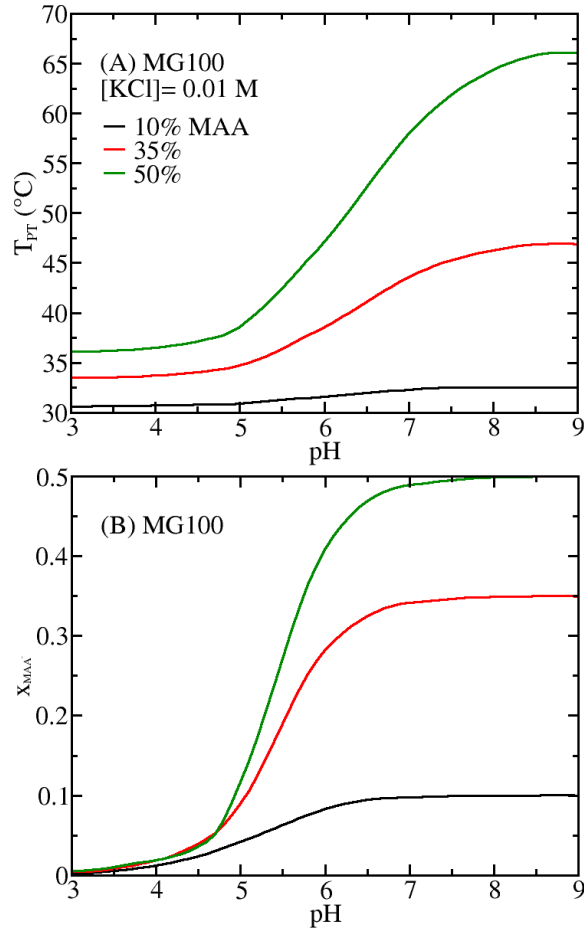


Figura 4.8: (A) Gráfico de temperatura de transición T_{PT} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01M$; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}}$ en función del pH para las mismas condiciones del panel A (*i.e.*, en el T_{pt}); x_{MAA^-} es proporcional a la carga total del polímero; N_{seg} es el mismo para todos los microgeles.

A diferencia de este comportamiento, el VPTT de los microgeles basados en PNIPAm permanentemente cargados disminuye con la concentración de sal [48]. 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 figura 4.7 muestran que la temperatura de transición está controlada por la cantidad de carga dentro del microgel. De hecho, aumentar el con-

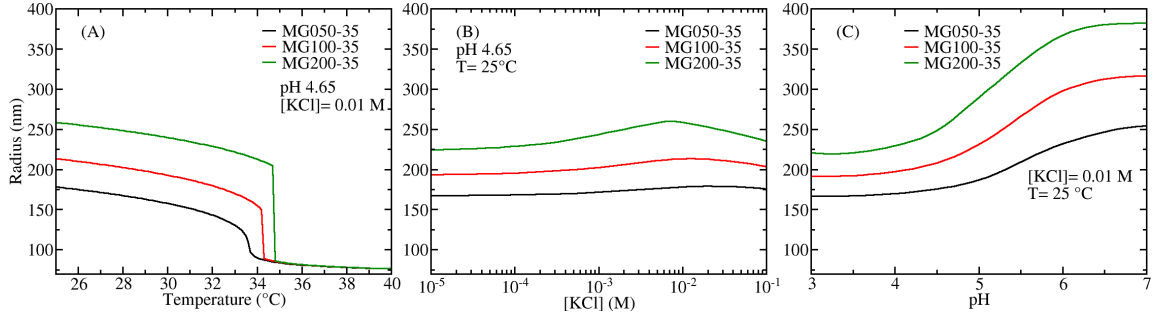


Figura 4.9: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura, la concentración de sal y el pH (paneles A, B y C respectivamente). Diferentes curvas corresponden a microgeles con segmentos de 50 (MG050), 100 (MG100) y 200 (MG200) por cadena de polímero, todos con 35% MAA.

tenido de MAA tiene el mismo efecto de desplazar el VPTT a valores más altos, como se ve en la figura 4.8A. 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, usamos la fracción total de monómeros cargados:

$$x_{MAA^-} = \frac{N_{MAA^-}}{N_{seg}} = f x_{MAA} \quad (4.21)$$

donde N_{MAA^-} es el número de segmentos MAA desprotonados; todas las demás cantidades se han definido en la sec. 4.1.1; 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 4.8B muestra que existe una clara correlación entre el T_{pt} y la carga total del microgel (dada por x_{MAA^-}) al cambiar el pH o el contenido de MAA del polímero.

4.2.3 Efecto del grado de entrecruzamiento

A continuación analizamos cómo el grado de entrecruzamiento de la red polimérica afecta el comportamiento descrito con anterioridad. Se ha considerado microgeles con segmentos de 50, 100 y 200 por cadena. Estas partículas tienen el mismo número total de segmentos. La figura 4.9 muestra la respuesta de los microgeles MAA de 35% a los cambios de temperatura (panel A), concentración de sal (B) y pH (C).

Los microgeles con menor grado de entrecruzamiento (mayor número de segmentos por cadena) presentan mayor hinchamiento. Este comportamiento de los microgeles P(NIPAm-MAA) ha sido confirmado experimentalment [36]. Cualitativamente, la respuesta a la concentración de sal y al pH es similar (paneles B y C de la figura 4.9, respectivamente) para todas las longitudes de cadena consideradas. Una observación interesante es que la disminución del grado de entrecruzamiento conduce a una transición de volumen más brusca cuando aumenta la temperatura (figura 4.9A); además la T_{pt} aumenta. Nuestros resultados son consistentes con los trabajos de Li and Tanaka [45] y Wu and Zhou [80] que informaron un cambio en la transición del volumen de NIPAm de continuo a discontinuo a medida que disminuye la concentración del entrecruzante en la síntesis.

En la figura 4.9 también vemos que el aumento de la longitud de la cadena (disminución del grado de entrecruzamiento) desplaza la T_{pt} a temperaturas más altas. Esto es consistente con los resultados de la espectroscopia UV de Lee et al. [43] para microgeles P(NIPAm-AA). Este comportamiento ocurre para todo el rango de condiciones exploradas en este trabajo

La constante de fuerza de la contribución elástica a la energía libre es inversamente proporcional a la longitud de la cadena n_{ch} (ver eq. 4.2). Al reducir el grado de entrecruzamiento, se hincha el microgel más flexible, lo que permite un mayor grado de 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 T_{pt} está fuertemente correlacionado con el grado de carga.

La presencia de unidades ácidas acentúa la dependencia de la T_{pt} con la longitud de la cadena porque incorpora el equilibrio de protonación al juego, pero este comportamiento es intrínseco al equilibrio entre las interacciones hidrofóbicas y la elasticidad de la red. 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 MAA.

4.2.4 Adsorción de drogas

Los microgeles de respuesta múltiple se consideran excelentes candidatos para el desarrollo de vehículos funcionales de administración de fármacos. Por ejemplo, se

sabe que el pH extracelular del tejido tumoral es más bajo que el del tejido sano [22], lo que hace que los microgeles respondan al pH. Lo que los hace ideales para la administración local de medicamentos contra el cáncer [17]. Además, para lograr la administración intestinal del fármaco por vía oral, Peppas *et al.* ha 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 [12, 20, 73, 78].

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 doxorubicina (Doxo) y la daunorrubicina (Dauno) son dos de las antraciclinas importantes y ampliamente utilizadas en la quimioterapia para tratar una amplia gama de cánceres [5, 13, 15, 57]. Estas terapias se pueden seguir usando fluorescencia y adsorbancia, lo que las hace atractivas desde el punto de vista de la investigación [60, 72, 77]. Además, estos fármacos tienen carga positiva en la mayoría de las condiciones, lo que puede facilitar su encapsulación en microgeles de polímeros aniónicos [44]. Serpe *et al.* [72] han estudiado la captación y liberación térmicamente 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, Martínez-Moro *et al.* [52] ha descrito la interacción entre Doxo y microgeles P(NIPAm-MAA) en diferentes condiciones.

La figura 4.10 muestra el número de moléculas de Dauno (panel A) y Doxo (panel B) dentro del microgel en función de la concentración de sal y el pH de la solución. Puede notarse que las mejores condiciones para la encapsulación de estos fármacos terapéuticos corresponden a baja concentración de sal y pH 6 – 8. La disminución de la concentración de sal favorece la absorción. Tanto Dauno como Doxo tienen una carga neta de +1 a un pH ácido y neutro. Como resultado, su absorción tiene que competir con la de los iones de potasio para neutralizar la carga negativa de la red de polímeros [60]. La figura 4.5 muestra que, en ausencia de un fármaco disuelto, la carga del microgel disminuye al disminuir la concentración de sal, lo que parece entrar en conflicto con la absorción mejorada que se observa en la figura 4.10 para estas condiciones. Sin embargo, tras la absorción del fármaco, el grado de carga de

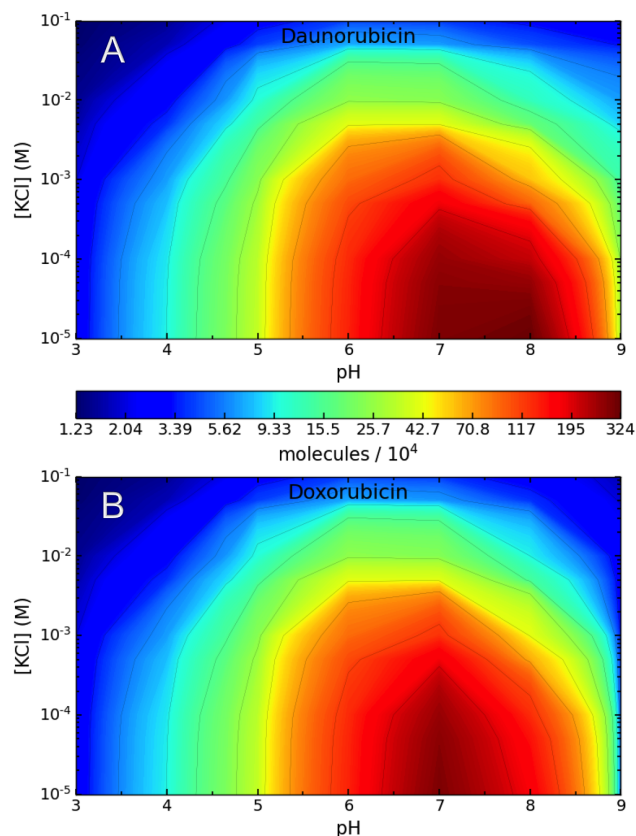


Figura 4.10: Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubicina (A) y doxorubicina (B) absorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es 1 mM y $T = 25^\circ\text{C}$. el microgel P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch} = 100$ de longitud de cadena y 35% MAA (MG100-35).

los segmentos MAA aumenta significativamente, particularmente en condiciones de bajo contenido de sal. Nótese también que este comportamiento está particularmente asociado con la concentración de fármaco relativamente alta considerada en este trabajo (1 mM).

La fracción de segmentos MAA cargados negativamente en el polímero aumenta con el pH, lo que explica por qué también aumenta la absorción de Dauno/Doxo (condiciones ácidas). Sin embargo, en condiciones alcalinas, la carga neta positiva de estos fármacos disminuye al aumentar el pH, lo que desfavorece la absorción. Como resultado, la absorción de Dauno/Doxo es una función no monotónica del pH.

En nuestro modelo, los puntos isoelectricos de Dauno y Doxo son 8.4 y 7.9, respectivamente. La figura 4.10 muestra que la absorción de ambas moléculas puede ser significativa alrededor y por encima de estos valores de pH. En otras palabras, existe una absorción considerable de moléculas con carga negativa dentro de la red de polímeros con carga similar. Aunque, de hecho, estas moléculas están cargadas negativamente en la fase de solución, la absorción ocurre porque el pH cae dentro del microgel, lo que permite que las drogas regulen su carga eléctrica y permanezcan cargadas positivamente dentro del microgel.

El punto isoelectrico más bajo de la doxorubicina se debe a la desprotonación de su grupo hidroxilo sustituyente (ver *D4* en figura 4.2 y tabla 4.3). Como resultado de esta carga negativa adicional en condiciones alcalinas, el rango de pH de adsorción significativa es ligeramente más amplio para la daunorrubicina.

Chapter 5

esfericas

5.1 Introduction

The design of functional vehicles for the encapsulation, transport and release on target of therapeutic agents is one of the major challenges of bionanotechnology [REFs: ye2018review] . Despite being formulated to specifically treat certain diseases, many drugs fail to capitalize on their design properties due to unwanted interactions with the environment surrounding the target [REFs: ibraheem2014administration] . Nanoparticles are being explored as a solution to these limitations, serving as smart carriers that can protect drugs against harmful environmental factors. Various nanocarriers, including liposomes, polymeric micelles, and inorganic particles have been investigated for their potential to effectively transport and release molecular cargo [REFs: chamundeeswari2019nanocarriers, lopez2012organic] . These nanocarriers can increase circulation time while conferring stealth properties to the complex, helping evade the immune or digestive systems [REFs: gaucher2010polymeric] . By increasing the circulation time, nanocarriers can also help reduce the need for frequent dosing.

Nanogels, in particular, are soft nanoparticles with diameters smaller than 200 nm that can uptake and release relatively large quantities of solvent in response to changes in the surrounding environment. Depending on the chemical composition of the crosslinked polymer that makes the nanogel skeleton, these particles can reversibly swell or deswell as a result of changes in temperature [REFs: agni-hotri2021temperature] , pH [REFs: sharma2022modulating] , salt concentration [REFs: saray-

[din2022calculations](#)] and a variety of external stimuli [[REFs: jung2020responsive,plamper2017functional,yang2022co](#)] . These unique properties of polymer nanogels can be exploited to target drug delivery to specific microenvironments, such as the acidic surroundings of tumors [[REFs: zhang2020construction](#)] or wounded or inflamed tissue with higher temperatures [[REFs: wu2010core](#)] . Besides, moieties can be incorporated on its polymeric surface to enhance specificity of the delivery, allowing the nanogel to selectively bind receptors on the target [[REFs: ahadian2020micro, mukherjee2019lipid, torchilin2007micellar, farokhzad2006targeted](#)] . The ability of nanogels to release medication in a controlled manner to specific environments can help prevent the emergence of drug resistance [[REFs: mukherjee2019lipid](#)] .

A significant and growing fraction of newly developed drugs to treat different diseases are proteins [[REFs: mahmood2023recent](#)] . The stability of these proteins is an issue, as they are easily denatured by changes in pH or temperature [[REFs: frokjaer2005protein](#)] . Polymer hydrogels and nanogels have been shown to help prevent protein denaturation and loss of activity under these conditions [[REFs: macdougall2021charged, peppas2004hydrogels](#)] . The potential to maintain the native conformation of proteins, combined with the stimuli-responsive behavior of nanogels, makes them suitable candidates to develop functional vehicles for the encapsulation, transport and targeted release of therapeutic proteins. Additionally, the polymer network of nanogels can be tailored with different functional groups to control both the specific or non-specific interactions with proteins, thereby increasing the efficacy of encapsulation/delivery.

Despite their many advantages, the development of nanogel-based drug delivery systems is still in its early stages, and there are still many questions that need to be addressed before this technology can be fully realized. In particular, as they are required to function in various biological fluids, understanding how nanogels behave and interact with proteins in terms of the composition of its polymer network and that of the protein solution is crucial for their successful application. In this work, we use a theoretical approach to study how the chemical identity and the spatial distribution of functional groups on the polymer network modify nanogel response and its interaction with specific proteins, with a specific focus on electrostatically driven protein adsorption/desorption. Our goal is to provide a better basic understand-

ing of the factors that influence the performance of these systems and to identify strategies to improve their effectiveness in the context of drug delivery nanovehicles.

We consider nanogels made of copolymer networks containing both a hydrophilic, charge-neutral monomer and a pH-responsive one, and their interactions with small globular proteins, such as cytochrome c, insulin, and myoglobin, which have different isoelectric points. ROJO The interaction of these proteins with polymeric systems have been studied previously [REFs: [hagemann2018use](#),[oberle2015competitive](#)] . These polymeric systems have also been studied using the theory and molecular simulations.[REFs: [sharma2022modulating](#),[hofzumahaus2021monte](#),[polotsky2013collapse](#),[walkowiak2020thermodynamic](#)] ROJO In particular, the search for more effective and less invasive means of insulin administration has presently immense importance in biomedical research [REFs: [lowman1999oral](#),[wong2018microparticles](#),[chaturvedi2013polymeric](#)] .

We study nanogels based on copolymers of vinyl alcohol (VA) and either a methacrylic acid (MAA; proton donor) or allylamine (AH; proton acceptor). Due to their biocompatibility these monomers are widely used for potential drug delivery applications [REFs: [asadi2020common](#),[sarwar2020smart](#),[lowman1999oral](#)] . With the goal of gaining a deeper understanding of the factors that affect the performance of these systems and identifying strategies for adjusting their interactions with different proteins, we derive and apply a statistical thermodynamic theory that allows for a molecular-level description of all chemical species. This method incorporates an explicit description of network conformations that result in elasticity, ion and solvent confinement entropic effects, acid-base equilibrium chemistry as well as electrostatic interactions and steric repulsions. Specifically, we investigate the effect of the spatial distribution of pH-sensitive units through the polymer network on the nanogel swelling and protein adsorption.

5.2 Method: Molecular Theory

5.2.1 Theoretical Framework

This study presents a self-consistent molecular theory to address the effect of the spatial distribution of pH-responsive groups on the thermodynamics of protein adsorption to polymer nanogels. This theory is based on the developments of Szleifer and

collaborators to study weak polyelectrolyte surfaces [REFs: [nap2006weak](#), [Gong2007PRL](#)] . We have previously extended this method to investigate the adsorption of proteins to pH-responsive hydrogel films [REFs: [hagemann2018use](#), [longo2019protonation](#)] . Here, we generalize the approach to describe the behavior of nanogels made of crosslinked pH-responsive copolymer chains in contact with a protein solution.

This method involves minimizing a generalized free energy that includes all relevant physical chemistry. Additionally, it incorporates a coarse-grained molecular characterization of the various chemical species present in the system, including their shape, size, charge distribution, and protonation state. The system under study is a single nanogel in equilibrium with an aqueous solution having externally defined bulk composition. Namely, the pH, salt concentration and protein concentration are the independent variables. The polymer network that gives structure to the nanogel contains two types of segments: a pH-sensitive unit, either acidic (MAA) or basic (AH), and neutral segment (VA); crosslinks are described as charge neutral segments. The semi-grand potential of this system contains the following contributions:

$$\begin{aligned} \Omega_{NG} = & -TS_{mix} - TS_{conf,nw} + F_{chem,nw} + F_{chem,pro} \\ & + U_{elec} + U_{ste} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} N_{\gamma} \end{aligned} \quad (5.1)$$

where S_{mix} is the translational (mixing) entropy of the solution species: water molecules (H_2O), hydronium ions (H_3O^+), hydroxide ions (OH^-), salt cations, salt anions and proteins. We consider a monovalent salt, NaCl, and assume it is completely dissociated into sodium (Na^+) and chloride ions (Cl^-). $S_{conf,nw}$ represents the conformational entropy that results from the flexibility of the polymer network, which can assume many different conformations. $F_{chem,nw}$ is the chemical free energy that describes the equilibrium between the protonated and deprotonated species of functional (acid/basic) units on the polymer. Similarly, $F_{chem,pro}$ describes the protonation of titratable residues of the protein. U_{elec} and U_{ste} account, respectively, for the electrostatic interactions and steric repulsions. Finally, the sum over γ expresses the chemical equilibrium between our system and the bulk solution that represent a bath for the free particles, where μ_{γ} and N_{γ} are the chemical potential and number of molecules of species γ , respectively; the subindex γ runs over the free chemical

species, including proteins. Note that Ω_{NG} is a semi-grand potential because the nanogel can exchange each of these free molecules with the bulk solution, while the polymer network is confined within our system. A detailed derivation of the theory can be presented in the SI.

5.2.2 Molecular Model: Proteins

We consider three different proteins: cytochrome c, insulin and myoglobin. To describe these molecules we use a coarse-grained model where each amino acid residue is described by a single particle centered at the position of the α -carbon. The sequence and position of all α -carbons are taken from the crystallographic structure in the corresponding protein data bank entry [REFs: berman2000protein] : 2B4Z for cytochrome c [REFs: mirkin2008high], IZNI for insulin [REFs: bentley1976structure], and 3RGK for myoglobin [REFs: hubbard1990x].

The coarse-grained particles in this model are each assigned a volume and a pKa (if the unit is titratable) according to the amino acid that they represent; this is summarized in table 5.1. These pKa's are taken from experimental data and represent average values over a large number of proteins [REFs: grimsley2009summary]. In most occurrences of a residue, its pKa does not significantly deviate from the average value. In specific instances, however, some residues display a different pKa; these special cases are described in the SI.

Using this molecular model, figure 5.1 shows the charge (number) of the three proteins in dilute solution as a function of pH. The isoelectric point (pI) is the pH at which the net charge of a protein is zero. From the graph, we obtain the values 9.65 (9.6 [REFs: hristova2019isoelectric]), 5.5 (5.3 [REFs: guckeisen2019isoelectric]), 7.15 (7.2 [REFs: batys2020myoglobin]) for the pI of cytochrome c, insulin, and myoglobin respectively; the values in parentheses are the pI of the proteins reported experimentally.

5.2.3 Molecular model: Nanogel Network

Besides the protein model presented in sec. 5.2.2, we need to specify a molecular model to describe the polymer network that makes the nanogel backbone. Such

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 5.1: Volume and pKa of the coarse-grained particles (amino acid residues, small ions, solvent molecules and polymer segments) considered in our molecular model.

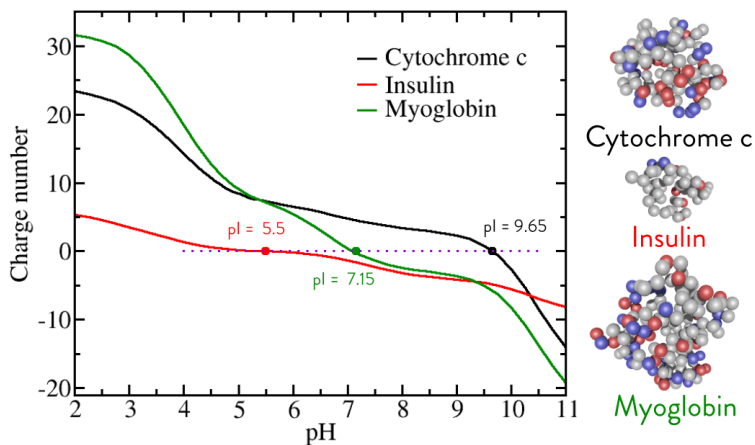


Figura 5.1: Left: Charge number of the proteins in a dilute solution as a function of pH (solid-line curves); filled circles mark the isoelectric point, where the net charge of the protein is zero. The coarse-grained representation of the proteins is illustrated on the right, where amino acid residues are represented by a single sphere (red: acidic; blue: basic; gray: charge-neutral residues).

model must provide a set of molecular configurations of the polymer network that is representative of the whole conformational space. A particular network conformation is given by the spacial position of all its segments.

The nanogel network is composed of 25 segment-long crosslinked polymer chains. In total this network contains 10054 segments. Each segment is a coarse-grained representation of either a crosslink, a charge neutral unit (VA) or an acid/basic monomer (MAA/AH). [tabla 5.1](#) includes the volume and pKa (if the unit is titratable) used to describe these coarse-grained units.

The polymer network has diamond-like topology, where crosslinks are placed at the original position of carbon atoms and connected to four polymer chains. To build this network, we first construct a three-dimensional structure where all the polymer chains are elongated, to then only keep the segments contained within a sphere of radius R_{cut} placed at the center of mass of the structure; R_{cut} is selected such that the network will have 10000 segments approximately. Originally, all polymer chains connect two crosslinks, but as a result of this procedure some will be left dangling on the network surface, connected to a single crosslink. Most of these superficial *dangling* chains are shorter than 25 segments. Altogether these chains contain 22% of the total number of segments. To generate the different molecular conformations of the polymer network, we have performed Molecular Dynamics simulations using GROMACS 5.1.2 [REFs: [indah12001gromacs](#)] (details are given in the SI).

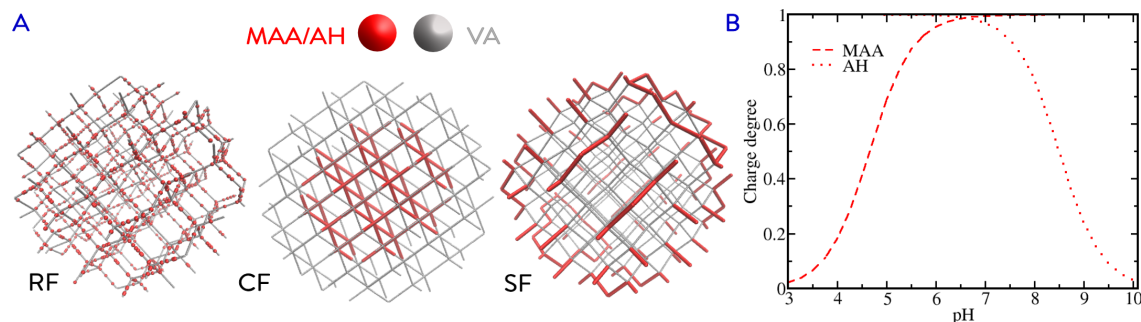


Figura 5.2: A: The nanogel network consists of crosslinked copolymer chains of a charge-neutral segment (VA: vinyl alcohol) and a functional unit (either MAA: methacrylic acid or AH: allylamine). This scheme illustrates the three different comonomer distributions considered; from left to right: RF: a random distribution of functional groups throughout the network; CF: the functional units occupy the center/core of the network; SF: only the free-end dangling chains on the network surface are functionalized with pH-responsive units. B: Plot of the ideal pH-dependent degree of charge of the isolated functional unit in dilute solution.

We consider different pH-responsive nanogels, containing either acid (MAA) or

basic (AH) groups, and evaluate three different topologies for the spatial distribution of these functional segments, which are schematized in figura 5.2: (i) a *randomly functionalized* (RF) structure where the pH-responsive segments are spread throughout the network at random, (ii) a *core functionalized* (CF) structure, where the pH-sensitive units occupy the center of the network, and (iii) a *surface functionalized* (SF) structure in which only the dangling chains on the network surface are ionizable.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Nanogel response

Primero, examinaremos el comportamiento de los nanogeles en función del pH cuando no hay proteínas presentes. Para cuantificar el tamaño de un nanogel, usamos el radio promedio conjunto de la partícula, R , que se puede calcular usando:

$$R = \frac{4 \int_0^\infty dr G(r) r \langle \phi(r) \rangle}{3 \int_0^\infty dr G(r) \langle \phi(r) \rangle} \quad (5.2)$$

donde r es la distancia desde el centro de masa de la red polimérica (nuestra teoría asume simetría radial); $\langle \phi(r) \rangle$ es la fracción de volumen local del polímero que incluye todos los tipos de segmentos, ionizables y de carga neutra; los corchetes angulares indican el promedio del conjunto sobre las diferentes conformaciones de la red; $G(r) = 4\pi r^2$ es el área superficial de la esfera de radio r .

La Figura 5.3 muestra R en función del pH para las tres diferentes estructuras consideradas: RF, CF y SF. El panel A describe un nanogel basado en MAA, mientras que el panel B describe 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 de 22%. Los nanogeles basados en MAA funcionalizados al azar y en el núcleo se hinchan al aumentar el pH (panel A). Esto se debe a que los segmentos MAA se desprotonan y se cargan eléctricamente a medida que aumenta el pH (ver figura 5.2B), lo que da como resultado repulsiones electrostáticas dentro de la red. La distancia entre las unidades MAA cargadas debe aumentar para reducir estas interacciones repulsivas, y la red aumenta para colocar estos segmentos más separados. Para disminuir la

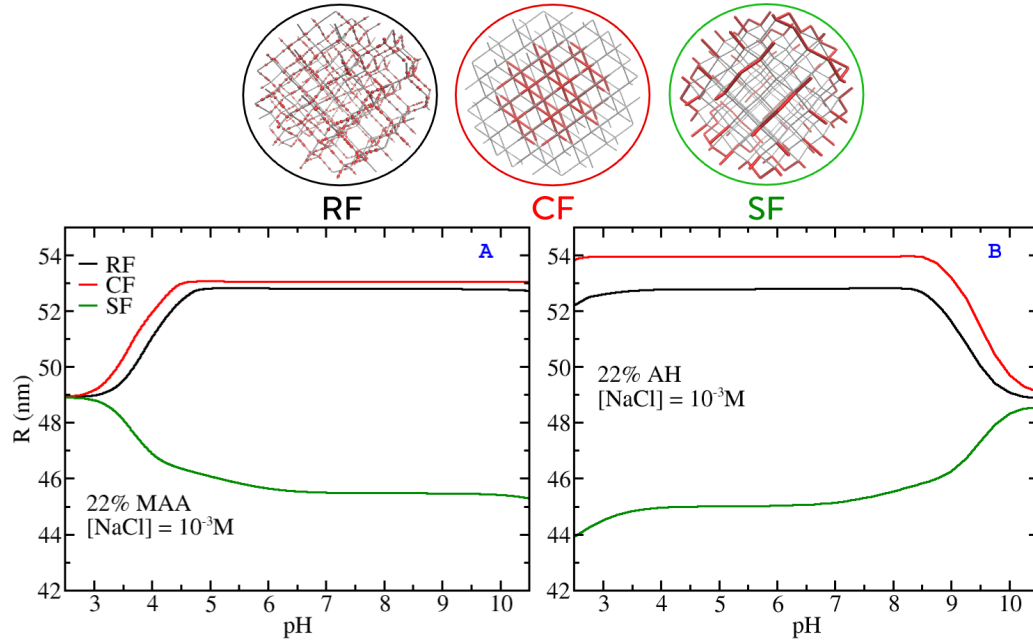


Figura 5.3: Conjunto de radio promedio, R , en función del pH para nanogeles de copolímero MAA-VA (panel A) y AH-VA (panel B). Se consideran tres estructuras diferentes en cada caso donde las unidades funcionales (MAA/AH) se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la red polimérica (RF), ocupan el centro 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 $10^{-3}M$.

repulsión entre unidades MAA cargadas, su distancia espacial debe aumentar, lo que resulta en una expansión neta de la red.

La red MAA funcionalizada en superficie, por otro lado, muestra un comportamiento de expansión completamente diferente en figura 5.3A. Este nanogel se deshinch a medida que las unidades titulables se cargan al aumentar el pH. Para explicar este comportamiento contrario a lo que se espera, observamos la distribución local de polímeros dentro de estas estructuras en diferentes condiciones. Para ello, utilizamos la distribución radial de los monómeros funcionales. Para los nanogeles MAA, dicha cantidad se define como:

$$\lambda_{MAA}(r) = 4\pi r^2 \langle \phi_{MAA}(r) \rangle \quad (5.3)$$

en donde $\langle \phi_{MAA}(r) \rangle$ da la fracción de volumen local de los segmentos de ácido metacrílico. 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.

figura 5.4 shows the radial distribution of MAA segments for the different networks considered. In each case we include results for a pH 3 solution, where MAA segments are charge-neutral, and pH 7 where they are fully charged; the intrinsic pKa of MAA is 4.65. For a random functionalization (panel A), the distribution of MAA segments is displaced towards the nanogel-solution interface as the network becomes electrically charged when pH increases. As aforementioned, this displacement occurs to reduce the electrostatic repulsions between charged MAA segments. As a result, the whole polymer distribution stretches out as well, including charge neutral VA units. The same behavior takes place for a core functionalization (panel B), although by design MAA segments in this network, whether charged or not, are more likely to occur at shorter distances from the nanogel center as compared to the other structures. The segment displacement to higher r 's observed in panels figura 5.4A and B explain the increase of the average nanogel size with pH seen in figura 5.3A for the RF and CF structures.

On the other hand, Figura 5.4C shows that the MAA distribution of the surface-functionalized nanogel displaces inwards when the network becomes charged with pH. To reduce intra-network repulsions, the dangling PMAA chains, which sit at the nanogel surface at low pH, also try to also occupy the volume inside the network when they are charged. This inwards shift of the distribution of polymer segments explains the deswelling behavior of the SF MAA nanogel with increasing pH seen in figura 5.3A. Note, however, that despite this partial displacement towards the interior of the network, the most likely position of MAA segments is always the polymer-solution interface for low and high pH solutions.

The behavior of AH-based nanogels is analogous to that of MAA-based networks, but in response to pH changing in the opposite direction. AH groups protonate and become positively charged with decreasing pH (see figura 5.2B). For randomly and core-functionalized AH-nanogels, this increase in electric charge with decreasing pH

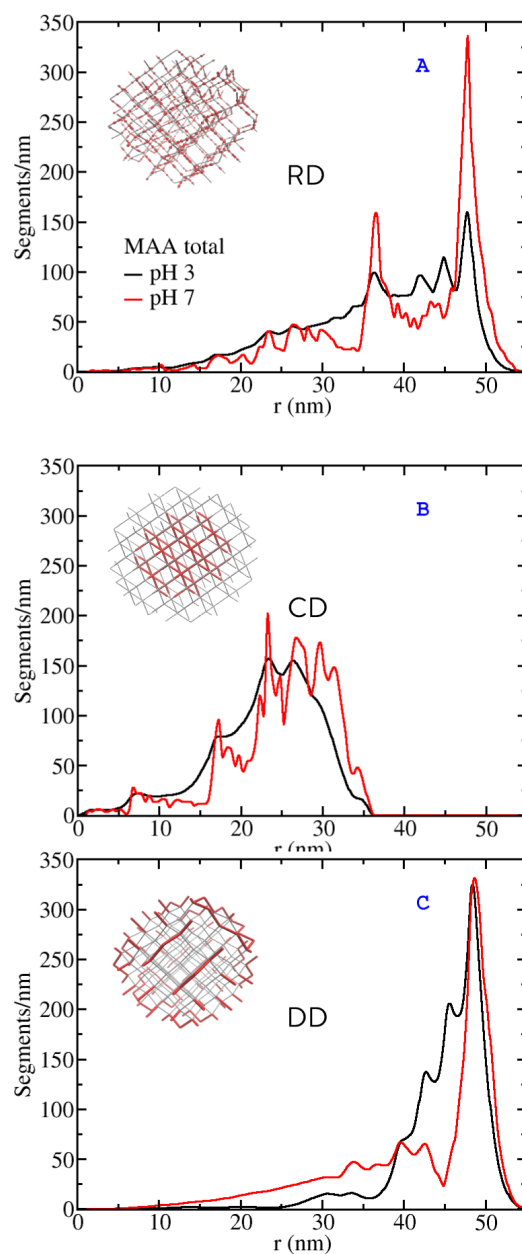


Figura 5.4: Distribución radial de segmentos MAA, $\lambda_{MAA}(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3}M$ NaCl; cada panel corresponde a un nanogel de MAA-VA diferente que tienen una funcionalización de red particular y 22% MAA. Estos grupos funcionales están completamente protonados (sin carga) a pH 3 y completamente disociados (cargados) a pH 7.

drives an outwards displacement of the segment distribution, which accounts for the swelling of figura 5.3B; for the SF structure, meanwhile, the deswelling with decreasing pH seen in figura 5.3B is consistent with an inward displacement of polymer

5.3.2 Protein adsorption to MAA-based nanogels

The preceding section evaluates the impact of network functionalization and chemical composition on the nanogel response to pH variations in the absence of proteins. The reorganization of polymer segments in as a result of pH changes is contingent upon a design choice: the distribution of functional units within the network. We will now examine the impact of this polymer reorganization on the level of protein adsorption to different nanogels and the spatial distribution of adsorbed proteins. This section discusses the adsorption of cytochrome c and myoglobin to different MAA-based nanogel structures. Results for insulin are omitted in this section because, due to its low isoelectric point, this protein does not adsorb to MAA-based nanogels

Consider a polymer nanogel centered at $r = 0$ in contact with a aqueous protein solution. The number of proteins adsorbed within the spherical shell between r and $r + dr$ is given by the excess quantity

$$\langle N(r) \rangle dr = 4\pi r^2 (\langle \rho(r) \rangle - \rho_{bulk}) dr \quad (5.4)$$

where $\langle \rho(r) \rangle$ and $\rho_{bulk} = \lim_{r \rightarrow \infty} \langle \rho(r) \rangle$ are respectively the local and bulk (number) density of protein. Integrating $\langle N(r) \rangle$ yields the *excess adsorption* (henceforth, simply the adsorption) that quantifies the number of proteins incorporated to the polymer network,

$$\Gamma = \int_0^\infty \langle N(r) \rangle dr \quad (5.5)$$

Figura 5.5 shows the adsorption from single protein solutions of cytochrome c (top panels, A and B) and myoglobin (bottom panels, C and D) to MAA-VA nanogels having different network functionalizations; pH is the independent variable of these calculations, but we also evaluate the effect of NaCl concentration by comparing different panels in the same line. The nanogels of Figura 5.5 contain 22% MAA, which

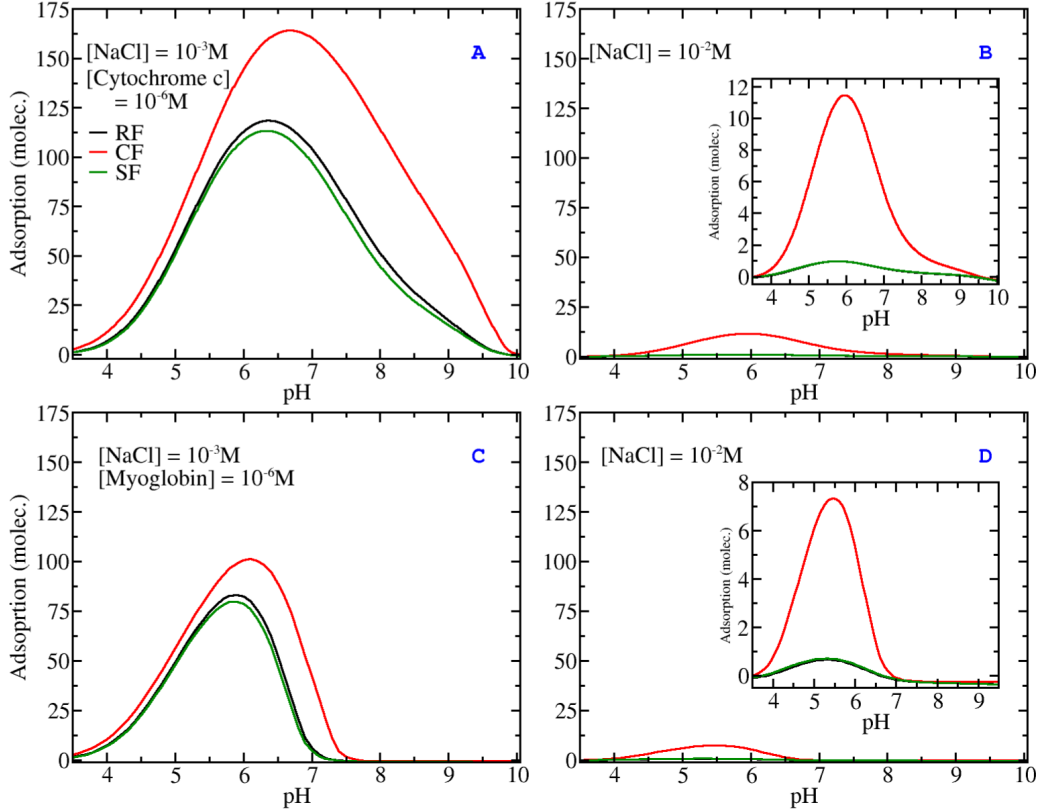


Figure 5.5: Plots of the excess adsorption Γ of cytochrome c (panels A and B) and myoglobin (panels C and D) to MAA-VA nanogels as a function of pH. The salt concentration is $10^{-3} M$ on the left-side panels (A and C) and $10^{-2} M$ on the right-side panels (B and D); the insets in these latter panels are zoom-in representations of the main plots. These nanogels have 22% MAA; protein concentration is $10^{-6} M$.

means that all the segments in the superficial dangling chains of the SF network are MAA. First, we will discuss the features of Figure 5.5 common to all panels to later concentrate on the effect of network functionalization.

Protein adsorption is a nonmonotonic function of pH with a maximum in the region between pH 5-7, which depends on the salt concentration and the specific protein. This pH response can be explained in terms of the electrostatic interactions and the protonation behavior of both MAA segments and that of the proteins. The acidic units in the polymer dissociate and the network becomes negatively charged when the pH increases above their intrinsic pK_a (4.65 for MAA). Above this pH, but below its isoelectric point, the protein is positively charged. Under these conditions,

the attractive protein-network interactions drive adsorption. At both sides of the pH scale, however, these interactions are either negligible (low pH) because MAA is protonated and charge-neutral or repulsive (high pH) because the proteins are negatively charged. Either situation leads to no protein adsorption ($\Gamma \approx 0$) or desorption ($\Gamma < 0$).

Overall, cytochrome c and myoglobin adsorptions are qualitatively similar. There are two main differences: (i) the magnitude of the adsorption (cythochrome c adsorbs significantly more), and (ii) cytochrome c adsorbs in a wider pH-range, which is due to its higher isoelectric point (9.65 as compared to 7.15 for myoglobin). This also implies that, when other conditions are the same, the maximum level of cytochrome c adsorption takes place at a slightly higher pH.

Relative to the other configurations, Figura 5.5 shows that the core distribution of MAA segments leads to significant more adsorption under most conditions. We will show that this behavior occurs because such distribution of MAA segments allows for a more effective embedding of the adsorbed protein with opposite electric charge. On the other hand, the adsorption behavior of randomly and surface functionalized networks is strikingly similar within the pH and salt concentrations studied, and for the different proteins as well. The distribution of functional units between RF and SF structures differs greatly at low pH. However, upon polymer reorganization at higher pH as MAA units charge, these distributions become relatively similar to each other (compare panels A and C of Figura 5.4), accounting for the comparable protein adsorption observed in RF and SF nanogels.

To explain the better performance of the core-functionalized MAA nanogels in incorporating proteins, Figura 5.6A shows the radial distribution of cytochrome c molecules as a function of the distance r to the nanogel center of mass. The solution has pH 7 and 1 mM NaCl, roughly corresponding to the conditions of maximum adsorption of this protein in Figura 5.5A. There is a clear correlation between the distribution of functional groups throughout the polymer network and the location of adsorbed cytochrome c.

When the center of the network is functionalized, the highest probability of finding the proteins occurs deep inside the nanogel between 20-30 nm. In Figura 5.6A the maximum number of adsorbed proteins occurs at $r = 28$ nm for 1 mM NaCl,

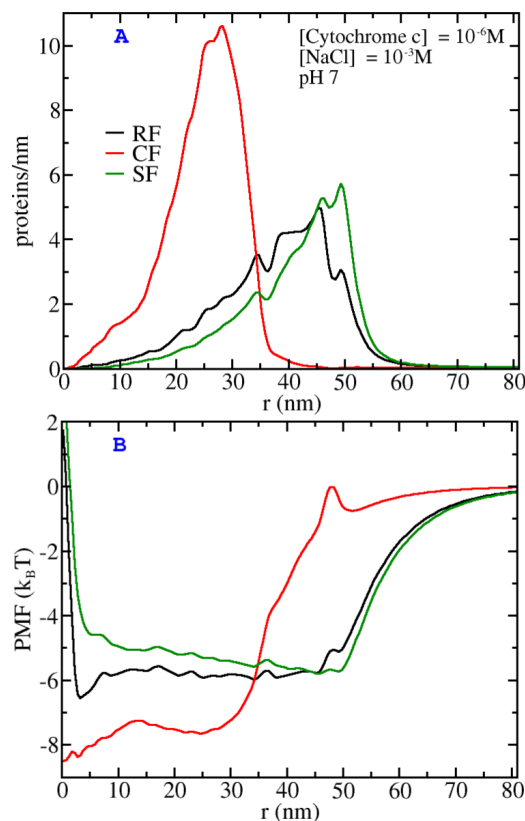


Figure 5.6: Panel A: Plot of the radial distribution of cytochrome c molecules, $\langle N(r) \rangle$, as a function of position for MAA-VA nanogels having different functionalizations. These networks have 22% MAA, pH is 7, protein concentration is 10^{-6} M, and NaCl concentration is 10^{-3} M. Panel B shows the potential of mean force, $PMF(r)$, acting on cytochrome c for the same conditions as panel A.

and at $r = 25$ nm for 10 mM NaCl. Congruently, the distribution profile of charged MAA displays a shallow maximum in this spatial region (see figure 5.4B, red curve). Namely, adsorbed proteins sit where they can be surrounded by oppositely charged network segments. Interestingly, the same phenomenon takes place in the adsorption to RF and SF nanogels. The distributions of charged MAA display a sharp maximum near the nanogel surface, between 45–50 nm (see red curves in figure 5.4, panels A and C). Fig 6A shows that cytochrome c is most likely to adsorb next to these regions of high MAA (charge) density.

When comparing the distributions of cytochrome c inside RF and SF nanogels in figure 5.6A, we observe that the profiles are relatively similar to each other. As

expected, if only the surface is functionalized, the protein profile shifts towards the polymer-solution interface. To further quantify the interaction with the nanogels, we use the potential of mean force acting on a protein at a distance r from the center of the polymer network, defined as:

$$PMF(r) = -k_B T \ln \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\rho_{bulk}} \quad (5.6)$$

where $\lim_{r \rightarrow \infty} PMF(r) = 0$, which means that the nanogel-protein interaction vanishes when they are sufficiently far apart.

Figura 5.6B shows $PMF(r)$ acting on cytochrome c at the same conditions of panel A, and for the three different nanogel functionalizations. Deep inside the nanogel, protein interaction with the CF structure is the strongest: $-8k_B T$ approximately in the spatial range from $r = 0$ to 30 nm. This interaction is relatively short-ranged because it decreases significantly above *approx* 40 nm. On the other hand, cytochrome c interactions with RF and SF nanogels extend longer, up to 55 – 60 nm. Inside the nanogel, these interactions are weaker than that with the CF structure. The adsorption free energy is $\sim -6k_B T$ and it remains roughly constant inside the RF nanogel. For the surface-functionalized nanogel, on the other hand, the minimum of $PMF(r)$ is also $\sim -6k_B T$, occurring next to the polymer-solution interface ($r \approx 50$ nm). As opposed to the RF structure, this interaction is not constant inside the nanogel, but it increases monotonously as r decreases and the protein gets further away from the functionalized superficial dangling chains.

A feature of protein adsorption that we have not fully discussed yet is the effect of salt concentration. For both cytochrome c and myoglobin, figura 5.5 shows that the incorporation of proteins inside the different nanogels is significantly enhanced by decreasing the solution salt concentration. In order further characterize this behavior in figura 5.7 presents cytochrome c adsorption as a function of NaCl concentration at pH 7. This graph shows that all network functionalizations display a qualitatively similar behavior, with a dramatic decrease in adsorption between 1 and 10 mM NaCl. At 100 mM all nanogels show negligible or negative adsorption.

When the solution salt concentration is high, both Na^+ and Cl^- ions are found in high concentrations inside the nanogel. These ions screen the electrostatic attractions between the positive charges of the protein and the negative charges on the

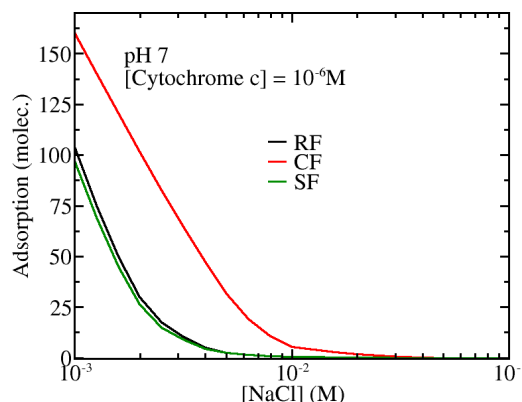


Figura 5.7: Plot of the excess adsorption Γ of cytochrome c as a function of salt concentration at pH 7 for MAA-VA nanogels with different network functionalizations having 22% MAA; protein concentration is $10^{-6} M$.

polymer, which are the driving force for protein adsorption. Effectively, these attractions become short range and are not strong enough to result in significant if any protein adsorption. If the concentration of NaCl is lower, on the other hand, these electrostatic interactions are less screened and effectively longer ranged, which allows for protein adsorption. Thus, decreasing the salt concentration enhances adsorption. ROJO Such behavior has been observed in experiments, which show that there is an increase in protein adsorption at low salt concentration [REFs: [becker2012proteins](#), [henzler2010adsorption](#), [xu2018interaction](#)]. Adsorption to planar and spherical polyelectrolyte brushes is significantly favored at lower salt concentrations, as demonstrated using isothermal titration calorimetry. ROJO

In considering carriers for protein delivery applications our results suggest that the best conditions for encapsulation correspond to low salt. The adsorption profiles of figura 5.7 are qualitatively similar for the three functionalizations, but the number of proteins inside the nanogel is always significantly larger for the CF structure. This feature may be critical in designing delivery vehicles for a target having intermediate salt concentrations. The CF incorporates more proteins at the same conditions, but it may not be able to release them if the target has intermediate salt concentration. For these conditions the random functionalization will be able to release all its cargo.

5.3.3 Insulin adsorption AH-based nanogels

Insulin does not adsorb to the MAA nanogels of sec. 5.3.2 This is because the isoelectric point of insulin and the pKa of MAA are close to each other, meaning that for solutions where the protein is positively charged, the nanogel is charge neutral, and if the nanogel is negatively charged so is the protein. In this context, we decided to investigate insulin adsorption to an allylamine nanogel, which is positively charged below its pKa of 9.5, overlapping with the range where insulin is negatively charged. Other than the functional monomers, the structure of these AH-VA copolymer networks is the same as that of the MAA-VA nanogels previously described.

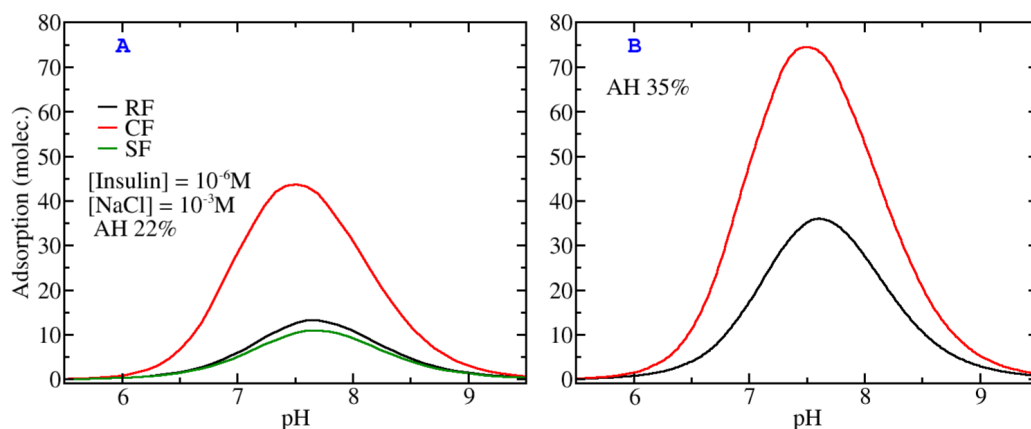


Figure 5.8: Plots of adsorbed insulin molecules, Γ , as a function of pH for AH-VA nanogels having different functionalizations. The AH content is 22% for the polymer networks of panel A and 35% for those of panel B (this latter degree of functionalization cannot be achieved for the SF nanogel). Other conditions are 10^{-3} M NaCl, and $[\text{Insulin}] = 10^{-6}$ M.

Figure 5.8A shows the adsorption of insulin to AH-based nanogels having different spatial functionalizations. Again we have considered networks with 22% of pH-sensitive monomers so that we can include results for the SF nanogel, whose dangling chains are AH homo-polymers. The main features of this plot are qualitatively similar to those of cytochrome c and myoglobin adsorption to the MAA nanogels (see Figure 5.5). Namely, insulin displays a nonmonotonic adsorption as a function of the solution pH. Moreover, we see that the core distribution of AH segments captures more insulin than either the random or the surface functional-

izations. The RF and SF nanogels display relatively similar pH-dependent adsorption profiles. Finally, a rising salt concentration has a critical effect on the magnitude of insulin adsorption, which is because of the increasing shielding of network-protein electrostatic attractions by mobile ions (see figura ??).

Despite the qualitative similarities between the adsorptions profiles of Figura 5.8A and those of cytochrome c and myoglobin (Figura 5.5A and C), we see that the number of insulin molecules captured by the AH-networks is significantly less than that of the other proteins by the MAA-based nanogels. For this reason, we will next evaluate the effect of the degree of functionalization of the polymer network to enhance protein adsorption. Figura 5.8B presents insulin adsorption for nanogels having 35% of AH segments. Here, the surface functionalized structure is not included because there are not enough segments in the dangling chains. A higher HA content drives more adsorption, which results from comparing both panels of Figura 5.8. Once again, the CF nanogel adsorbs more insulin than the RF network (more than twice as many proteins for the conditions of this calculations).

Figura 5.9A shows how adsorbed proteins are spatially distributed inside the different AH-based nanogels with 22 degree of functionalization. The pH of these results corresponds to the adsorption maximum of Figura 5.8A. Insulin adsorption to the CF nanogel is not only significantly higher than the adsorption to the RF and SF nanogels, but it also occurs deeper inside the structure. The most likely position of an insulin molecule occurs around $r = 25$ nm for the CF nanogel, while this position moves to around 40 – 45 and 50 nm for the RF and SF structures respectively.

For MAA-based nanogels, Figura 5.6A shows relatively minor differences between the distributions of cytochrome c inside RF and SF networks. Such are differences slightly accentuated for insulin adsorption to the AH-VA nanogels, as seen in Figura 5.9A. Insulin distribution is displaced to the interior of the network in the randomly modified nanogel as compared to the surface functionalization, where proteins are more likely to occupy the very vicinity of polymer-solution interface. Overall insulin distribution profiles are still relatively similar for these two structures. These results show, once again, that network design (polymer synthesis) provides a tool to control the distribution of proteins inside the nanogel.

Panel B of figura 5.9 shows the potential of mean force acting on insulin molecules

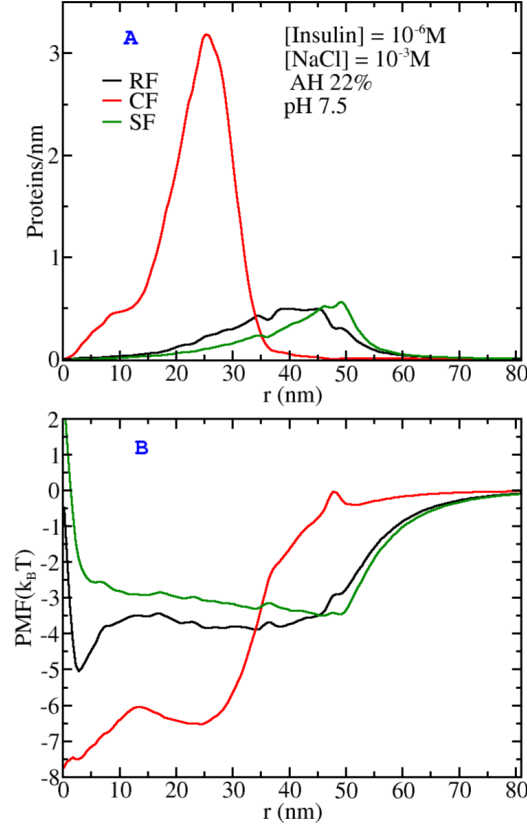


Figure 5.9: A: Plot of the local distribution of insulin molecules, $\langle N(r) \rangle$, as a function of position for AH-VA nanogels having 22% pH-sensitive segments in different network configurations. pH is 7.5, 10^{-6} M insulin and 10^{-3} M NaCl. B: Potential of mean force, $PMF(r)$, as a function of position for the same conditions as panel A.

at the same conditions as panel A. The attractive interaction on adsorbed insulin ranges from -8 to $-6k_B T$ inside the CF structure and from -5 to $-4k_B T$ inside RF nanogel. Inside the SF nanogel the potential presents a minimum of $-4k_B T$ at the surface and then increases monotonously as r decreases inside the gel.

5.4 Conclusions

We have presented a study of protein adsorption to polymer nanogels having different pH-responsive functionalizations. We have derived and applied a thermodynamic theory that can be informed by a coarse-grained molecular model.

The

Bibliography

- [1] 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.
- [2] F. Afroze, 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.
- [3] 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.
- [4] Juan A. Allegretto, Juan M. Giussi, Sergio E. Moya, Omar Azzaroni, and Matias Rafti. Synthesis and characterization of thermoresponsive zif-8@pnipam-co-maa microgel composites with enhanced performance as an adsorption/release platform. *RSC Adv.*, 10:2453–2461, 2020. doi: 10.1039/C9RA09729E. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C9RA09729E>.
- [5] 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.

- [6] 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.
- [7] 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>.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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>.

- [13] 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>.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Mahrokh Dadsetan, K. Efua Taylor, Chun Yong, eljko Bajzer, Lichun Lu, and Michael J. Yaszemski. Controlled release of doxorubicin from ph-responsive microgels. *Acta Biomaterialia*, 9(3):5438 – 5446, 2013. ISSN 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.019>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112004564>.
- [18] 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>.
- [19] 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.

- [20] 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>.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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>.
- [24] Juan Martín Giussi, Marta Martinez, Agustin 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.
- [25] 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>.
- [26] 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>.

- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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>.
- [31] 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>.
- [32] Prateek K. Jha, Jos W. Zwanikken, Francois 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.
- [33] 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.
- [34] 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.

- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Shanza Rauf Khan, Zahoor H. Farooqi, Muhammad Ajmal, Mohammad Siddiq, and Abbas Khan. Synthesis, Characterization, and Silver Nanoparticles Fabrication in N-isopropylacrylamide-Based Polymer Microgels for Rapid Degradation of p-Nitrophenol. *J. Dispers. Sci. Technol.*, 34(10):1324–1333, 2013. ISSN 01932691. doi: 10.1080/01932691.2012.744690.
- [38] 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>.
- [39] Jochen Kleinen and Walter Richtering. Defined complexes of negatively charged multisensitive poly(N- isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) microgels and poly(diallyldimethylammonium chloride). *Macromolecules*, 41(5):1785–1790, 2008. ISSN 00249297. doi: 10.1021/ma7023683.
- [40] Jochen Kleinen, Andreas Klee, and Walter Richtering. Influence of architecture on the interaction of negatively charged multisensitive poly(N-isopropylacrylamide)-co-methacrylic acid microgels with oppositely charged polyelectrolyte: Absorption vs adsorption. *Langmuir*, 26(13):11258–11265, 2010. ISSN 07437463. doi: 10.1021/la100579b.
- [41] 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.
- [42] Jonas Landsgesell, Lucie Nová, Oleg Rud, Filip Uhlík, David Sean, Pascal Hebbeker, Christian Holm, and Peter Košovan. Simulations of ionization equi-

- libria in weak polyelectrolyte solutions and gels. *Soft Matter*, 15(6):1155–1185, 2019. ISSN 17446848. doi: 10.1039/c8sm02085j.
- [43] 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.
- [44] 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>.
- [45] Yong Li and Toyochi 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.
- [46] Lei 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>.
- [47] 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>.
- [48] 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>.

- [49] 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.
- [50] 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>.
- [51] Micaela Alejandra Macchione, María Florencia Sacarelli, Ana Racca, Catalina Biglione, Graciela Panzetta-Dutari, and Miriam C Strumia. Dual-responsive nanogels based on oligo (ethylene glycol) methacrylates and acidic co-monomers. *Soft Matter*, 15(47):9700–9709, 2019. ISSN 1744-683X. doi: 10.1039/C9SM01180C. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C9SM01180C>.
- [52] 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>.
- [53] 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.
- [54] Gayle E. Morris, Brian Vincent, and Martin J. Snowden. Adsorption of lead ions onto n-isopropylacrylamide and acrylic acid copolymer microgels. *J. Colloid Interface Sci.*, 190(1):198–205, 1997. ISSN 00219797. doi: 10.1006/jcis.1997.4843.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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>.
- [61] 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>.
- [62] Felix A Plamper and Walter Richtering. Functional microgels and microgel systems. *Accounts of chemical research*, 50(2):131–140, 2017. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00544.

- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] Ricarda Schroeder, Andrey A. Rudov, L. Andrew Lyon, Walter Richtering, Andriy Pich, and Igor I. Potemkin. Electrostatic Interactions and Osmotic Pressure

- of Counterions Control the pH-Dependent Swelling and Collapse of Polyampholyte Microgels with Random Distribution of Ionizable Groups. *Macromolecules*, 48(16):5914–5927, 2015. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.5b01305.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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>.
- [74] Shan Shi, Qianman Wang, Tao Wang, Shuping Ren, Yu Gao, and Na Wang. Thermo-, pH-, and light-responsive poly(N -isopropylacrylamide-co -methacrylic acid)-au hybrid microgels prepared by the in situ reduction method based on au-thiol chemistry. *J. Phys. Chem. B*, 118(25):7177–7186, 2014. ISSN 15205207. doi: 10.1021/jp5027477.
- [75] 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.
- [76] Wenjuan Su, Man Yang, Kongshuang Zhao, and To Ngai. Influence of Charged Groups on the Structure of Microgel and Volume Phase Transition by Dielectric Analysis. *Macromolecules*, 49(20):7997–8008, 2016. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.6b00809.

- [77] M. Than Htun. Photophysical study on daunorubicin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Luminescence*, 129(4):344 – 348, 2009. ISSN 0022-2313. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2008.10.020>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022231308003013>.
- [78] Madeline Torres-Lugo, Marcos Garca, Rae Record, and Nicholas A Pappas. Physicochemical behavior and cytotoxic effects of p(methacrylic acid-ethylene glycol) nanospheres for oral delivery of proteins. *Journal of Controlled Release*, 80(1):197 – 205, 2002. ISSN 0168-3659. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00027-5). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365902000275>.
- [79] 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.
- [80] Chi Wu and Shuiqin Zhou. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous? *Macromolecules*, 30(3):574–576, 1997. doi: 10.1021/ma960499a.
- [81] 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>.
- [82] 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>.