



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

MICROGELES POLIMÉRICOS:
ENCAPSULADO, LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS Y SOLUCIONES COLOIDALES

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

DIRIGADO POR:

GABRIEL S. LONGO
ALBERTO G. ALBESA

2023

Departamento de Química

Guía del Navegante...

Este capítulo busca guiar al lector en la distribución de la presente tesis.

En el primer capítulo, nos adentramos en el mundo de los materiales blandos, la esencia misma de estos materiales y su relevancia en la industria y la ciencia moderna. Se hará énfasis en los hidrogeles poliméricos, dentro de los cuales encontraremos a los films y a los micro y nanogeles. Se presentarán las motivaciones y objetivos. Además, se mencionará el enfoque utilizado y las herramientas empleadas para llevar a cabo los estudios presentados en la tesis.

El primer sistema polimérico, los films, se retoma en los antecedentes (Capítulo 2), en los cuales se da una primera aproximación de parte de quien escribe a la Teoría Molecular. Se destacan las ventajas del uso de la termodinámica estadística y cómo su combinación con las propiedades moleculares de los sistemas nos permite explicar toda la termodinámica necesaria para la descripción y predicción de su comportamiento en condiciones determinadas. Se revisan conceptos generales del comportamiento de estas cadenas poliméricas entrecruzadas en solución. En particular, se mostrará la respuesta de los films poliméricos a cambios en el pH y la concentración de sal. En este capítulo también se encontrarán resultados sobre la aplicabilidad en el secuestro de dos proteínas modelos (citocromo y mioglobina). La elección de estos resultados, respuesta a pH, concentración salina y adsorción de proteínas, se debe a que son retomados en los capítulos subsecuentes. En particular las proteínas se han seleccionado debido a su uso en resultados experimentales en sistemas poliméricos ([REFs]). Además, en los siguientes sistemas (siguientes capítulos) se incorporarán nuevos adsorbatos: insulina y las drogas doxorubicina (y su derivado daunorubicina). La insulina se ha seleccionado debido a su importancia en tratamientos contra la diabetes y la búsqueda de mejores transportadores

para mejorar su dosificación. El mismo criterio se ha utilizado en la elección de las drogas doxorubicina y daunorubicina, antraciclinas muy utilizadas en tratamientos anticancerígenos.

Es importante destacar que durante este aprendizaje se logró la presentación de trabajos en los que se hace uso de los films poliméricos en el secuestro de moléculas, con aplicabilidad en la agroquímica ([REFs: film-glifosato]), y principalmente en su uso de secuestro de fármacos ([REFs: polimainas]), trabajo con el cual nos acercamos a los objetivos de esta tesis.

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

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

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

Contents

Guía del Navegante...	2
1 Introducci'ón	6
1.1 Materia Blanda	6
1.1.1 Objetivos	8
1.1.2 Films poliméricos	9
1.1.3 Geles poiméricos 2	9
2 Antecedentes	12
2.1 Encapsulado y Liberación de medicamentos	13
2.2 enoque teorico	14
2.3 Teoría Molecular en films poliméricos	15
2.4 Solución Bulk	27
2.5 resolución numérica	30
2.6 resultados	33
2.6.1 Respuesta al pH	34
2.6.2 Adsorción	40
3 Geles poliméricos	43
3.1 Modelo de 2 fases	43
3.1.1 Fase Microgel	46
3.1.2 Fase solución	52
3.1.3 Minimización gráfica	53
3.1.4 Absorción	54
3.2 Resultados y discusión	58

3.2.1	Respuesta al pH y la concentración de sal	58
3.2.2	Respuesta a la Temperatura	64
3.2.3	Efecto del grado de entrecruzamiento	68
3.2.4	Adsorción de drogas	69
4	esfericas	74
4.1	Introduction	74
4.2	Method: Molecular Theory	75
4.2.1	Teoria red polimérica	76
4.2.2	Solución Bulk	85
4.2.3	Resolución numérica	86
4.2.4	Molecular Model: Proteins	88
4.2.5	Molecular model: Nanogel Network	89
4.3	Results and discussion	91
4.3.1	Caraterización del nanogel	91
4.3.2	Protein adsorption to MAA-based nanogels	96
4.3.3	Insulin adsorption AH-based nanogels	100
4.4	Conclusions	103
	Bibliography	110

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 cosméticos 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 adsorción y proteccion de adsorbatos de interés. [REFs] Estas características permiten que las drogas/proteinas adsorbidas interactuen con el solvente en el cual son solubles. La proteccion es debido a la restricción de entrada de otros agentes, además de evitar el movieminto libre de la droga. Aspecto muy importante si se consideran proteínas y se quiere evitar su desplegamiento. Sin embargo la caracteris más notoria de estos materiales es su capacidad de responder a diversos estímulos. 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 partículas, intercambios iónicos lo cual permite el diseño de transportadores. [here](#)

El diseño de dispositivos inteligentes optimizados para tareas específicas basados en estos sistemas blandos demanda un estricto control sobre sus propiedades físico-químicas y la respuesta de estos geles. Por lo tanto, su diseño requiere el desarrollo de modelos que permitan entender y predecir cómo el comportamiento observado resulta de la interrelación entre la estructura química del polímero que lo componen, la organización 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 múltiples estímulos (pH y temperatura) de manera predecible y controlable representa un desafío enorme. [\[REFs\]](#)

1. materiales con respuesta a Temperatura 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 concentración 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 teórico haciendo uso de simulaciones computacionales para el desarrollo de nuevos materiales capaces de responder a estimulo, una caracterización exhaustiva de sus propiedades fisicoquímicas.

Descripción generica de los obsetivos... uso de la TM y familiarización 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 aproximación. Fisi-quimica de geles homogeneos y con respuesta a multi estimulo. Adsorción de drogas terapeuticas, condiciones optimcas de encapsulamiento. Complejización de la teoría para modificar parametros de estructura, es decir como afectan los cambios de topologia de estos geles. Adsorción de biomoleculas. Nueva inormación sobre la arquitectura de los geles y su relación con la adsorción de proteínas. Finalmente, método estocastico para el estudio de soluciones de geles polimericos. En un modelo sencillo. Cómo la concentración afecta la distribución de tamaño, adsorción, etc.

1.1.1 Objetivos

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

1. Desarrollar un modelo mecano-estadístico utilizando TM para describir la respuesta a cambios de pH, temperatura y concentración de sal en microgeles formados por homopolímeros.
2. Extender dicho modelo para investigar el comportamiento de microgeles de copolímeros con respuesta a múltiples estímulos.
3. Estudiar los mecanismos de adsorción de diferentes biomoléculas en los microgeles en función de las condiciones del medio y la estructura/composición química de las cadenas poliméricas.
4. Desarrollar un modelo combinando simulaciones de TM y Dinámica Molecular (DM) para estudiar el comportamiento de estos microgeles en soluciones relativamente concentradas.

1.1.2 Films poliméricos

Los hidrogeles de cadenas de polímeros reticulados se consideran actualmente para diversas aplicaciones en la investigación biomédica. Estos materiales pueden parecerse al tejido biológico y diseñarse para responder a cambios ambientales como variaciones de temperatura, pH, fuerza iónica y en la concentración de algunas biomoléculas. Como resultado, los hidrogeles poliméricos actualmente son candidatos prometedores para el desarrollo de una variedad de biomateriales con aplicaciones para biodetección [1,2], ingeniería de tejidos [3,4], regeneración ósea [5], materiales biomiméticos [6,7], administración de fármacos [8,9] y muchas otras aplicaciones biomédicas [10]. Estos hidrogeles responden a los cambios de pH porque contienen una cantidad significativa de grupos ácidos débiles.

1.1.3 Geles poiméricos 2

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, nanocarries 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: saraydin2022calculations] 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 understanding 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.

Chapter 2

Antecedentes

Los hidrogeles consisten en una red de polímeros reticulados altamente hidratados y generalmente biocompatibles. Estos materiales pueden parecerse a los tejidos biológicos y pueden ser diseñados para responder a cambios ambientales como variaciones en la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la concentración de algunas biomoléculas. Como resultado, los hidrogeles poliméricos son actualmente candidatos prometedores para el desarrollo de una variedad de biomateriales con aplicaciones en biosensores, ingeniería de tejidos, regeneración ósea, materiales biomiméticos, administración de medicamentos y muchas otras aplicaciones biomédicas. El entorno acuoso dentro de los hidrogeles puede proteger a las proteínas de la desnaturalización y agregación, mientras que estas se mantienen activas y estructuradas cuando se liberan de los hidrogeles. En la administración oral de medicamentos, los hidrogeles con respuesta al pH han sido ampliamente investigados como vehículos funcionales que pueden encapsular y liberar proteínas, evitando su degradación en el entorno gastrointestinal. El control de la función y el comportamiento de un biomaterial requiere comprender su interacción con las proteínas. Por ejemplo, las lentes de contacto basadas en ácido poli(metacrílico) (PMAA) con respuesta al pH están expuestas al fluido lagrimal, que contiene cientos de proteínas. La adsorción de algunas de estas proteínas debe evitarse, ya que afecta la comodidad de uso y puede provocar inflamación; sin embargo, la adsorción selectiva de proteínas con propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, como la lisozima, podría ser beneficiosa. Sin embargo, la interacción entre proteínas y superficies poliméricas está gobernada por

una compleja interacción entre diferentes grados de libertad. La capacidad tanto del adsorbato como del material adsorbente para protonar/deprotonar, regular su carga eléctrica y modificar el entorno cercano, contribuye a esta complejidad.

2.1 Encapsulado y Liberación de medicamentos

Los sistemas de delivery de drogas son dispositivos que permiten administrar fármacos de forma controlada y localizada en el organismo, mejorando la eficacia de su componente activo y reduciendo así los efectos secundarios. Los hidrogeles son materiales compuesto por cadenas polimérica entrecruzadas que pueden absorber grandes cantidades de agua, o el solvente en donde se encuentren. Los hidrogeles son excelente candidatos como sistemas de delivery de drogas porque tienen propiedades como la biocompatibilidad, la sensibilidad a estímulos externos y la capacidad de liberar el fármacos por difusión (al colapsar) o por hinchamiento.

Los primeros hidrogeles.... Ejemplos de hidrogeles usados en terapias... investigación de los estímulos.

Uno de los principales desafíos en el campo de la administración de fármacos es lograr una entrega controlada y sostenida de los medicamentos al sitio de acción deseado en el organismo. Los hidrogeles poliméricos ofrecen una solución prometedora a este desafío debido a sus propiedades físicas y químicas ajustables, que les permiten encapsular y liberar fármacos de manera controlada.

Existen varias técnicas para la preparación de hidrogeles poliméricos utilizados en sistemas de administración de fármacos. Una de las más comunes es la polimerización de monómeros hidrofílicos en presencia de un agente entrecruzante. Esto permite formar una red tridimensional de polímeros que retiene grandes cantidades de agua. La estructura porosa resultante del hidrogel permite la difusión controlada del fármaco a través de la matriz polimérica.

La capacidad de los hidrogeles poliméricos para liberar fármacos de manera controlada puede ajustarse mediante la modificación de la composición química del hidrogel, incluyendo el tipo de polímero utilizado, la densidad de entrecruzamiento y la presencia de grupos funcionales. Estos factores influyen en la velocidad de absorción y desorción del fármaco, lo que a su vez afecta la liberación del mismo.

Además de su capacidad de liberación controlada de fármacos, los hidrogeles poliméricos también pueden proteger los fármacos de la degradación enzimática y mejorar su estabilidad durante el almacenamiento. Esto es especialmente importante para aquellos fármacos que son sensibles a las condiciones del entorno, como la temperatura o el pH.

El uso de hidrogeles poliméricos como sistemas de administración de fármacos ha demostrado beneficios significativos en varios campos de la medicina. Por ejemplo, se han desarrollado hidrogeles para la liberación sostenida de fármacos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las infecciones.

En resumen, los hidrogeles poliméricos son materiales prometedores en el campo del drug delivery debido a su capacidad de encapsular y liberar fármacos de manera controlada. Su versatilidad y ajustabilidad química permiten adaptar sus propiedades a las necesidades específicas de cada aplicación médica. El uso de hidrogeles poliméricos en sistemas de administración de fármacos ofrece la posibilidad de mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios no deseados de los medicamentos.

2.2 enoque teorico

Descripcion de diferentes teorias para explicar comportamiento de estos nanogles, diferentes escalas de modelado. Resultados obtenidos....

Cerrar con teoria molecular y su aplicabilidad en films para explicar comportamientos.. pH, sal, adsorcion.

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 [11y13], 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 capitulo mostraremos un estudio de estos sistemas poliméricos haciendo uso de de la teoría molecular.

2.3 Teoría Molecular en films poliméricos

Este método consiste en minimizar una energía libre generalizada que incluye toda la termodinámica relevante que engloba los procesos del film contacto con una solución. Para tal fin se necesita de una descripción molecular de grano grueso de las diferentes especies químicas que componen el sistema. Dicha descripción incluye forma, tamaño, distribución de carga (si los hubiese) y estado de protonación de cada componente molecular en los casos que corresponda. En esta primera instancia describiremos la fisicoquímica de un film se encuentra en equilibrio con una solución acuosa, la tiene una composición definida externamente. Es decir, el pH, la concentración de sal y la concentración de adsorbatos son variables independientes.

Para esto nos valdremos de una red polimérica que da estructura a nuestro film, que posee distintos tipos de segmentos: una unidad sensible al pH, en particular consideraremos un film polimérico compuesto por unidades ácidas de ácido metacrílico (*MAA*).

Este film está se encuentra en equilibrio con una solución con una temperatura, pH y concentración de sal definidas. Además vamos a considerar que en dicha solución hay un adsorbato: una proteína. El uso de una proteína modelo como adsorbato nos beneficia dado que poseen distintos tipos de aminoácidos con lo cual la descripción de la misma puede ser usada para otros adsorbatos.

Considerando los aspectos anteriores es posible definir una energía libre:

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

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

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

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

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

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

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

Como primer termino tenemos la entropía de mezcla de las especies móviles, entre ellas consideramos a nuestra proteína modelo:

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

en donde $\frac{1}{k_B T}$, y k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta del sistema. La variable z es la coordenada que mide la distancia a la superficie de soporte de nuestro film, el área total de esta superficies es A . $\rho_{\gamma}(z)$ y μ_{γ} es densidad local, a un z dado, y potencial químico estándar de la especie γ respectivamente. El subíndice γ toma en cuenta la molécula de agua y sus respectivos iones (hidronio e hidróxido), además de los iones provenientes de la sal (K^+ y Cl^-).

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

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

La entropía conformational que resulta de la flexibilidad de la red polimérica de

nuestro film se representa en $S_{conf,nw}$, esta tiene en cuenta todas las configuraciones de un set $\{\alpha\}$.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

τ de la proteína.

Que se define como:

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

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

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

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

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

La energía electrostática se define como:

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

en donde $\Psi(z)$ es el potencial electrostático dependiente de la posición, ϵ es la constante de permitividad del medio, q_{γ} es la carga correspondiente a la especie móvil γ , q_{τ} es la carga que adquieren los segmentos titulables de la proteína. Finalmente q_{MAA} es la carga que adquiere el segmento de MAA al desprotonarse.

En este contexto, la densidad de carga media es:

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

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

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

en donde v_{γ} , v_{λ} y v_{MAA} son los volúmenes moleculares de los segmentos γ de las especies libres, λ en la proteína y los segmentos de MAA del film respectivamente. $\langle \rho_{pro,\lambda}(z) \rangle$ es definimo de la misma forma que en la eq. 2.8. Cabe destacar que el subidice λ considera a todos los segmentos de la proteína, es decir $\tau \in \lambda$.

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

En este punto la energía libre, eq 2.1, puede escribir como una funcional de funciones, esta ultimas están compuesta por la probabilidad de distribución de segmentos de nuestra red polimérica. las densidades locales de cada una de las especies libres, incluidas la densidad de conformaciones de la proteína, los grados de protonación/disociación y el potencial electrostático local. Es decir:

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

en donde:

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

de forma más explicita:

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

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

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

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

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

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

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

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

Todos los subíndices utilizados se encuentran en la tabla.... hacer tabla (?)

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

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

$$\rho_\gamma(z)v_w = a_\gamma \exp[-\beta q_\gamma \Psi(z)] \exp[-\beta v_\gamma \Pi(z)] \quad (2.18)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$\begin{aligned}
P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \ln f(z) \right] \\
& \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta q_{MAA} \Psi(z) \right] \\
& \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta v_{MAA} \Pi(z) \right]
\end{aligned} \tag{2.23}$$

en donde:

$$\begin{aligned}
Q = & \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \ln f(z) \right] \right\} \\
& + \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta q_{MAA} \Psi(z) \right] \right\} \\
& + \sum_{\alpha} \left\{ \exp \left[-A \int_0^\infty \rho_{MAA}(\alpha, z) \beta v_{MAA} \Pi(z) \right] \right\}
\end{aligned} \tag{2.24}$$

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

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

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

$$\begin{aligned}
\rho_{pro}(\theta, z) v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[-A \int_0^\infty dz' n_{\tau}(\theta, z, z') \ln f_{\tau}(z') \right] \\
& \prod_{\lambda} \exp \left[-A \int_0^\infty dz' n_{\lambda}(\theta, z, z') [v_{\lambda} \beta \Pi(z') + q_{\lambda} \Psi(z')] \right]
\end{aligned} \tag{2.26}$$

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

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

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

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

resultando:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Una vez obtendos los potenciales $\Pi(z)$ y $\Psi(z)$ es posible derivar cualquier cantidad termodinámica de interés a partir de la energía libre o haciendo uso de alguna expresión explícita.

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

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

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

2.4 Solución Bulk

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

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

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

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

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

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

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

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

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

en consecuencia para las especies libres γ resulta:

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

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

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

finalmente para la densidad de proteína se obtiene:

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

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

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

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

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

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

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

y para la proteína:

$$\tilde{a}_{pro} = \rho_{pro}(\theta) v_w \exp [cn_\tau \ln f_\tau^b] \exp [cn_\lambda (v_\lambda \beta \Pi^b + q_\lambda \Psi^b)] \quad (2.42)$$

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

2.5 resolución numérica

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

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

$$1 = \left[\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(i_z) \rangle v_{\lambda} + \langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle v_{MAA} \right], \text{ with } i_z = 1, 2, 3.., n_z \quad (2.43)$$

Esta expresión nos permite resolverla en cada una de las capas i_z , cuya posición es descrita usando la coordenada $z_i = (i_z - 0.5)\delta$, lo cual las ubica en el centro de cada capa. i_z toma los valores de 1 a n_z , donde se toma a n_z lo suficientemente grande para que las densidades de cada una de las especies involucradas, así como también el potencial electrostático, convergan a sus valores en el baño térmico (el bulk de la solución). Es decir: $\rho_{\gamma}(n_z) = \rho_{\gamma}^b$, $\rho_{pro}(\theta, n_z) = \rho_{pro}^b(\theta)$ y $\Psi(n_z) = \Psi^b = 0$. Para valores de $n_z \geq 500$ es posible obtener estas condiciones (dado que no son impuestas per se en la teoría).

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

$$\rho_\gamma(i_z)v_w = a_\gamma \exp[-\beta q_\gamma \Psi(i_z)] \exp[-\beta v_\gamma \Pi(i_z)] \quad (2.44)$$

El grado de disociación:

$$\frac{f_j(i_z)}{1 - f_j(i_z)} = \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} \exp[-\beta q_j \Psi(i_z)] \quad (2.45)$$

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

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

$$\langle \rho_{MAA}(i_z) \rangle = \sum_{\alpha} P(\alpha) \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \quad (2.46)$$

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

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \ln f(i_z) \right] \\ & \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta q_{MAA} \Psi(i_z) \right] \\ & \exp \left[-A\delta \sum_{i_z=1}^{n_z} \rho_{MAA}(\alpha, i_z) \beta v_{MAA} \Pi(i_z) \right] \end{aligned} \quad (2.47)$$

en donde $\Psi(i_z)$ y $\Pi(i_z)$ son los valores discretos de la interacción de estos potenciales. Además $\rho_{MAA}(\alpha, i_z)$ es la distribución discreta para una conformación α la cual son provistas por el tipo de modelo molecular a usar.

La densidad discreta de la proteína se expresa:

$$\rho_{pro}(\theta, i_z) v_w = \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[-A\delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\tau}(\theta, i_z, j_z) \ln f_{\tau}(j_z) \right] \prod_{\lambda} \exp \left[-A\delta \sum_{j_z=1}^{n_z} n_{\lambda}(\theta, i_z, j_z) [v_{\lambda} \beta \Pi(j_z) + q_{\lambda} \Psi(j_z)] \right] \quad (2.48)$$

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

$$\epsilon \frac{\Psi(i_z + 1) + \Psi(i_z - 1) + 2\Psi(i_z)}{\delta^2} = \langle \rho_q(i_z) \rangle \quad (2.49)$$

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

$$\langle \rho_q(i_z) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_z) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_z) \langle \rho_{pro,\tau}(i_z) \rangle q_{\tau} + f(i_z) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_z) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (2.50)$$

Así como fueron definidas las condiciones de contorno en la ecuación 2.32 es necesario redefinirla para el sistema discreto. Estas condiciones deben satisfacer el desvanecimiento del potencial electrostático, $\Psi(n_z) = 0$. Además se debe cumplir que la derivada del mismo entre la superficie de soporte y el film se anule. Para ello es necesario agregar una capa $i_z = 0$. Y resultando:

$$\frac{\Psi(1) - \Psi(0)}{\delta} = 0 \quad (2.51)$$

lo que implica que $\Psi(0) = \Psi(1)$.

En resumen dadas las condiciones del bulk de la solución, o condiciones de laboratorio, compuestas por el pH, concentración de sal y proteína. temperatura, restaría conocer las cantidades $\Psi(i_z)$ y $\Pi(i_z)$ para cada capa i_z . Variables que pueden ser obtenidas al resolver en cada capa las ecuaciones 2.43 y 2.49. De esta forma el número de ecuaciones totales a resolver es $2n_z$ (dos por cada capa). el número de términos

de cada ecuación es dependiente de la cantidad de especies involucradas con sus respectivas conformaciones. Este sistema de ecuaciones es resuelto usando el método de Newton con Jacobiano libre, implementado en códigos FORTRAN desarrollados en el grupo de trabajo.

2.6 resultados

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

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

Estos conceptos sobre el comportamiento ácido/base son fundamentales para comprender el equilibrio que ocurre cuando los monómeros se confinan en una red polimérica. Al introducir los monómeros ácidos en la red, se establece un equilibrio dinámico entre las formas protonadas y desprotonadas de los grupos protonables. Este equilibrio depende tanto del pH del entorno como de las características intrínsecas de los monómeros y la red polimérica. Al comprender y controlar este equilibrio, es posible modular las propiedades físicas y químicas del gel, como su capacidad de hinchamiento, solubilidad, y liberación de fármacos.

Estos principios serán utilizados en los sistemas de estudio que se explorarán

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

2.6.1 Respuesta al pH

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

$$f = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (2.52)$$

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

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

Estas consideraciones de solución ideal se utilizan comúnmente para estimar el grado de carga de las unidades ácidas dentro de cadenas poliméricas. Sin embargo, este comportamiento es diferente para sistemas en confinamiento. Las unidades protonables que forman parte de una red polimérica son un ejemplo de ello, lo cual modifica significativamente su comportamiento de protonación.

Red polimérica

A continuación, describiremos el comportamiento de estos sistemas confinados, es decir, hidrogeles sensibles al pH, haciendo uso de la teoría planteada anteriormente.

A diferencia de las soluciones diluidas, las unidades ácidas en una red de polímeros experimentan repulsiones electrostáticas cuando están cargadas. Esto conduce a una disminución significativa en la disociación de estos grupos en comparación con las condiciones ideales, con el objetivo de reducir la fuerza de las repulsiones dentro de la red polimérica.

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

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

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

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

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

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

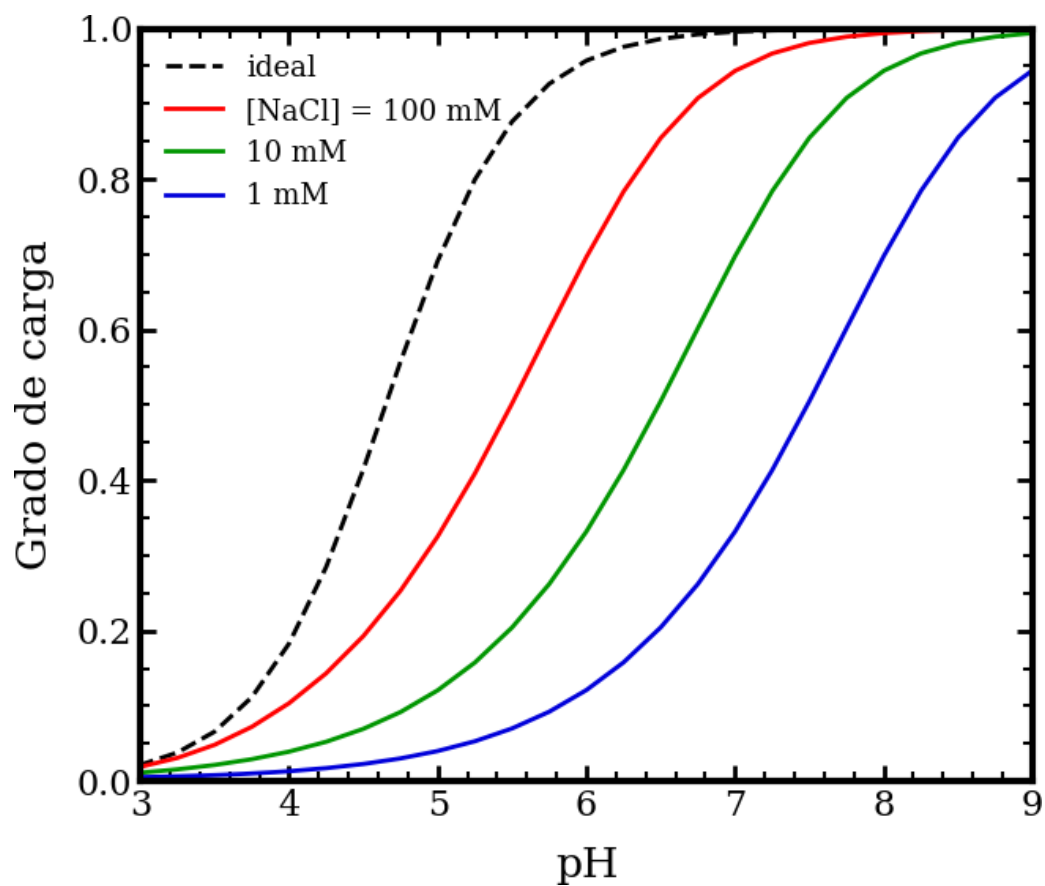


Figura 2.1: Grado de carga del gel como función del pH. Grado de carga para un monomero aislado en presentado en curva a rayas, se compara para diferentes concentraciones de sal, a mayor concentración salina más nos acercamos al sistema ideal.

$$pH(z) = -\log_{10}(H^+) \quad (2.53)$$

Una baja disociación (un alto nivel de protonación) de las unidades ácidas de las unidades de MAA en nuestra red polimérica puede explicarse en términos del pH local dentro del material. Definimos el pH del gel (pH_{gel}) como el promedio del pH local dentro del film. Resultados previos han mostrado que esta cantidad está bien definida [48].

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

Haciendo uso de la ecuación 2.52, es posible calcular el grado de disociación de la estructura polimérica de nuestro hidrogel. El uso de pH_{gel} es indispensable en condiciones en las que el pH difiere del pH de la solución. El mismo procedimiento se realiza para calcular el estado de protonación local de las unidades titulables de las especies que se adsorben en el film (ver figura 2.2).

Sin embargo, aunque esto parece simplificar el problema de establecer la carga neta de cualquier especie del sistema, en nuestro caso la red polimérica y las proteínas adsorbidas, determinar los cambios en el pH local tiene la misma complejidad que el problema original (es decir, la de determinar la carga del film). El pH local que se establece dentro del material, así como su valor en la interfaz entre el film polimérico y la solución acuosa, es el resultado de la compleja interacción entre la organización molecular, los equilibrios químicos y las interacciones físicas que determinan el equilibrio termodinámico en las condiciones impuestas externamente (pH, concentración de sal). Todas las variables expuestas se describen en la sección 2.3.

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

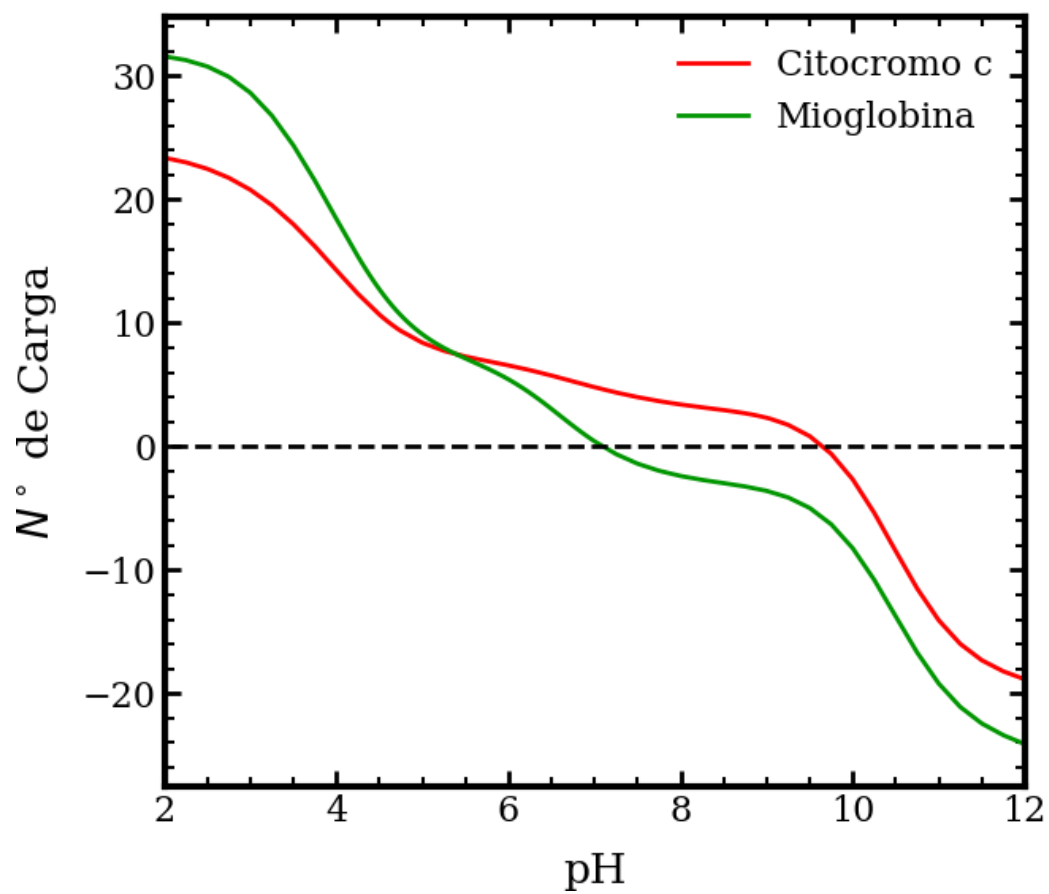


Figura 2.2: Número de carga de las proteínas citocromo c y myoglobina como función del pH en el seno de la solución (bulk). La línea a trazos muestra el cambio en el signo de la carga.

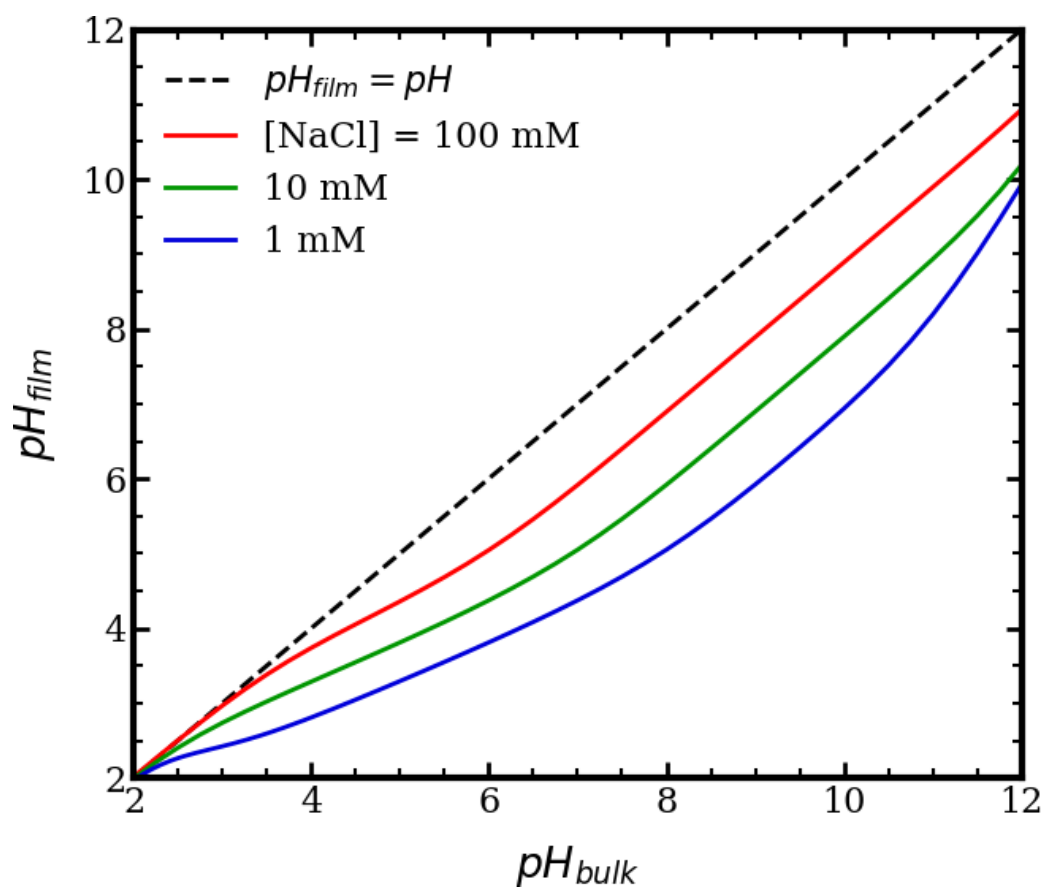


Figura 2.3: pH local del gel como función del pH en el seno de la solución (bulk). Cada curva corresponde a una concentración de sal diferente.

2.6.2 Adsorción

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

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

Para cuantificar la cantidad de proteína adsorbida en el film utilizamos la expresión:

El uso de hidrogeles como transportadores de adsorbatos con fines terapéuticos ha despertado un gran interés en la comunidad científica. Sin embargo, para aprovechar al máximo su potencial, es fundamental poder cuantificar y cualificar la adsorción de moléculas y proteínas en estos sistemas.

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

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

$$\Gamma_{pro} = \int_0^\infty dz (\rho_{pro}(z) - \rho_{pro}^b) \quad (2.54)$$

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

Para estas proteínas, la adsorción es una función no monótona del pH de la solución (ver Figura 2.4). A pH bajo, estas proteínas tienen una carga alta y positiva, pero la red de poliácidos (*PMAA*) solo está débilmente ionizada (véanse las

Figuras 2.1 y 2.2). A un pH suficientemente alto, por otro lado, el polímero está fuertemente cargado negativamente, pero las proteínas tienen una carga débilmente positiva o incluso negativa. Bajo tales condiciones (muy) ácidas o alcalinas, las interacciones electrostáticas son débilmente atractivas o repulsivas, respectivamente. No hay fuerza impulsora para la adsorción. A valores de pH intermedios, por el contrario, donde tanto la proteína como la red polimérica tienen cargas fuertes y opuestas, se produce una adsorción significativa con un máximo necesario en tales condiciones.

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

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

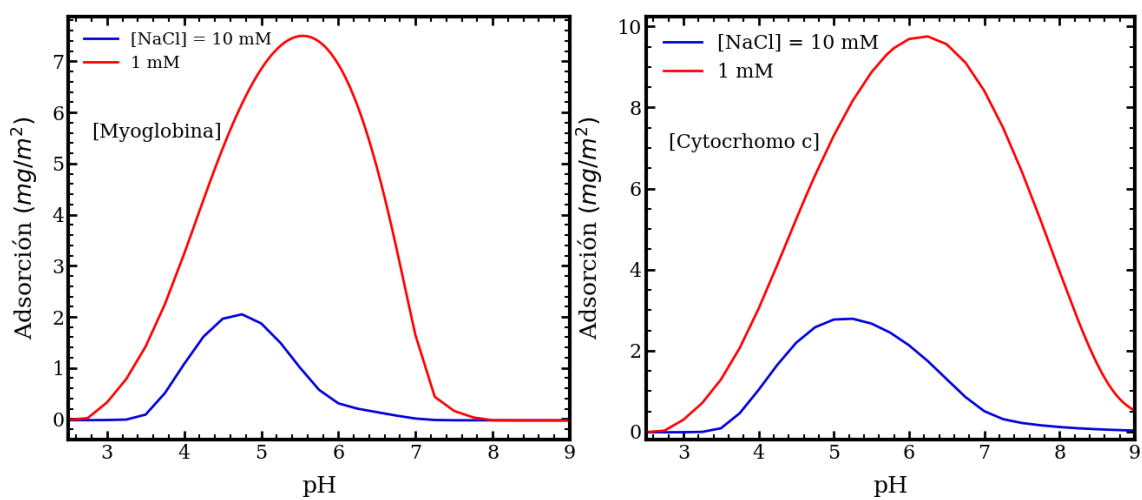


Figura 2.4: Adsorción de proteínas: citocromo c y mioglobina en panel A y B respectivamente. La concentración de los adsorbatos es $10\mu M$

Chapter 3

Geles poliméricos

3.1 Modelo de 2 fases

Los microgeles son partículas blandas hechas de cadenas de polímeros entrecruzados que pueden mostrar un comportamiento tanto coloidal como macromolecular [63]. 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 [76]. 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 [76].

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}) [59, 60]. 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) [59], cuyo volumen colapsa por encima de 32°C , siendo el mismo para el polímero lineal [69].

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, 52], así como la copolimerización con un monómero iónico o ionizable [28, 49]. Este último enfoque produce microgeles de respuesta múltiple que son susceptibles a cambios en la temperatura, el pH y la concentración de sal [21, 76]. Los microgeles de NIPAm y AA han sido ampliamente estudiados [6, 8, 34, 55]; 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, 55, 80]. 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 [63]. 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, 75]. Estos microgeles también se pueden aplicar para el desarrollo de emulsiones sensibles al pH, la sal y la temperatura [9, 56, 57, 70] o como plantillas para el ensamblaje de nanomateriales [80]. 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, 53, 62].

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, 77]. También se han aplicado teorías y simulaciones moleculares de grano grueso para investigar el comportamiento de los microgeles poliméricos sensibles a estímulos [3, 42, 66]. 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, 54, 65]. Recientemente, estudios con simulaciones han considerado la respuesta al pH de microgeles compuestos de polímeros reguladores de carga [30, 50, 67, 71, 72]. 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, 64].

3.1.1 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 un potencial semi gran canónico, Ω_{MG} .

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

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

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

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

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

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

donde ϕ_{MAA} es la fracción de volumen que ocupan estos segmentos, v_{MAA} es el volumen de este segmento, y f es el grado de disociación del mismo. La fracción de volumen de los segmentos MAA cargados es $f\phi_{MAA}$, y la de las unidades protonadas

(o sin carga) es $(1 - f)\phi_{MAA}$. Los potenciales químicos estándar son μ_{MAA-}^0 y μ_{MAAH}^0 para las especies desprotonadas(cargadas) y protonadas, respectivamente. Utilizamos el término segmento para identificar las unidades químicas que componen las cadenas poliméricas (MAA y NIPAm).

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

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

Esta expresión se describe en [54] y proviene del modelo de elasticidad del caucho, donde N_{seg} es el número total de segmentos en la red de polímero y n_{ch} es el número de segmentos por cadena de polímero o *longitud de cadena*. La constante de elasticidad en esta energía es proporcional al cociente $\frac{N_{seg}}{n_{ch}}$, que representa el número (total) de cadenas de polímero en el microgel. El radio del microgel seco es R_0 , lo que satisface con la expresión:

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

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

U_{elec} y U_{ste} representan respectivamente las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas.

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

donde q_{γ} y q_{MAA} son la carga eléctrica de las moléculas γ y los segmentos MAA,

respectivamente. El potencial electrostático dentro de la fase de microgel es ψ_{MG} . Fuera de esta fase el potencial es nulo $\psi_s = 0$

En donde se impone una restricción de electroneutralidad del microgel, que puede expresarse como:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Este término explica la respuesta de PNIPAm a los cambios de temperatura a través de un parámetro de interacción polímero solvente, χ , que depende de la temperatura y la fracción de volumen de NIPAm, ϕ_{NIPAm} . Según Afroze et al. [2], este parámetro de Flory-Huggins se puede expresar como:

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

con

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

para $k = 0, 1, 2$, los coeficientes son: $g_{00} = -12.947$, $g_{02} = 0.044959 \text{ K}^{-1}$, $g_{10} = 17.920$, $g_{12} = -0.056944 \text{ K}^{-1}$, $g_{20} = 14.814$, $g_{22} = -0.051419 \text{ K}^{-1}$ y $g_{k1} \equiv 0$ [2]

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

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

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

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

La forma explícita del potencial termodinámico es:

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

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

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

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

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

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 3.1: 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 . La constante de equilibrio termodinámico que describe la protonación/desprotonación MAA es

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

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

Si se considera un valor de R , las únicas incógnitas restantes para determinar $\Omega_{MG}(R)$ son la presión osmótica, π_{MG} y el potencial electrostático, ψ_{MG} . Estas dos cantidades se pueden calcular resolviendo numéricamente la incompresibilidad y la electroneutralidad de la fase de microgel, ec. 3.8 y ec. 3.7, respectivamente. Para resolver estas ecuaciones utilizamos un método híbrido de Powell sin jacobiano y un código FORTRAN desarrollado internamente. En resumen, es posible calcular la variación de energía potencial respecto del radio del microgel R , y con ello calcular el valor del radio óptimo del gel para unas condiciones dadas(pH, temperatura, concentración de sal). Esto se ilustra en la sección 3.1.3.

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

3.1.2 Fase solución

En la solución, el potencial termodinámico es:

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

el subíndice s indica las densidades en la fase solución. Al escribir la ec. 3.20, hemos considerado un volumen de referencia igual al del microgel, V , y se ha considerado, como se mencionó con anterioridad, cero el potencial electrostático en la fase de solución. Además en la ultima línea de la ecuación 3.20 se ha incorporado la restricción para la incompresibilidad del sistema, con π_s como la presión osmótica en la fase solución.

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

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

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

con

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

para $\gamma \in \{w, H_3O^+, OH^-, +, -\}$, donde π_s es la presión osmótica de la fase de solución introducida como un multiplicador de Lagrange por la ecuación 3.21. Al conocer π_s , podemos determinar las actividades de todas las especies químicas libres, y con las mismas resolver el sistema de la fase microgel. Los resultados de la minimización de la energía con un dado valor de R es presentada en la siguiente sección.

3.1.3 Minimización gráfica

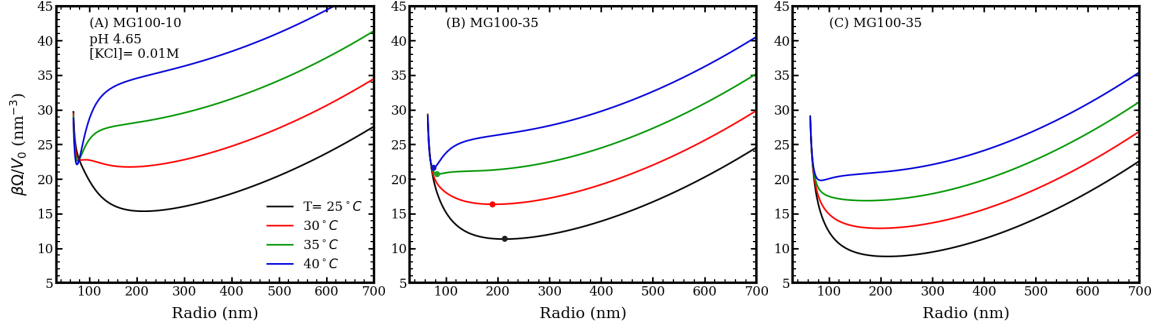


Figura 3.1: Potencial termodinámico en función del radio del microgel a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $cs = 10^{-2}M$. Cada panel corresponde a un microgel MG100 diferente (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) con 10% (A), 35% (B) y 50% (C) MAA. Las curvas presentan el potencial termodinámico en exceso de la contribución de la solución, $\Omega = \Omega_{MG} - \Omega_s$, en algunas unidades convenientes, donde $V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3$ es el volumen de la partícula polimérica seca. En el panel B, los puntos marcan el radio óptimo para cada temperatura, que es el mínimo local/global de la curva correspondiente (ver tabla 3.2).

Como mencionamos en la sección 3.1.1 es posible determinar completamente la energía libre de la fase de microgel para cualquier R dado. Las variables independientes en este cálculo son la temperatura, el pH y la concentración de sal de la solución en contacto con la fase microgel. El número de segmentos en la red de polímero N_{seg} , la longitud de la cadena n_{ch} y la fracción de segmentos MAA, x_{MAA} , caracterizan completamente a nuestro microgel, es decir son variables de entrada pre-establecidas.

Consideramos microgeles con $N_{seg} = 10^7$ segmentos y $n_{ch} = 50, 100$ y 200 , que tienen $x_{MAA} = 0, 1, 0, 35$ o $0, 5$. En esta primera instancia evaluamos el efecto de aumentar o reducir la cantidad de monómero ácido con respecto a los microgeles de poli(NIPAm-*co*-MAA) que tienen 35% MAA.

Estos microgeles están etiquetados como $MGn_{ch}-p_{MAA}$, 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), obtenemos la energía $\Omega(R) = \Omega_{MG}(R) - \Omega_s(R)$. En esta expresión obtenemos el potencial termodinámico en exceso de la contribución energética de la solución. Con ella podemos encontrar el R_{opt} , siendo este el radio óptimo, tal que la curva tenga un mínimo local (y global). Como ejemplo, este procedimiento se ilustra en la figura 3.1 para microgeles MG100. Los resultados obtenidos de la minimización de las curvas figura 3.1 se resumen en la tabla 3.2.

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

Tabla 3.2: Minimización de las curvas de la figura 3.1. Esta tabla resume los radios óptimos de tres microgeles MG100 a diferentes temperaturas, pH 4.65 y $[KCl] = 10^{-2}M$.

3.1.4 Absorción

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

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

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

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

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

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

La siguiente línea en la ec. 3.24 describe la contribución del analito a la energía electrostática, donde f_{τ} es el grado de carga de las unidades τ , que es igual a g_{τ} si τ es un grupo básico, o $(1 - g_{\tau})$ si la unidad es ácida; q_{τ} es la carga de las especies ionizadas. Los dos últimos términos dan cuenta del equilibrio químico entre el microgel y la fase de solución, donde μ_a es el potencial químico del analito.

Además, la ec. 3.8 debe incorporar la fracción total de volumen ocupada por el analito: $\rho_a \sum_{\lambda} n_{\lambda} v_{\lambda}$, donde λ recorre todos los tipos de segmentos que forman la molécula, incluyendo unidades titulables $\{\tau\} \in \{\lambda\}$. La presencia del analito en la fase de solución también representa contribuciones adicionales al potencial termodinámico Ω_s de ec. 3.20, que contienen los mismos componentes que ec. 3.24.

De estas últimas dos ecuaciones se reescriben como:

Para la fase gel:

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

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

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

y

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

Para la fase solución:

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

y sus respectivas restricciones:

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

y

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

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

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

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

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

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

Consideraremos la absorción de los fármacos quimioterapéuticos Daunorrubic-

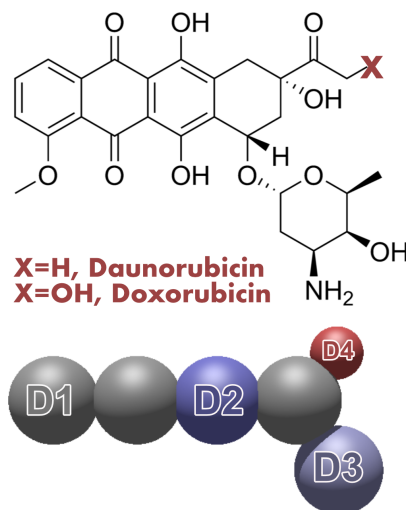


Figura 3.2: Estructura química (arriba) y modelo de grano grueso (abajo) aplicado para describir daunorrubicina y doxorubicina. Los segmentos de grano grueso $D1 - D4$ se describen en la tabla 3.3.

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

ina (Dauno) y Doxorubicina (Doxo) en nuestros microgeles P(NIPAm-MAA) en diferentes condiciones. El modelo molecular aplicado para describir estos analitos se ilustra en la figura 3.2 y la parametrización se presenta en la tabla 3.3 [61].

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Respuesta al pH y la concentración de sal

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

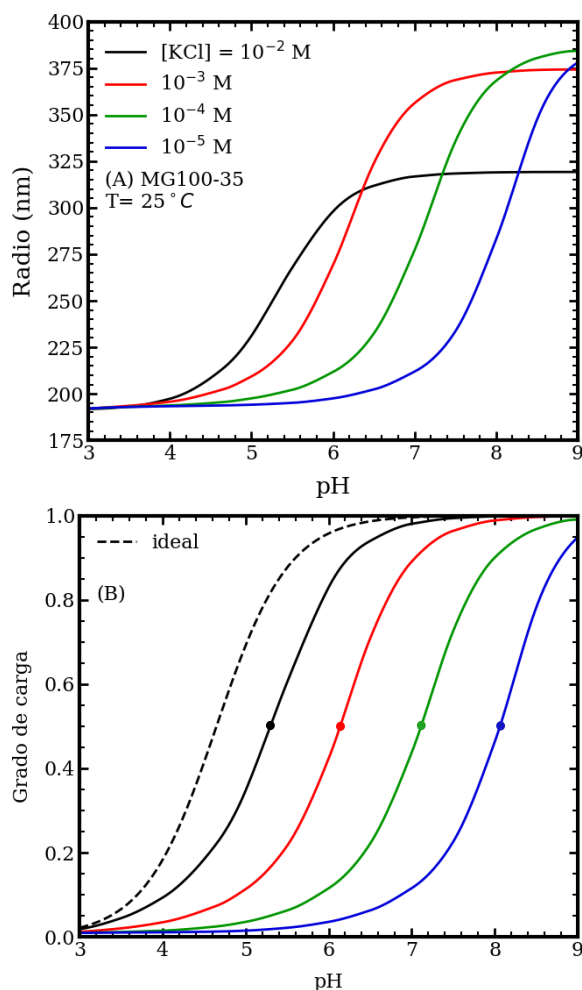


Figura 3.3: Gráfico de tamaño de microgel (A) y grado de carga (B) en función del pH para soluciones que tienen diferentes concentraciones de sal y $T = 25^\circ\text{C}$. Las cadenas de polímero en el microgel MG100-35 son $n_{ch} = 100$ -long. y tienen 35% MAA. La curva de punteada en el panel B es la disociación ideal del ácido metacrílico ($pK_a = 4.65$). Los círculos de color en las curvas del panel A marcan el pK_a aparente del microgel.

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

La Figura 3.3A muestra el tamaño del microgel (radio, R) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Los microgeles de P(NIPAm-MAA) se hinchan al aumentar el pH. A medida que el pH se incrementa, un número creciente de unidades

de *MAA* se desprotona y, por lo tanto, se cargan eléctricamente. La Figura 3.3B muestra cómo la fracción de *MAA* cargados (f : grado de carga; ver ec. 3.18) depende del pH de la solución. El hinchamiento observado en el panel A, que surge al aumentar el pH, es una respuesta a las crecientes repulsiones dentro del microgel, resultado del aumento de la carga eléctrica en la red polimérica, como se observa en el panel B.

El inicio de la transición de este hinchamiento se desplaza a valores de pH más altos cuando se reduce la concentración de sal (ver Figura 3.3A). Las curvas de disociación de protones del panel B presentan el mismo desplazamiento a pH más altos, en comparación con el comportamiento ideal de un monómero de *MAA* aislado en solución diluida. Hemos discutido este comportamiento en el capítulo 2, en la sección 2.6.1.

El pKa aparente es el pH en el cual la mitad de los segmentos de *MAA* se desprotonan, y este valor cuantifica el comportamiento de carga del microgel (ver Figura 3.3B), así como la transición de expansión (como se observa en el panel A, marcado con círculos en $pH = pKa$). Los pKa aparentes de la Figura 3.3B se muestran en la Tabla 3.4.

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

Tabla 3.4: pka's aparente de la fig. 3.3 para un gel MG100-35 a 25°C.

Una concentración relativamente alta de iones de sal dentro del microgel da como resultado el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre los segmentos *MAA* cargados; estas interacciones repulsivas se vuelven de corto alcance. Cuando el pH de la solución aumenta, la disociación de los segmentos de *MAA* sucede sin un alto costo energético originado por las repulsiones electrostáticas. En estas condiciones, la desprotonación de *MAA*, inducida por la energía química libre (equilibrio ácido-base), se aproxima al comportamiento ideal o de una solución diluida (comparándose los casos de alta concentración salina con la curva de línea punteada en la Figura 3.3B).

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

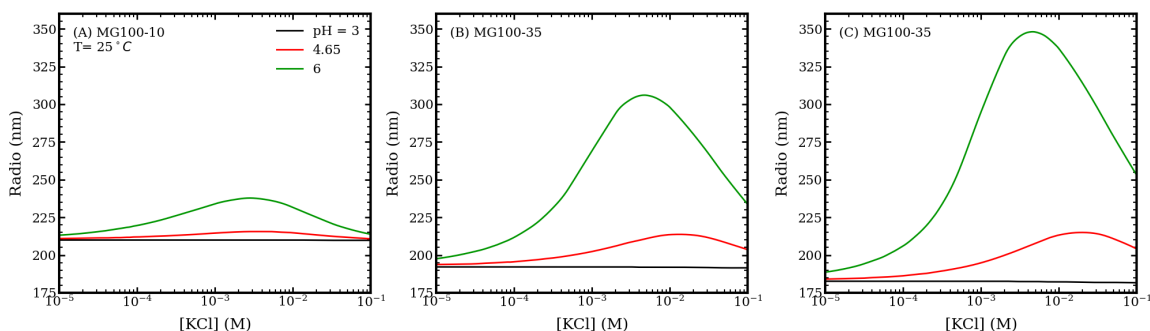


Figura 3.4: Gráfico del tamaño del microgel en función de las concentraciones de sal para diferentes soluciones de pH y $T = 25^\circ\text{C}$. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen fracciones MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

La Figura 3.4 ilustra cómo el tamaño de los microgeles de P(NIPAm-MAA) depende de la concentración de sal para diferentes valores de pH. A una salinidad relativamente alta, estos microgeles se hinchan con el aumento de la concentración de sal, lo que es consistente con los resultados de dispersión de luz dinámica (DLS) reportados por Wong et al. [80] para microgeles P(NIPAm-MAA) y concentraciones de KCl en el rango de $0.1 - 0.5\text{ M}$.

Las curvas de la Figura 3.4 muestran un comportamiento reentrante, en el que el tamaño primero aumenta y luego disminuye al aumentar la concentración de sal. Esta respuesta no monotónica es más acentuada cuando la carga del polímero aumenta debido a un mayor contenido de unidades de *MAA* (observado en los diferentes paneles de la Figura 3.4).

Se han informado transiciones de hinchamiento-deshinchamiento con concentraciones de sal variables en una variedad de sistemas poliméricos reguladores de carga. El grosor de las capas de 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, 51, 83], lo cual ha sido confirmado por resultados experimentales [82]. De manera similar, los resultados teóricos predicen que el tamaño de los polielectrolitos débiles ramificados en forma de estrella muestra un máximo en función de la concentración de sal en la solución [7, 38]. También se ha predicho que el espesor de las películas de poliácidos débiles entrecruzados mostrará este comportamiento de hinchamiento reentrante [47].

En este mismo sentido, se ha predicho una transición de deshinchamiento a hinchamiento impulsada por la concentración de sal para los nanogeles de polielectrolitos fuertes [33]. Este comportamiento, en el caso de los polielectrolitos “quencheados”, se atribuye a los efectos de volumen excluidos de los iones absorbidos a altas concentraciones salinas.

Más relevante para nuestro estudio, son los resultados teóricos de una transición reentrante de hinchamiento a colapso para microgeles sensibles al pH y al calor [64]. Polotsky et al. [64] explica que el aumento de la concentración de sal promueve inicialmente la disociación de carga de los grupos ácidos débiles hasta alcanzar la saturación, momento en el cual el grado de disociación alcanza el valor ideal. Más allá de este punto, el aumento de la concentración de sal en la solución solo mejora el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas y, por lo tanto, el microgel se deshinchacha.

Experimentalmente, Capriles-González et al. [11] informaron sobre el hinchamiento no monotónico de los microgeles de poli(NIPAm-*co*-AA) (P(NIPAm-AA)) en función de la concentración de NaCl utilizando técnicas de DLS.

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

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

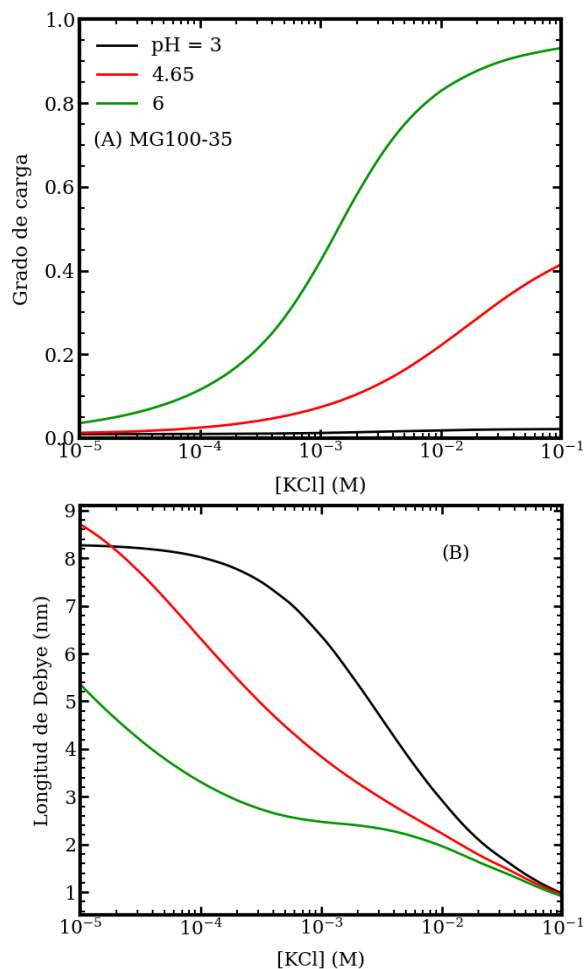


Figura 3.5: Curvas del grado de carga MAA (A) y la longitud de Debye (B) dentro de los microgeles MG100-35 en función de la concentración de sal para diferentes valores de pH. Estos resultados corresponden a las condiciones de figura 3.4B.

la solución, lo que conduce al comportamiento de hinchamiento-deshinchamiento. El panel A muestra que la carga del microgel aumenta monótonamente con la concentración de sal. En el panel B, usamos la longitud de Debye para cuantificar la extensión de las interacciones electrostáticas. El alcance efectivo de estas interacciones se acorta dentro del microgel a medida que aumenta la concentración de sal. Se puede observar en la figura 3.5 que en condiciones de pH 3 la carga dentro del microgel es insignificante, lo que resulta en un hinchamiento muy poco apreciable en la figura 3.4B.

Esta teoría requiere que el interior del microgel sea de carga neutra. La congujación de cargas y contraiones debe estar equilibrada. 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) aquí planteados son más grandes que ese tamaño en la mayoría de las condiciones, particularmente cuando el pH está por encima del pKa aparente y la mayoría de los grupos MAA están desprotonados. Además, los iones de sal se absorben dentro del microgel para reforzar dicha restricción, lo que permite que los segmentos de MAA se desprotonen y se carguen eléctricamente. Describimos este efecto como el apantallamiento de las repulsiones electrostáticas entre los grupos de MAA, que es un concepto que hemos discutido con anterioridad.

3.2.2 Respuesta a la Temperatura

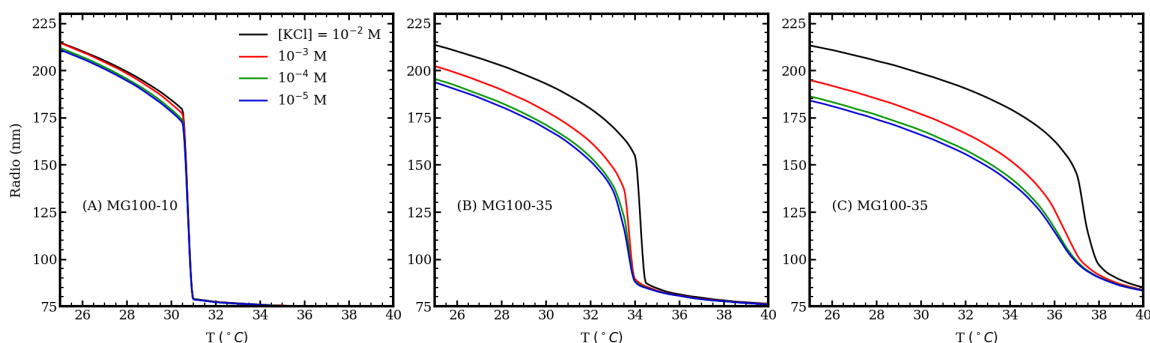


Figura 3.6: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura para diferentes concentraciones de sal en solución y pH 4,65. Los paneles corresponden a microgeles MG-100 (longitud de cadena, $n_{ch} = 100$) que tienen diferentes fracciones de MAA: 10% (A), 35% (B) y 50% (C).

Discutido el efecto del pH y la concentración de sal, ahora nos enfocaremos en mostrar la respuesta de los microgeles de P(NIPAm-MAA) frente a cambios en la temperatura. En cada panel de la figura 3.6 se muestra el tamaño de tres geles MG-100 como función de la temperatura a distintas concentraciones salinas. A baja temperatura, estos microgeles muestran un estado relativamente hinchado, mientras que a altas temperaturas se produce un estado colapsado (alta densidad de polímero).

Esto último ocurre dado que el NIPAm adquiere un comportamiento hidrofóbico por encima de su temperatura de transición crítica inferior (LCST por sus siglas en inglés), expulsando el solvente de su interior y colapsando su estructura [68]. El tamaño del gel en este estado es robustamente independiente de la concentración salina o el pH y posee un radio muy cercano al del microgel seco (ver tabla 3.2).

Por otro lado, el estado hinchado del gel está dominado por las repulsiones electrostáticas entre los segmentos de *MAA* cargados y los contraiones absorbidos, como fue descrito en la sección 3.2.1. El tamaño y la carga del microgel son funciones monótonamente decrecientes de la temperatura. El estado hinchado se caracteriza por un mayor grado de carga. De hecho, la transición de volumen, de estados hinchado a colapsado, está acompañada por una transición en el grado de carga de los segmentos de *MAA*.

OJO QUE FALTARIA REFERIR A UNA FIGURA

En la mayoría de las condiciones, pero no en todas, la transición entre estos dos estados del microgel es brusca y ocurre en un rango estrecho alrededor de una temperatura bien definida, que definimos como Temperatura de Transición de Volumen (T_{TV}). Comparando los diferentes paneles de la figura 3.6, vemos que aumentar el contenido de *MAA* de los microgeles conduce a una transición más suave alrededor de T_{TV} .

La figura 3.7A muestra que la T_{TV} aumenta con el pH y la concentración de sal. Estos resultados son consistentes con los experimentos de DLS que muestran que la temperatura de transición volumétrica de los microgeles P(NIPAm-*MAA*) aumenta con el pH [39], lo que también se ha observado para los microgeles P(NIPAm-AA) [11]. Se ha definido T_{TV} como el punto de inflexión de las curvas $R(T)$ de la figura 3.6 entre los estados hinchado y colapsado [41].

El panel B de la figura 3.7 muestra el grado de carga de los segmentos de *MAA* en el T_{TV} . Existe una clara correlación entre la dependencia de T_{TV} con el pH y la salinidad, y el estado de carga del microgel en las condiciones VPT. La temperatura de transición aumenta con el pH y la concentración de sal, al igual que la carga de la red de polímeros.

A diferencia de este comportamiento, el VPTT de los microgeles basados en PNIPAm permanentemente cargados disminuye con la concentración de sal [49]. En

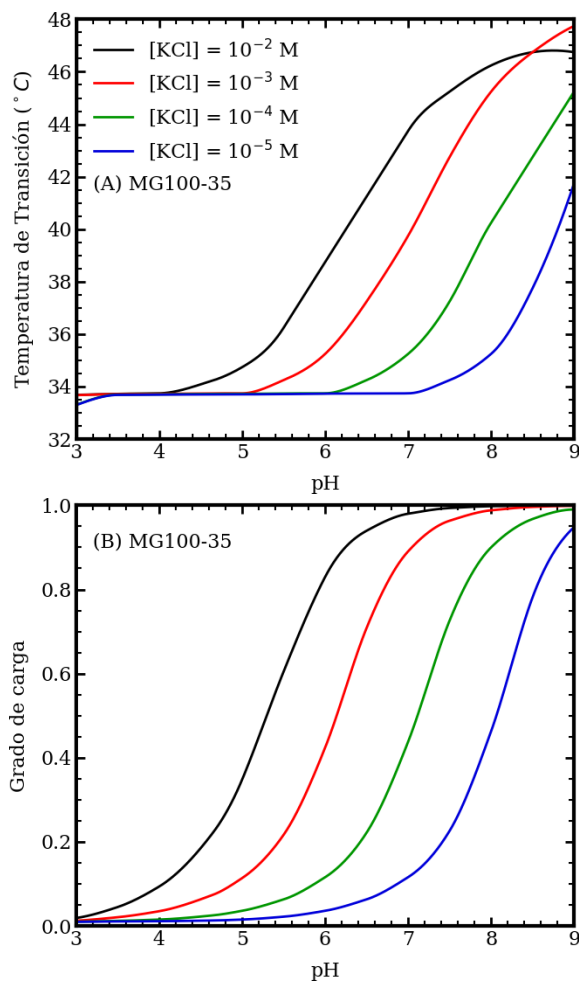


Figura 3.7: Gráficos que muestran la temperatura de transición de volumen T_{TV} (A) y la fracción de MAA cargado a esta temperatura (B) en función del pH para diferentes concentraciones de sal. Este microgel P(NIPAm-MAA) tiene una longitud de cadena de $n_{ch} = 100$ y un MAA de 35%.

este caso, la carga del polímero permanece constante, mientras que la incorporación de iones de sal solo debilita las repulsiones electrostáticas entre las cargas.

Los resultados de la figura 3.7 muestran que la temperatura de transición está controlada por la cantidad de carga dentro del microgel. De hecho, aumentar el contenido de MAA tiene el mismo efecto de desplazar el VPTT a valores más altos, como se observa en la figura 3.8A. Una vez más, este comportamiento resulta de una estructura polimérica más cargada.

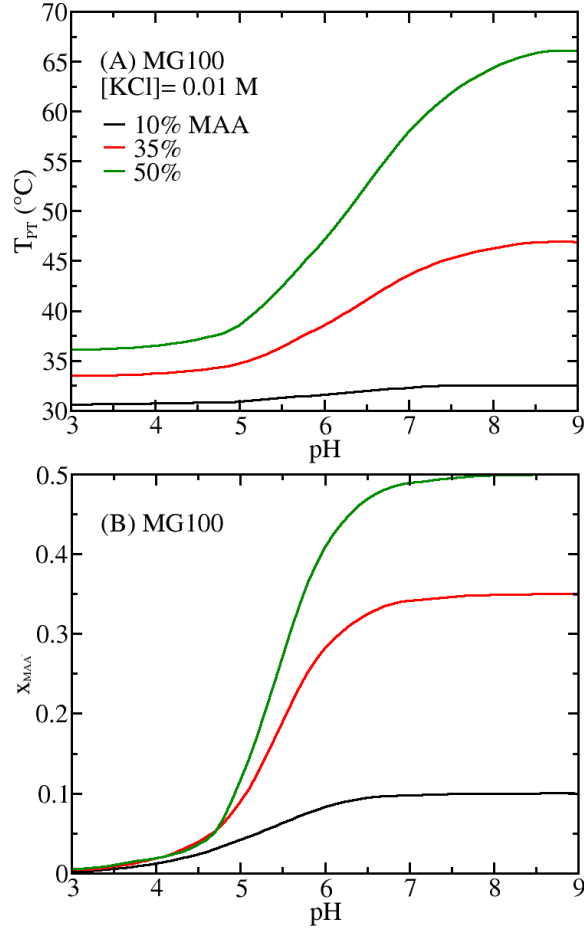


Figura 3.8: (A) Gráfico de temperatura de transición T_{TV} en función del pH para microgeles MG-100 (longitud de cadena de polímero, $n_{ch} = 100$ segmentos) que tienen diferentes contenidos de MAA; $[KCl] = 0.01M$; (B) Fracción de segmentos cargados $x_{MAA-} = \frac{N_{MAA-}}{N_{seg}}$ en función del pH para las mismas condiciones del panel A (*i.e.*, en el T_{TV}); x_{MAA-} es proporcional a la carga total del polímero; N_{seg} es el mismo para todos los microgeles.

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

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

Donde N_{MAA-} es el número de segmentos MAA desprotonados, todas las demás cantidades se han definido en la sección 3.1.1. x_{MAA-} es proporcional a la carga total

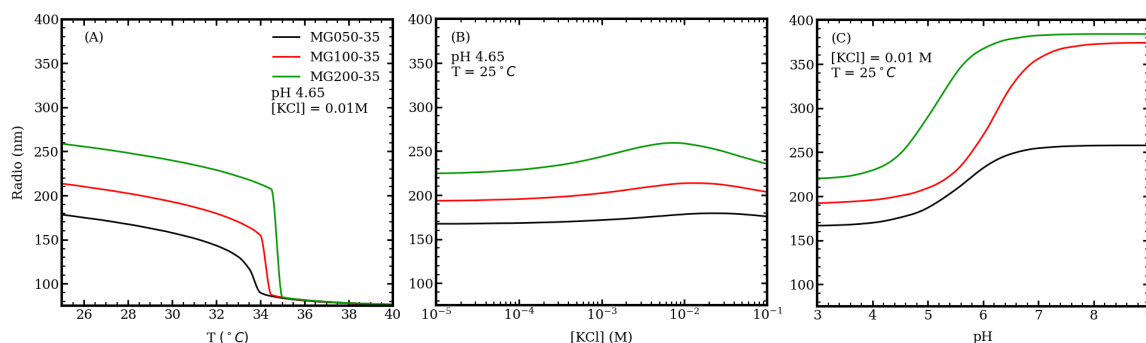


Figura 3.9: Gráfico del tamaño del microgel en función de la temperatura, la concentración de sal y el pH (paneles A, B y C respectivamente). Diferentes curvas corresponden a microgeles con segmentos de 50 (MG050), 100 (MG100) y 200 (MG200) por cadena de polímero, todos con 35% MAA.

de la red de microgel, y debido a que todos los microgeles tienen el mismo número total de segmentos, la constante proporcional es la misma para todos los contenidos de MAA considerados. La figura 3.8B muestra que existe una clara correlación entre T_{TV} y la carga total del microgel (dada por x_{MAA^-}) al cambiar el pH o el contenido de MAA del polímero.

3.2.3 Efecto del grado de entrecruzamiento

En esta instancia vamos a analizar cómo el grado de entrecruzamiento de la red polimérica afecta el comportamiento previamente descrito de nuestro gel. Consideramos microgeles con segmentos de 50, 100 y 200 por cadena, manteniendo el mismo número total de segmentos. A medida que la cantidad de segmentos por cadena disminuye, aumenta el grado de entrecruzamiento en el microgel. La figura 3.9 muestra la respuesta de los microgeles con un porcentaje de MAA del 35% ante cambios de temperatura (panel A), concentración de sal (panel B) y pH (panel C).

Los microgeles con menor grado de entrecruzamiento (mayor número de segmentos por cadena) presentan un mayor grado de hinchamiento. Este comportamiento de los microgeles P(NIPAm-MAA) ha sido confirmado experimentalmente [36]. Cualitativamente, la respuesta a la concentración de sal y al pH es similar para todas las longitudes de cadena consideradas (paneles B y C de la figura 3.9, respectivamente). Una observación interesante es que la disminución del grado de entrecruzamiento

conduce a una transición de volumen más brusca a medida que aumenta la temperatura (figura 3.9A), y además, la temperatura de transición de volumen (T_{TV}) aumenta. Estos resultados son consistentes con los trabajos de Li and Tanaka [45] y Wu and Zhou [81], quienes informaron un cambio en la transición de volumen de NIPAm de continua a discontinua a medida que disminuye la concentración del entrecruzante en la síntesis.

En la figura 3.9, también se observa que el aumento de la longitud de la cadena (disminución del grado de entrecruzamiento) desplaza la temperatura de transición de volumen (T_{TV}) hacia valores más altos. Esto concuerda con los resultados de la espectroscopía UV realizada por Lee et al. [43] para los microgeles P(NIPAm-AA). Este comportamiento se observa en todo el rango de condiciones exploradas en este capítulo.

La constante de fuerza de la contribución elástica a la energía libre es inversamente proporcional a la longitud de la cadena n_{ch} (ver ecuación 3.16). Al reducir el grado de entrecruzamiento, el microgel se hincha y se vuelve más flexible, lo que permite una mayor carga en la red de polímero. En consecuencia, se requiere una temperatura más alta para inducir el colapso de la red de polímero. Hemos demostrado que la temperatura de transición de volumen (T_{TV}) está fuertemente correlacionada con el grado de carga.

La presencia de unidades ácidas acentúa la dependencia de la T_{TV} con la longitud de la cadena, ya que incorpora el equilibrio de protonación al balance energético. Sin embargo, este comportamiento es intrínseco a la interacción entre las propiedades hidrofóbicas y la elasticidad de la red polimérica. De hecho, la temperatura de transición de los microgeles de PNIPAm puros también aumenta con la longitud de la cadena, aunque el efecto es significativamente más débil en ausencia de segmentos de MAA.

3.2.4 Adsorción de drogas

Los microgeles poliméricos se han destacado como transportadores inteligentes de medicamentos debido a sus propiedades únicas. Estos sistemas nanoestructurados (en este caso microestructurados) ofrecen una plataforma versátil para la encapsulación, protección y liberación controlada de sustancias bioactivas. Los microgeles

pueden responder a estímulos externos, como hemos mostrados en las secciones anteriores, como cambios de pH, temperatura y concentración de iones, lo que les permite liberar su carga terapéutica de manera selectiva y específica en el sitio deseado.

Por ejemplo, se sabe que el pH extracelular del tejido tumoral es más bajo que el del tejido sano [22], lo que hace que los microgeles respondan al pH sean idóneos para la administración local de medicamentos contra el cáncer [17].

Peppas *et al.* han estudiado ampliamente los microgeles sensibles al pH basados en MAA como transportadores inteligentes que pueden operar utilizando los diferentes niveles de acidez a lo largo del tracto digestivo y prevenir la degradación de fármacos en el estómago [12, 20, 74, 79].

En esta sección, evaluamos la capacidad de los microgeles P(NIPAm-MAA) para incorporar dos fármacos quimioterapéuticos. En particular, investigamos las mejores condiciones para la encapsulación de fármacos en condiciones de laboratorio. Consideramos que la doxorrubicina (Doxo) y la daunorrubicina (Dauno) son dos de las antraciclinas importantes y ampliamente utilizadas en la quimioterapia para tratar una amplia gama de cánceres [5, 13, 15, 58]. Estas drogas se pueden seguir utilizando fluorescencia y adsorbancia, lo que las hace atractivas desde el punto de vista de la investigación [61, 73, 78]. Además, estos fármacos pueden adquirir carga positiva en la mayoría de las condiciones, lo que puede facilitar su encapsulación en microgeles de polímeros aniónicos [44]. Serpe *et al.* [73] han estudiado la captación y liberación termicamente activadas de Doxo a partir de películas capa por capa de microgeles de P(NIPAm-AA) y poli(clorhidrato de alilamina). Más recientemente, utilizando resonancia magnética nuclear de lapso de tiempo, Martínez-Moro *et al.* [53] han descrito la interacción entre Doxo y microgeles P(NIPAm-MAA) en diferentes condiciones.

La figura 3.10 ilustra el número de moléculas de Dauno (panel A) y Doxo (panel B) dentro del microgel en relación con la concentración de sal y el pH de la solución. Se observa que las condiciones óptimas para la encapsulación de estos fármacos terapéuticos corresponden a una baja concentración de sal y un pH de 6 a 8. La reducción en la concentración de sal favorece la absorción. Tanto Dauno como Doxo presentan una carga neta de +1 a pH ácido y neutro (ver la figura 3.11).

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

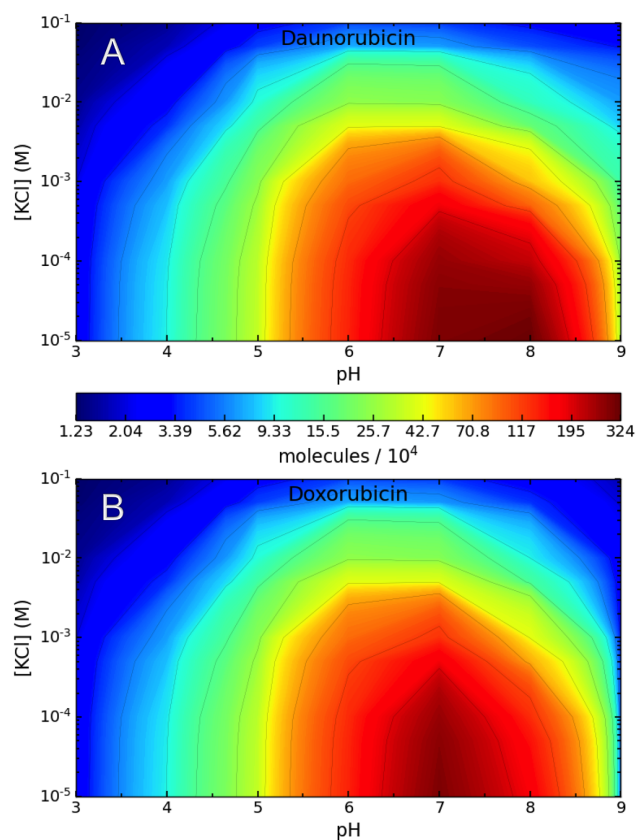


Figura 3.10: Mapas en color que muestran el número de moléculas de daunorrubicina (A) y doxorubicina (B) absorbidas por microgel en función del pH de la solución y la concentración de sal. La concentración de fármaco en solución es 1 mM y $T = 25^\circ\text{C}$. el microgel P(NIPAm-MAA) tiene $n_{ch}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

(Pérez Chávez et al. [61]). En la figura 3.5, se observa que en ausencia de un fármaco disuelto, la carga del microgel disminuye a medida que se reduce la concentración de sal, lo que aparentemente entra en conflicto con la mejora de la absorción observada en la figura 3.10 bajo estas condiciones. Sin embargo, después de la absorción del fármaco, el grado de carga de los segmentos de MAA aumenta significativamente, especialmente en condiciones de baja concentración de sal. Además, es importante destacar que este comportamiento está particularmente asociado con la relativamente alta concentración de fármaco considerada en estos resultados (1 mM).

La fracción de segmentos de MAA cargados negativamente en el polímero au-



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

menta con el pH, lo que explica por qué también aumenta la absorción de Dauno/Doxo en condiciones ácidas. Sin embargo, en condiciones alcalinas, la carga neta positiva de estos fármacos disminuye con el aumento del pH, lo que desfavorece su absorción. Por lo tanto, la absorción de Dauno/Doxo es una función no monótona del pH.

En nuestro modelo, los puntos isoelectricos de Dauno y Doxo son 8.4 y 7.9, respectivamente. La figura 3.10 muestra que la absorción de ambas moléculas puede ser significativa alrededor y por encima de estos valores de pH. En otras palabras, hay una absorción considerable de moléculas con carga negativa dentro de la red de nuestro gel con carga similar. Aunque estas moléculas están cargadas negativamente en la fase de solución, la absorción ocurre porque el pH disminuye dentro del microgel, lo que permite que los fármacos regulen su carga eléctrica y permanezcan cargados

positivamente dentro del microgel. **GRAFICO DEL CAMBIO DE pH**

El punto isoeléctrico más bajo de la doxorrubicina se debe a la desprotonación de su grupo hidroxilo sustituyente (véase el segmento *D4* en la figura 3.2 y tabla 3.3). Como resultado de esta carga negativa adicional en condiciones alcalinas, el rango de pH de adsorción es ligeramente más amplio para la daunorrubicina.

Chapter 4

esfericas

4.1 Introduction

Los nanogeles poliméricos son sistemas poliméricos que presentan una estructura tridimensional en forma de red. Estos nanogeles se forman mediante la reticulación de polímeros (o copolímeros), lo que da lugar a una matriz de polímero tridimensional que puede retener grandes cantidades de agua o solventes.

Estos nanogeles han demostrado ser de gran interés en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo el encapsulado y la liberación de fármacos, la ingeniería de tejidos y la bioimagen.

Los nanogeles representan una plataforma versátil y prometedora para diversas aplicaciones biomédicas. Su capacidad para retener agua y solventes, su tamaño nanométrico y su capacidad de funcionalización los convierten en sistemas atractivos para la entrega de fármacos.

En estas sección... geles poliméricos... Se aborda una perspectiva diferente con información a la que no era posible acceder con el modelo anterior. El conocimiento de la estructura interna, o una aproximación de ella nos abre las puertas al diseño de más y mejores materiales...

4.2 Method: Molecular Theory

El estudio de estos nanogeles conlleva un formalismo similar al visto en el capítulo de los films poliméricos y al modelo de dos fases.

Es decir buscamos con este método minimizar una energía libre del sistema. Incorporando una caracterización molecular de grano grueso de las diversas especies químicas presentes.

El sistema en estudio es un solo nanogel en equilibrio con una solución acuosa que tiene una composición de bulk definida externamente. Es decir, el pH, la concentración de sal y la concentración de proteína son las variables independientes. La red polimérica que da estructura al nanogel contiene dos tipos de segmentos: una unidad sensible al pH, ya sea ácida (MAA) o básica (AH), y un segmento neutro (VA); los segmentos que componen al entrecruzante en nuestra red se describen como segmentos de carga neutral.

Como vimos en... la energía libre se convierte en un gran potencial el cual nos permite un mejor manejo y resolución del sistema. Este potencial contiene las siguientes contribuciones:

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

donde S_{mez} es la entropía de traslación (y de mezcla) de las especies de la solución: moléculas de agua (H_2O), iones de hidronio (H_3O^+), iones de hidróxido (OH^-), cationes de sal, aniones de sal y proteína. Consideramos una sal monovalente, NaCl completamente dissociada en iones de sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-). $S_{conf,net}$ representa la entropía conformacional que resulta de la flexibilidad de la red de polímeros, que puede asumir muchas conformaciones diferentes. $F_{qca,net}$ es la energía química libre que describe el equilibrio entre las especies protonadas y desprotonadas de unidades funcionales (ácidas/básicas) en el polímero. De manera similar, $F_{qca,pro}$ describe la protonación de residuos titulables de la proteína. U_{elec} y U_{ste} representan, respectivamente, las interacciones electrostáticas y las repulsiones estéricas. U_{Vdw} contiene las interacciones de Van der Waals entre los distintos segmentos y el solvente.

Finalmente, la suma de γ expresa el equilibrio químico entre nuestro sistema y la solución bulk que representa un “baño térmico” para las partículas libres, donde μ_γ y N_γ son el potencial químico y el número de moléculas de especie γ , respectivamente; el subíndice γ recorre las especies químicas libres. El siguiente término tiene en cuenta el equilibrio descrito anteriormente, pero en esta ocasión para la proteína.

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

4.2.1 Teoría red polimérica

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

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

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

donde $\beta = \frac{1}{k_B T}$, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta del sistema, $\rho_{\gamma}(r)$ y μ_{γ} es la densidad local, en la posición r , y potencial químico de la especie γ respectivamente. El subíndice γ toma en cuenta las moléculas de agua y sus iones (hidronio e hidróxido), y los iones disociados de la sal (K^+ , Cl^-). $G(r)$ es la constante de simetría de nuestro sistema, en particular para cada r : $G(r) = 4\pi r^2$. Esta última se ejemplificara de mejor forma en la sección del modelado molecular.

El segundo término de la entropía de mezcla que considera los aportes entrópicos de la proteína. $\rho_{pro}(\theta, r)$ es la densidad local de la proteína en la conformación θ . La proteína puede tomar cualquier conformación presente en su set de conformaciones

$\{\theta\}$ La contribución entrópica también incluye la rotación espacial. La densidad media local total de proteína es:

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

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

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

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

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

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

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

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

donde $f(r)$ es el grado de carga de los segmentos MAA en la capa esférica entre r y $r + dr$. μ_{MAA-}^0 y μ_{MAAH}^0 son los potenciales químicos estándar de las especies

desprotonadas y protonadas respectivamente. v_{MAA} es el volumen molecular del segmento de MAA .

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

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

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

El cual es definido como:

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Para unidades básicas: $g_\tau(r) = f_\tau(r)$ (τ se carga positivamente)

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

La energía electrostática se define:

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

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

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

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

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

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

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

U_{VdW} es la energía de interacción de Van der Waals (*VdW*). En este sistema se ha asumido que todos los segmentos tienen un carácter hidrofílico. Es decir, las interacciones *VdW* entre diferentes pares de segmentos y éstas con moléculas de agua son similares. Como resultado, la energía de interacción neta *VdW* representa una constante aditiva a la energía total del potencial. Por lo tanto, esta contribución puede ser ignorada. Esto es posible por los segmentos considerados en la estructura

del nanogel, como se mostró en el capítulo anterior, en el modelo de dos fases, se consideró la interacción entre los segmentos de NIPAm como un potencial aparte. Por lo que las interacciones de Van der Waals fueron tenidas en cuenta.

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

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

Los primeros dos términos del lado izquierdo de la ecuación explican el equilibrio químico de las especies móviles γ y de las proteínas dentro de la solución. Los dos últimos términos consideran los iones de hidrógeno de los segmentos protonables de la proteína y los segmentos *MAA* de la red polimérica que forma el nanogel. Notese que se van de la mano con el grado de asociación g_τ y $1 - f$ para la proteína y la red polimérica respectivamente.

Finalment la forma explicita de nuestro gran potencial es expresado:

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

Para esta expresion, 4.14, se ha introducido nuestra restricci3n de la incompresibilidad del volumen (ec. 4.12), como un multiplicador de Lagrange $\Pi(r)$, este veremos cumple la funci3n de una presi3n osm3tica del sistema.

Como se menciona al inicio de este capitulo, el siguiente paso es la busqueda de las condiciones que minimizen la energa total. Esto se logra al derivar respecto de

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En donde:

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

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

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

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

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

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

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

de Poisson:

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

Considerando las simetrías de nuestro problema:

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

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

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

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

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

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

Ahora todas las funciones que componen el potencial termodinámico Ω_{NG} se han expresado en términos del potencial electrostático local $\Psi(r)$, la presión osmótica dependiente de la posición $\Pi(r)$ y algunas cantidades de entrada que incluyen las actividades de las especies libres. Dada la concentración de sal, el pH y la concentración de proteínas en la solución bulk, todas estas actividades se pueden calcular imponiendo la incompresibilidad y la neutralidad de carga a dicha solución y utilizando la condición de equilibrio de la auto-disolución del agua. Entonces, las únicas incógnitas restantes son $\Psi(r)$ y $\Pi(r)$ en cada r . Estas funciones locales se calculan resolviendo numéricamente las ecuaciones 4.12 y 4.25 en cada capa r .

4.2.2 Solución Bulk

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.3 Resolución numérica

Para obtener resultados de la minimización de la energía, las ecuaciones integro-diferenciales no lineales descritas anteriormente (secciones 4.2.1 y 4.2.2) deben resolverse numéricamente. Para lograr esto, el volumen del sistema se divide en capas de espesor $\delta = 0.5$. En esta división se ha considerado una simetría radial

En las ecuaciones presentadas, las sumas sobre capas reemplazan las integrales a lo largo de la coordenada r , mientras que las diferencias finitas reemplazan las derivadas.

Reescribiendo, la restricción de incompresibilidad se expresa como:

$$1 = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) v_{\gamma} + \sum_{\lambda} \langle \rho_{pro,\lambda}(i_r) \rangle v_{\lambda} + \sum_i \langle \phi_i(i_r) \rangle \quad (4.35)$$

Lo que nos da una ecuación para cada capa i_r , en donde cada posición es descrita por la coordenada $r_i = (i_r - 0.5)\delta$. La variable i_r toma valores de 1 a n_r , en donde n_r es un número suficientemente grande de capas para que se satisfagan las restricciones impuestas en nuestro sistema. Entre ellas $\rho_{\gamma}(n_r) \approx \rho_{\gamma}^b$, $\rho_{pro}(\theta, n_r) \approx \rho_{pro}^b(\theta)$ and $\psi(n_r) \approx \psi^b = 0$.

Con estas consideraciones podemos reescribir:

$$\frac{f(j_r)}{1-f(j_r)} = \left(\frac{a_{H^+}}{k_{a,j}^0} \right)^{\mp 1} e^{-\beta q_{MAA} - \psi(i_r)} \quad (4.36)$$

For the free species:

$$\rho_\gamma(i_r)v_w = a_\gamma \exp[-\beta\psi(i_r)q_\gamma] \exp[-\beta\Pi(i_r)v_w] \quad (4.37)$$

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

$$\begin{aligned} \rho_{pro}(\theta, i_r)v_w = & \tilde{a}_{pro} \prod_{\tau} \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_\tau(\theta, i_r, j_r) \ln f_\tau(j_r) \right] \\ & \times \prod_{\lambda} \exp \left[\sum_{j_r=1}^{n_r} \tilde{m}_\lambda(\theta, i_r, j_r) (\beta\Pi(j_r)v_\lambda + \beta\Psi(j_r)q_\lambda) \right] \end{aligned} \quad (4.38)$$

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

$$\begin{aligned} P(\alpha) = & \frac{1}{Q} \prod_{r_j} \prod_i \exp \left[-\beta\Pi(r_j)\tilde{\phi}_r^i(\alpha, r_j) \right] \\ & \times \prod_{r_j} \exp \left[-\beta\Psi(r_j) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} q_{MAA} \right] \\ & \times \prod_{r_j} \exp \left[-\ln(f(r_j)) \frac{\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_j)}{v_{MAA}} \right] \end{aligned} \quad (4.39)$$

donde:

$$\tilde{\phi}_r^{MAA}(\alpha, r_i) = \int_{r_i-\delta/2}^{r_i+\delta/2} dr \phi_r^{MAA}(\alpha, r) \quad (4.40)$$

La ecuación de Poisson se escribe:

$$\epsilon \frac{\Psi(i_r + 1) - 2\Psi(i_r) + \Psi(i_r - 1)}{\delta^2} + 2\epsilon \frac{\Psi(i_r + 1) - \Psi(i_r)}{(i_r - 0.5)\delta^2} = -\langle \rho_q(i_r) \rangle \quad (4.41)$$

en donde la densidad de carga se define:

$$\langle \rho_q(i_r) \rangle = \sum_{\gamma} \rho_{\gamma}(i_r) q_{\gamma} + \sum_{\tau} f_{\tau}(i_r) \langle \rho_{pro,\tau}(i_r) \rangle q_{\tau} + f(i_r) \frac{\langle \phi_{MAA}(i_r) \rangle}{v_{MAA}} q_{MAA} \quad (4.42)$$

Nuestras condicones de contorno se reescriben:

$$\frac{\Psi(1) - \Psi(0)}{\delta} = 0 \quad (4.43)$$

Como se definio en el capítulo donde hablamos sobre los films poliméricos, capitulo 2, definiendo el pH, concentración de sal y proteína. temperatura, es posible calcular las variables restantes $\Pi(i_r)$ y $\Psi(i_r)$ para cada capa i_r . Variables que pueden ser obtenidas al resolver en cada capa las ecuaciones 4.35) y (4.41. 2.49. De esta forma el número de ecuaciones totales a resolver es $2n_r$ (dos por cada capa). Este sistema de ecuaciones es resuelto usando el método de Newton con Jacobiano libre, implementado en códigos FORTRAN desarrollados en el grupo de trabajo.

4.2.4 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 3R GK 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 tabla 4.1. These pKa's are taken from experimental data and

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

Tabla 4.1: Volume and pKa of the coarse-grained particles (amino acid residues, small ions, solvent molecules and polymer segments) considered in our molecular model.

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, figura 4.1 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.

4.2.5 Molecular model: Nanogel Network

Besides the protein model presented in sec. 4.2.4, we need to specify a molecular model to describe the polymer network that makes the nanogel backbone. Such model must provide a set of molecular configurations of the polymer network that is representative of the whole conformational space. A particular network conformation

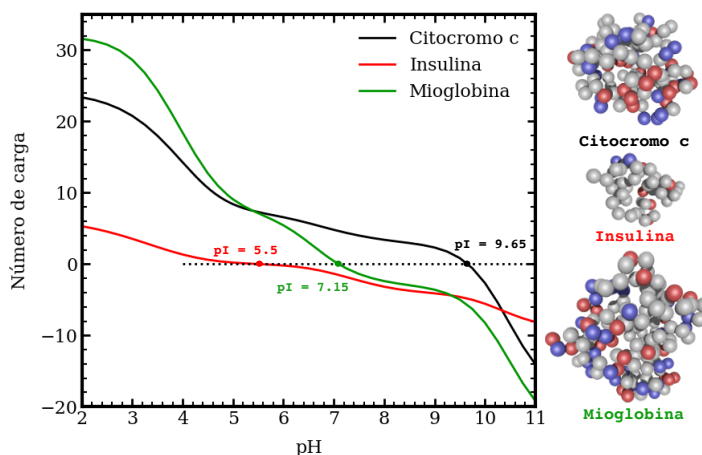


Figura 4.1: Left: Charge number of the proteins in a dilute solution as a function of pH (solid-line curves); filled circles mark the isoelectric point, where the net charge of the protein is zero. The coarse-grained representation of the proteins is illustrated on the right, where amino acid residues are represented by a single sphere (red: acidic; blue: basic; gray: charge-neutral residues).

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 4.1 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: indahl2001gromacs] (details are given in the SI).

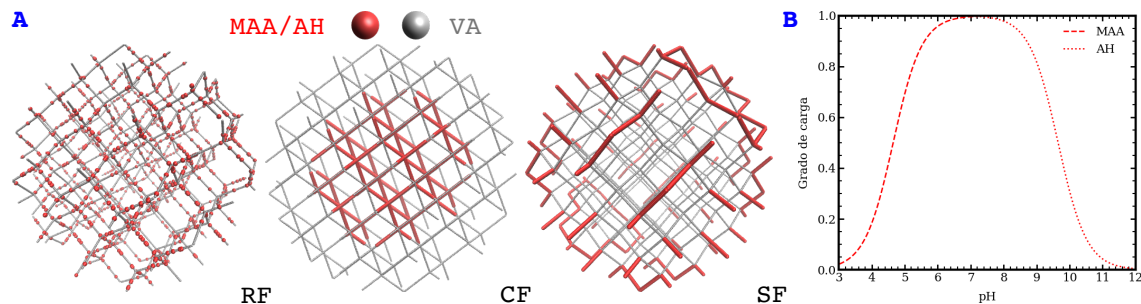


Figura 4.2: A: The nanogel network consists of crosslinked copolymer chains of a charge-neutral segment (VA: vinyl alcohol) and a functional unit (either MAA: methacrylic acid or AH: allylamine). This scheme illustrates the three different comonomer distributions considered; from left to right: RF: a 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 4.2: (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.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Caraterización del nanogel

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

Para cuantificar el tamaño de un nanogel, utilizaremos el radio medio de la

partícula, R , que se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:

$$R = \frac{4}{3} \frac{\int_0^\infty dr G(r) r \langle \phi(r) \rangle}{\int_0^\infty dr G(r) \langle \phi(r) \rangle} \quad (4.44)$$

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

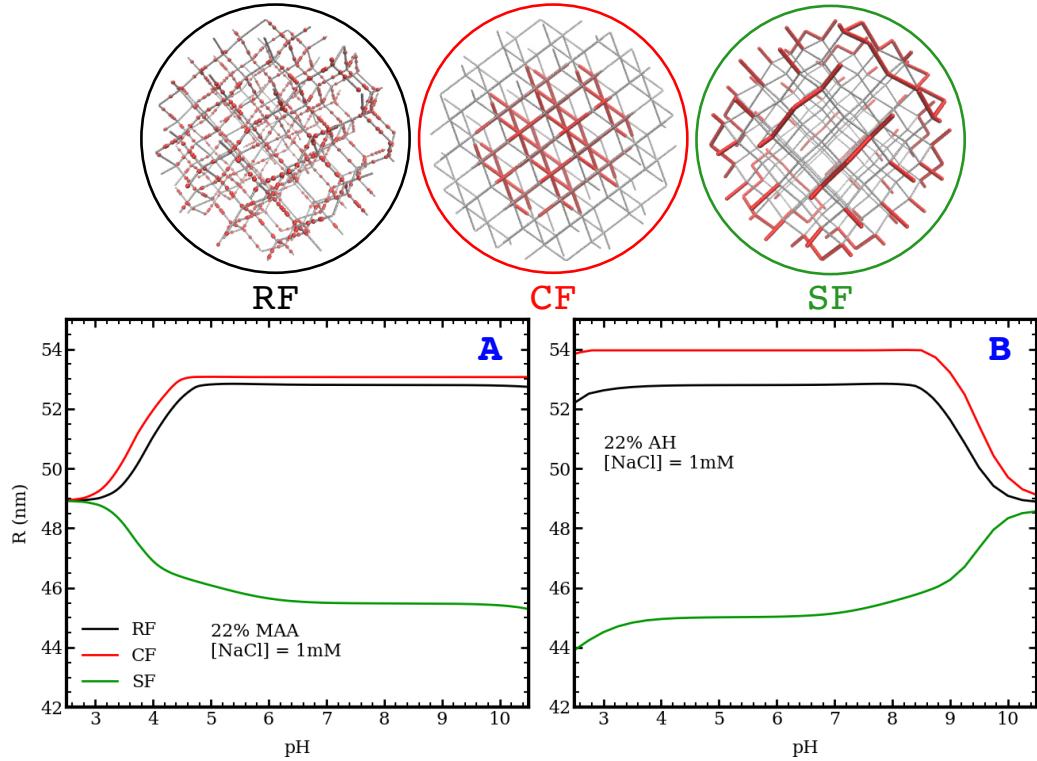


Figura 4.3: Radio promedio, R , en función del pH para nanogeles de copolímero MAA-VA (panel A) y AH-VA (panel B). Se consideran tres estructuras diferentes en cada caso donde las unidades funcionales (MAA/AH) se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la red polimérica (RF), ocupan el centro de la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

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

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

$$\lambda_{MAA}(r) = 4\pi r^2 \langle \phi^{MAA}(r) \rangle \quad (4.45)$$

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

La Figura 4.4 muestra la distribución radial de los segmentos de MAA para las diferentes redes consideradas. En cada caso, se incluyen resultados para una solución de pH 3, donde los segmentos MAA tienen carga neutra, y pH 7, donde están com-

pletamente cargados (ver Figura 4.2B). Para una funcionalización de tipo aleatoria (Panel A), la distribución de los segmentos *MAA* se desplaza hacia la interfaz de solución del nanogel a medida que la red se carga eléctricamente al aumentar el pH. Este desplazamiento ocurre para reducir las repulsiones electrostáticas entre los segmentos *MAA* cargados.

Como resultado, toda la distribución del polímero también se extiende, incluidas las unidades *VA* de carga neutra (ver Figura 4.5). El mismo comportamiento tiene lugar para una funcionalización central (Panel B), aunque por diseño, los segmentos *MAA* en esta red, ya sea que estén cargados o no, es más probable que ocurran a distancias más cortas del centro del nanogel en comparación con las otras estructuras. El desplazamiento de segmentos a valores más altos de r observado en los paneles A y B de la Figura 4.4 explica el aumento del tamaño promedio del nanogel con pH observado en la Figura 4.3A para las estructuras RF y CF.

Por otro lado, la Figura 4.4C muestra que la distribución superficial de segmentos de *MAA* se desplaza hacia el interior cuando la red se carga con el aumento de pH. Para reducir las repulsiones dentro de la red, las cadenas libres (de la superficie) de PMAA, que se asientan en la superficie del nanogel a un pH bajo, también intentan ocupar el volumen dentro de la red cuando están cargadas. Este cambio hacia el interior de la distribución de segmentos de polímero (Figura 4.5C) explica el comportamiento de deshinchamiento del nanogel tipo SF con el aumento del pH observado en la Figura 4.3A. Nótese, sin embargo, que a pesar de este desplazamiento parcial hacia el interior de la red, la posición más probable de los segmentos *MAA* siempre es la interfaz polímero-solución para soluciones de pH alto y bajo. Al empujar toda la estructura hacia el interior del nanogel, los segmentos de *MAA* quedan igualmente expuestos.

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

la figura 4.3B; mientras tanto, para la estructura tipo SF, el deshinchamiento con la disminución del pH que se ve en la figura 4.3B es consistente con un desplazamiento hacia adentro del polímero

La figura 4.5 muestra la distribución de todos los segmentos que componen la red polimérica de los diferentes nanogeles. Al igual que en fig. 4.4 presentamos la distribución para dos diferentes valores de pH. Que corresponde a los estados protonado (pH 3) y desprotonado (pH 7) de los segmentos de MAA. En los paneles A y B se observa un aumento de cantidad de segmentos a valores más altos de r al cargarse el nanogel. Comportamiento observado en la figura 4.3, en donde hay un aumento del radio del nanogel (RF y CF). En cambio el desplazamiento hacia dentro de los segmentos de la red polimérica al transicionar de un estado cargado a uno descargado en la distribución superficial (SF) explica la disminución del tamaño del gel observada en la figura 4.3B.

El comportamiento de los nanogeles compuestos por AH es análogo al de las redes basadas en MAA, pero en respuesta al cambio de pH en la dirección opuesta. Los grupos AH se protonan y se cargan positivamente con la disminución del pH (ver Figura 4.2B). Para nanogeles de AH funcionalizados aleatoriamente y en su núcleo, este aumento en la carga eléctrica con la disminución del pH provoca un desplazamiento hacia afuera de la distribución del segmento, similar a lo observado para los nanogeles compuestos por MAA (ver Figura ??A y B). Esto explica la hinchazón observada en la Figura 4.3B. Por otro lado, para la estructura tipo SF, el deshinchamiento con la disminución del pH que se observa en la Figura 4.3B es consistente con un desplazamiento hacia el interior del nanogel (ver Figura ??C).

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

cargado a uno descargado en la distribución superficial (SF) explica la disminución del tamaño del nanogel observada en la figura 4.3B.

4.3.2 Protein adsorption to MAA-based nanogels

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

En esta parte, se mostrará el impacto de esta reorganización de la red polimérica en el nivel de adsorción de proteínas en diferentes nanogeles, así como la distribución espacial de las proteínas adsorbidas. En particular, se presentará el análisis de la adsorción del citocromo c y mioglobina en diferentes estructuras de nanogeles basados en MAA. Además, se realizarán estudios de adsorción de insulina, pero en este caso con nanogeles que contienen AH como segmento protonable. Los resultados de la insulina con MAA se omiten debido a su bajo punto isoeléctrico, ya que esta proteína no se adsorbe en nanogeles basados en MAA.

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

$$\langle N(r) \rangle dr = 4\pi r^2 (\langle \rho(r) \rangle - \rho_{bulk}) dr \quad (4.46)$$

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

$$\Gamma = \int_0^\infty \langle N(r) \rangle dr \quad (4.47)$$

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

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

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

En cuanto a las otras configuraciones, la Figura 4.6 muestra que la distribución central de los segmentos *MAA* conduce a una adsorción significativamente mayor en la mayoría de las condiciones. Demostramos que este comportamiento se debe a que dicha distribución de segmentos *MAA* permite una incorporación más efectiva de la

proteína adsorbida con carga eléctrica opuesta. Por otro lado, el comportamiento de adsorción en las redes funcionalizadas aleatoriamente y en la superficie es sorprendentemente similar en el rango de pH y concentraciones de sal estudiadas, tanto para las diferentes proteínas como entre sí. Aunque las distribuciones de unidades funcionales entre las estructuras RF y SF difieren significativamente a pH bajo, se vuelven relativamente similares entre sí después de la reorganización del nanogel a un pH más alto cuando las unidades *MAA* se cargan. Esto explica la adsorción comparable de proteínas observada en los nanogeles RF y SF (compara los paneles A y C de la Figura 4.4).

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

Cuando el núcleo de la red está funcionalizado, la mayor probabilidad de encontrar las proteínas ocurre en el interior del nanogel, entre 20 y 30 nm. En la figura 4.7A, el número máximo de proteínas adsorbidas se produce a $r = 28$ nm para 1 mM de NaCl, y a $r = 25$ nm para 10 mM de NaCl. Coherentemente, el perfil de distribución de los grupos *MAA* cargados muestra un máximo suave en esta región espacial (ver Figura 4.4B, curva roja). Es decir, las proteínas adsorbidas se ubican donde pueden estar rodeadas de segmentos de la red con carga eléctrica opuesta. Curiosamente, el mismo fenómeno ocurre en la adsorción en los nanogeles RF y SF. Las distribuciones de *MAA* cargados muestran un máximo pronunciado cerca de la superficie del nanogel, entre 45 y 50 nm (ver curvas rojas en la figura 4.4, paneles A y C). La figura 4.7A muestra que el citocromo *c* es más propenso a adsorberse junto a estas regiones de alta densidad de *MAA* (carga).

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

desplaza hacia la interfaz polímero-solución.

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

$$\text{PMF}(r) = -k_B T \ln \frac{\langle \rho(r) \rangle}{\rho_{\text{bulk}}} \quad (4.48)$$

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

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

Por otro lado, las interacciones del citocromo c con los nanogeles RF y SF se extienden más lejos, hasta 55 – 60 nm. En el interior del nanogel, estas interacciones son más débiles que las de la estructura CF. La energía libre de adsorción es aproximadamente $-6k_B T$, y se mantiene aproximadamente constante dentro del nanogel RF.

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

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

Una característica de la adsorción de proteínas que nos falta discutir es el efecto de la concentración de sal. Tanto para el citocromo c como para la mioglobina, la figura 4.6 muestra que la incorporación de proteínas dentro de los diferentes nanogeles se ve significativamente mejorada al disminuir la concentración de sal en la solución. Para caracterizar mejor este comportamiento, la figura 4.8 presenta la adsorción de

citocromo c en función de la concentración de NaCl a pH 7. Este gráfico muestra que todas las funcionalizaciones de la red presentan un comportamiento cualitativamente similar, con una disminución drástica en la adsorción entre 1 y 10 mM de NaCl. A 100 mM, todos los nanogels muestran una adsorción despreciable o negativa.

Cuando la concentración de sal en la solución es alta, tanto los iones Na^+ como los iones Cl^- se encuentran en altas concentraciones dentro del nanogel. Estos iones opacan las atracciones electrostáticas entre las cargas positivas de la proteína y las cargas negativas del nanogel, que son la fuerza impulsora para la adsorción de proteínas. En efecto, estas atracciones se vuelven de corto alcance y no son lo suficientemente fuertes como para dar lugar a una adsorción significativa, si es que ocurre. Por otro lado, si la concentración de NaCl es menor, estas interacciones electrostáticas se ven menos apantalladas y efectivamente tienen un alcance mayor, lo que permite la adsorción de proteínas. Por lo tanto, la disminución de la concentración de sal mejora la adsorción. Este comportamiento ha sido observado en experimentos; los brushes de polielectrolíticos muestran un aumento en la adsorción de proteínas a baja concentración de sal [REFs: [wittemann2006interaction](#), [becker2012proteins](#), [henzler2010adsorption](#), [xu2018interaction](#)] .

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

4.3.3 Insulin adsorption AH-based nanogels

La insulina no se adsorbe a los nanogels de MAA de la sección 4.3.2. Esto se debe a que el punto isoeléctrico de la insulina y el pKa del MAA están cerca entre sí (numericamente hablando 5.5 y 4.65 respectivamente), lo que significa que para

soluciones donde la proteína tiene carga positiva, el nanogel tiene carga neutra, y si el nanogel tiene carga negativa, también la tiene la proteína. En este contexto, decidimos investigar la adsorción de insulina en un nanogel de alilamina, que tiene carga positiva por debajo de su pKa de 9.5, superponiéndose con el rango donde la insulina tiene carga negativa. Aparte de los monómeros funcionales, la estructura de estas redes de copolímero AH-VA es la misma que la de los nanogeles de MAA-VA descritos anteriormente.

La figura 4.9A muestra la adsorción de insulina en nanogeles basados en AH con diferentes funcionalizaciones espaciales. Una vez más, hemos considerado redes con un 22% de monómeros sensibles al pH para poder incluir resultados para el nanogel SF, cuyas cadenas colgantes están completamente compuestas de AH. Las principales características de este gráfico son cualitativamente similares a las de la adsorción de citocromo c y mioglobina en los nanogeles de MAA (ver figura 4.6). Es decir, la insulina muestra una adsorción no monótona en función del pH de la solución. Además, observamos que la distribución central de los segmentos de AH captura más insulina que las funcionalizaciones aleatorias o superficiales. Los nanogeles RF y SF muestran perfiles de adsorción dependientes del pH relativamente similares. Finalmente, una mayor concentración de sal tiene un efecto crítico en la magnitud de la adsorción de insulina, que disminuye significativamente debido al aumento del apantallamiento de las atracciones electrostáticas entre la red y la proteína por los iones móviles.

La figura 4.9A muestra que los nanogeles basados en AH son efectivos para encapsular insulina. Sin embargo, a pesar de las similitudes cualitativas entre los perfiles de adsorción de esta figura y los de citocromo c y mioglobina (4.6A y C), vemos que la cantidad de moléculas de insulina capturadas por los nanogeles de AH es significativamente menor que la de las otras proteínas capturadas por los nanogeles basados en MAA. Por esta razón, también hemos evaluado el efecto del grado de funcionalización de la red de polímero para mejorar la adsorción de proteínas. La figura 4.9B presenta la adsorción de insulina para nanogeles con un 35% de segmentos de AH. En este caso, la estructura funcionalizada en la superficie no se incluye porque no hay suficientes segmentos en las cadenas para llegar a ese porcentaje. Un mayor contenido de AH promueve una mayor adsorción, como se puede observar

al comparar ambos paneles de la figura 4.9. Una vez más, el nanogel CF adsorbe más insulina que la red RF (más del doble de proteínas para las condiciones de estos cálculos).

A continuación, describimos la distribución de moléculas de insulina dentro de los nanogeles basados en AH. La figura 4.10A muestra cómo se disponen espacialmente las proteínas adsorbidas dentro de los diferentes nanogeles basados en AH con un grado de funcionalización del 22%; utilizamos ese grado de funcionalización para comparar los resultados de los nanogeles CF, RF y SF. El pH de estos resultados corresponde al máximo de adsorción de la figura 4.9A. La adsorción de insulina en el nanogel CF no solo es significativamente mayor que la adsorción en los nanogeles RF y SF, sino que también ocurre en una posición más profunda dentro de la estructura. La posición más probable de una molécula de insulina se encuentra alrededor de $r = 25$ nm para el nanogel CF, mientras que esta posición se desplaza a alrededor de 40-45 y 50 nm para las estructuras RF y SF, respectivamente.

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

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

4.4 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

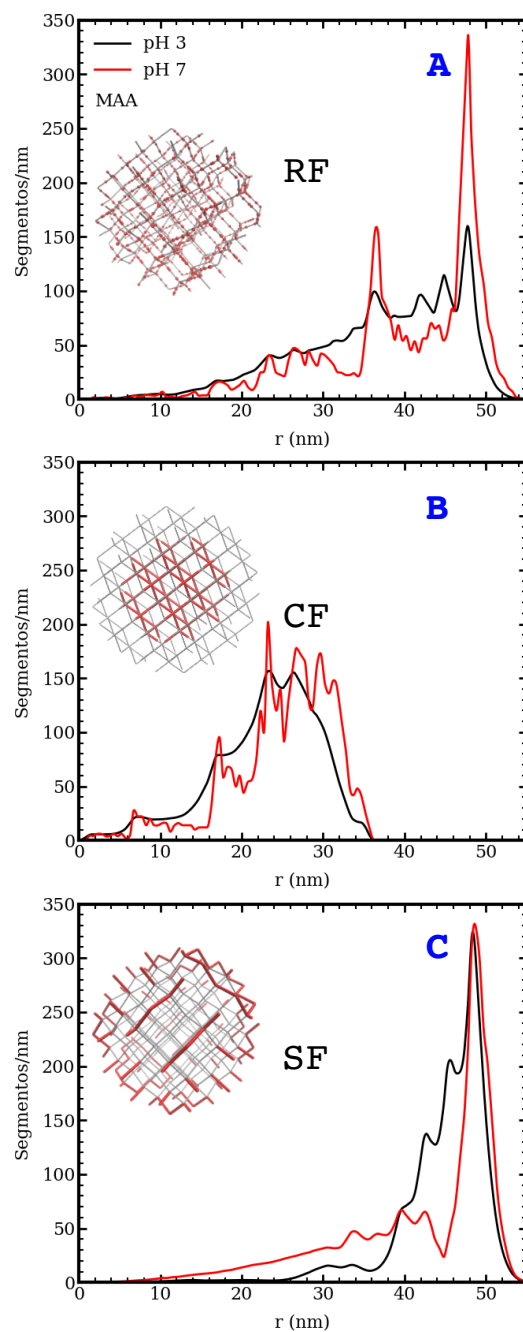


Figura 4.4: Distribución radial de segmentos MAA, $\lambda_{MAA}(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3}M$ NaCl; cada panel corresponde a un nanogel de MAA-VA diferente que tienen una funcionalización de red particular y 22% MAA. Estos grupos funcionales están completamente protonados (sin carga) a pH 3 y completamente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

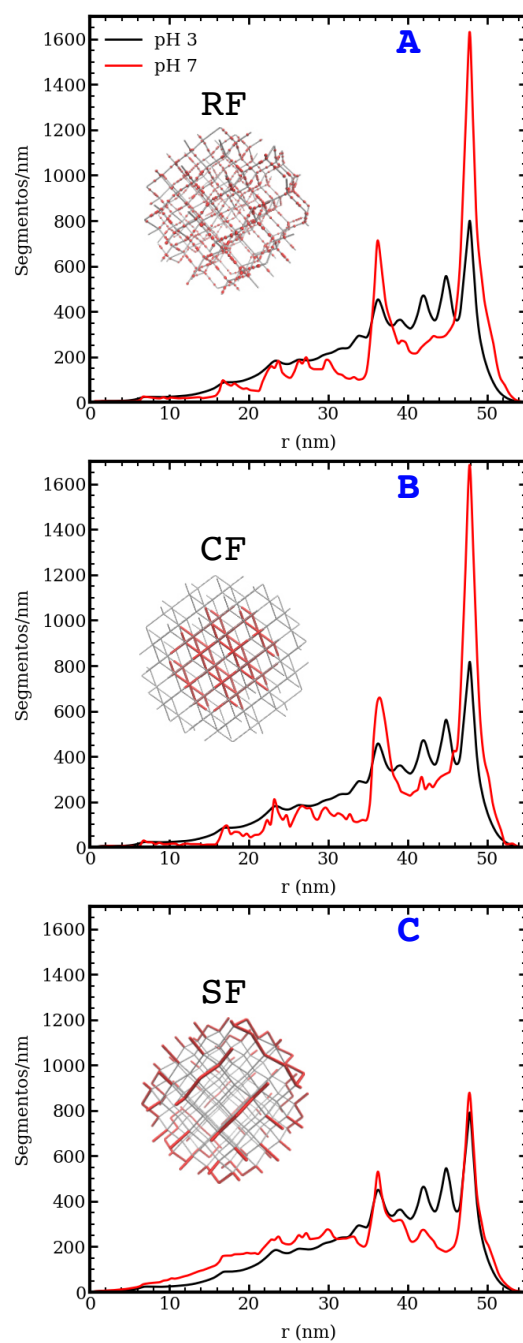


Figura 4.5: Distribución radial de los segmentos que componen la estructura del nanogel, $\lambda(r)$, a pH 3 y 7, y $10^{-3}M$ NaCl; cada panel corresponde a una funcionalización diferente

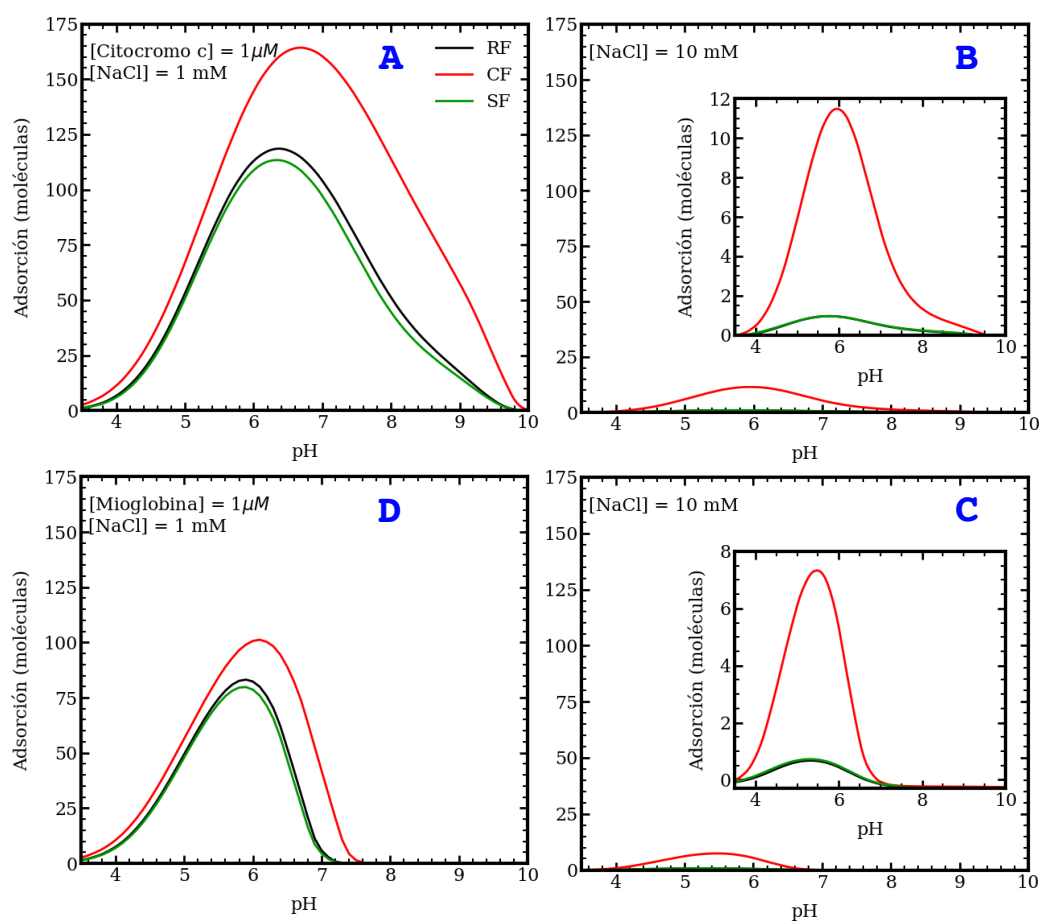


Figura 4.6: Gráficos del exceso de adsorción Γ de citocromo c (paneles A y B) y mioglobina (paneles C y D) a nanogeles MAA-VA en función del pH. La concentración de sal es $10^{-3} M$ en los paneles del lado izquierdo (A y C) y $10^{-2} M$ en los paneles del lado derecho (B y D); Se muestra una ampliación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

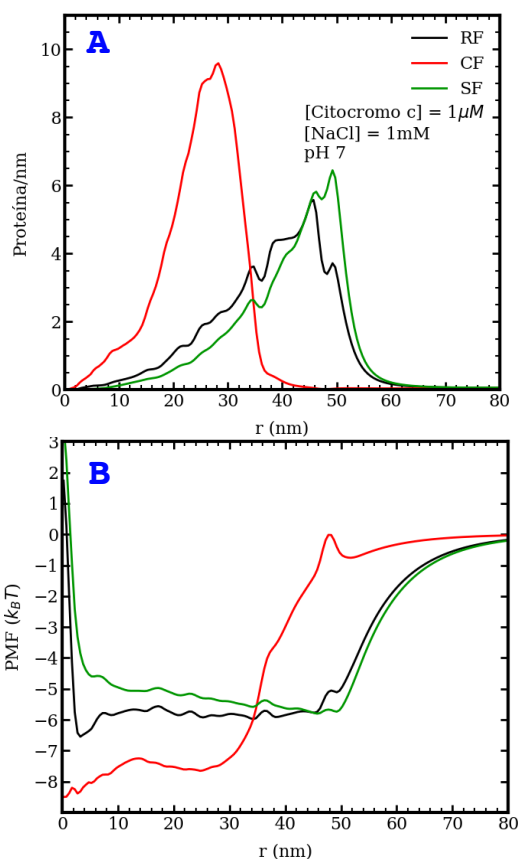


Figura 4.7: Panel A: Gráfico de la distribución radial de las moléculas de citocromo c, $\langle N(r) \rangle$, en función de la posición de los nanogeles MAA-VA con diferentes funcionalizaciones. Estas redes tienen 22% MAA, el pH es 7, la concentración de proteína es de $10^{-6}M$ y la concentración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

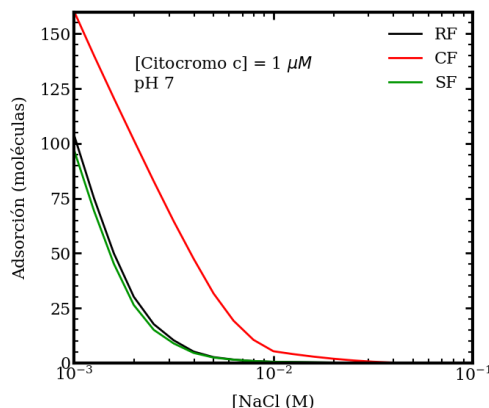


Figura 4.8: Plot of the excess adsorption Γ of cytochrome c as a function of salt concentration at pH 7 for MAA-VA nanogels with different network functionalizations having 22% MAA; protein concentration is $10^{-6} M$.

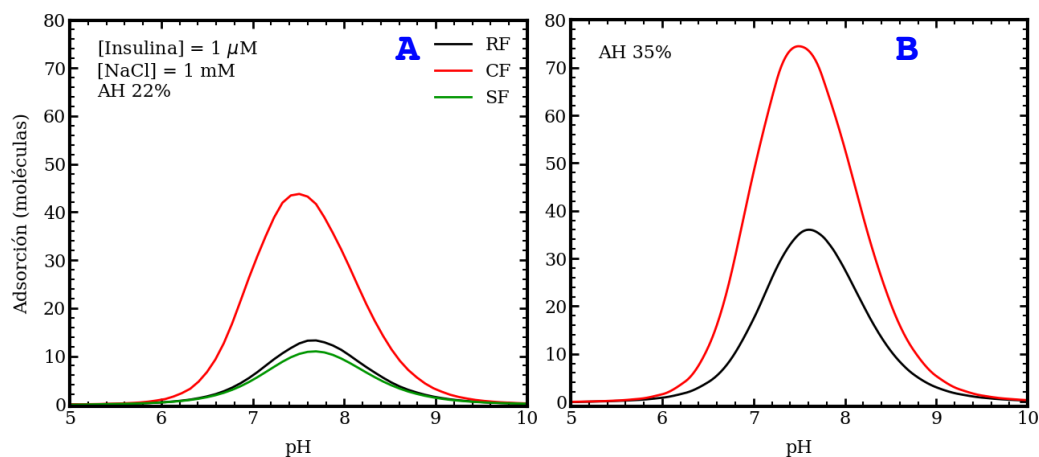


Figura 4.9: Plots of adsorbed insulin molecules, Γ , as a function of pH for AH-VA nanogels having different functionalizations. The AH content is 22% for the polymer networks of panel A and 35% for those of panel B (this latter degree of functionalization cannot be achieved for the SF nanogel). Other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

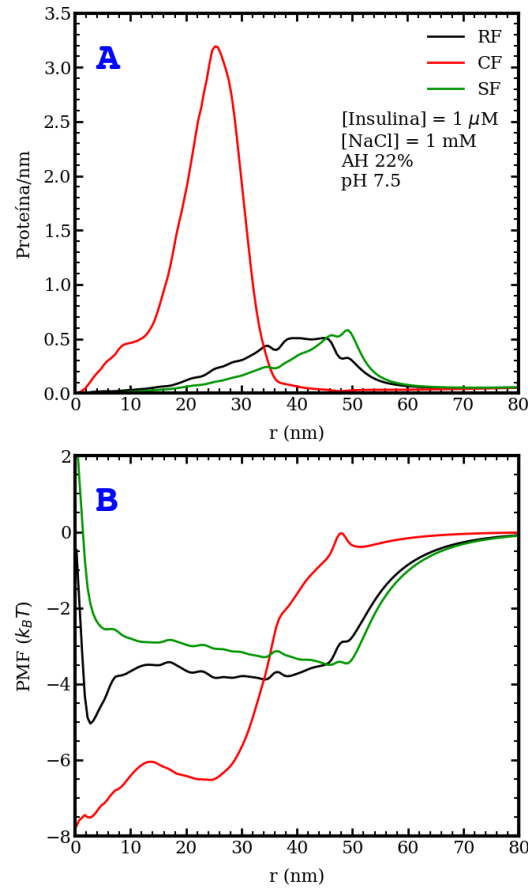


Figura 4.10: A: Plot of the local distribution of insulin molecules, $\langle N(r) \rangle$, as a function of position for AH-VA nanogels having 22% pH-sensitive segments in different network configurations. pH is 7.5, 10^{-6} M insulin and 10^{-3} M NaCl. B: Potential of mean force, $PMF(r)$, as a function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

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, Željko Bajzer, Lichun Lu, and Michael J. Yaszemski. Controlled release of doxorubicin from pH-responsive microgels. *Acta Biomaterialia*, 9(3):5438 – 5446, 2013. ISSN 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.019>. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112004564>.
- [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] Gabriel S Longo, Monica Olvera de la Cruz, and Igal Szleifer. Non-monotonic swelling of surface grafted hydrogels induced by ph and/or salt concentration. *The Journal of chemical physics*, 141(12):124909, 2014. doi: 10.1063/1.4896562.

- [49] 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>.
- [50] 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.
- [51] 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>.
- [52] 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>.
- [53] 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>.
- [54] 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.

- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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>.
- [62] 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>.

- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] Ricarda Schroeder, Andrey A. Rudov, L. Andrew Lyon, Walter Richtering, Andrij Pich, and Igor I. Potemkin. Electrostatic Interactions and Osmotic Pressure of Counterions Control the pH-Dependent Swelling and Collapse of Polyampholyte Microgels with Random Distribution of Ionizable Groups. *Macromolecules*, 48(16):5914–5927, 2015. ISSN 15205835. doi: 10.1021/acs.macromol.5b01305.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] 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>.
- [75] 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.
- [76] 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.

- [77] 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.
- [78] 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>.
- [79] Madeline Torres-Lugo, Marcos García, Rae Record, and Nicholas A Pepas. Physicochemical behavior and cytotoxic effects of p(methacrylic acid–glyethylene 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>.
- [80] 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.
- [81] Chi Wu and Shuiqin Zhou. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous? *Macromolecules*, 30(3):574–576, 1997. doi: 10.1021/ma960499a.
- [82] 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>.
- [83] 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>.