



REORGANIZAÇÃO CONFORMACIONAL DA GELATINA INDUZIDA PELA INTERAÇÃO COM OURO: UM ESTUDO DE DINÂMICA MOLECULAR

Tallys T. Silveira¹; Tiago E. Oliveira¹

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
tallys.silveira@ufcspa.edu.br

Palavras-Chave: Polímero, hidrogéis, bioimpressão.

Introdução

A bioimpressão tridimensional representa uma das principais estratégias da engenharia de tecidos para a obtenção de estruturas biológicas com arquiteturas complexas e características semelhantes às de tecidos naturais. O desempenho dessa tecnologia está diretamente relacionado às propriedades das biotintas utilizadas, que devem apresentar adequada capacidade de impressão, estabilidade estrutural, biocompatibilidade e propriedades mecânicas compatíveis com a aplicação pretendida. Nesse contexto, hidrogéis poliméricos destacam-se pela capacidade de compor a matriz extracelular dessas biotintas, sendo amplamente investigados para aplicações em medicina regenerativa, cicatrização de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármacos. Entretanto, a otimização simultânea das propriedades estruturais e mecânicas desses materiais ainda constitui um dos principais desafios para a ampliação de suas aplicações em bioimpressão (GHOSH; YI, 2022).

Entre os biomateriais empregados na formulação de biotintas, uma opção comum é a gelatina, um biopolímero derivado da hidrólise parcial do colágeno, apresentando elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e amplamente disponível. Além de favorecer a adesão e proliferação celular, a gelatina apresenta propriedades que podem ser moduladas por modificações químicas e pelas interações entre suas cadeias. Assim, características como resistência mecânica, estabilidade e comportamento reológico estão intimamente relacionadas à sua organização conformacional (ASIM *et al.*, 2023). Na ciência dos polímeros, é amplamente reconhecido que alterações na conformação e mobilidade das cadeias podem resultar em mudanças significativas nas propriedades macroscópicas do material. Dessa forma, compreender o comportamento molecular da gelatina torna-se essencial para o desenvolvimento racional de biomateriais com propriedades controladas (RUBINSTEIN; COLBY, 2003).

Entre as estratégias empregadas para modificar as características de hidrogéis destaca-se a incorporação de nanopartículas, usadas para ajustar propriedades físico-químicas e mecânicas, ampliando seu potencial de aplicação em biomateriais. Nesse contexto, há uma ampla escolha por nanopartículas de ouro para assumir o papel descrito, pois apresentam elevada estabilidade química e biocompatibilidade. Em nível molecular, superfícies de ouro



apresentam elevada afinidade por biomoléculas, promovendo processos de adsorção capazes de modificar a orientação, a mobilidade e a organização conformacional das cadeias poliméricas. Assim, compreender como essas interações ocorrem na interface ouro-gelatina constitui um passo importante para correlacionar fenômenos observados em escala molecular com o comportamento macroscópico desses materiais (LIU; PENG, 2017).

Embora existam diversos estudos experimentais envolvendo hidrogéis de gelatina contendo nanopartículas de ouro, os mecanismos moleculares responsáveis pelas interações entre as cadeias poliméricas e superfícies metálicas permanecem apenas parcialmente compreendidos. Em particular, ainda são escassos os estudos que investigam como a presença do ouro influencia a conformação, a flexibilidade e a mobilidade das cadeias de gelatina em nível molecular (RAFFAINI; GANAZZOLI, 2010). Nesse contexto, a dinâmica molecular constitui uma ferramenta importante para investigar esses fenômenos, permitindo analisar, de um ponto de vista microscópico, as interações entre a gelatina e superfícies de ouro, as quais são de difícil observação por técnicas experimentais (TAVANTI; PEDONE; MENZIANI, 2019).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo elucidar, em nível molecular, a influência da interação entre gelatina e ouro sobre o comportamento estrutural e dinâmico de uma cadeia polimérica, contribuindo para a compreensão dos mecanismos que podem influenciar as propriedades de hidrogéis empregados em bioimpressão tridimensional.

Material e Métodos

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas no pacote GROMACS (ABRAHAM *et al.*, 2015). O principal sistema proposto contém 4680 átomos de ouro dispostos em uma superfície de formato retangular centralizada que divide a caixa de simulação em 2 partes, também possui 1 cadeia modelo de gelatina e um número total de 9484 moléculas de água, contidos em uma caixa com 357,48 nm³. Além disso, foi realizada uma simulação com o sistema *branco* equivalente ao principal, mas sem a superfície de ouro. A cadeia de gelatina foi descrita pelo campo de forças CHARMM36 (HUANG; MACKERELL, 2013), o modelo de água utilizado foi o TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983) e os átomos de ouro foram descritos pelo modelo INTERFACE FF (HEINZ *et al.*, 2013), compatível com o CHARMM36 e disponibilizado através das ferramentas do software CHARMM-GUI (JO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2016). A temperatura e a pressão foram mantidas constantes 25 °C e 1 atm (em regime semi-isotrópico), respectivamente.

O modelo de gelatina utilizado foi gerado a partir da sequência FASTA retirada do artigo experimental de referência (WANG *et al.*, 2022), em seguida, usou-se o software Pymol (SCHRÖDINGER, 2020) para formar a estrutura tridimensional da cadeia, seguindo a posição de cada aminoácido presente na sequência FASTA. Em seguida, utilizou-se da ferramenta “Builder” do Pymol para adicionar átomos de oxigênio em segmentos de prolina, com o objetivo de convertê-la em hidroxiprolina (HYP), presente na sequência usada como referência. Posteriormente, usou-se o software CHARMM-GUI para obter os parâmetros da



molécula de gelatina construída computacionalmente, assim como o arquivo de coordenadas contendo os átomos de ouro dispostos em uma superfície com dimensões adequadas para o tamanho da caixa de simulação. O sistema descrito é representado visualmente na Figura 1.

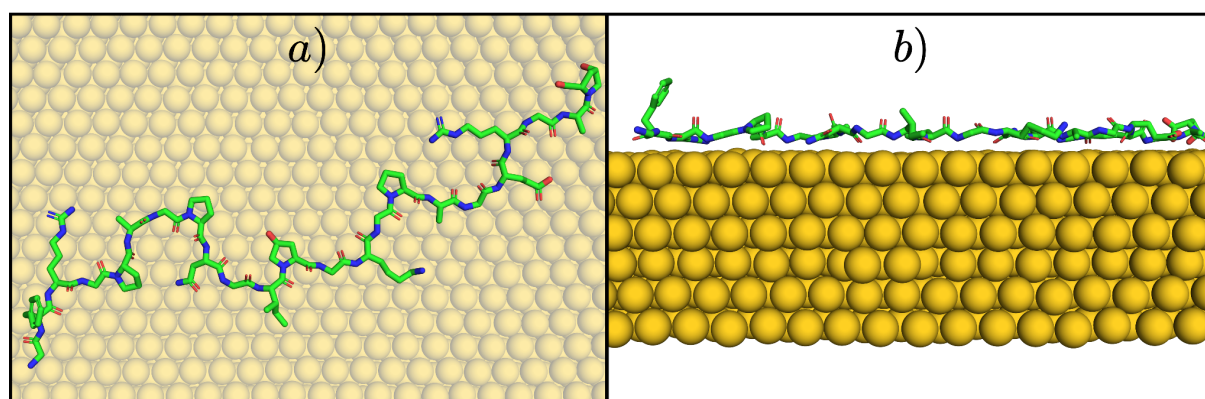


Figura 1: Representação do sistema construído computacionalmente, composto por uma superfície de ouro e uma cadeia de gelatina, visualizado sob diferentes perspectivas: (a) vista superior e (b) vista lateral.

Como parte do protocolo de simulação, realizou-se primeiro uma minimização de energia do sistema, seguido de curtas equilibrações com temperatura e volume constantes, e pressão e temperatura constantes. A trajetória final foi simulada em 250 nanossegundos, dos quais apenas os últimos 50 foram analisados. Foram avaliadas alterações estruturais e dinâmicas por meio de análises de raio de giro (R_g), coeficiente de difusão, área superficial acessível ao solvente (SASA) e ligações de hidrogênio através das funções do pacote GROMACS. Também realizou-se a análise de função de distribuição de distâncias mínimas (MDDF), utilizando a função externa ComplexMixtures (MARTÍNEZ, 2022).

Resultados e Discussão

A análise das trajetórias de dinâmica molecular revelou diferenças consideráveis no comportamento conformacional da cadeia de gelatina quando simulada em solução aquosa e quando em contato com a superfície de ouro.

O raio de giro (Figura 2) foi utilizado como parâmetro para avaliar o enovelamento da cadeia durante a simulação. Observou-se que o sistema contendo a superfície de ouro apresentou um valor médio de $1,92 \pm 0,01$ nm, sendo este superior em todo o intervalo avaliado ao do sistema contendo apenas gelatina e água, cujo raio de giro médio foi de $1,02 \pm 0,14$ nm. Além disso, o valor consideravelmente maior do desvio padrão na simulação contendo a cadeia livre indica a ocorrência de sucessivos ciclos de expansão e enovelamento ao longo da trajetória, refletindo sua elevada flexibilidade estrutural, compatível com o modelo de novelo aleatório. Estes valores também indicam que a presença da superfície metálica levou à estabilização de uma conformação mais estendida da cadeia de gelatina.

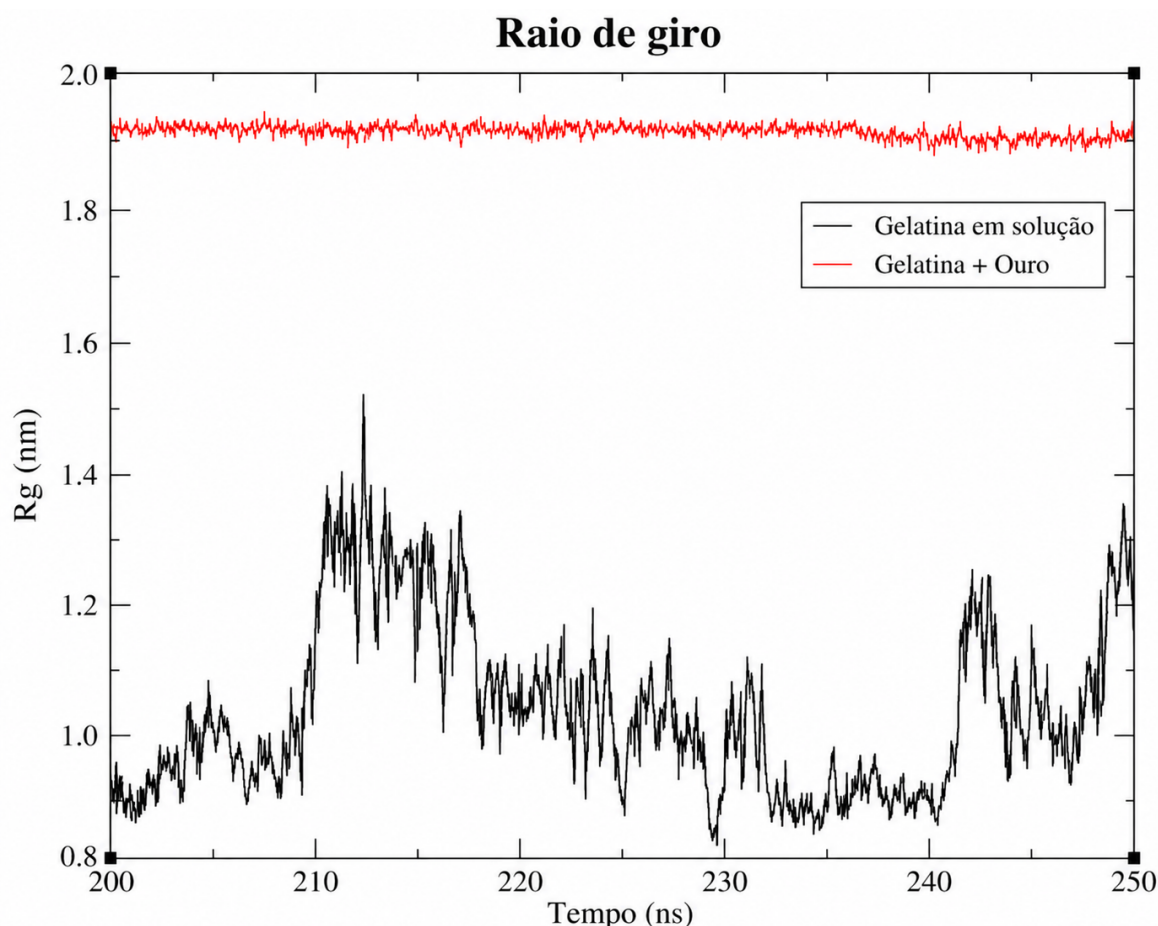


Figura 2: Curvas correspondentes aos valores de raio de giro para ambos os sistemas simulados.

O comportamento observado pela análise de raio de giro é compatível com o processo de adsorção de macromoléculas sobre superfícies sólidas, no qual diferentes segmentos da cadeia estabelecem contatos com o substrato, reduzindo a liberdade conformacional. Em proteínas e polímeros biológicos, esse fenômeno pode resultar tanto da formação de interações diretas com a superfície quanto da restrição estérica imposta pelo processo de adsorção. Outros trabalhos que utilizam de dinâmica molecular envolvendo proteínas em contato com átomos de ouro já relataram reorganizações conformacionais após o contato inicial, acompanhadas por redução da flexibilidade estrutural (WANG *et al.*, 2021).

Os resultados do coeficiente de difusão reforçam essa interpretação. O sistema contendo ouro apresentou coeficiente de difusão médio de $0,0013 \pm 0,0012 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, enquanto o sistema contendo apenas gelatina e água apresentou valor aproximadamente três ordens de grandeza superior, sendo este $0,7508 \pm 0,0600 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Essa diferença indica redução expressiva da mobilidade da cadeia após sua interação com a superfície metálica.



A diminuição da difusão sugere que a adsorção da gelatina no ouro restringe significativamente sua mobilidade. Embora as análises realizadas não permitam determinar diretamente propriedades reológicas macroscópicas, a redução da mobilidade molecular representa um indicativo de que a incorporação de nanopartículas de ouro pode influenciar o comportamento mecânico de hidrogéis de gelatina. Essa hipótese é consistente com estudos experimentais que demonstram alterações na viscosidade de hidrogéis contendo nanopartículas metálicas, embora o impacto dessas alterações dependa da concentração das partículas, do tamanho e da intensidade das interações do polímero com a superfície (ZHANG *et al.*, 2021).

A análise da área superficial acessível ao solvente (SASA) também reforçou os resultados obtidos pelo raio de giro. O sistema contendo a superfície de ouro apresentou valor médio de $30,07 \pm 0,42 \text{ nm}^2$, superior ao observado para a cadeia em solução ($24,53 \pm 1,66 \text{ nm}^2$). O aumento da área acessível no sistema contendo a superfície de ouro sugere que a cadeia permaneceu em uma conformação menos compacta durante a maior parte do intervalo avaliado. Na Tabela 1, é possível observar os valores decompostos das regiões da cadeia de gelatina expostas ao solvente, em cada sistema.

Região da cadeia de gelatina	Ouro + Gelatina (nm ²)	Gelatina em solução (nm ²)
Esqueleto carbônico	6,37 ($\pm 0,21$)	4,48 ($\pm 0,48$)
Cadeias laterais	23,70 ($\pm 0,36$)	20,05 ($\pm 1,33$)
Molécula inteira	30,07 ($\pm 0,42$)	24,53 ($\pm 1,66$)

Tabela 1: Área das regiões da cadeia de gelatina disponível ao solvente, em cada simulação.

Em contraste com as diferenças observadas para o raio de giro, coeficiente de difusão e SASA, o número médio de ligações de hidrogênio polímero-água permaneceu praticamente constante entre os sistemas simulados, sendo de $64,09 \pm 3,40$ ligações para gelatina adsorvida em ouro e $65,53 \pm 4,96$ interações para gelatina apenas em solução. Esse resultado indica que a reorganização conformacional observada não está associada a alterações significativas da rede de ligações de hidrogênio da cadeia. Este comportamento sugere que a principal influência responsável pelas diferenças estruturais observadas decorre da interação da gelatina com a superfície de ouro, e não da ruptura de interações internas da própria gelatina, ou da cadeia com o solvente.

A análise de MDFF forneceu evidências adicionais sobre o microambiente ao redor da cadeia de gelatina. O gráfico representando as curvas de cada sistema pode ser observado na Figura 3.

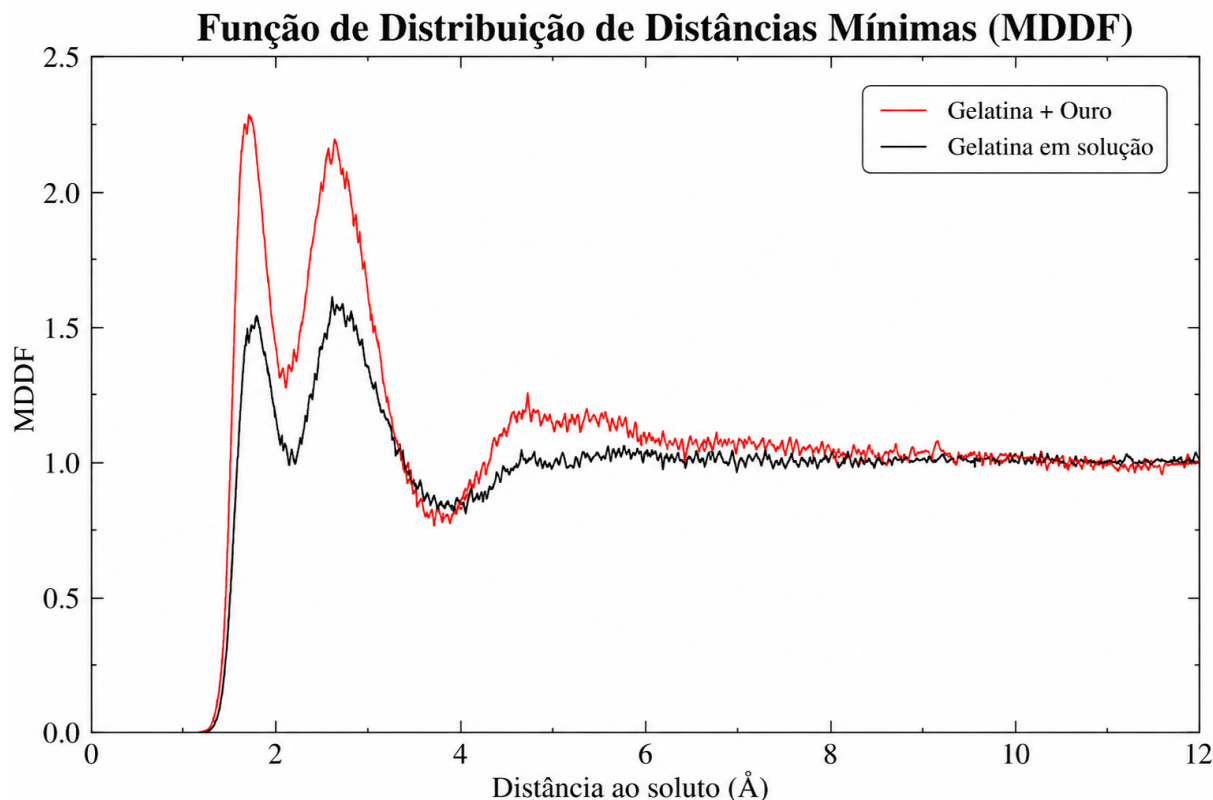


Figura 3: Curvas correspondentes aos valores de MDDF para ambos os sistemas simulados.

Observou-se aumento pronunciado da densidade local do solvente nas proximidades da cadeia quando esta se encontrava adsorvida sobre a superfície de ouro, em comparação ao sistema contendo apenas água. O resultado indica reorganização do ambiente molecular ao redor da gelatina em função da presença da superfície metálica. Esse comportamento pode refletir modificações na estrutura local do solvente e na distribuição espacial das moléculas próximas à cadeia durante o processo de adsorção, fenômeno já observado em estudos computacionais envolvendo interfaces sólido-líquido (OZBOYACI *et al.*, 2016).

Conclusões

Em conjunto, praticamente todas as análises convergem para uma mesma interpretação. A superfície de ouro promove a adsorção da cadeia de gelatina, reduz sua mobilidade, restringindo sua flexibilidade conformacional e favorece a permanência da cadeia em conformações mais estendidas. A concordância entre os resultados obtidos por diferentes métricas aumenta a robustez dessa interpretação e sugere que os efeitos observados não decorrem de um único parâmetro isolado, mas representam uma alteração consistente do comportamento da cadeia de gelatina.

Do ponto de vista aplicado, tais resultados fornecem uma explicação molecular plausível, capaz de promover alterações nas propriedades físicas de hidrogéis contendo nanopartículas de ouro. Embora propriedades reológicas não tenham sido calculadas



diretamente neste trabalho, a redução expressiva da mobilidade molecular e a estabilização conformacional observadas indicam que a presença das nanopartículas pode modificar o comportamento coletivo das cadeias poliméricas, influenciando características relevantes para processos de bioimpressão por extrusão e para o desenvolvimento de biomateriais baseados em gelatina.

Existe, ainda, a perspectiva de complementar os dados adquiridos pela pesquisa com análises de um novo sistema, este contendo múltiplas cadeias de gelatina próximas da superfície de ouro, de forma que seja possível verificar as interações da rede polimérica em regiões próximas e distantes da superfície metálica, com a intenção de compará-las.

Agradecimentos

UFCSPA, Fapergs e CNPq.

Referências

- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25, 2015. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- ASIM, S.; TABISH, T. A.; LIAQAT, U.; et al. Advances in gelatin bioinks to optimize bioprinted cell functions. *Advanced Healthcare Materials*, 12(17), e2203148, 2023. DOI: 10.1002/adhm.202203148.
- GHOSH, S.; YI, H. G. A Review on Bioinks and their Application in Plant Bioprinting. *International Journal of Bioprinting*, 8(4), 612, 2022. DOI: 10.18063/ijb.v8i4.612.
- HEINZ, H.; LIN, T.-J.; MISHRA, R. K.; EMAMI, F. S. Thermodynamically Consistent Force Fields for the Assembly of Inorganic, Organic, and Biological Nanostructures: The INTERFACE Force Field. *Langmuir*, 29, 1754–1765, 2013. DOI: 10.1021/la3038846.
- HUANG, J.; MACKERELL JR., A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145, 2013. DOI: 10.1002/jcc.23354.
- JO, S.; KIM, T.; IYER, V. G.; IM, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865, 2008. DOI: 10.1002/jcc.20945.
- JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935, 1983. DOI: 10.1063/1.445869.
- LEE, J.; CHENG, X.; SWAILS, J. M.; et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405–413, 2016. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00935.
- LIU, J.; PENG, Q. Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 55, 13–27, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.03.055.
- MARTÍNEZ, L. ComplexMixtures.jl: Investigating the structure of solutions of complex-shaped molecules from a solvent-shell perspective. *Journal of Molecular Liquids*, 347, 117945, 2022. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.117945.
- OZBOYACI, M.; KOKH, D. B.; CORNI, S.; et al. Modeling and simulation of protein-surface interactions: achievements and challenges. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 49, e4, 2016. DOI: 10.1017/S0033583515000256.



RAFFAINI, G.; GANAZZOLI, F. Protein adsorption on biomaterial and nanomaterial surfaces: a molecular modeling approach to study non-covalent interactions. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 8(3), 135–145, 2010. DOI: 10.5301/JABB.2010.6093.

RUBINSTEIN, M.; COLBY, R. H. *Polymer Physics*. Oxford University Press, 2003. DOI: 10.1093/oso/9780198520597.002.0001.

SCHRÖDINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, 2020.

TAVANTI, F.; PEDONE, A.; MENZIANI, M. C. Multiscale Molecular Dynamics Simulation of Multiple Protein Adsorption on Gold Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3539, 2019. DOI: 10.3390/ijms20143539.

WANG, L.; HUANG, Y.; DING, K.; et al. Polyphosphate enhanced biomimetic mineralization of 3D printing scaffolds for bone regeneration. *Composites Part B: Engineering*, 239, 109989, 2022. DOI: 10.1016/j.compositesb.2022.109989.

WANG, X.; ZHANG, Y.; LI, Z.; et al. Rearrangement of protein structures on a gold nanoparticle surface is regulated by ligand adsorption modes. *Nanoscale*, 13(48), 20425–20436, 2021. DOI: 10.1039/d1nr04813a.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; et al. Gold nanoparticles-deranged double network for Janus adhesive-tough hydrogel as strain sensor. *Chemical Engineering Journal*, 420, 130447, 2021. DOI: 10.1016/j.cej.2021.130447.