

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**ESTUDO COMPUTACIONAL VIA DINÂMICA MOLECULAR DE POLI(VINIL
ÁLCOOL) FUNCIONALIZADO COM O TRIPEPTÍDEO RGD**

Maíra Theisen

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, janeiro de 2017.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**ESTUDO COMPUTACIONAL VIA DINÂMICA MOLECULAR DE POLI(VINIL
ÁLCOOL) FUNCIONALIZADO COM O TRIPEPTÍDEO RGD**

Maíra Theisen

Dissertação realizada sob a orientação da Prof. Rosane M. D. Soares e coorientação do Prof. Hubert K. Stassen, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, janeiro de 2017.

Dedico este trabalho a pessoa que mais me apoiou durante o mestrado, e que foi tão importante na minha vida: Masahiro Hatori.

“Toute tentative pour rapporter les questions chimiques aux doctrines mathématiques doit être considérée, aujourd’hui et toujours, comme profondément irrationnelle, comme étant contraire à la nature des phénomènes.”

Auguste Comte

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.”

Marie Curie

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 BIOMATERIAIS.....	6
2.2 HIDROGÉIS.....	7
2.2.1 Classificação dos hidrogéis.....	9
2.2.2 Métodos de reticulação.....	10
2.2.2.1 Hidrogéis reticulados quimicamente.....	10
2.2.2.2 Hidrogéis reticulados fisicamente.....	12
2.2.3 Hidrogéis responsivos.....	15
2.2.2.3 Hidrogéis pH-responsivos.....	17
2.2.2.4 Hidrogéis termorresponsivos.....	18
2.2.4 Água em hidrogéis.....	19
2.2.5 Caracterização dos hidrogéis.....	21
2.2.6 Hidrogéis de poli(vinil álcool).....	24
2.3 INTERAÇÃO BIOMATERIAL E MEIO AMBIENTE.....	27
2.3.1 Matriz extracelular.....	27
2.3.2 Aminoácidos.....	28
2.3.3 Sequência peptídica RGD.....	31
2.4 DINÂMICA MOLECULAR.....	33
2.4.1 Condições de contorno.....	35
2.4.2 Campo de força.....	35
2.4.2.1 Campo de força AMBER.....	36
2.4.3 Gromacs.....	37
2.4.4 Análises da Dinâmica Molecular.....	38
2.4.4.1 Função de distribuição radial.....	38
2.4.4.2 Raio de giro.....	38
2.4.4.3 Desvio quadrático médio.....	39
2.4.4.4 Ligação de hidrogênio.....	40
2.5 GAUSSIAN.....	40

3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. METODOLOGIA.....	43
4.1 CONSTRUÇÃO DAS MOLÉCULAS E AJUSTE DAS CARGAS.....	43
4.1.1 PVA.....	43
4.1.2 Tripeptídeo RGD.....	45
4.1.3 PVA-amina.....	45
4.1.4 PVA-amina-ace.....	46
4.1.5 Anel.....	46
4.1.6 PVA-RGD.....	46
4.2 DINÂMICA MOLECULAR.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
5.1 SISTEMA PVA-42.....	50
5.2 SISTEMA POLIPVA-RGD.....	54
5.3 SISTEMA RGD.....	58
5.4 SISTEMAS 9PRGD E 9PRGDA.....	60
5.4.1 No vácuo.....	60
5.4.2 Solvatado.....	64
6. CONCLUSÕES.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de polímero: (a) linear, (b) ramificado e (c) reticulado.....	1
Figura 2. Classificação dos polímeros.....	2
Figura 3. Classificação dos hidrogéis.....	9
Figura 4. Métodos de preparação de hidrogéis reticulados quimicamente.....	11
Figura 5. Enxerto de um monômero em um polímero pré-formado.....	12
Figura 6. Métodos de formação de reticulações físicas em hidrogéis via: (a) complexação polímero-polímero, (b) ligações de hidrogênio, (c) interações hidrofóbicas, (d) interações cabeça-cauda, (e) interações iônicas e (f) reconhecimento molecular específico.....	14
Figura 7. Classificação dos hidrogéis responsivos.....	15
Figura 8. Comportamento pH-responsivo de hidrogéis e solubilidade de hidrosol aniônico e catiônico.....	18
Figura 9. Comportamento termorresponsivo de hidrogéis e solubilidade do hidrosol.....	19
Figura 10. Forças de intumescimento em hidrogéis.....	20
Figura 11. Estrutura do monômero de poli(vinil álcool).....	25
Figura 12. Componentes da matriz extracelular.....	27
Figura 13. Os 20 aminoácidos comuns em proteínas. As estruturas correspondem a forma predominante em pH neutro. A porção não sombreada das moléculas corresponde à estrutura comum a todos os aminoácidos, enquanto a parte sombreada representa o grupo R de cada molécula.....	28
Figura 14. Formação de uma ligação peptídica.....	30
Figura 15. Estrutura do tripeptídeo RGD.....	32
Figura 16. Curvas de titulação dos aminoácidos: (a) glicina, (b) ácido aspártico e (c) arginina.....	33
Figura 17. Etapas envolvidas em uma simulação de dinâmica molecular.....	34

Figura 18. RDF para oxigênio-oxigênio no modelo SPC da água.....	38
Figura 19. Raio de giro do PVA.....	39
Figura 20. RMSD do PVA em diferentes valores de pH.....	40
Figura 21. Estrutura do (a) isopropanol, (b) trímero e (c) tetrâmero construídas no GaussView.....	43
Figura 22. Separação do trímero nos blocos L, C e R.....	44
Figura 23. Estrutura do tripeptídeo RGD.....	45
Figura 24. Estrutura da forma PVA-amina.....	45
Figura 25. RMSD do PVA para as três temperaturas estudadas.....	50
Figura 26. (a) Raio de giro do PVA para as três temperaturas estudadas e (b) conformação da molécula em diferentes tempos de simulação.....	51
Figura 27. (a) RDF do O (polímero) - H (água) e (b) integral da RDF para as três temperaturas estudadas.....	52
Figura 28. Estrutura e nomenclatura dos átomos em 42-pva.....	52
Figura 29. (a) RDF do H (polímero) - O (água) e (b) integral da RDF para as três temperaturas estudadas.....	53
Figura 30. RDF do par (a) HO1p-OW, (b) O1p-HW, (c) HO2-OW e (d) O2-HW para as três temperaturas estudadas.....	53
Figura 31. RMSD do sistema polipva-rgd para as três temperaturas estudadas.....	54
Figura 32. Raio de giro do sistema polipva-rgd para as três temperaturas estudadas.....	54
Figura 33. Gráficos do (a) raio de giro, (b) RMSD do sistema polipva-rgd para as três temperaturas até o tempo final de simulação e (c) conformações da molécula em tempos de simulação diferentes para as três temperaturas.....	55
Figura 34. RDF do O(polímero) – H(água) para as três temperaturas estudadas.....	56

Figura 35. Estrutura e nomenclatura dos átomos em polipva-rgd.....	57
Figura 36. RDF do H(polímero) – O(água) para as três temperaturas estudadas.....	57
Figura 37. RDF do par (a) HO2-OW, (b) O2-HW, (c) O1p-HW e (d) O3-HW para as três temperaturas estudadas.....	58
Figura 38. RMSD do tripeptídeo em pH neutro e ácido ao longo da simulação.....	59
Figura 39. Raio de giro do tripeptídeo em pH neutro e ácido ao longo da simulação.....	59
Figura 40. RMSD dos sistemas em pH neutro e ácido.....	60
Figura 41. Raio de giro dos sistemas em pH neutro e ácido.....	60
Figura 42. Estrutura e nomenclatura do 9prgd.....	61
Figura 43. RDF do sistema 9prgd no vácuo: (a) HO2 com oxigênios da molécula, (b) HO1 com oxigênios da molécula e (c) H91 com oxigênios da molécula.....	62
Figura 44. RDF do sistema 9prgd com pares entre as cadeias de PVA.....	64
Figura 45. RMSD dos sistemas 9prgd (pH neutro) e 9prgda (pH ácido) ao longo da simulação.....	65
Figura 46. Raio de giro dos sistemas 9prgd (pH neutro) e 9prgda (pH ácido) ao longo da simulação.....	65
Figura 47. RDF do par O1p-HO2 para os 4 tempos de simulação analisados em (a) pH neutro e (b) pH ácido.....	68
Figura 48. RDF do par OA11-HC7x para os 4 tempos de simulação analisados em (a) pH neutro e (b) pH ácido.....	70
Figura 49. RDF do par OA12-HC7x para os 4 tempos de simulação analisados em (a) pH neutro e (b) pH ácido.....	71
Figura 50. RDF dos átomos O2, O1p, O1e e O3 do polímero com o HW da água no tempo de 100 ns de simulação para (a) pH neutro e (b) pH ácido.....	72
Figura 51. RDF dos átomos HO1 e HO2 do polímero com o OW da água no tempo de 100 ns de simulação para (a) pH neutro e (b) pH ácido.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura e nomenclatura de polímeros.....	3
Tabela 2. Relação entre artigos científicos que envolvam o termo “hydrogel” e os que além disso, utilizem algum método computacional.....	4
Tabela 3. Algumas aplicações de materiais sintéticos e naturais modificados em medicina.....	7
Tabela 4. Polímeros utilizados para a produção de hidrogéis e suas respectivas aplicações.....	8
Tabela 5. Exemplos de comportamento responsivo de hidrogéis a mudanças de fatores ambientais.....	16
Tabela 6. Mudanças nas propriedades do hidrogel devido à estrutura do hidrogel e composição do líquido.....	21
Tabela 7. Nomenclaturas e propriedades de aminoácidos.....	29
Tabela 8. Exemplos de níveis de teoria e métodos utilizados no Gaussian.....	41
Tabela 9. Carga dos átomos por bloco.....	44
Tabela 10. Descrição dos sistemas.....	47
Tabela 11. Configurações dos sistemas simulados.....	48
Tabela 12. Pares de átomos analisados e distâncias encontradas nas RDF.....	63
Tabela 13. Medidas das ligações de hidrogênio intramoleculares em cada uma das cadeias.....	64
Tabela 14. Resultados das RDF de átomos do PVA com átomos das cadeias pva-rgd dos sistemas 9prgd e 9prgda em diferentes tempos de simulação.....	67
Tabela 15. Resultados das RDF entre átomos do RGD dos sistemas 9prgd e 9prgda em diferentes tempos de simulação.....	69
Tabela 16. Resultados das RDF dos oxigênios e hidrogênios do pva-rgd com a água.....	71

ABREVIATURAS

AFM – microscopia de força atômica

AMBER – Assisted Model Building and Energy Refinement

DFT – Teoria do Funcional de Densidade

DM – Dinâmica molecular

DN – Redes duplas

DP – Grau de polimerização

DSC – calorimetria diferencial de varredura

GHK – glicil-histidil-lisina

GROMACS – GRONingen Machine for Chemical Simulations

HCM – células mesangiais humanas

IOL – lentes intraoculares

IUPAC – União internacional de Química Pura e Aplicada

LCST - temperatura de solução crítica inferior

LVCS – quitosana de baixa viscosidade

MEC – matriz extracelular

NIH – National Institutes of Health

NMR – ressonância magnética nuclear

PAN - poli(acrilonitrila)

PDB – Protein Data Bank

pI – ponto isoelétrico

PME – Particle Mesh Ewald

PNIPAAm – poli(N-isopropilacrilamida)

PP - polipropileno

PS – poli(1-fenil-etileno)

PVA – poli(vinil álcool)

PVC – poli(cloro etano)

SA – alginato de sódio

SEM – microscopia eletrônica de varredura

RDF – função de distribuição radial

RESP – restrained electrostatic potential

Rg – raio de giro

RGD – arginina-glicina-ácido aspártico

RGDS – arginina-glicina-ácido aspártico-serina

RMSD – desvio quadrático médio

UCST – temperatura de solução crítica superior

WOS – Web of Science

XRD – difração de raios X

RESUMO

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais ligadas entre si por reticulações químicas ou físicas, e podem absorver água ou fluidos biológicos. A estrutura permite que estes materiais tenham altos níveis de hidrofiliabilidade e biocompatibilidade, que em conjunto com as demais propriedades, fazem com que os hidrogéis sejam vistos como promissores biomateriais. Devido a estas características, hidrogéis possuem diversas aplicações voltadas as áreas médica e farmacêutica. Alguns hidrogéis apresentam um comportamento responsivo a variações de alguma condição do ambiente, são os chamados hidrogéis responsivos ou hidrogéis inteligentes.

Neste trabalho foi escolhido o polímero poli (vinil álcool) funcionalizado com o tripeptídeo RGD. A investigação foi desenvolvida através de simulações de dinâmica molecular a fim de primeiramente observar a formação do hidrogel. Para então observar a influência do tripeptídeo, da temperatura e do pH na capacidade do polímero de absorver água e em sua estrutura. Para isso, foram realizadas análises de desvio quadrático médio estrutural, raio de giro e ligações de hidrogênio.

As análises de função de distribuição radial mostraram indícios da formação de ligações de hidrogênio, tanto de interações intramolecular como intermolecular. Enquanto as demais análises mostraram que pode ocorrer comportamento responsivo para a temperatura de 310 K. Quando a pH do meio passa de neutro para ácido, ocorrem mudanças nas ligações de hidrogênio e na estrutura.

Estudos experimentais de hidrogéis ainda possuem algumas limitações, visto que certas características do material não podem ser determinadas com precisão. Através de métodos computacionais medidas como a quantidade e localização de reticulações e de peptídeo podem ser determinadas. Assim, estudos computacionais prévios ou posteriores podem ajudar a esclarecer dados obtidos experimentalmente.

Palavras-chaves: hidrogel, poli(vinil álcool), RGD, dinâmica molecular, pH.

ABSTRACT

Hydrogels are three-dimensional polymeric network crosslinked to each other by chemical or physical crosslinks, and can imbibe water or biological fluids. The materials structure allows it to have high levels of hydrophilicity and biocompatibility, which together with the other properties make them promising biomaterials. Due to these two characteristics hydrogels have numerous biomedical and pharmaceutical applications. Some hydrogels have a responsive behavior due to changes in their environment, the so-called stimuli-responsive hydrogels, or “smart” hydrogels.

For this work the poli(vinyl alcohol) polymer functionalized with RGD peptide was chosen. The work was developed using molecular dynamics simulations in order to observe the hydrogel formation and also the influence of tripeptide, temperature and pH in water imbibe capacity and polymer structure. For this analysis of root-mean-square deviation, radius of gyration and radial distribution function was performed.

The analysis of radial distribution function showed signs of hydrogen bond formation of both intramolecular and intermolecular interactions. Other analysis showed that thermoresponsive behavior may occur for 310 K. When the environment pH value is modified from neutral to acidic, changes occur in hydrogen bonds and structure.

Experimental studies of hydrogels have some limitations because some characteristics of the material can't be precisely determined. With computational methods the amount and the location of crosslinks and peptide can be determined. Therefore, previous or posterior computational studies can help to elucidate experimental data.

Keywords: hydrogel, poli(vinyl alcohol), RGD, molecular dynamics, pH.

1. INTRODUÇÃO

Embora o uso de polímeros naturais ocorra há séculos na Europa,⁽¹⁾ foi somente no século XIX que os primeiros polímeros semissintéticos foram criados. Nessa época, Hancock e Goodyear desenvolveram concomitantemente trabalhos com a borracha natural e John W. Hyatt fabricou a celuloide a partir de nitrato de celulose. Mais de quarenta anos se passaram, até que no início do século XX Leo Baekeland criasse a baquelite, um dos primeiros polímeros sintéticos.⁽²⁾ Desde então, estas macromoléculas vêm sendo utilizadas desde a fabricação de tecidos (poliéster) até em transportes (borracha sintética ou natural) e construção civil (Cloreto de polivinila).

Polímeros podem ser definidos como macromoléculas constituídas a partir de unidades de monômeros repetidas, ligadas covalentemente entre si e formados através de reações de polimerização. As reações podem dar origem a cadeias lineares ou ramificadas (Figura 1). Um mesmo polímero pode ser classificado de diversas formas, dependendo do critério escolhido. Na figura 2 são mostrados os principais critérios de classificação dos polímeros.

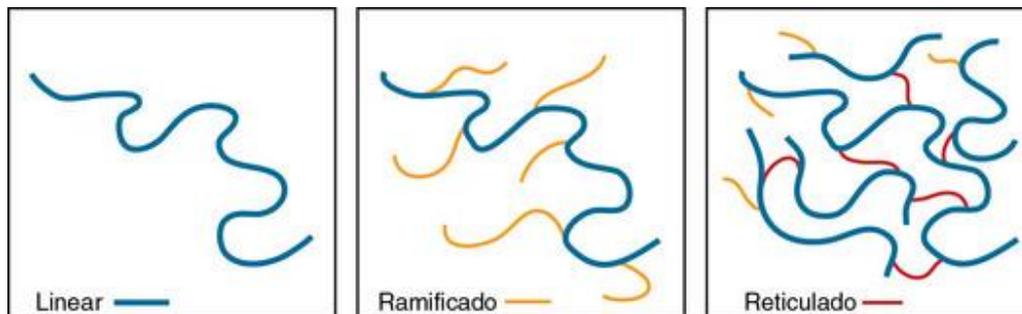


Figura 1. Representação de polímero: (a) linear, (b) ramificado e (c) reticulado.⁽³⁾

O comprimento da cadeia polimérica é definido pelo número de unidades de repetição (incluindo grupos terminais) empregadas, ao qual é denominado grau de polimerização (DP, do inglês *degree of polymerization*). Já a massa molecular da cadeia polimérica é calculada como um produto da massa molecular do monômero e do grau de polimerização.⁽⁴⁾

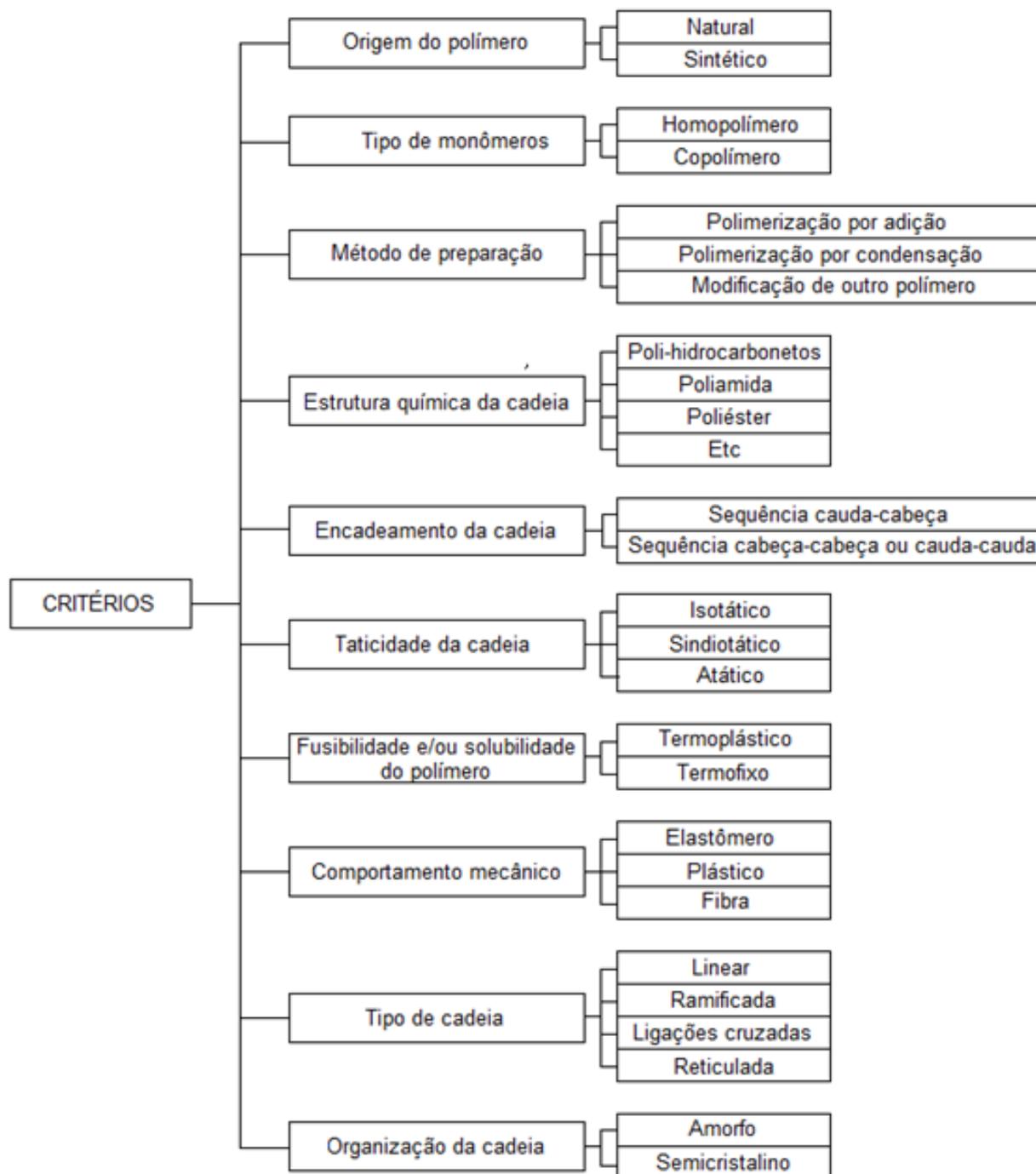
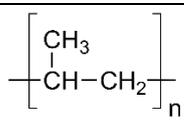
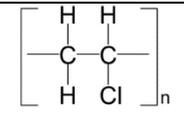
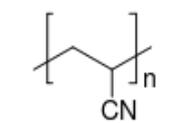
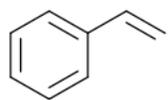
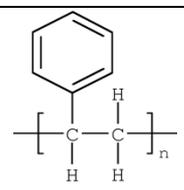


Figura 2. Classificação dos polímeros. Adaptado de ⁽⁵⁾ e ⁽⁶⁾

A nomenclatura dos polímeros costuma ser complexa e obedece aos critérios da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Muitos polímeros têm seu nome baseado no nome da estrutura monomérica que os constitui (Tabela 1). Esta acaba sendo a nomenclatura usual, apesar de existir uma nomenclatura estabelecida pela IUPAC.

Tabela 1. Estrutura e nomenclatura de polímeros. ⁽⁷⁾

Estrutura do monômero	Nome do monômero	Nomenclatura usual	Unidade de repetição polimérica	Nomenclatura IUPAC	Sigla
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2$	Propileno	Polipropileno		Polipropileno	PP
$\text{CH}_2=\text{CHCl}$	Cloreto de vinila	Poli (cloreto de vinila)		Poli(cloro etano)	PVC
$\text{CH}_2=\text{CHCN}$	Acrilonitrila	Poliacrilonitrila		Poliacrilonitrila	PAN
	Estireno	Poliestireno		Poli (1-fenil-etileno)	PS

Com os avanços na síntese em Química Orgânica ocorridos no século XVIII e a criação do primeiro polímero sintético em 1907, uma nova gama de materiais poliméricos passa a ser utilizada em procedimentos médicos – os biomateriais. ⁽¹⁾ Esses materiais eram empregados com o objetivo de atingirem propriedades mecânicas desejadas e ao mesmo tempo, apresentarem toxicidade mínima. Biomateriais apenas começaram a ser vistos como um campo de estudo nas décadas de 1960 e 1970, quando foram realizados os primeiros simpósios sobre o tema e com a formação da *Society of Biomaterials* em 1975.

Dentre a ampla classe de biomateriais, os hidrogéis são bastante empregados como biomaterial nas áreas médicas e farmacêutica, devido principalmente a duas de suas características: quantidade de água que estas moléculas conseguem reter e a sua biocompatibilidade. ⁽⁸⁾ Destacam-se as aplicações para a liberação controlada de fármacos ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ e a engenharia de tecidos. ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾ Hidrogéis consistem em cadeias poliméricas reticuladas entre si, formando redes tridimensionais. Existe um grupo de hidrogéis, denominados de hidrogéis responsivos (ou inteligentes), que apresentam alterações em seu grau de intumescimento em decorrência de mudanças ocorridas no meio em que este está inserido. As mudanças mais estudadas costumam ser de temperatura e pH, mas também podem ocorrer em diversos outros fatores, como quanto a presença de eletrólitos, luz e campo elétrico. ⁽¹³⁾

Embora hidrogéis tenham sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos, métodos computacionais são muito pouco empregados para prever o comportamento de um hidrogel. Esse fato pode ser comprovado ao se realizar uma busca utilizando a palavra-chave “*Hydrogel*” no banco de dados *Web of Science (WOS)*. Como pode ser visto na Tabela 2, a soma de resultados para três categorias que englobem algum tipo de método computacional não representa 0,3% do total de citações para o termo “*hydrogel*”.

Tabela 2. Relação entre artigos científicos que envolvam o termo “*hydrogel*” e os que além disso, utilizem algum método computacional. (Pesquisa WOS junho/2016)

<i>Categoria</i>	<i>Número de resultados encontrados</i>
<i>Hydrogel</i>	47334
<i>Computer Science</i>	110
<i>Medical Informatics</i>	14
<i>Mathematical Computational Biology</i>	17

Métodos computacionais são uma boa alternativa, pois permitem construir e investigar os materiais em nível molecular, assim como analisar propriedades geradas por modificações na estrutura do material. Esta é uma opção que pode ser empregada tanto previamente à realização de experimentos em laboratório, quanto posteriormente aos experimentos, buscando justificar e/ou elucidar os resultados encontrados.

Além disso, é um método barato, quando comparado com os valores de reagentes e polímeros empregados para formulação de hidrogéis. Uma metodologia bastante empregada no estudo de sistemas biológicos é a Dinâmica Molecular (DM), que possibilita prever interações em nível atômico.

Com o intuito de aproximar a dinâmica molecular e o estudo de hidrogéis poliméricos, neste trabalho será investigado o hidrogel formado pelo polímero poli(vinil álcool) modificado com o tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) através de simulações computacionais de Dinâmica Molecular, com a utilização do campo de força AMBER. A metodologia de escolha tornará possível prever quais os pontos em que ocorrem as ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, ou seja, as reticulações que permitem a formação do hidrogel. E, adicionalmente, o fato do hidrogel de poli(vinil álcool) ser retratado na literatura

como um hidrogel responsivo ao pH, ^{(14) (15) (16) (17)} poder-se-á observar a influência do pH na estrutura e na capacidade de reter água.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS

Segundo o *National Institutes of Health* (NIH) podemos definir um biomaterial como “qualquer substância (que não os medicamentos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema, que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com o propósito de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”.⁽¹⁸⁾

Tratando-se de biomateriais, um importante conceito a ser abordado é o de biocompatibilidade. As primeiras utilizações de biomateriais remontam aos egípcios e romanos na antiguidade, com a utilização de suturas de linho e ouro, além do uso de madeira e ouro como dentes artificiais.⁽¹⁹⁾ Suas aplicações se intensificaram desde o início do século XX, e somente na década de 1970 artigos começaram a utilizar a palavra biocompatibilidade.⁽²⁰⁾ Uma das definições mais citadas é retirada do *Williams Dictionary of Biomaterials* e diz que biocompatibilidade é “a capacidade de um material de realizar uma resposta apropriada no hospedeiro em uma situação específica”.⁽²¹⁾ No entanto, essa definição é bastante vaga, e, portanto, tem-se buscado uma definição mais específica. Uma alternativa é dada pelo professor Buddy D. Ratner, que propôs duas definições: biocompatibilidade “a capacidade de um material localmente provocar e guiar a cicatrização de feridas, reconstrução e integração de tecidos” e biotolerabilidade “a capacidade de um material de residir em um corpo por longos períodos de tempo com apenas pequenos graus de reação inflamatória”.⁽²²⁾

A era moderna de implantes na área médica remonta ao oftalmologista Harold Ridley, que na década de 1940, enquanto tratava de pilotos de caça, observou que o polímero poli (metil metacrilato) poderia ser apropriado para o uso em lentes implantadas. Essa observação levou ao desenvolvimento das lentes intraoculares (IOLs, do inglês *intraocular lenses*) utilizadas atualmente e que revolucionaram o tratamento para a catarata. Nessa mesma época, outras evoluções ocorreram nessa área, como o implante de quadril de John Charnley e o enxerto vascular de Arthur Voorhees.⁽²³⁾ O primeiro hidrogel desenvolvido para aplicação biomédica de que se tem relato na literatura foi desenvolvido em 1960 por Wichterle e Lim. Os autores partiram do polímero 2-hidroxietil-metacrilato, e os estudos mostraram que esse material era promissor para o uso em lentes de contato, artérias, entre outros.⁽²⁴⁾

Na tabela 3 são apresentados alguns usos desses materiais em medicina. ⁽²⁵⁾ Esta área de estudo mostra-se interessante devido à grande quantidade de materiais diferentes que podem ser empregados e à interdisciplinaridade que a envolve. A área de biomateriais é na verdade, uma interface entre química, engenharia química, ciência dos materiais, ciência de superfície, mecânica, bioengenharia, biologia e medicina.

Tabela 3. Algumas aplicações de materiais sintéticos e naturais modificados em medicina. Adaptado de ⁽²⁵⁾.

Aplicação	Tipo de material
Substituição de articulações	Ti, liga Ti-Al-V, aço inoxidável, polietileno
Placa óssea para fixação de fratura	Aço inoxidável, liga Co-Cr
Cimento ósseo	Poli (metil metacrilato)
Reparo de defeito ósseo	Hidroxiapatita
Tendão e ligamentos artificiais	Teflon, dacron
Implante dentário para fixação de dente	Ti, alumina, fosfato de cálcio
Prótese de vaso sanguíneo	Dacron, teflon, poliuretano
Válvula cardíaca	Carbono, aço inoxidável, tecido reprocessado
Cateter	Borracha de silicone, teflon, poliuretano
<i>Órgãos</i>	
Coração artificial	Poliuretano
Modelo para reparação da pele	Compósitos silicone-colágeno
Rim artificial	Celulose, poliacrilonitrila
Substituição coclear	Eletrodos de platina
Lentes intraocular	Poli(metil metacrilato), hidrogel
Lentes de contato	Silicone-acrilato, hidrogel
Bandagem de córnea	Hidrogel, colágeno

2.2 HIDROGÉIS

Hidrogel, de acordo com a IUPAC, é um gel no qual o agente de intumescimento é a água, e a rede normalmente é formada por polímero. ⁽²⁶⁾ Uma das principais características desses materiais é sua capacidade de reter grandes quantidades de água sem alterações em sua

estabilidade dimensional. Esta capacidade em reter água deve-se aos grupos funcionais hidrofílicos presentes na estrutura do polímero. Enquanto que as reticulações, ou seja, pontos de fixação que interligam as cadeias poliméricas, podem ser químicas (ligações covalentes) ou físicas (ligações de hidrogênio, interações iônicas, etc), e são responsáveis pela estabilidade da estrutura, mesmo no estado intumescido, impedindo que ocorra a dissolução. ⁽²⁷⁾ Os grupos ácidos ligados as cadeias poliméricas desprotonam em pH elevado, enquanto os grupos básicos são protonados em valores baixos de pH. ⁽²⁸⁾

Eles podem se apresentar em diferentes formas físicas: forma sólida moldada (lentes de contato), matrizes de pó pressionado (comprimidos ou cápsulas para ingestão oral), micropartículas (bioadesivos ou tratamento de feridas), revestimento (implantes, cateteres, pílulas ou comprimidos), membranas ou folhas (reservatório na liberação de medicamentos por via transdérmica), líquida (que forma géis sob aquecimento ou resfriamento), entre outras. ⁽²⁹⁾. A Tabela 4 apresenta uma lista com alguns hidrogéis e suas respectivas aplicações.

Tabela 4. Polímeros utilizados para a produção de hidrogéis e suas respectivas aplicações. Adaptada de ⁽⁸⁾.

Aplicações	Polímeros
Tratamento de feridas	Poliuretano, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, polivinilpirrolidona, ágar, goma xantana, metilcelulose, carboximetilcelulose, ácido hialurônico
Liberação de medicamento, farmacêutica	Polivinilpirrolidona, amido, poli(ácido acrílico), carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, poli(vinil álcool), quitosana
Materiais dentários	Hidrocoloides, gomas
Implantes, engenharia de tecidos	Poli(vinil álcool), poli(ácido acrílico), ácido hialurônico, colágeno
Sistemas poliméricos injetáveis	Poliésteres, polifosfazenos, polipeptídeos, quitosana

Quanto à biocompatibilidade, hidrogéis e os produtos de degradação formados não devem ser tóxicos, e preferencialmente, devem ser metabolizados e/ou excretados. Hidrogéis costumam ter boa biocompatibilidade com os tecidos, visto que apresentam pouca tendência de terem proteínas ou células aderidas a sua superfície. Isso ocorre devido à pequena energia livre

interfacial, causada pela presença da água em sua superfície. Além disso, a natureza do material e sua superfície macia minimizam irritações no tecido. ⁽⁸⁾

2.2.1 Classificação dos hidrogéis

Existem diversas classificações que podem ser empregadas para hidrogéis. As classificações podem ser baseadas na origem, método de preparação, tipo de reticulação, propriedades físicas, comportamento responsivo, entre outros. Na figura 3 são apresentadas algumas destas classificações.



Figura 3. Classificação dos hidrogéis. Adaptado de ⁽³⁰⁾

Hidrogéis formados por polímeros de origem natural incluem proteínas e polissacarídeos. Esses materiais possuem diversas vantagens, como baixa toxicidade e boa

biocompatibilidade. Hidrogéis formados por polímeros sintéticos são tradicionalmente preparados utilizando métodos de síntese química. Mas, recentemente, estudos têm reportado a utilização de engenharia genética e métodos biosintéticos para a elaboração destes materiais. Petka et al ⁽³¹⁾ estudaram um hidrogel com comportamento responsivo ao pH e a temperatura, que utilizou métodos envolvendo DNA recombinante.

2.2.2 Métodos de reticulação

2.2.2.1 Hidrogéis reticulados quimicamente

São também conhecidos como hidrogéis termofixos ou permanentes e apresentam as cadeias poliméricas covalentemente ligadas. Eles atingem um ponto de equilíbrio de intumescimento, o qual depende de alguns fatores como a interação polímero-água e a densidade de reticulação. ⁽³²⁾ ⁽³³⁾ Estes hidrogéis podem ser formados com resistência mecânica controlável e maior estabilidade fisiológica, quando comparado com hidrogéis que possuem reticulação física. As reticulações químicas podem ser formadas durante ou depois da polimerização, como é visto na figura 4. A utilização de dimetacrilatos como monômeros leva a formação de reticulação, com os dois metacrilatos incorporados à cadeia principal do polímero em dois locais diferentes. Já o glutaraldeído é bastante utilizado como um reagente que promove a reticulação após a polimerização. Outra forma de diferenciar as reticulações químicas é quanto ao modo pelo qual são formadas: com o auxílio de um agente reticulante, por radiação, enxerto ou através de enzimas. ⁽³⁴⁾ Um maior tempo de degradação destes hidrogéis pode ser atingido, dependendo da natureza das ligações químicas da molécula e das reticulações. ⁽²⁹⁾

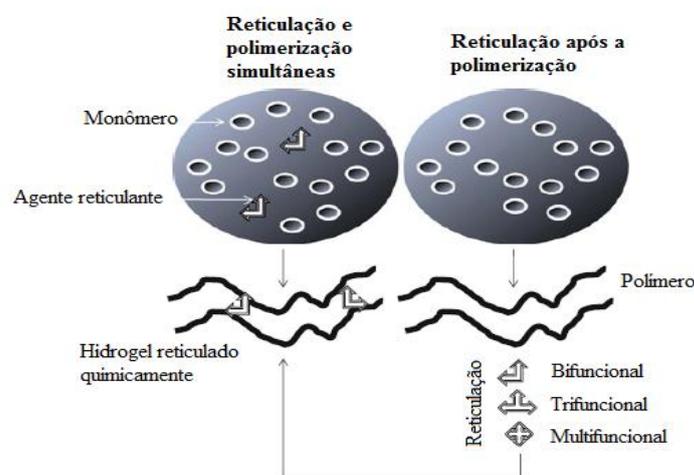


Figura 4. Métodos de preparação de hidrogéis reticulados quimicamente. Adaptado de ⁽³⁵⁾

- Reticulação através de agente reticulante: neste tipo de configuração, as cadeias poliméricas são interligadas com o auxílio de reagentes químicos, resultando na formação de uma rede tridimensional. Um dos agentes reticulantes mais utilizados é glutaraldeído, no entanto, este composto é conhecido por ser tóxico. A reticulação direta em meio aquoso é desejada, mas muitas vezes é necessária a adição destas moléculas potencialmente tóxicas para iniciar o processo. Este é o caso do cianoborohidreto de sódio, utilizado para promover a reticulação de poli(vinil álcool) e poli(etileno glicol) funcionalizados. Mas elas podem ser encontradas em pequenas quantidades no produto final. Além disso, o destino destas moléculas no corpo humano ainda não é bem conhecido. Por estes fatores, sua aplicação médica e farmacêutica ainda é limitada. ⁽³⁶⁾ No entanto, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando agentes reticulantes que apresentam toxicidade muito menor que o glutaraldeído. Este é o caso de algumas moléculas, como a genipina ⁽³⁷⁾ e o ácido cítrico. ⁽³⁸⁾

- Reticulação através de radiação: Este método é bastante utilizado, visto que não utiliza aditivos químicos, além de manter a biocompatibilidade do polímero. Esta técnica depende da produção de radicais livres no polímero, seguido da utilização de radiação de altas energias (raios gama, raios x ou feixe de elétrons). O ambiente no qual se encontra o polímero, podendo ser uma solução diluída ⁽³⁹⁾, solução concentrada ⁽⁴⁰⁾ ou estado sólido ⁽⁴¹⁾, interferem na ação da radiação (direta ou indireta). No caso de um ambiente aquoso (solução diluída) a ação será indireta, pois a maior parte da radiação é absorvida pela água. A radiólise da água é responsável por gerar os radicais livres que poderão interagir com o polímero. Para o caso do estado sólido, ocorre a formação de radicais na cadeia pela ação direta da radiação.

- Reticulação através de enxerto: este método envolve a incorporação de monômeros a um polímero já formado, como é mostrado na figura 5. O crescimento de monômeros funcionalizados no polímero leva a ramificações, e posteriormente formam-se as reticulações. A cadeia polimérica pode ser ativada através de: reagentes químicos (enxerto químico), tratamento com radiação de altas energias (enxerto de radiação), reação fotoquímica, plasmas ou enzimas. ⁽⁴²⁾ Said et al, estudaram a formação de hidrogéis de carboximetilcelulose/ácido acrílico através da irradiação com feixe de elétrons. ⁽⁴³⁾ Em outro caso, pesquisadores da Universidade de Stanford e do Instituto Max Planck, elaboraram um material para uso em implantes médicos, composto por um hidrogel enxertado em uma superfície de titânio. ⁽⁴⁴⁾

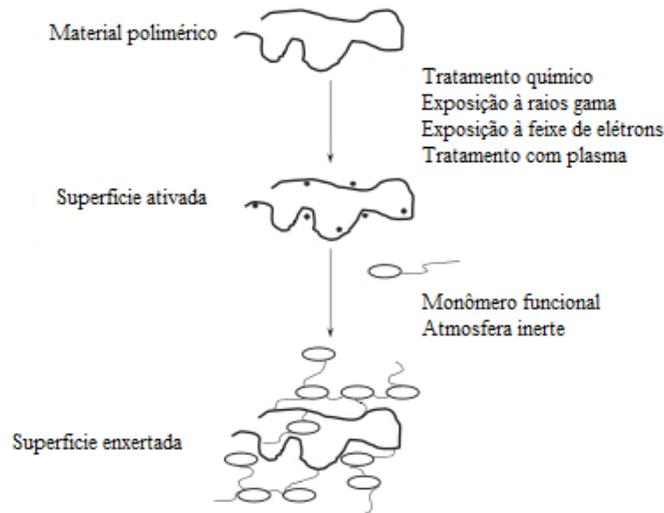


Figura 5. Enxerto de um monômero em um polímero pré-formado. ⁽⁸⁾

2.2.2.2 Hidrogéis reticulados fisicamente

São também conhecidos como hidrogéis termoplásticos ou reversíveis e as reticulações entre as cadeias poliméricas provêm de forças secundárias, como a iônica, ligação de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Essas interações são ditas reversíveis pois podem ser rompidas através de mudanças nas condições do ambiente (temperatura, pH, entre outras) ou aplicação de tensão. ^{(32) (33)} O interesse por esse tipo de hidrogel tem crescido recentemente e deve-se a não utilização de agentes reticulantes na síntese do hidrogel. Esses agentes podem comprometer a integridade das substâncias que se deseja encapsular, além de frequentemente serem compostos tóxicos que precisam ser removidos do gel antes que esse possa ser utilizado. ⁽³⁰⁾ No entanto, estes hidrogéis também apresentam desvantagens, como por exemplo, sua estabilidade *in vivo* que pode ser afetada devido a interações com funções corpóreas, tanto fisiológicas quanto mecânicas. Exemplos destas funções incluem suporte de peso, como no caso de ossos e articulações, nos quais o material pode fornecer resistência mecânica insuficiente. Outro caso leva em conta a mudança súbita de condições do ambiente, como a concentração de íons e o pH, que ocorrem em respostas inflamatórias, e podem levar ao colapso do gel. ⁽³⁴⁾ Também existem algumas limitações, pois é difícil resolver algumas variáveis, como o tempo de formação do gel, tamanho dos poros da rede e tempo de degradação. ⁽²⁹⁾ Diversos métodos de reticulação física estão disponíveis: interações iônicas, interações hidrofóbicas, interações por

ligação de hidrogênio, entre outros. Alguns métodos são apresentados na figura 6 e/ou descritos abaixo.

- Complexação polímero-polímero (complexo coacervado): esse tipo de gel pode ser formado pela mistura de um polímero catiônico com um polímero aniônico, como mostra a figura 6. Esse método baseia-se no princípio de que, por possuírem cargas opostas, os polímeros irão se manter juntos. Levando a formação de um complexo com solubilidade dependente da concentração e pH da solução.

- Ligação de hidrogênio: hidrogéis reticulados por ligações de hidrogênio podem ser obtidos diminuindo-se o pH da solução que contém um polímero com grupos carboxila.

- Aquecimento/resfriamento de uma solução polimérica: esse tipo de reticulação pode ser formada pelo resfriamento de uma solução quente, como por exemplo, gelatina e carragenina. O mecanismo de gelificação da carragenina envolve primeiramente a transformação de uma forma colapsada para uma estrutura tipo hélice. Na etapa seguinte, devido à presença de cátions, ocorre a formação de agregados, como pode ser visto na figura 6. (45)

- Interações iônicas: polímeros iônicos podem ser reticulados pela adição de contra-íons di ou trivalentes. Na figura 6 pode ser visto o exemplo dessa interação entre os grupos aniônicos do alginato e o cátion divalente Ca^{2+} .

- Congelamento/descongelamento: outra forma de obter a reticulação física de um hidrogel é através do uso de ciclos de congelamento/descongelamento. Durante os ciclos ocorre a formação de microcristais na estrutura. (8)

Uma terceira forma de reticulação consiste tanto em hidrogéis com reticulações químicas quanto físicas. Eles têm sido empregados para superar possíveis desvantagens do uso de hidrogéis com somente um tipo de reticulação. O material possui a propriedade de absorção de uma elevada quantidade de água em uma vasta faixa de pH, além de ser mais sensível a alterações do mesmo, se comparado com hidrogéis reticulados quimicamente. Em trabalhos recentes, Cong et al. (46) e Yalpani (47) estudaram redes duplas de compósitos grafeno-polímero que apresentaram propriedades mecânicas superiores e habilidade de auto cura.

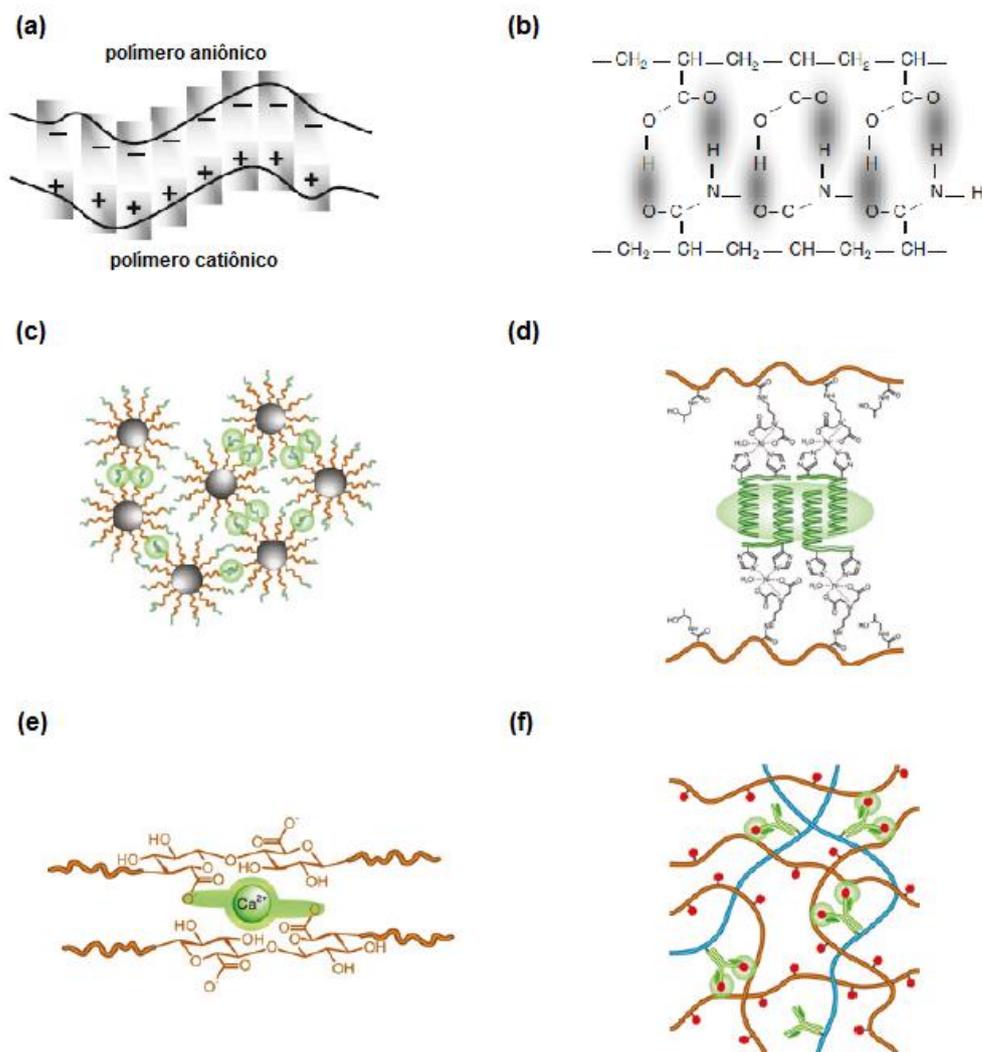


Figura 6. Métodos de formação de reticulações físicas em hidrogéis via: (a) complexação polímero-polímero, (b) ligações de hidrogênio, (c) interações hidrofóbicas, (d) interações cabeça-cauda (e) interações iônicas e (f) reconhecimento molecular específico. Adaptado de ⁽²⁹⁾ e ⁽³⁵⁾

2.2.3 Hidrogéis responsivos

Existe uma categoria de hidrogéis que apresenta um comportamento responsivo a mudanças do ambiente. Esses hidrogéis apresentam mudanças no intumescimento, estrutura da rede, permeabilidade e/ou força mecânica em virtude de pequenas mudanças ocorridas no ambiente. Tais materiais podem ser chamados de hidrogéis inteligentes, ambientalmente sensíveis ou hidrogéis responsivos. Esses hidrogéis ainda podem ser classificados quanto ao tipo de estímulo, que majoritariamente possui origem química ou física, como é mostrado na

figura 7. Os dois estímulos mais amplamente estudados são o pH (estímulo químico) e a temperatura (estímulo físico). Recentemente, os estímulos bioquímicos foram classificados em uma terceira categoria (como mostrado na figura 7), na qual ocorre o comportamento responsivo a antígenos, enzimas e outros agentes bioquímicos. Esses materiais possuem a maior parte de suas aplicações nas áreas farmacêutica, biotecnológica e médica. ⁽⁴⁸⁾

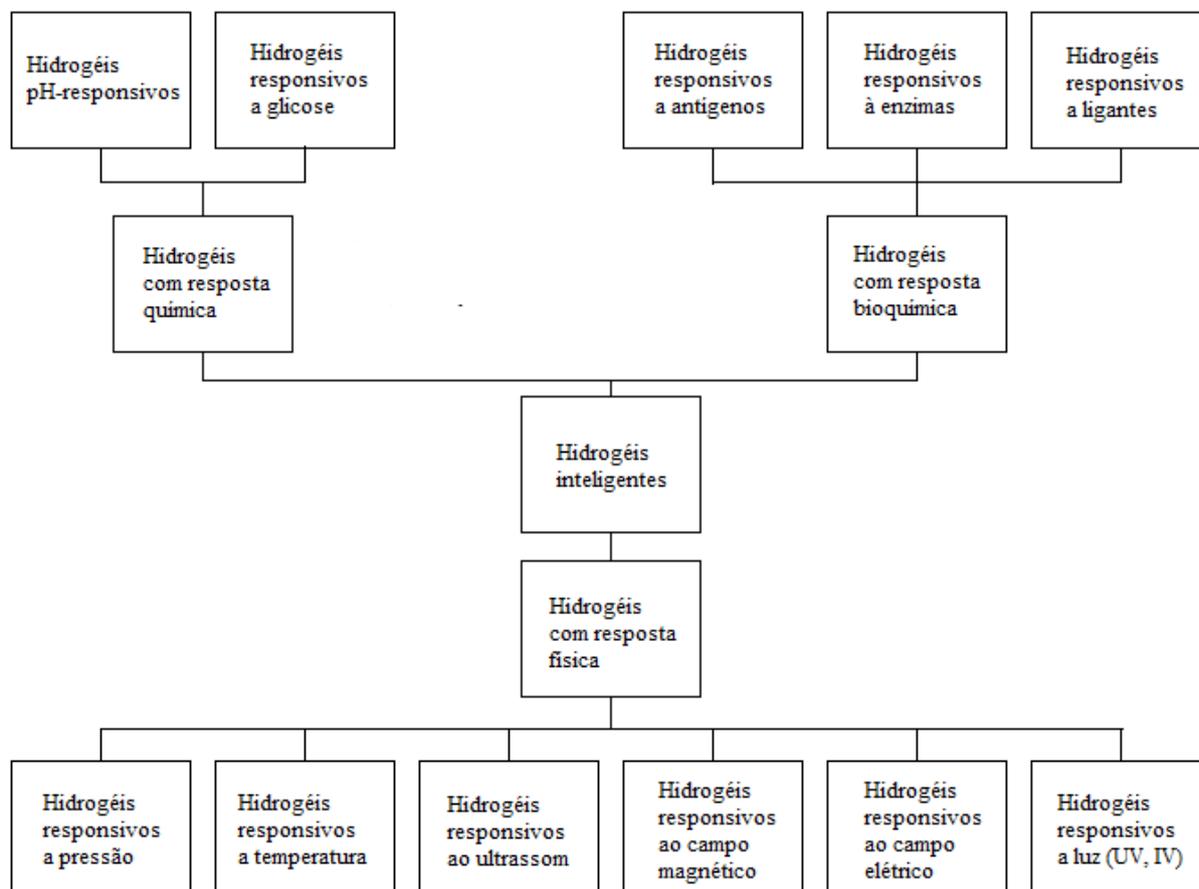


Figura 7. Classificação dos hidrogéis responsivos. Adaptado de ⁽⁴⁸⁾

Estes materiais têm sido amplamente utilizados na liberação controlada de medicamentos. Não somente por envolverem o medicamento, formando uma espécie de barreira para protegê-lo do ambiente, mas por poderem fazer a liberação de forma controlada através de mudanças na estrutura do gel em resposta a mudanças do ambiente. Kozlovskaya et al. ⁽⁴⁹⁾ relataram em 2014 a utilização de hidrogel de poli(ácido metacrílico), um hidrogel pH responsivo, para a liberação controlada de doxorrubicina (remédio utilizado no tratamento de câncer).

Embora o mais comum seja que o hidrogel apresente apenas um comportamento responsivo, tem-se desenvolvido hidrogéis formados por copolímeros, a fim de que apresentem

um comportamento responsivo duplo. Kim et al. desenvolveram em 2004 um copolímero de poli (ácido acrílico)/ácido poli(vinil sulfônico) que apresentou comportamento responsivo tanto a temperatura quanto ao pH. ⁽⁵⁰⁾

O comportamento intumescido/colapsado no gel é regido pela limitada difusão do polímero em água. Assim, o inverso da taxa de difusão é proporcional ao quadrado do tamanho da cadeia. Algumas estratégias podem ser empregadas a fim de aumentar a resposta do gel. Devido à dependência da difusão, diminuir o tamanho do gel é uma forma de atingir uma cinética rápida. Outra forma seria elaborar um gel heterogêneo, de modo que a estrutura contivesse microporos, para aumentar a superfície de contato entre polímero e solvente. ⁽²⁹⁾

Os hidrogéis também podem responder a mudanças no ambiente alterando sua forma ou tamanho. Na tabela 5 são apresentadas algumas mudanças do hidrogel em resposta ao meio no qual ele está inserido.

Tabela 5. Exemplos do comportamento responsivo de hidrogéis a mudanças de fatores ambientais. Adaptada de ⁽³⁵⁾

Hidrogéis podem responder a:		
pH	Temperatura	Composição do líquido
Se o hidrogel for iônico	Se o hidrogel puder formar interações hidrofóbicas ou agregação de cadeias	Se o ambiente no qual ele está inserido contiver não-solventes e sais
<i>Com o aumento do pH</i>	<i>Com o aumento da T</i>	<i>Com mudanças no meio de intumescimento</i>
<i>Intumescimento aumenta em hidrogéis aniônicos que contenham grupos carboxila</i>	<i>Solubilidade diminui para derivados de celulose, como polímero que contenham grupos metil ou hidroxipropil</i>	<i>Intumescimento diminui bruscamente para hidrogéis iônicos, com o aumento da concentração de não-solvente e sais</i>
<i>Intumescimento diminui em hidrogéis catiônicos que contenham grupos amino</i>	<i>Solubilidade aumenta em hidrocolóides, como gelatina e ágar-ágar</i>	<i>Intumescimento diminui moderadamente para hidrogéis não-iônicos com o aumento da concentração de não-solvente e sais (e sua valência)</i>

2.2.3.1 Hidrogéis pH-responsivos

Os hidrogéis pH-responsivos possuem grupos iônicos nas ramificações de sua cadeia carbônica, os quais, podem receber ou doar prótons (H^+) como resposta a mudanças de pH do meio. ⁽⁵¹⁾ Com a mudança do pH, o grau de ionização destes hidrogéis é bastante afetado em um pH específico, conhecido como pK_a ou pK_b . Essa rápida mudança na carga de rede das ramificações ionizadas provoca transição repentina do volume, devido à criação de força de repulsão eletrostática entre os grupos ionizados. Hidrogéis pH-responsivos podem ser divididos em dois grupos: hidrogéis aniônicos e catiônicos.

Os primeiros possuem grupos como ácidos carboxílicos ⁽⁵²⁾ ou sulfônicos ⁽⁵³⁾ enquanto o segundo apresenta grupos amino ⁽⁵⁴⁾ nas ramificações. No caso dos aniônicos, a desprotonação ocorre quando o pH do meio está acima do pK_a , causando um número maior de cargas fixas e aumento da repulsão eletrostática entre as cadeias. Com isso, tem-se aumento da hidrofilicidade e, conseqüentemente, aumento no intumescimento do hidrogel. Para os hidrogéis catiônicos a ionização ocorre quando o valor é menor que o pK_b . Então, em um meio com pH baixo, ocorre o aumento da ionização, resultando em um aumento do intumescimento, devido ao aumento da repulsão eletrostática. ⁽⁵⁵⁾

Dois grandes fatores controlam o grau de intumescimento deste tipo de hidrogel. O primeiro refere-se às propriedades do polímero (carga iônica, pK_a e pK_b dos grupos ionizáveis, densidade de reticulação, entre outros) e o segundo refere-se às propriedades do meio de intumescimento (pH, força iônica, contra-íon e sua valência). ⁽⁴⁸⁾ Na figura 8 é possível visualizar o comportamento responsivo ao pH. Este tipo de hidrogel responsivo tem sido bastante usado no desenvolvimento de formulações de liberação controlada para administração oral, devido ao pH mais ácido (< 3) encontrado no estômago, quando comparado com o pH neutro do intestino por exeplo. ⁽²⁹⁾

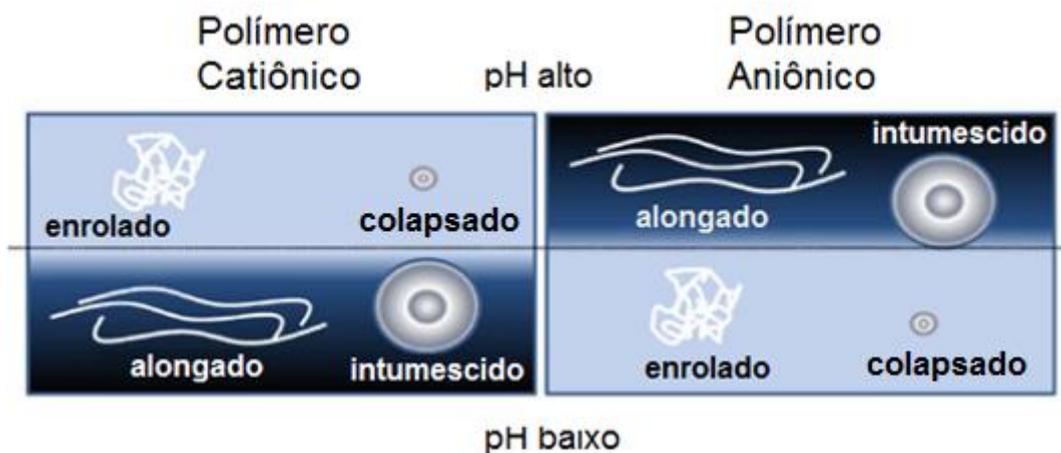


Figura 8. Comportamento pH-responsivo de hidrogéis e solubilidade de hidrosol aniônico e catiônico. Adaptado de ⁽³⁵⁾

2.2.3.2 Hidrogéis termorresponsivos

Como variações de temperatura podem ocorrer naturalmente e o estímulo à temperatura pode ser facilmente controlado, esse tipo de hidrogel tem atraído bastante a atenção de pesquisadores e é um dos mais estudados. ^{(56) (57) (58) (59)}

Esse grupo também pode ser dividido em duas categorias: sistemas termo sensitivos positivos e negativos. Um hidrogel positivo possui uma temperatura de solução crítica superior (UCST, do inglês *upper critical solution temperature*), abaixo da qual ocorre a contração do hidrogel. Os hidrogéis negativos possuem uma temperatura de solução crítica inferior (LCST, do inglês *lower critical solution temperature*), e caso o sistema seja aquecido acima desta temperatura, ocorre a contração do hidrogel. ⁽⁵⁵⁾ Esse comportamento é resultado de um balanço entre ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Abaixo da LCST as ligações de hidrogênio prevalecem, e, portanto, o polímero é solúvel. Enquanto que acima da LCST as interações hidrofóbicas prevalecem e o polímero é insolúvel na água. Como pode ser visto na figura 9, esses hidrogéis também podem ser chamados de termorresponsivos inversos. Estes hidrogéis têm sido empregados pela indústria farmacêutica na elaboração de medicamentos injetáveis, pois fazem a transição sol-gel quando em contato com o corpo humano (dependendo da temperatura de transição sol-gel da molécula). ⁽³⁵⁾

No estado intumescido, as moléculas de água formam ligações de hidrogênio com os grupos polares do polímero no interior do hidrogel e se organizam ao redor dos grupos hidrofóbicos. Na temperatura de solução crítica, a ligação de hidrogênio resultante da interação água-polímero se torna desfavorecida em relação às interações polímero-polímero e água-água. Isto leva a liberação da água para fora do hidrogel e resulta no encolhimento da estrutura. ⁽²⁹⁾

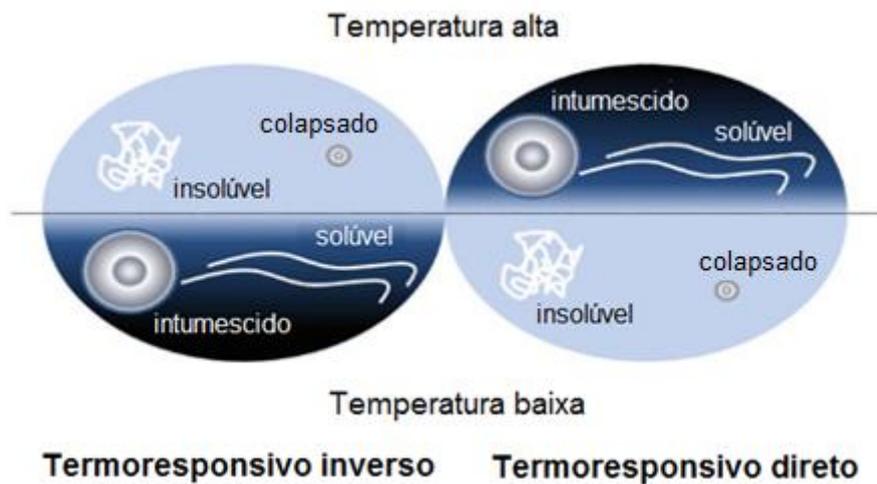


Figura 9. Comportamento termorresponsivo de hidrogéis e solubilidade do hidrossol. Adaptado de ⁽³⁵⁾

2.2.4 Água em hidrogéis

A dissolução de um polímero ocorre em duas etapas: na primeira, as moléculas do solvente difundem através da matriz polimérica, formando um estado intumescido (denominado gel). Na segunda etapa ocorre a dispersão das moléculas em uma solução. A solução é formada quando a interação polímero-solvente é favorecida em relação às interações polímero-polímero e solvente-solvente. Se o polímero utilizado for hidrofílico e o solvente for água, o produto da interação entre estas duas espécies será chamado de hidrossol. Esta interação depende de diversos fatores: estrutura do polímero, presença de íons, grupos funcionais, temperatura, pH, entre outros. A dissolução pode ser impedida pela adição de reticulações ao polímero - um hidrossol reticulado é chamado de hidrogel. ⁽³⁵⁾

A capacidade de intumescimento de um hidrogel pode ser determinada pelo espaço interno da rede polimérica, disponível e capaz de conter água. Uma das bases que determina o

intumescimento são as forças de interação polímero-água. Quanto mais hidrofílica a estrutura do polímero, mais fortes se tornam estas interações, devido aos grupos funcionais hidrofílicos presentes. No caso do hidrogel possuir grupos iônicos, ocorre a osmose, devido a diferença de concentração de íons no interior do gel e na solução. A carga iônica da estrutura gera a repulsão entre as cadeias poliméricas em solução aquosa e resulta em significativa expansão de espaço para absorver água. As três forças tratadas acima (interações polímero-água, elástica e osmose) resultam em expansão da rede do hidrogel. ⁽⁶⁰⁾

A primeira parte das cadeias poliméricas a ser hidratada são os grupos hidrofílicos polares e estes configuram a primeira camada de solvatação. Com isso, a rede começa a intumescer, e acaba por expor os grupos hidrofóbicos, também capazes de interagir com as moléculas de água, levando a formação da segunda camada de solvatação. A combinação destas duas camadas pode ser chamada de camada total de água (ou camada total de solvatação). A rede acaba absorvendo uma quantidade adicional de água, devido a uma força motora osmótica das cadeias, no sentido da diluição infinita. No entanto, esta diluição infinita é evitada por forças de retração elásticas da rede, que se originam das reticulações. O balanço entre a força de retração e a força de diluição infinita estabelece um equilíbrio de intumescimento (figura 10). Essa quantidade adicional de água pode ser chamada de “água livre” ou “água bulk”, e assume-se que ela preencha os espaços entre as cadeias e/ou macroporos.

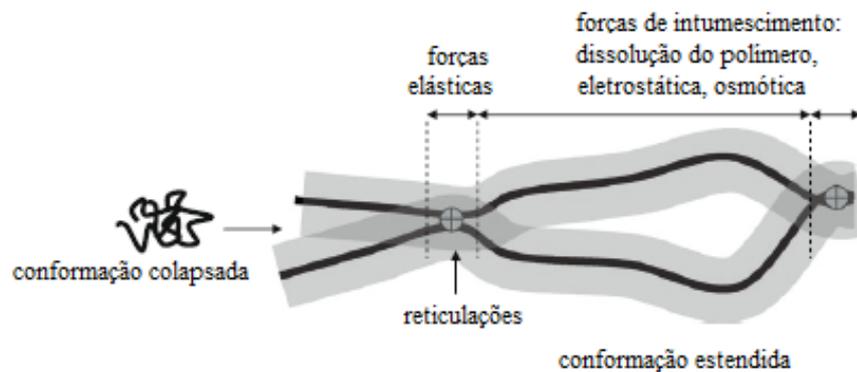


Figura 10. Forças de intumescimento em hidrogéis. Adaptado de ⁽⁶⁰⁾

Caso as reticulações ou as cadeias poliméricas sejam degradáveis (ligações instáveis), o passo seguinte é a desintegração e/ou dissolução. Esse processo depende da natureza e da composição do hidrogel. ⁽⁸⁾ Um hidrogel biodegradável é útil caso a aplicação desejada seja para engenharia de tecidos, cicatrização de feridas ou liberação de medicamentos.

2.2.5 Caracterização dos hidrogéis

Diferentes técnicas podem ser empregadas na caracterização de hidrogéis. Eles normalmente são caracterizados por sua capacidade de absorver líquidos (intumescimento termodinâmico), a razão com que o líquido é absorvido pela estrutura (intumescimento cinético), e suas propriedades mecânicas no estado hidratado (resistência mecânica do estado hidratado). Na tabela 6 são mostrados fatores que afetam as propriedades dos hidrogéis. ⁽³⁵⁾

Tabela 6. Mudanças nas propriedades do hidrogel devido à estrutura do hidrogel e composição do líquido. Adaptado de ⁽³⁵⁾

Capacidade de intumescimento ↑	Razão de intumescimento ↑	Resistência mecânica do estado hidratado ↑
Estrutura do hidrogel: polímeros bastante hidrofílicos, polímeros iônicos contendo íons monovalentes, baixa densidade de reticulação, reticuladores hidrofílicos	Estrutura do hidrogel: mais hidrofílico, maior densidade de reticulação, maior porosidade, poros interconectados.	Estrutura do hidrogel: menor porosidade, mais hidrofobicidade, alta densidade de reticulação
Composição do líquido: mais solvente, menos sais, baixa força iônica, menor número de cátions di e trivalentes.	Composição do líquido: mais solvente, presença de melhoradores de permeação para hidrogéis mais hidrofóbicos.	Composição do líquido: mais não-solvente, mais sais.

Os mais importantes parâmetros que definem a estrutura e propriedades de intumescimento do hidrogel são a fração volumétrica de polímero no estado intumescido ($V_{2,s}$), a massa molecular de cadeias poliméricas entre reticulações (\overline{M}_C) e a correlação entre duas reticulações adjacentes (ξ). A fração volumétrica de polímero no estado intumescido mostra a quantidade de líquido que pode ser absorvida nos hidrogéis e é descrita como uma razão do volume do polímero (V_P) e o volume do gel intumescido (V_g), como mostrado na equação 1. ⁽⁶¹⁾

$$V_{2,S} = \frac{V_P}{V_g} \quad (\text{eq. 1})$$

A massa molecular de cadeias poliméricas entre reticulações representa o grau de reticulação da rede do hidrogel. A \overline{M}_c pode ser calculada segundo a equação de Flory-Rehner (equação 2) para um hidrogel neutro e na ausência de solvente.

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{\overline{M}_n} - \frac{\left(\frac{\bar{v}}{V_1}\right)[\ln(1-v_{2,S})+v_{2,S}+\chi_{12}v_{2,S}^2]}{v_{2,S}^{1/3} - \frac{v_{2,S}}{2}} \quad (\text{eq. 2})$$

Onde, \overline{M}_n é a média de massa moléculas das cadeias poliméricas lineares, \bar{v} é o volume específico do polímero, V_1 é o volume molar de água, χ_{12} é o parâmetro de interação polímero-água. Peppas et al ⁽⁶²⁾ modificaram a equação de Flory-Rehner para hidrogéis preparados na presença de água, e chegaram a equação 3.

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\frac{\bar{v}}{V_1}[\ln(1-v_{2,S})+v_{2,S}+\chi_{12}v_{2,S}^2]}{v_{2,r} \left[\left(\frac{v_{2,S}}{v_{2,r}}\right)^{\frac{1}{3}} - \frac{v_{2,S}}{2v_{2,r}} \right]} \quad (\text{eq. 3})$$

Onde, $v_{2,r}$ é a fração volumétrica do polímero no estado relaxado (estado do polímero logo após a reticulação, mas antes do intumescimento).

Por último, temos correlação entre duas reticulações adjacentes (ξ) ou dimensão na malha, e que pode ser descrita segundo a equação 4. Esse parâmetro permite a medida do espaço disponível entre as cadeias poliméricas.

$$\xi = v_{2,S}^{-\frac{1}{3}} (\overline{r_o^2})^{1/2} = Q^{1/3} (\overline{r_o^2})^{1/2} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde, $(\overline{r_o^2})^{1/2}$ é a raiz quadrática média da distância de ponta a ponta das cadeias da rede entre duas reticulações adjacentes em um estado não-perturbado. Ela pode ser determinada segundo a relação apresentada na equação 5.

$$(\overline{r_o^2})^{1/2} = l(C_n N)^{1/2} = l \left(C_n \frac{2M_c}{M_r} \right)^{1/2} \quad (\text{eq. 5})$$

Onde, C_n é a razão característica de Flory, l é o comprimento de ligação ao longo da cadeia principal do polímero, N é o número de ligações entre reticulações adjacentes e M_r é a

massa molecular das unidades de repetição que compõem o polímero.⁽⁶¹⁾ A dimensão de malha é afetada por diversos fatores, como grau de reticulação, estrutura química dos monômeros presentes e estímulos externos.

As cadeias poliméricas de um hidrogel interagem com as moléculas de solvente e tendem a expandir até um estado totalmente solvatado, enquanto a estrutura de reticulações aplica uma força retrativa para puxar as cadeias. O equilíbrio é atingido quando estas forças de expansão e retração se equivalem.^{(29) (63)}

Inúmeras técnicas podem ser empregadas na investigação das propriedades de superfície dos hidrogéis. Microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*) e microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) são utilizadas para analisar a topografia da superfície, e, no caso da primeira técnica, ainda pode ser empregada na investigação de propriedades mecânicas em nível molecular, pela compressão com a ponteira do aparelho.

Existem ainda métodos que podem ser utilizados para estimar as quantidades relativas de água livre (ou bulk) e das camadas de solvatação, enquanto frações do total de água presente do hidrogel. Os mais utilizados para esta finalidade são: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance*). Análise termogravimétrica e difração de raios X são utilizadas para a confirmação da formação de reticulações na estrutura.⁽²⁹⁾ Uma importante técnica de caracterização utilizada para reticulação por radiação é a análise sol-gel, que permite estimar parâmetros como rendimento de reticulação e degradação, entre outras. E, permite correlacionar os parâmetros com algumas propriedades físico-químicas.⁽⁸⁾

As propriedades mecânicas dependem da composição e estrutura dos hidrogéis. Os géis formados por polímeros são considerados estruturas fracas, pois são macios e frágeis, além de não suportarem grandes deformações. Isto se deve ao fato dos géis não serem formados por redes poliméricas totalmente conectadas e possuem heterogeneidades. O desempenho mecânico dos hidrogéis pode ser medido através de seu módulo de elasticidade. No caso destes materiais, a avaliação é feita por cisalhamento ou compressão, e não por alongamento, devido a sua pouca deformabilidade. As propriedades mecânicas nos hidrogéis são afetadas pela composição, densidade de reticulação, condições de polimerização e grau de intumescimento. Além disso, a resistência mecânica dos hidrogéis frequentemente provem totalmente das reticulações.⁽²⁹⁾

Novos materiais estão sendo desenvolvidos, buscando justamente melhorar estas propriedades. Em 2003, Gong et al. ⁽⁶⁴⁾ utilizaram combinações diferentes de polímeros para criar redes duplas (DN, do inglês *double network*) de géis. As DN apresentaram valores melhores para as propriedades mecânicas medidas, como por exemplo, a tensão suportada pela DN ter sido 20 vezes maior que de seus componentes sozinhos. Esses materiais abrem novas possibilidades de utilização para os hidrogéis, como substitutos de cartilagem articular, tendões, ligamentos e outros. ^{(65) (66)}

2.2.6 Hidrogéis de poli (vinil álcool)

O polímero poli(vinil álcool), também conhecido pela sigla PVA, é um composto poli-hidroxi, solúvel em água e não-iônico. É um material bastante estudado e utilizado como hidrogel com finalidade médica ^{(67) (68) (69)} e farmacêutica, ^{(70) (9)} devido a sua biocompatibilidade, não-toxicidade e suas propriedades de gelificação. ⁽⁷¹⁾ Em trabalho publicado em 2002, Wan et al desenvolveram um *stent* para válvula cardíaca com PVA, que apresenta melhores propriedades mecânicas e possui maior vida útil do que o *stent* usado na mesma época. ⁽⁷²⁾

O hidrogel pode ser formado através de métodos de reticulação química ou física, sendo que os reticulados fisicamente apresentam a vantagem de ser biodegradáveis, e, portanto, apresentam diversas aplicações biomédicas. Esse polímero pertence ao grupo dos hidrogéis pH-responsivos e a estrutura de seu monômero pode ser visualizada na Figura 11.

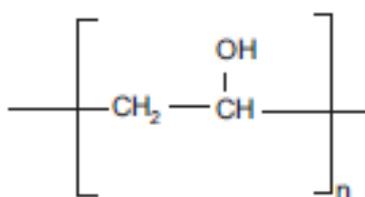


Figura 11. Estrutura do monômero de poli(vinil álcool). ⁽⁶²⁾

Estudando sistemas de liberação controlada de medicamentos, em 2010 Hua et al. utilizaram Ca^{2+} como agente reticulante e ciclos de congelamento/descongelamento para preparar hidrogéis de alginato de sódio/poli(vinil álcool) (SA/PVA). Os pesquisadores visavam aumentar a eficiência de encapsulamento de fármacos e melhorar o intumescimento do sistema. Os resultados foram comparados com um sistema que continha somente o alginato de sódio

reticulado com Ca^{2+} , e foi observada melhora das propriedades desejadas.⁽⁷¹⁾ Em outro caso de 2009, Tripathi et al. desenvolveram um revestimento antimicrobiano de quitosana e PVA reticulados com glutaraldeído, para ser utilizado em embalagens de alimentos. Após análises de XRD (difração de raios X), SEM, DSC e TGA, o filme produzido mostrou-se eficaz contra três tipos de bactérias encontradas nesse meio e parece ser promissor para esse tipo de aplicação.⁽⁷³⁾

No entanto, o PVA puro não apresenta propriedades tão atrativas, visto que tanto seu intumescimento quanto a capacidade responsiva são baixos.^{(71) (14)} Por isso, a fim de obter melhores resultados e ampliar as possibilidades de utilização deste material, muitas vezes ele é funcionalizado e/ou colocado junto a outro polímero. Khan et al utilizaram hidrogéis de quitosana de baixa viscosidade (LVCS) e PVA reticulados por glutaraldeído. O comportamento de intumescimento foi investigado através de mudanças no valor do pH, composição polimérica e grau de reticulação. Foi observado que o intumescimento aumenta com o aumento do conteúdo de PVA na estrutura em soluções com valores maiores de pH. Já com o aumento de LVCS, o aumento de intumescimento ocorre em valores de pH ácido. Esse comportamento é motivado pelos grupos funcionais das duas espécies. Também foi observado que o intumescimento diminui com o aumento de reticulações. Estes resultados foram importantes para avaliar-se a influência dessas propriedades na liberação de medicamentos.⁽⁹⁾

Uma das modificações empregada em diversos estudos, é a adição de peptídeos aos grupos hidroxila do PVA.⁽¹⁴⁾ Quando a propriedade desejada é a adesão celular, a menor sequência peptídica que pode ser utilizada para esta finalidade é arginina-glicina-ácido aspártico (RGD).⁽⁷⁴⁾ Schmedlen et al. em 2002 investigaram hidrogéis de PVA fotoreticulados e modificados com o tetrapeptídeo RGDS (arginina-glicina-ácido aspártico-serina). Além disso, foram “semeados” fibroblastos no interior do hidrogel, e estes mantiveram sua viabilidade durante duas semanas de cultura. Observou-se que o hidrogel modificado auxiliou na adesão e espalhamento dos fibroblastos, e, portanto, mostrou-se promissor para aplicações em engenharia de tecidos.⁽⁷⁵⁾ Kawaze et al. imobilizaram o tripeptídeo GHK (glicil-histidil-lisina) na superfície de um gel contendo PVA. Hepatócitos isolados de ratos foram então inoculados no GHK imobilizado, e colocados em cultura, na qual observou-se a agregação destes hepatócitos. Enquanto o agregado ficou firmemente aderido à superfície do gel por todo o tempo da cultura, praticamente não foi constatada adesão ao GHK não imobilizado.⁽⁷⁶⁾

Em um trabalho de 2014, Wang et al. utilizaram três diferentes derivados de aminoácidos (glicina, alanina e valina) ligados a algum dos grupos hidroxil do PVA. Foi observado que esses derivados de PVA apresentavam comportamento termorresponsivo, e que a temperatura de transição de fase poderia ser modulada pela variação do grau de substituição ou do derivado de aminoácido. Essa estrutura mostrou-se uma boa opção para dispersão de nanopartículas de ouro.⁽⁷⁷⁾

Embora sejam poucos, é possível encontrar alguns trabalhos que realizem estudos de simulação por dinâmica molecular com PVA. Chiessi et al. em 2007 estudaram um hidrogel de PVA reticulado quimicamente, com alto grau de hidratação e simulado em uma temperatura de 323K. A análise da trajetória possibilitou observar aspectos como as ligações de hidrogênio e a difusão de água na rede. Os resultados da simulação foram validados por comparação com resultados experimentais de espalhamento de nêutrons do mesmo sistema.⁽⁷⁸⁾ Em outro estudo, Sun et al. em 2014 simularam um hidrogel quimicamente reticulado de PVA modificado com um peptídeo. Na simulação esse composto interagiu com o medicamento trastuzumab (utilizado no tratamento do câncer de mama). O sistema foi simulado em dois valores de pH (neutro e ácido), e o complexo proteína-hidrogel apresentou rápida resposta à mudança do pH. Segundo os autores, os resultados obtidos com o estudo trazem uma nova perspectiva para a elaboração de novos hidrogéis com propriedades desejadas.⁽¹⁴⁾

2.3 INTERAÇÃO BIOMATERIAL E MEIO AMBIENTE

2.3.1 Matriz extracelular

O espaço entre as células é preenchido por um material extracelular que forma uma espécie de rede de macromoléculas, constituído por proteínas e polissacarídeos, produzidos e secretados pelas células. Essa rede de macromoléculas é chamada de matriz extracelular (MEC) e pode ser visualizada na figura 12. Na MEC são encontrados diferentes tipos de macromoléculas: colágeno e elastina (responsáveis pela estrutura e elasticidade de vários tecidos), fibronectina e laminina (responsáveis pela adesão matriz-célula) e cadeias de polissacarídeos que formam uma espécie de gel hidratado, resistente à compressão e que permite a difusão de nutrientes e hormônios. A MEC constitui a interface entre a célula e um biomaterial. Mas a matriz não é um meio inerte, e desempenha funções como suporte,

resistência, tensão e organização estrutural para os tecidos. Além disso, ela é fundamental para a adesão das células com componentes da MEC e comunicação celular. ^{(79) (80) (81)}

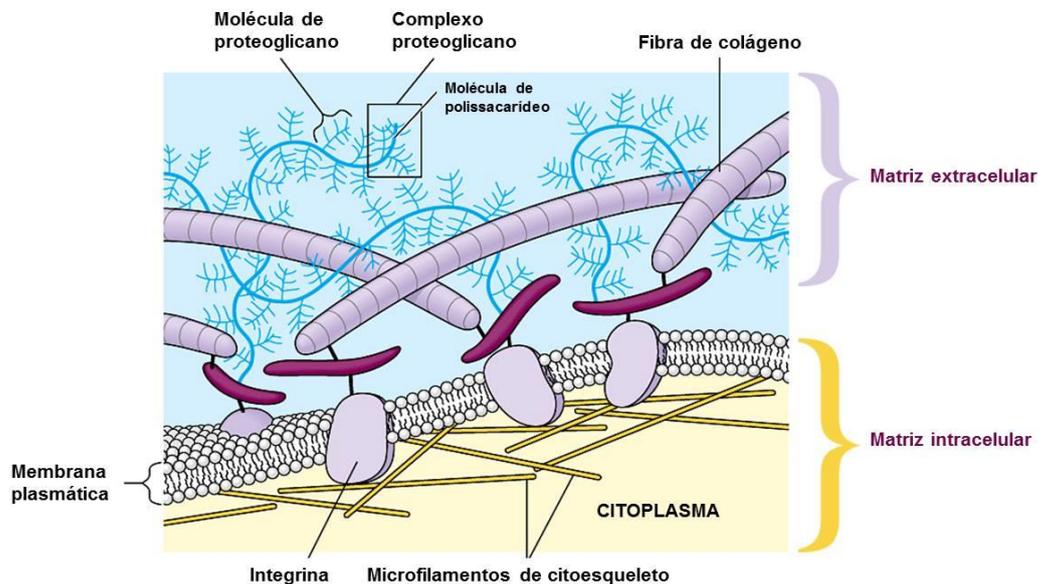


Figura 12. Componentes da matriz extracelular. Adaptado de ⁽⁸²⁾

Embora polímeros normalmente sejam estudados para utilização como biomateriais, em 2015 Nafea et al. propuseram a incorporação de heparina e gelatina em uma rede de PVA para simular um modelo simplificado de matriz extracelular. A estrutura mostrou-se estável e manteve as características do polímero. A incorporação de moléculas biológicas permitiu suplementar o hidrogel de PVA com novas funcionalidades, importantes na proliferação celular. A estrutura mostrou-se promissora para diversas aplicações biomédicas, incluindo implantes de células artificiais. ⁽⁸³⁾

2.3.2 Aminoácidos

Existem 20 aminoácidos que são comumente encontrados em proteínas e todos eles são ditos α -aminoácidos. São assim chamados pois possuem os 4 grupos ligados ao carbono central (carbono α). Em comum todos apresentam um grupo carboxila (-COOH), um grupo amino (-NH₂) e um átomo de hidrogênio. Como pode ser visto na figura 13, o que os difere são suas cadeias laterais (grupos R) que possuem tamanho, estrutura e carga elétrica diferentes. ^{(84) (85)}

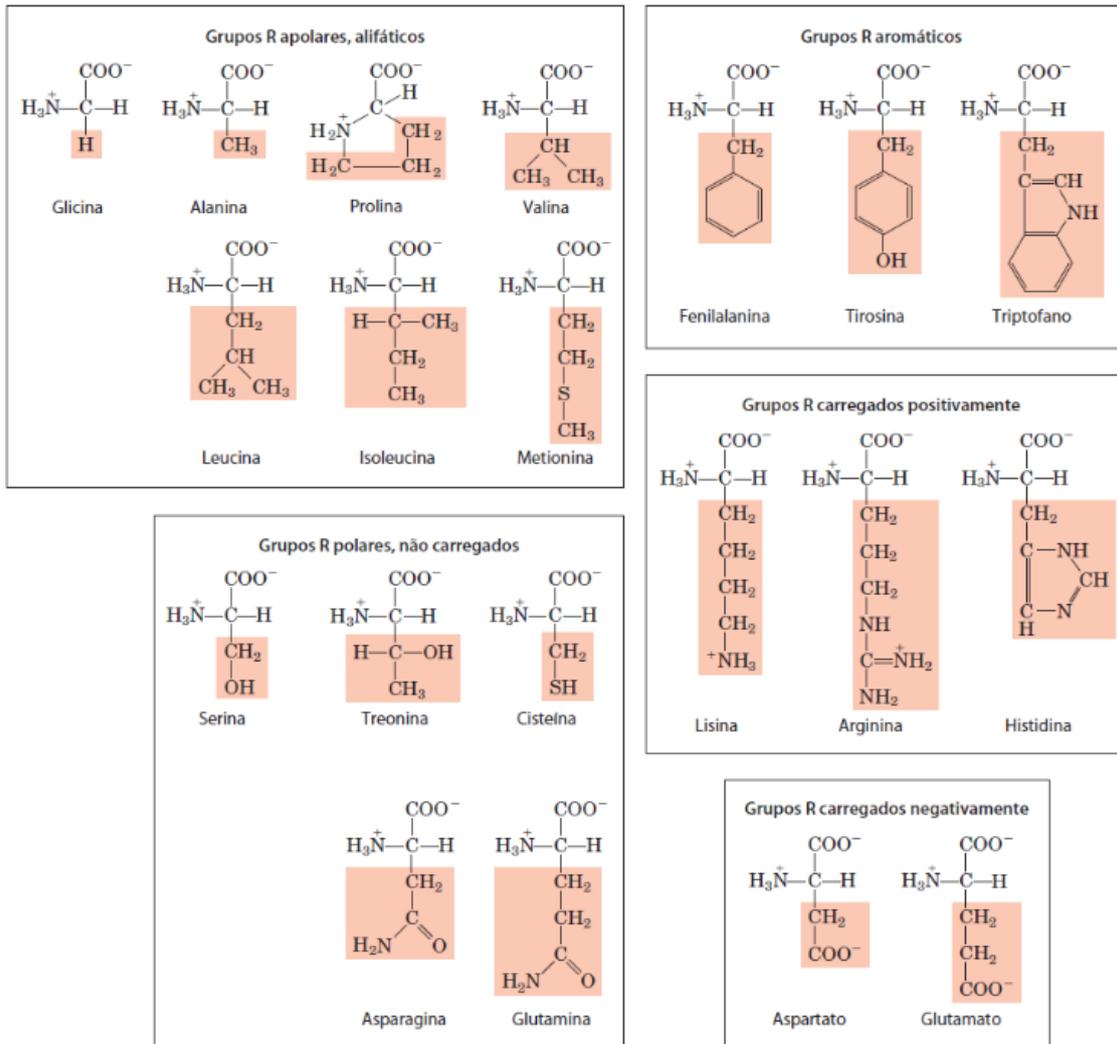


Figura 13. Os 20 aminoácidos. As estruturas correspondem a forma predominante em pH neutro. A porção não sombreada das moléculas corresponde à estrutura comum a todos os aminoácidos, enquanto a parte sombreada representa o grupo R de cada molécula. ⁽⁸⁶⁾

Para cada um destes aminoácidos foram atribuídas três nomenclaturas diferentes (que podem ser vistas na tabela 7). A primeira trata do nome comum dado a cada aminoácido e, que, em alguns casos deriva da fonte de que eles foram primeiramente isolados. A segunda e terceira nomenclaturas são abreviações que buscaram facilitar a composição de sequências peptídicas e proteínas.

Tabela 7. Nomenclaturas e propriedades de aminoácidos. Adaptado de ⁽⁸⁶⁾

Valores de <i>p</i> k						
Aminoácido	Abreviação	Símbolo	<i>p</i> k ₁ (—COOH)	<i>p</i> k ₂ (—NH ₃ ⁺)	<i>p</i> k _R (grupo R)	<i>p</i> I
Glicina	Gly	G	2,34	9,60		5,97
Alanina	Ala	A	2,34	9,69		6,01
Prolina	Pro	P	1,99	10,96		6,48
Valina	Val	V	2,32	9,62		5,97
Leucina	Leu	L	2,36	9,60		5,98
Isoleucina	Ile	I	2,36	9,68		6,02
Metionina	Met	M	2,28	9,21		5,74
Fenilalanina	Phe	F	1,83	9,13		5,48
Tirosina	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07	5,66
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39		5,89
Serina	Ser	S	2,21	9,15		5,68
Treonina	Thr	T	2,11	9,62		5,87
Cisteína	Cys	C	1,96	10,28	8,18	5,07
Asparagina	Asn	N	2,02	8,80		5,41
Glutamina	Gln	Q	2,17	9,13		5,65
Lisina	Lys	K	2,18	8,95	10,53	9,74
Histidina	His	H	1,82	9,17	6,00	7,59
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48	10,76
Aspartato	Asp	D	1,88	9,60	3,65	2,77
Glutamato	Glu	E	2,19	9,67	4,25	3,22

Uma ligação covalente pode ocorrer entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amino de outro aminoácido. Como resultado tem-se também a perda de uma molécula de água. Na figura 14 é mostrada a formação desta ligação, que é chamada de ligação peptídica. Quando a estrutura formada é composta por menos de 100 aminoácidos ela é chamada de peptídeo. E quando o número de aminoácidos é igual ou superior a 100, tem-se uma proteína.⁽⁸⁷⁾ Depois de incorporados a um peptídeo, cada aminoácido é chamado de resíduo de aminoácido.⁽⁸⁸⁾

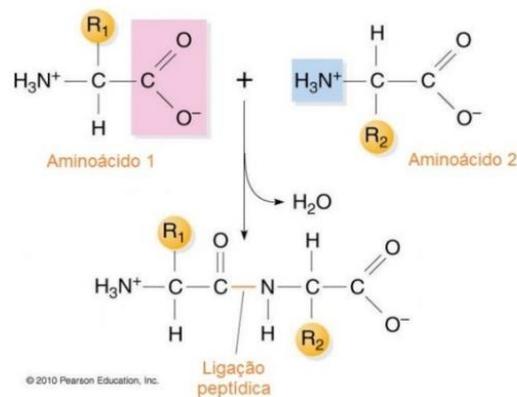


Figura 14. Formação de uma ligação peptídica. Adaptado de ⁽⁸⁹⁾

Os aminoácidos podem ser divididos em dois grupos: polares e apolares. Esta classificação se baseia na cadeia lateral que apresentam, e pode ser vista na figura 13. Os apolares são hidrofóbicos e possuem uma cadeia lateral que é insolúvel em água. Esses aminoácidos possuem apenas dois valores de pK_a , referentes a ionização dos grupos carboxila e amino. Em pH neutro a carga do aminoácido é zero, pois, os dois grupos estão ionizados (COO^- e NH_3^+). Os aminoácidos polares são hidrofílicos e possuem uma cadeia lateral solúvel em água. Podem ser separados em três grupos com base na natureza de sua carga:

- Não-carregados (neutros): possuem carga total zero em pH neutro e os grupos funcionais podem formar ligações de hidrogênio com outras moléculas polares.
- Carregados negativamente (ácidos): possuem a cadeia lateral ionizável, e assim, apresentam carga negativa em pH neutro.
- Carregados positivamente (básicos): possuem cadeia lateral ionizável, e em pH neutro, arginina e lisina irão possuir uma carga positiva, enquanto a histidina é uma base fraca e irá possuir carga neutra para este pH.⁽⁸⁷⁾

Quando se fala da carga dos aminoácidos é importante incluir o conceito de ponto isoelétrico (pI). O pI refere-se ao valor de pH no qual a carga líquida do aminoácido é zero. Em

pH neutro os aminoácidos são ditos zwitteriônicos por possuírem tanto um grupo com carga positiva quanto um grupo com carga negativa.⁽⁹⁰⁾ O pI é obtido através do cálculo da média dos dois valores de pK_a mais próximos entre si, como mostrado na equação 6.⁽⁸⁸⁾

$$pI = \frac{1}{2} (pk_i + pk_j) \quad (\text{eq. 6})$$

Onde pI é o ponto isoelétrico que se deseja calcular e i e j pode ser referente a pk_1 (-COOH), pk_2 (-NH₃⁺) ou pk_R (grupo R).

2.3.3 Sequência peptídica RGD

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas envolvendo a funcionalização de polímeros com moléculas de origem biológica, como proteínas e peptídeos. Pierschbacher e Ruoslahti⁽⁹¹⁾ em 1984 isolaram a sequência RGDS (arginina-glicina-ácido aspártico-serina) da fibronectina e sugeriram que esta sequência seria importante no reconhecimento celular. Fazendo buscas em outras proteínas, os pesquisadores encontraram esta sequência em outras cinco proteínas. Ao fazer alterações no tetrapeptídeo, perceberam que modificar o resíduo serina por cisteína, que é quimicamente similar, não resultava em perda substancial da atividade. No entanto, concluíram que o tripeptídeo RGD (figura 15) era a sequência mínima necessária para garantir a adesão celular. Pesquisadores da Universidade de Alcalá, na Espanha, mostraram que o peptídeo RGDS contribuiu na regulação da síntese da TGF-β1 em células mesangiais humanas (HCM, do inglês *human mesangial cells*).⁽⁹²⁾ A TGF-β1 é uma proteína que desempenha diversas funções, entre elas controla a proliferação e diferenciação de diversos tipos de célula.⁽⁹³⁾

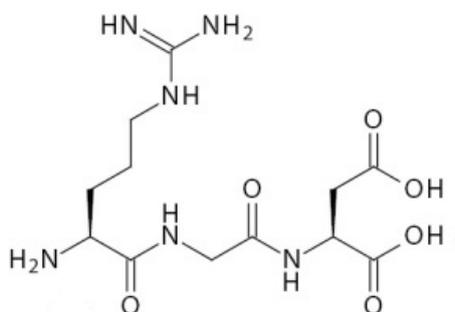


Figura 15. Estrutura do tripeptídeo RGD. Adaptado de⁽⁹⁴⁾

Esta sequência é interessante pois, como visto na figura 13, apresenta aminoácidos de três grupos diferentes: grupo R apolar (G), grupo R carregado positivamente (R) e grupo R carregado negativamente (D).

Aminoácidos possuem uma curva de titulação ácido-base característica, a qual envolve a adição e remoção de prótons. Os gráficos possuem dois ou três estágios distintos, dependendo da quantidade de desprotonações que possam ocorrer. Na figura 16 são mostradas as curvas de titulação para os três aminoácidos do RGD e suas respectivas estruturas em função do pH. O valor pequeno de pK_a do grupo $-COOH$ da glicina mostra que este grupo é bastante ácido (100 vezes mais ácido que o do ácido acético). Isto é resultado da repulsão entre o próton a ser doado e o grupo amino (que está positivamente carregado). Na espécie zwitteriônica, as cargas opostas conferem um efeito estabilizador para a molécula. De forma semelhante, o pK_a do grupo amino na glicina é menor que o valor médio do grupo amino em outras moléculas. Esse comportamento é parcialmente devido aos átomos de oxigênio do grupo carboxil que são eletronegativos, e tendem a puxar elétrons em sua direção, aumentando a tendência do grupo amino de doar o próton. Assim, o pK_a de qualquer grupo funcional é afetado pelo ambiente químico em que está inserido. ⁽⁸⁶⁾

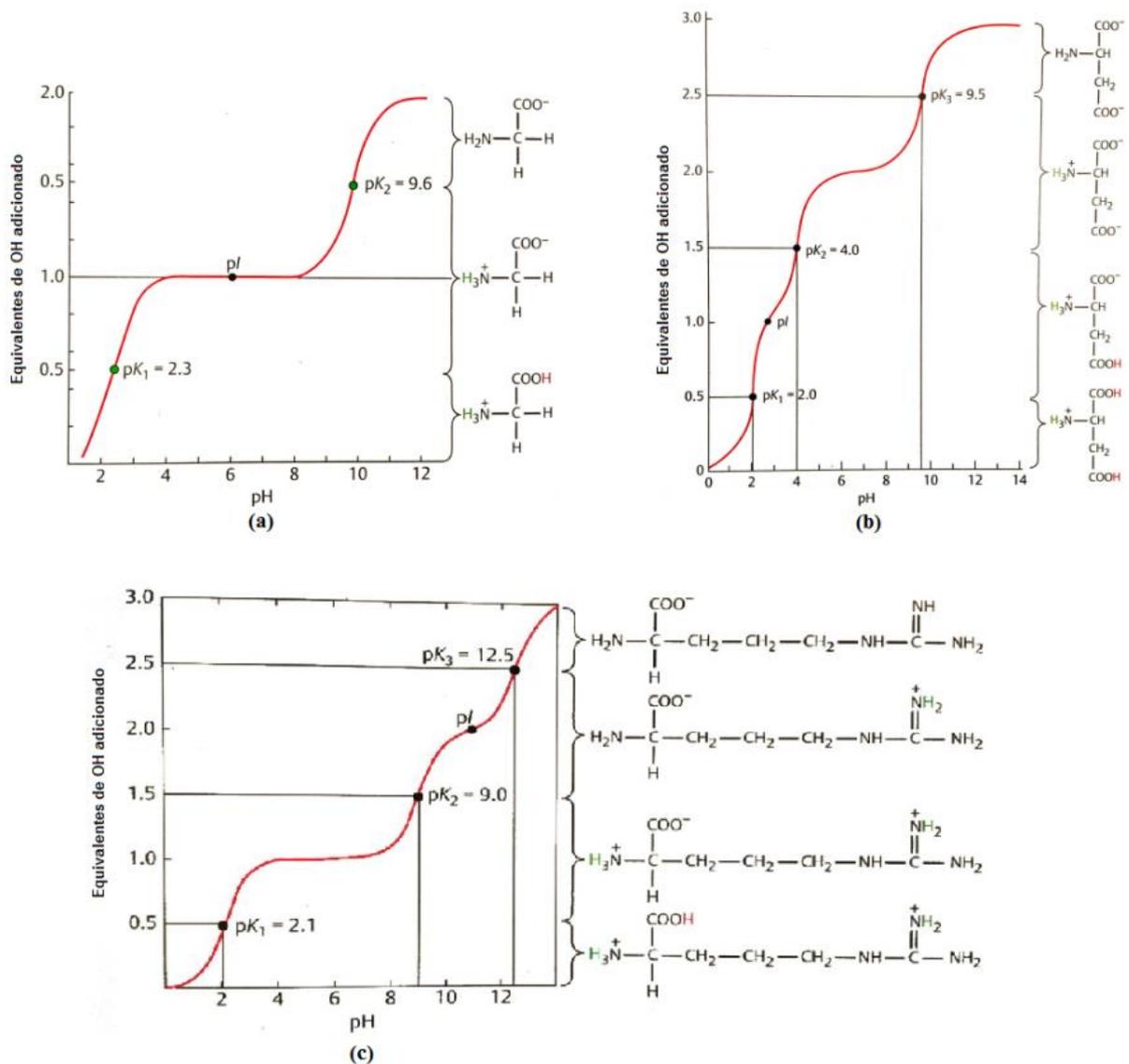


Figura 16. Curvas de titulação dos aminoácidos (a) glicina, (b) ácido aspártico e (c) arginina. (87)

2.4 DINÂMICA MOLECULAR

A Dinâmica Molecular (MD) é uma técnica computacional utilizada para determinar o movimento de partículas de um sistema, do qual se conhece o potencial de interação das partículas e as equações que descrevem seu movimento. Portanto, é possível estudar a configuração do sistema ao longo do tempo, e com isso, determinar algumas de suas propriedades. Tendo as posições e velocidades das partículas num tempo t_0 , pode-se obter as forças resultantes de cada partícula, e determinar as posições e velocidades em um instante posterior (t_0+dt), através das equações de movimento Newtonianas. Esse processo é seguido

inúmeras vezes, gerando trajetórias para todo o sistema. O número de partículas que estão sendo simuladas depende de diversos fatores, como a natureza do sistema, as propriedades que serão estudadas e a capacidade computacional disponível. O tempo de simulação depende dos processos que estão sendo investigados e da convergência estatística das propriedades de interesse. Na figura 17 são apresentadas as etapas utilizadas em uma simulação de DM. ⁽⁹⁵⁾

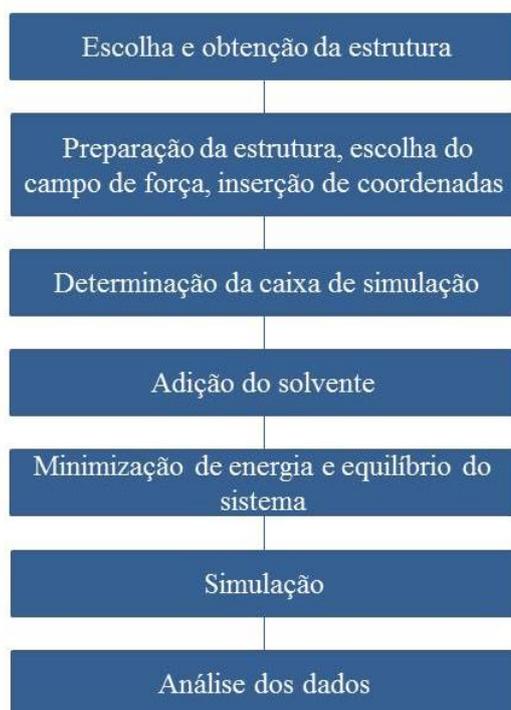


Figura 17. Etapas envolvidas em uma simulação de Dinâmica Molecular.

Existem duas características importantes neste método, a primeira diz respeito à relação formada entre os resultados obtidos através de MD e dados experimentais. Resultados experimentais podem motivar e/ou direcionar estudos computacionais. E resultados obtidos pela MD podem contribuir com explicações para dados obtidos experimentalmente. A segunda característica refere-se a grande quantidade de sistemas que podem ser estudados por este método, podendo ser sistemas homogêneos e mais simples, passando por moléculas de origem biológica, até sistemas biológicos mais complexos. ⁽⁹⁶⁾

Walter et al. em 2010 estudaram hidrogéis de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAM) em água através de estudos experimentais e de dinâmica molecular. O trabalho tinha como objetivo verificar as mudanças conformacionais do polímero em função da temperatura. Os estudos de DM foram realizados utilizando diferentes campos de força e modelos para a água,

e posteriormente, comparados com resultados obtidos experimentalmente. Com isso, foi possível verificar o modelo teórico de melhor acordo com os resultados experimentais. ⁽⁹⁷⁾

2.4.1 Condições de contorno

Inicialmente são consideradas a forma do sistema e as condições de contorno que serão aplicadas. Interações de longo alcance, como as de origem eletrostática, são dependentes destas condições. O sistema simulado irá interagir ao longo de suas fronteiras, e esse ambiente deve responder as mudanças sofridas pelo sistema. A condição que normalmente é adotada, e também a mais simples, chama-se condição de contorno periódica. Nela, o sistema é copiado nas três dimensões, adotando uma forma de rede periódica, constituída de células unitárias.

Esta célula unitária pode apresentar-se de maneiras distintas, sendo as mais comuns a triclinica, monoclinica e cúbica. Na primeira, têm-se três vetores (a, b e c) com ângulos distintos α , β e γ (sendo α o ângulo entre b e c, e assim por diante) entre os vetores. Se apenas um dos ângulos for diferente de 90° esta célula é chamada de monoclinica. Se os três ângulos forem iguais a 90° tem-se uma célula retangular, e se, além disso, o comprimento dos três vetores for o mesmo, a célula é dita cúbica. Uma célula unitária ideal possui volume mínimo sob a condição de que há uma determinada distância mínima entre qualquer átomo de uma proteína e alguma de suas imagens vizinhas. Essa condição assegura que a interação entre elas é pequena, enquanto o volume mínimo diminui o tempo computacional gasto com a simulação. ⁽⁹⁸⁾

2.4.2 Campo de Força

O campo de força é o conjunto de parâmetros necessários para descrever as interações intra e intermoleculares do sistema de estudo. Para descrever estas interações, assume-se que o potencial entre duas moléculas pode ser descrito como uma soma das interações entre cada par de átomos ou sítios de interação, e que estas dependem unicamente da distância entre eles. Para os movimentos internos das moléculas, acrescenta-se ao potencial as interações intramoleculares, relacionadas à deformação da geometria molecular. ⁽⁹⁶⁾

Atualmente estão disponíveis diversos campos de força, cada um com suas peculiaridades. Eles divergem quanto aos diferentes caminhos de desenvolvimento, princípios em que são baseados, dados, aplicações e resultados. Idealmente, a descrição do campo de força

deveria consistir de termos capazes de se adequar a diferentes moléculas, ambientes e condições. No entanto, a não aditividade dos termos e omissão de importantes contribuições, impossibilita esta transferência. Muitas vezes os parâmetros são ajustados com base em dados experimentais, e algum erro ou omissão em algum dos termos é compensado por alterações em outros. Assim, alterar as condições para os quais o campo de força foi ajustado pode levar a resultados incorretos. ⁽⁹⁸⁾

2.4.2.1 Campo de Força AMBER

O campo de força AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) é um dos campos de força mais utilizados para sistemas biológicos, sendo inicialmente construído para proteínas, enzimas, DNA e RNA. O potencial, ou seja, o conjunto de equações que regem o movimento dos átomos neste campo, é dado pela equação 7. ⁽⁹⁹⁾

$$U^{AMBER} = U_{ligado}^{AMBER} + U_{não-ligado}^{AMBER} \quad (\text{eq. 7})$$

Cujos termos são:

$$U_{ligado}^{AMBER} = \sum_{ligações} K_r (r_{ij} - r_0)^2 + \sum_{ângulos} K_\theta (\theta_{ij\bar{k}} - \theta_0)^2 + \sum_{diedrais} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ij\bar{k}l} - \gamma)]$$

$$U_{não-ligado}^{AMBER} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \left[\alpha_{LJ} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \left[\alpha_{el} \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \right]$$

$$A_{ij} = 4\epsilon_{ij}\sigma_{ij}^{12} \quad B_{ij} = 4\epsilon_{ij}4\sigma_{ij}^6$$

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_{ii} \cdot \epsilon_{jj}} \quad \sigma_{ij} = \frac{\sigma_{ii} + \sigma_{jj}}{2}$$

Na equação 7 temos o potencial dividido em duas partes: ligado e não-ligado. Os potenciais ligados são formados por: estiramento de ligação entre dois átomos (primeiro termo da segunda equação), ângulo de torção (segundo termo da segunda equação) e diedrais próprios e impróprios (terceiro termo da segunda equação). Os potenciais não-ligados tratam: das interações eletrostáticas (potencial coulômbico, segundo termo da terceira equação) e potencial de van der Waals (modelo de Lennard-Jones, primeiro termo da terceira equação). Não são consideradas interações não-ligadas para pares de átomos que estejam separados por menos do que três ligações químicas. ⁽⁹⁹⁾

O estiramento de ligação se assemelha ao sistema massa-mola, e pode ser calculado com base na constante de força (K_r), distância entre i e j (r_{ij}) e a distância de mínima energia (r_0). O ângulo de torção representa a deformação do ângulo formado por três átomos e pode ser calculado utilizando a constante de força (K_θ), o ângulo entre os três átomos (θ_{ijk}) e o ângulo de mínima energia (θ_0). Quanto aos diedrais, os próprios correspondem a rotação em torno de uma ligação e os impróprios correspondem a alteração do ângulo entre dois planos formados por um átomo central ligado a outros três átomos. V_n e n determinam a periodicidade do potencial (número de mínimos/máximos) no intervalo $[0, 2\pi]$, no qual n é um número inteiro e V_n é a barreira superior.

O potencial de van der Waals considera a repulsão entre átomos separados por pequenas distâncias ou grandes distâncias, mas com fraca atração entre si, sendo consideradas interações de baixo alcance. Os termos A_{ij} e B_{ij} (do primeiro termo da terceira equação) são os coeficientes que determinam a profundidade e localização de mínima energia. Nos quais ϵ representa a profundidade do poço de potencial e σ é a distância finita na qual o potencial é zero. O potencial eletrostático descreve a interação entre pares de cargas parciais, e são consideradas interações de longo alcance. Na equação, q_i e q_j representam as cargas parciais dos átomos i e j , $4\pi\epsilon_0$ é a constante eletrostática e r_{ij} é a distância entre os átomos i e j .⁽¹⁰⁰⁾

O ajuste de cargas no campo de força AMBER ocorre em três etapas. Primeiro é necessário fazer a otimização da geometria da molécula. Em seguida são realizados cálculos quânticos utilizando HF/6-31G* como base para gerar o potencial eletrostático e, em seguida, é feita a determinação das cargas parciais que correspondem ao potencial eletrostático gerado. Após os cálculos quânticos, é utilizado um método conhecido como RESP⁽¹⁰¹⁾ (*Restrained Electrostatic Potential*) para realizar o ajuste das cargas atômicas.⁽¹⁰²⁾

2.4.3 Gromacs

Gromacs (*GROningen Machine for Chemical Simulations*) é um pacote para realizar simulações de dinâmica molecular de sistemas de centenas a milhões de partículas. É um dos pacotes de software mais rápidos e populares, além de ser gratuito. Inicialmente foi projetado para simulação de moléculas biológicas, como proteínas e lipídios. Mas devido à grande velocidade nos cálculos, passou a ser utilizada também para sistemas não-biológicos, como polímeros.⁽¹⁰³⁾

2.4.4 Análises da Dinâmica Molecular

O Gromacs inclui ferramentas que permitem realizar inúmeras análises sobre o sistema que está sendo simulado. Abaixo são apresentadas algumas dessas análises.

2.4.4.1 Função de distribuição radial

A função de distribuição radial (RDF, do inglês *radial distribution function*) é uma análise utilizada quando se deseja verificar a distância entre dois átomos. A RDF é uma medida da probabilidade de se encontrar um átomo B a uma distância r de um átomo A. Na figura 18 é apresentado um modelo do gráfico gerado por esta análise. ⁽¹⁰⁴⁾

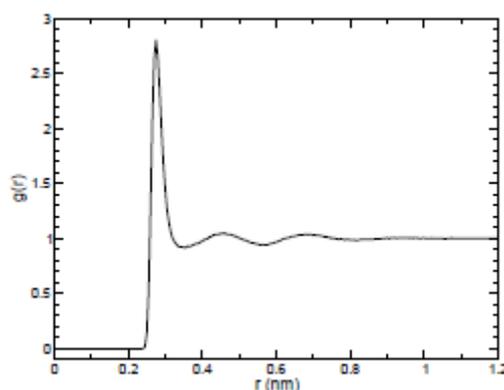


Figura 18. RDF para oxigênio-oxigênio no modelo SPC de água. ⁽¹⁰⁴⁾

2.4.4.2 Raio de giro

A análise do raio de giro (R_g , do inglês *radius of gyration*) é uma forma de medir a compacidade de uma estrutura. O programa calcula o R_g segundo a equação 8:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{eq. 8})$$

na qual m_i é a massa do átomo i e r_i é a posição do átomo i em relação ao centro de massa da molécula. Esta análise se torna bastante útil ao se trabalhar com polímeros em solução e proteínas. ⁽¹⁰⁴⁾ Na figura 19 é mostrado um exemplo de gráfico gerado por esta análise.

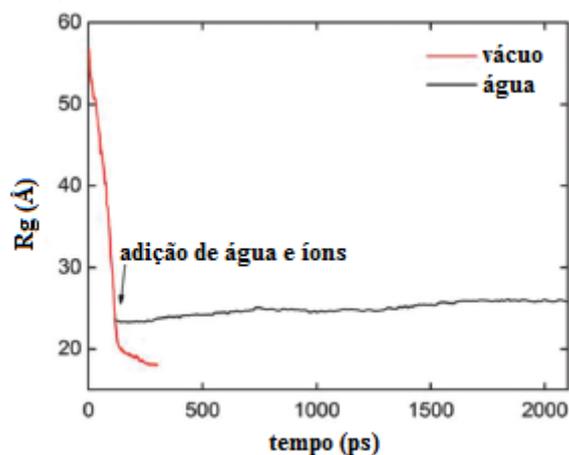


Figura 19. Raio de giro do PVA. Adaptado de ⁽¹⁴⁾

2.4.4.3 Desvio quadrático médio

A análise de desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *root mean square deviation*) de determinado átomo em uma molécula, com relação a uma estrutura de referência, pode ser calculado através do programa `g_rms`. Para isso, utilizam-se mínimos quadrados, ajustando a estrutura a estrutura de referência, e subsequentemente calculando o RMSD, como na equação 9.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{eq. 9})$$

onde $M = \sum_{i=1}^N m_i$, $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t e m_i é a massa do átomo i .

Através do programa `g_rmsdist` é possível calcular o RMSD utilizando um método que não necessita do ajuste (mostrado na equação 10).

$$RMSD(t) = \left[\frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \|r_{ij}(t) - r_{ij}(0)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{eq. 10})$$

onde a distância r_{ij} entre átomos no tempo t é comparada com a distância entre os mesmos átomos no tempo 0. ⁽¹⁰⁴⁾ Na figura 20 é mostrado um exemplo de gráfico gerado por esse tipo de análise.

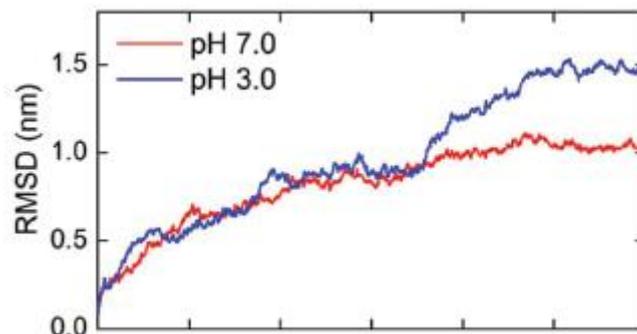


Figura 20. RMSD do PVA em diferentes valores de pH. ⁽¹⁴⁾

2.4.4.4 Ligação de hidrogênio

Nas análises de RDF já é possível avaliar a formação de uma ligação de hidrogênio. No entanto, existe um programa (g_hbond) que analisa as ligações de hidrogênio entre todos os possíveis doadores (D) e aceptores (A). Para determinar se existe tal ligação, são usados os critérios:

- raio de corte (X-aceptor), sendo X=doador ou H: $r \leq r_{HB} = 0,35 \text{ nm}$
- distância de corte (hidrogênio-doador-aceptor): $\alpha \leq \alpha_{HB} = 30^\circ$

O valor de 0,35 nm para r_{HB} corresponde ao primeiro mínimo da RDF mostrada na figura 18.

2.5 GAUSSIAN

É um programa ⁽¹⁰⁵⁾ criado por John Pople e seu grupo de pesquisa da Carnegie Mellon University na década de 1970 e utilizado na química computacional. O programa possibilita avaliar algumas propriedades de átomos, moléculas e sistemas reativos: determinar geometria molecular mais estável e energia, prever espectros de IR, Raman, RMN e outros, otimizar estados de transição, entre outras. ⁽¹⁰⁶⁾ Uma das ferramentas do Gaussian é o GaussView, interface gráfica do programa, que permite a construção de moléculas e sistemas reativos, e posterior análise dos resultados.

O Gaussian aproxima a forma e energia dos orbitais de uma determinada geometria molecular utilizando um modelo constituído de duas partes: um método e um conjunto de bases. Diversos métodos estão disponíveis para utilização no Gaussian: ab initio, teoria do funcional de densidade (DFT), semi-empírico e híbrido. Os métodos diferem principalmente em como, ou se, a correlação eletrônica é tratada.⁽¹⁰⁶⁾ Cada método, utiliza um nível de teoria (conjunto de aproximações que descrevem o sistema), e alguns exemplos podem ser vistos abaixo.⁽¹⁰⁷⁾
(108)

Tabela 8. Exemplos de níveis de teoria e métodos utilizados no Gaussian.

Método	Nível de teoria
Semi-empírico	AM1, PM3, MNDO
DFT	B3LYP, MPW1PW91, LDA
Ab initio	HF, MP2, CCSD
Híbrido	G2, G3

Os conjuntos de bases correspondem a conjuntos de funções utilizadas para descrever funções de onda, e alguns exemplos são: 3-21G, 6-31G, 6-31G*, 6-31G**, cc-pVDZ, entre outros.⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁷⁾ A utilização de níveis de teoria mais elevados e de conjuntos de bases maiores costumam levar a resultados mais precisos, no entanto, exigem um maior custo computacional.
(106)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir topologias e campos de força adequados para o polímero PVA através de cálculos quânticos, e analisar o comportamento responsivo do polímero frente a variações de temperatura e pH.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a sequência RGD de aminoácidos através das simulações de DM.
- Analisar as mudanças dos sistemas PVA e RGD em decorrência das mudanças no meio, por meio de análises de raio de giro, RMSD e distribuição de função radial.
- Observar a formação do hidrogel de PVA através de ligações de hidrogênio formadas entre as cadeias poliméricas.
- Analisar o comportamento do PVA funcionalizado com RGD.

4. METODOLOGIA

4.1 CONSTRUÇÃO DAS MOLÉCULAS E AJUSTE DAS CARGAS

4.1.1 PVA

Para as simulações de Dinâmica Molecular foi necessária a construção de várias cadeias, contendo diferentes números de monômeros e grupos adicionados ao polímero. Inicialmente foram construídas as estruturas do monômero, trímero e tetrâmero do álcool (como mostrado na figura 21) na interface gráfica GaussView. O passo seguinte foi a realização da otimização geométrica utilizando B3LYP/6-311**, seguida do cálculo do potencial eletrostático com RHF 6-31G (d) com o programa Gaussian.⁽¹⁰⁵⁾ Por fim, foi realizado o ajuste das cargas utilizando o método RESP (restrained electrostatic potential).⁽¹⁰¹⁾ Esse procedimento e parâmetros foram mantidos para os demais sistemas que foram construídos e são descritos abaixo. Foram estudadas as três estruturas para se ter um melhor entendimento das cargas nos segmentos internos que contém o grupo hidroxila.

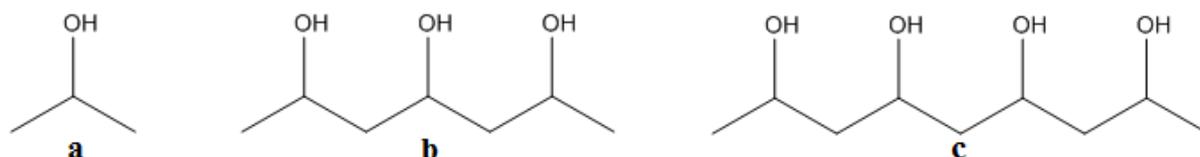


Figura 21. Estrutura do (a) isopropanol, (b) trímero e (c) tetrâmero construídas no Gaussview.

Para facilitar a construção posterior do polímero, com várias unidades de repetição, o trímero foi separado em três partes (figura 22): extremidade esquerda (L), monômero central (C) e extremidade direita (R). A numeração que aparece em vermelho na figura 22 corresponde ao número de cada átomo na molécula (dado pelo programa). Após esse passo, foi realizada nova otimização para cada uma das três partes e pequenos ajustes em algumas das cargas para que fosse possível tornar a carga total de cada bloco igual a zero (tabela 9).

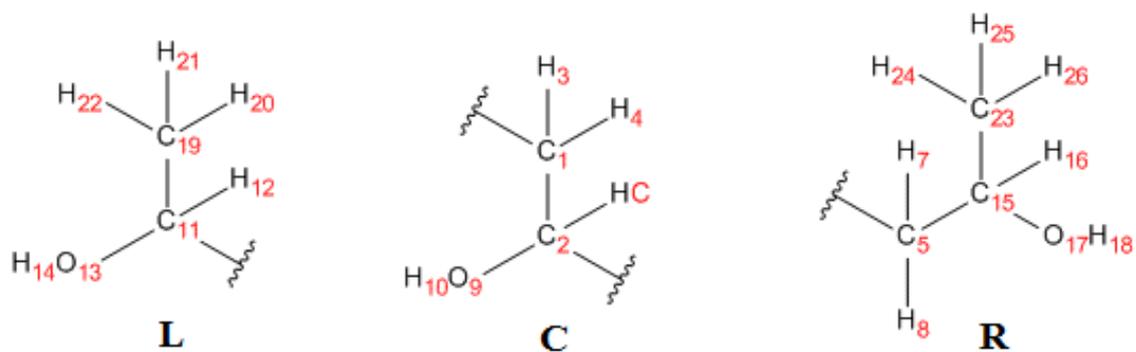


Figura 22. Separação do trímero nos blocos L, C e R.

Tabela 9. Cargas dos átomos por bloco.

Bloco L		Bloco C		Bloco R	
Nome do átomo	Carga	Nome do átomo	Carga	Nome do átomo	Carga
C ₁₉	-0,500	C ₁	-0,337	C ₅	-0,526
H ₂₀	0,096	H ₃	0,084	H ₇	0,136
H ₂₁	0,096	H ₄	0,084	H ₈	0,136
H ₂₂	0,096	C ₂	0,475	C ₁₅	0,568
C ₁₁	0,568	H ₆	-0,022	H ₁₆	0,030
H ₁₂	-0,060	O ₉	-0,734	O ₁₇	-0,750
O ₁₃	-0,722	H ₁₀	0,450	H ₁₈	0,448
H ₁₄	0,426			C ₂₃	-0,501
				H ₂₄	0,153
				H ₂₅	0,153
				H ₂₆	0,153

4.1.2 Tripeptídeo RGD

No caso do peptídeo, a estrutura não precisou ser construída, nem suas cargas estudadas, pois foi possível obtê-la no banco de dados Protein Data Bank (PDB).⁽¹⁰⁹⁾ A estrutura escolhida possui o nome 1FUV e foi modificada para conter somente o segmento tripeptídico RGD (figura 23).

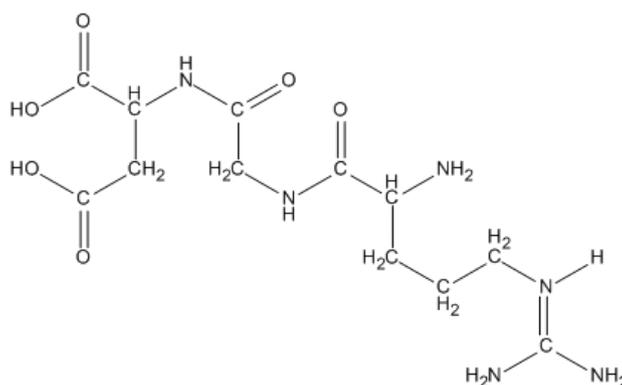


Figura 23. Estrutura do tripeptídeo RGD.

4.1.3 PVA-amina

Após os primeiros cálculos com o polímero e o peptídeo, foi preciso criar um segmento capaz de ligar estas duas partes. Com isso, uma nova estrutura foi construída no GaussView, denominada PVA-amina (figura 24). Nesta estrutura, é utilizado o tetrâmero do PVA, pois este permite a formação do anel com dois grupos hidroxila centrais e adjacentes. A estrutura mostrada na figura 24 possui a mesma configuração apresentada por Rasia⁽¹¹⁰⁾ para promover a modificação do polímero.

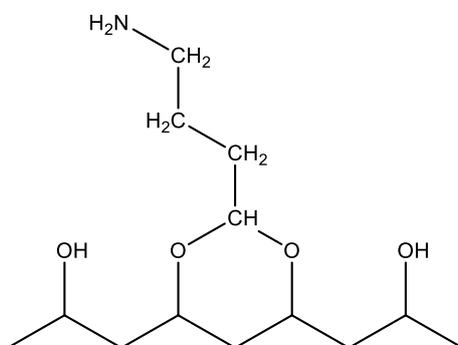


Figura 24. Estrutura da forma PVA-amina.

4.1.4 PVA-amina-ace

Foi acrescentado um grupo acetil (ACE) a estrutura anterior, através do programa GaussView. As cargas para este grupo foram baseadas nas cargas apresentadas por Cornell et al.⁽¹¹¹⁾ A inserção do grupo acetil foi estudada como forma de avaliar futuras mudanças em função da modificação do polímero pela presença do RGD.

4.1.5 Anel

Foram geradas duas estruturas para o anel (barco e cadeira), para a estrutura PVA-amina, e para amina-ace. Foi realizada a comparação de energia entre elas, para seguir utilizando as estruturas mais estáveis. Com base nas energias obtidas, observou-se que a forma cadeira do anel é a forma de menor energia para esta estrutura. Com isso, foram criadas três formas cadeiras distintas, e acrescentaram-se os fragmentos amina e ace. A mesma configuração foi encontrada como sendo a de menor energia nos dois casos. Portanto, seguiu-se com os cálculos e ajustes para estas estruturas.

4.1.6 PVA-RGD

Por fim, foi construída a estrutura contendo o tripeptídeo, pela adição do RGD à estrutura contendo o grupo amina, de forma a simular uma ligação peptídica. Como nas estruturas tratadas anteriormente, foi realizada a otimização geométrica da molécula e posteriormente, a sua simetrização com o auxílio do método RESP.

Partindo-se desta estrutura, foi feita a multiplicação do bloco central (que contém o peptídeo), resultando em uma molécula que contém 20 unidades deste bloco, e conseqüentemente, 20 cadeias de RGD acopladas ao polímero. A estrutura polimérica final possui DP=42, como a estudada por Sun et al.⁽¹⁴⁾

4.2 DINÂMICA MOLECULAR

As simulações de Dinâmica Molecular foram produzidas utilizando o pacote GROMACS 4.5.5⁽¹¹²⁾ Os parâmetros ligados e não-ligados das cadeias poliméricas utilizados

foram os do campo de força AMBER, mais precisamente o Amber ff99SB-ILDN⁽¹¹³⁾. Para todos os sistemas as moléculas foram centradas em uma caixa cúbica, com comprimento de aresta variando para cada um dos sistemas (tabela 11). Além disso, todos os sistemas foram solvatados utilizando o modelo TIP3P⁽¹¹⁴⁾ para a água. Nas tabelas 10 e 11 são mostradas a descrição e o resumo dos sistemas simulados, respectivamente. A temperatura foi controlada utilizando o termostato velocity rescaling (V-rescale)⁽¹¹⁵⁾, com uma constante de acoplamento de 0,1 ps. A pressão também foi mantida constante, em 1 bar, através da utilização do barostato de Parrinello-Rahman, com um tempo de acoplamento de 0,1 ps.

Tabela 10. Descrição dos sistemas.

Sistema	Descrição do sistema	Sistema	Descrição do sistema
1	Polímero com 42 unidades de repetição solvatado a 280 K.	2	RGD em pH neutro.
	Polímero com 42 unidades de repetição e solvatado a 298 K.		RGD em pH ácido.
	Polímero com 42 unidades de repetição e solvatado a 310 K.	4	9 cadeias poliméricas com 42 unidades de repetição com o RGD acoplado, solvatado e em pH neutro.
3	Cadeia polimérica com 42 unidades de repetição com RGD acoplado a 298 K.	5	9 cadeias poliméricas com 42 unidades de repetição com o RGD acoplado, no vácuo e em pH neutro.
	Cadeia polimérica com 42 unidades de repetição com RGD acoplado a 310 K.		9 cadeias poliméricas com 42 unidades de repetição com o RGD acoplado, solvatado e em pH ácido.
	9 cadeias poliméricas com 42 unidades de repetição com o RGD acoplado, solvatado e em pH neutro		9 cadeias poliméricas com 42 unidades de repetição com o RGD acoplado, no vácuo e em pH ácido.

Tabela 11. Configurações dos sistemas simulados.

Sistema	Nome	Número de átomos de polímero/peptídeo	Número de moléculas de água	Número total de átomos	pH	Temperatura (K)	Tempo de simulação (ns)	Número de íons Cl ⁻	Aresta da caixa (nm)
1	42PVA	299	12778	38633	neutro	298	50	0	7,2998
		299	12778	38633	neutro	280	35	0	7,2655
		299	12778	38633	neutro	310	20	0	7,3348
2	RGD	46	2495	7531	neutro	298	30	0	4,2333
		46	2495	7531	ácido	298	30	0	4,2316
3	Polipva-RGD	1419	88985	268374	neutro	298	100	0	13,8836
		1419	88985	268374	neutro	280	50	0	13,8618
		1419	88985	268374	neutro	310	35	0	13,9867
4	9prgd	12771	127090	394221	neutro	298	100	180	15,8171
		12771	0	12951	neutro	298	15	180	15,2719
5	9prgda	12951	125839	390828	ácido	298	100	360	15,7633
		12951	0	13311	ácido	298	15	360	15,7633

Quanto às interações eletrostáticas, foi utilizado o método PME (*Particle Mesh Ewald*)⁽¹¹⁶⁾ para os sistemas mais simples e o método *Reaction-Field* para os sistemas que continham 9 cadeias poliméricas com o RGD acoplado (sistemas 4 e 5). O raio de corte das interações de van der Waals foi fixado em 1,25 nm. Foi utilizado o algoritmo *leap-frog* para integrar as equações de movimento, com um tempo de integração de 2fs para as simulações. As ligações foram restritas com o algoritmo Lincs.⁽¹¹⁷⁾

Para os sistemas iniciais de cada tipo de estrutura ou no vácuo, foram realizados poucos ns de simulação (como visto da tabela 11), somente até que se obtivesse uma estrutura

equilibrada. Para a obtenção dos resultados foram feitos três tipos de análise: raio de giro (Rg), função de distribuição radial (RDF) e desvio quadrático médio (RMSD).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SISTEMA 42-PVA

Para esse sistema foi considerado o tempo de simulação de 0 a 20 ns dos sistemas 2, 3 e 4 das tabelas 10 e 11. O sistema foi inicialmente simulado na temperatura de 298K. Em seguida, foram feitas simulações a 280K e 310K, partindo-se da configuração já equilibrada do sistema inicial. A estrutura do polímero foi construída de forma linear, no entanto, ao longo da simulação foi observado que a estrutura se dobra e permanece desta forma até o final da simulação, como pode ser visto nas análises de RMSD apresentada na figura 25 e raio de giro da figura 26 (a). Na análise da figura 26 (a) estão marcados três valores de tempo de simulação e suas configurações são mostradas na figura 26 (b). As imagens contidas na figura 26 (b) mostram a mudança de conformação adotada pela molécula, e que corroboram com o que é visto no raio de giro (R_g) da figura 26 (a).

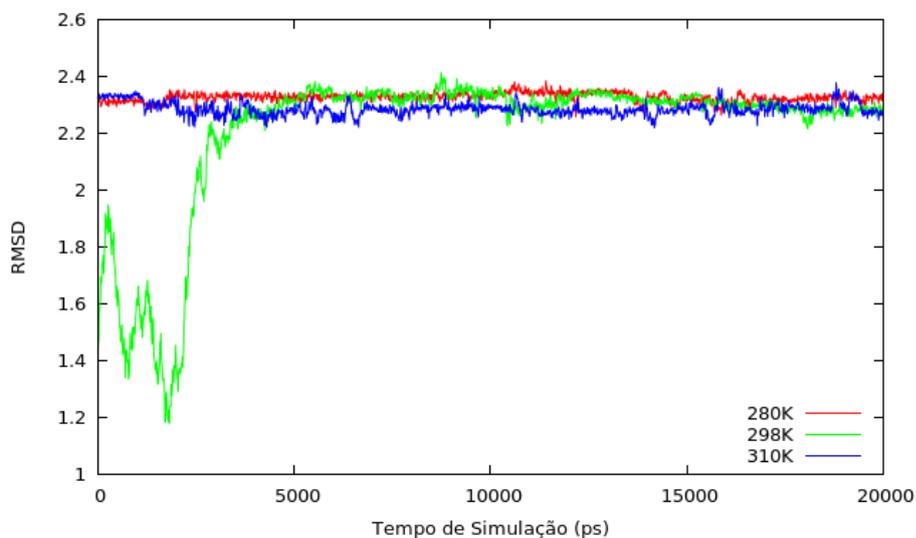


Figura 25. RMSD do PVA para as três temperaturas estudadas.

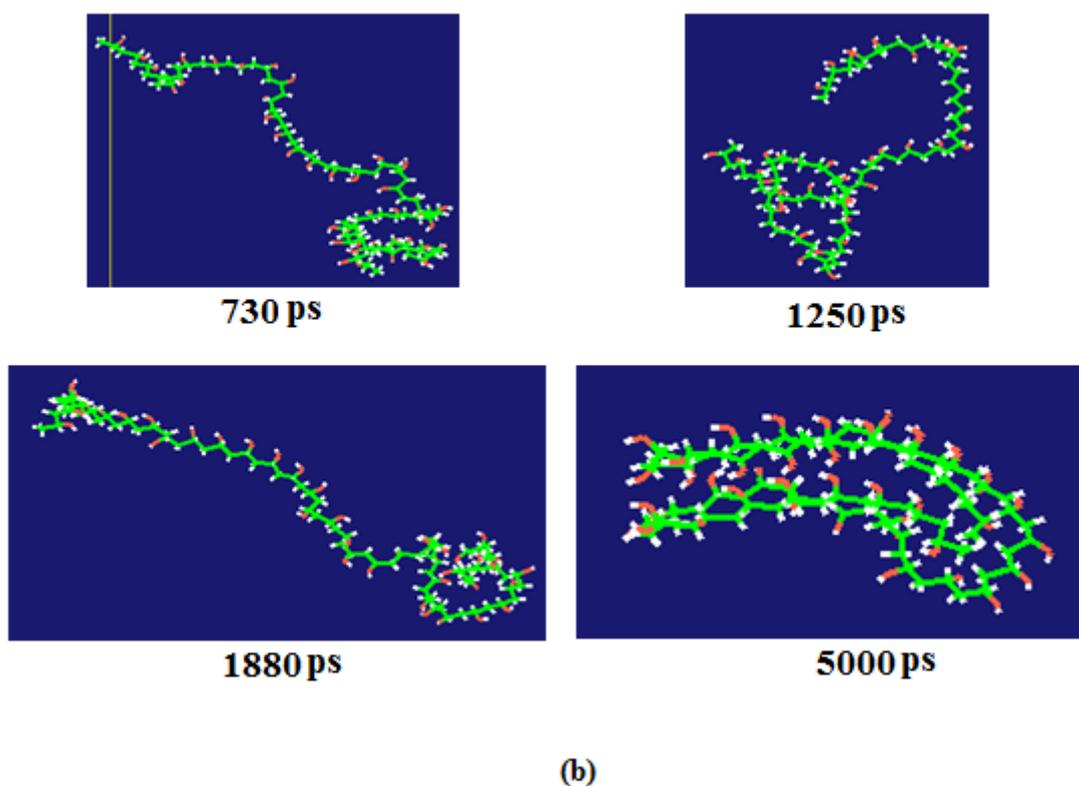
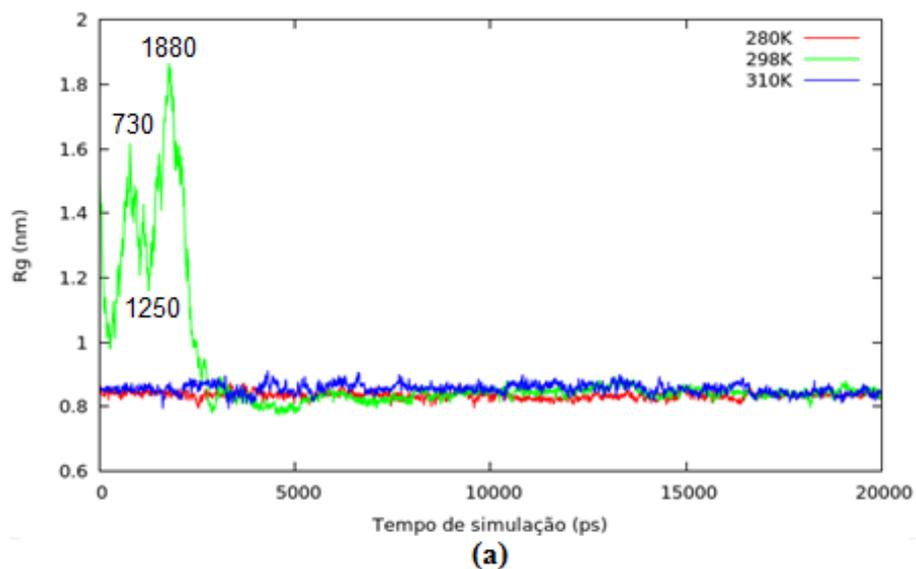


Figura 26. (a) Raio de giro do PVA para as três temperaturas estudadas e (b) conformação da molécula em diferentes tempos de simulação.

Nas figuras 27 e 29 são apresentados os resultados da análise de função de distribuição radial (RDF) para O(polímero) - H(água) e H(polímero) - O(água), respectivamente. Para a figura 27 foi considerado o oxigênio intitulado *O3* do PVA, localizado no segmento central (unidade de repetição) da molécula (figura 28), e que apresentou o primeiro pico próximo a 0,2

nm mais intenso. O gráfico 27 (a) mostra a probabilidade de encontrar átomos de hidrogênio da água a uma distância r do O3, enquanto o gráfico (b) mostra o número médio de vizinhos dentro de uma distância r . A distância em que aparece o primeiro pico em (a) é de 0,195 nm e o valor para o primeiro mínimo é de 0,5425 em (b).

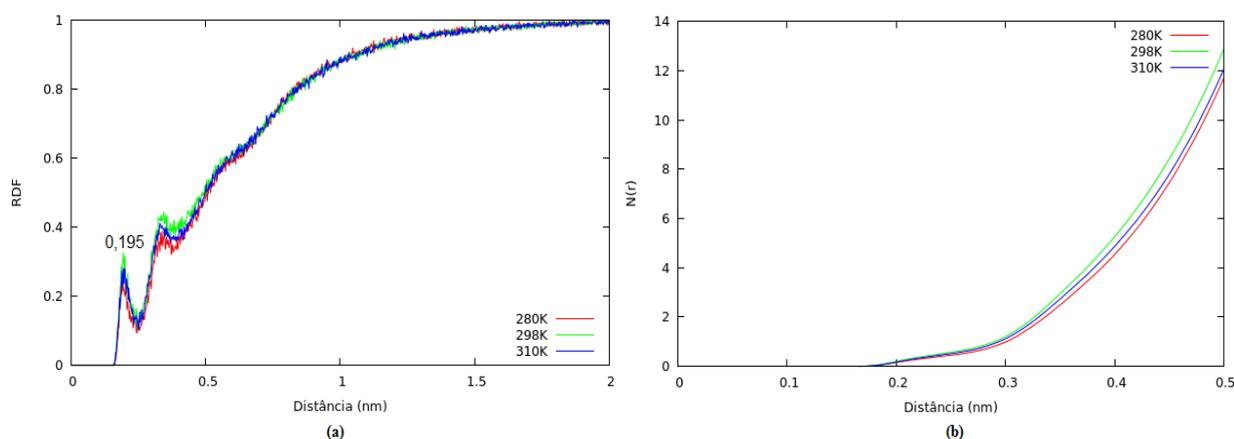


Figura 27. (a) RDF do O(polímero) – H(água) e (b) integral da RDF para as três temperaturas estudadas.

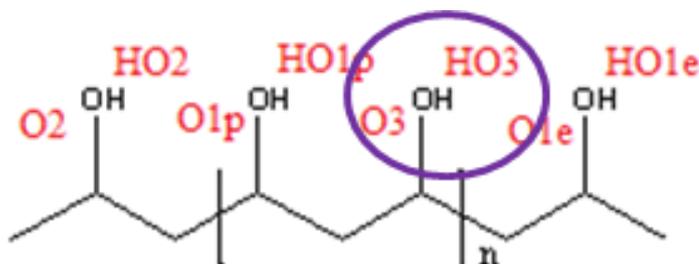


Figura 28. Estrutura e nomenclatura dos átomos em 42-pva.

Na figura 29 foi considerado o hidrogênio denominado $HO3$ do PVA, ligado ao átomo O3 (figura 28), e que apresentou o primeiro pico próximo a 0,2 nm mais intenso. Novamente, o gráfico (a) mostra a probabilidade de distância entre este hidrogênio e o oxigênio das moléculas de água, enquanto o gráfico (b) mostra o número médio de vizinhos dentro de uma distância r . A distância na qual aparece o primeiro pico em (a) é de 0,184 nm e o valor para o primeiro mínimo é de 0,3127 em (b). Enquanto na figura 30 são apresentadas as funções de distribuição radial dos átomos HO1p, O1p, HO2 e O2 com a água. Com base nas figuras 27, 29 e 30, percebe-se que a mudança da temperatura tem pouca influência sobre as RDF desse sistema.

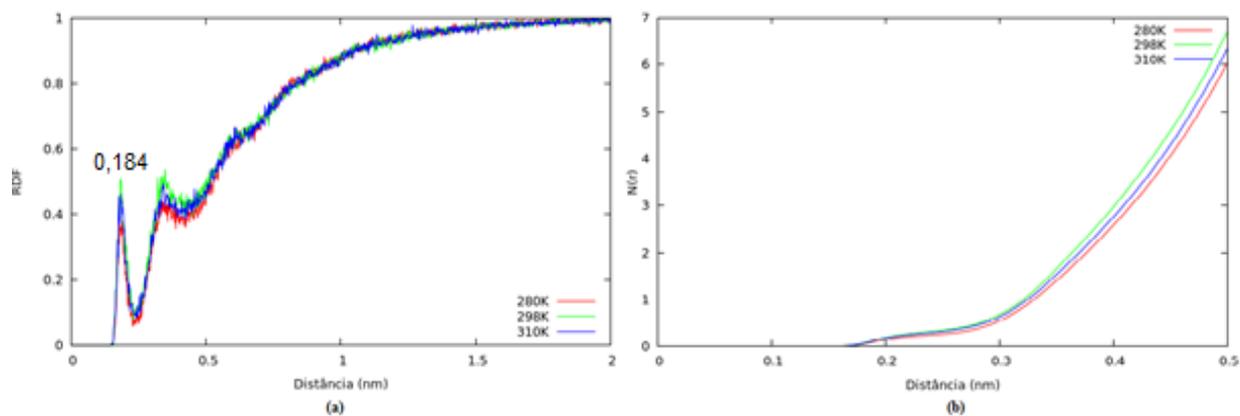


Figura 29. (a) RDF do H(polímero) – O(água) e (b) integral da RDF para as três temperaturas estudadas.

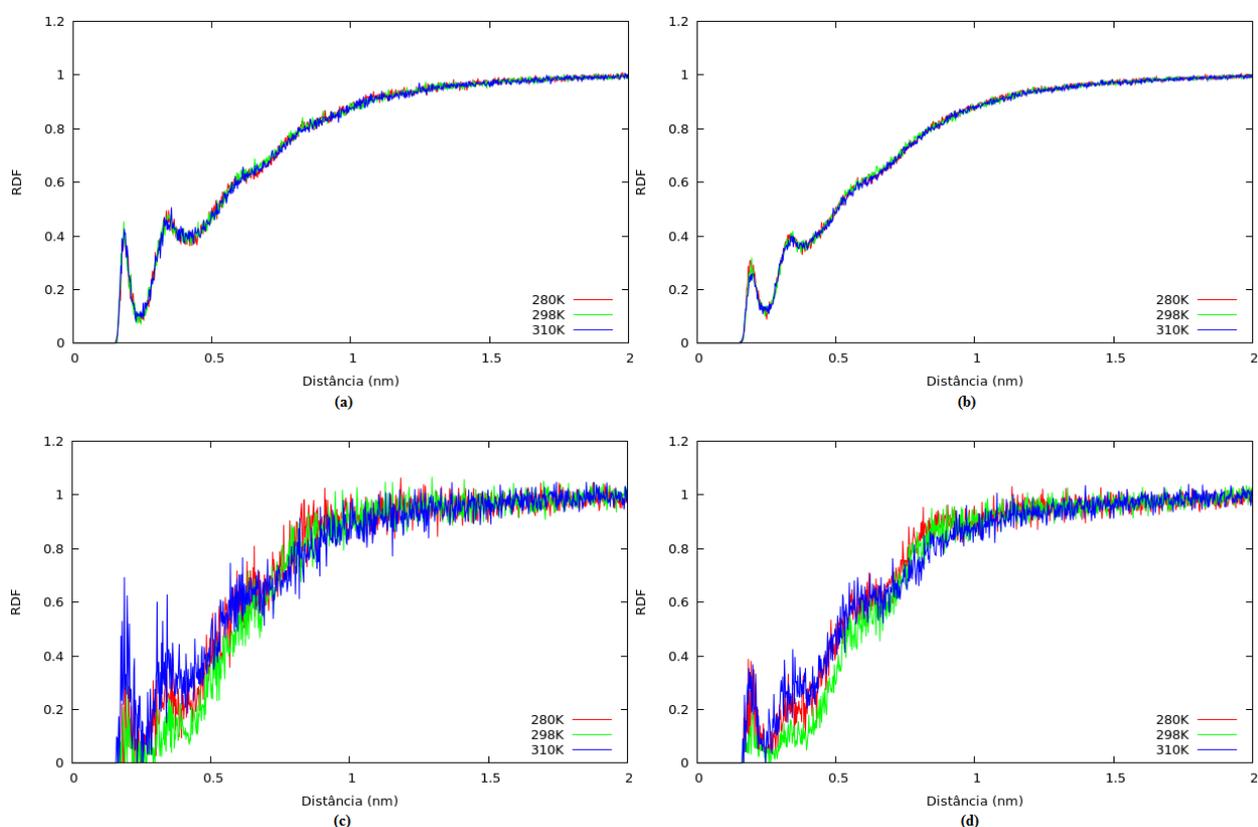


Figura 30. RDF do par (a) HO1p-OW, (b) O1p-HW, (c) HO2-OW e (d) O2-HW para as três temperaturas estudadas.

Visto que a estrutura ainda não contém o tripeptídeo, os átomos de oxigênio e hidrogênio da parte central (unidade de repetição) do polímero apresentam as mesmas chances de interação com a água que os átomos dos grupos hidroxila das pontas do polímero. No entanto, como pode ser visto na figura 30, átomos de O e H da parte central apresentam picos mais definidos com distância e intensidade semelhantes, diferentes dos apresentados pelos átomos das laterais (O1e,

O₂, HO1e e HO2). Esse comportamento possivelmente seja causado pelo fato dos átomos centrais (O1p, O3, HO1p e HO3) estarem numa proporção de 20:1 na molécula de PVA.

5.2 SISTEMA POLIPVA-RGD

O tempo de simulação considerado para as análises iniciais, nas três temperaturas estudadas é de 0 a 20 ns, para o sistema 3 das tabelas 10 e 11. Para este sistema foram calculados o RMSD e o raio de giro nas diversas temperaturas, como pode ser visto nas figuras 31 e 32, respectivamente.

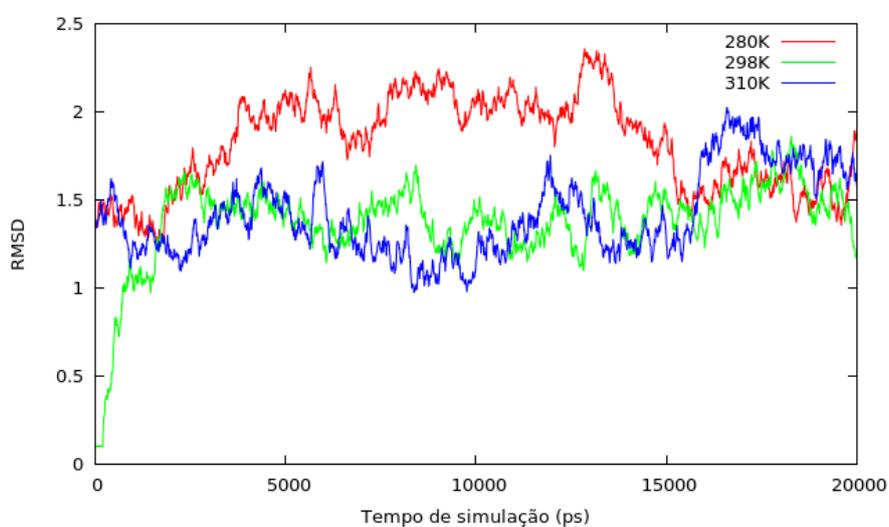


Figura 31. RMSD do sistema polipva-rgd para as três temperaturas estudadas.

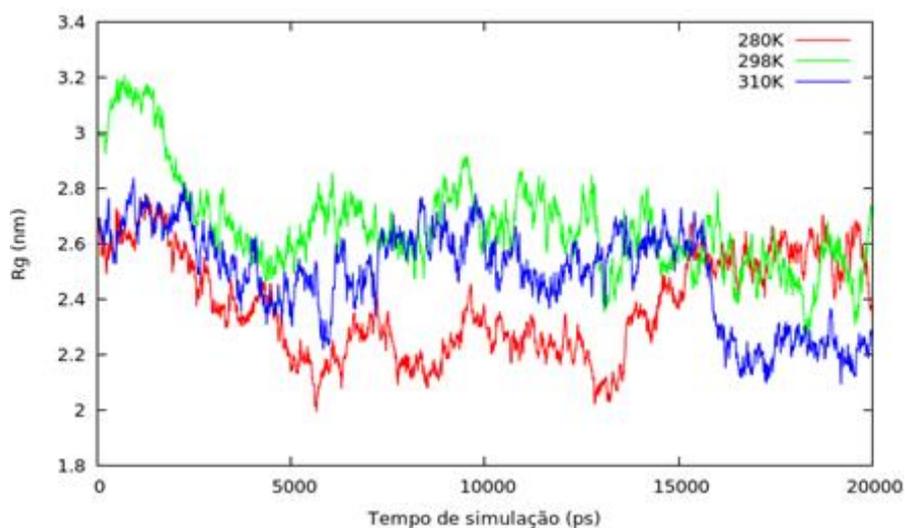


Figura 32. Raio de giro do sistema polipva-rgd para as três temperaturas estudadas.

Neste caso, diferentemente do sistema PVA-42, percebe-se que os valores de RMSD e Rg continuam mudando ao longo dos 20 ns de simulação. Portanto, uma nova análise em um tempo maior de simulação é necessária, para que seja observado se este comportamento é devido ao curto tempo de simulação, e neste caso, a estrutura não se encontra equilibrada. Na figura 33 são mostrados o raio de giro e o RMSD para os sistemas simulados após os 20 ns.

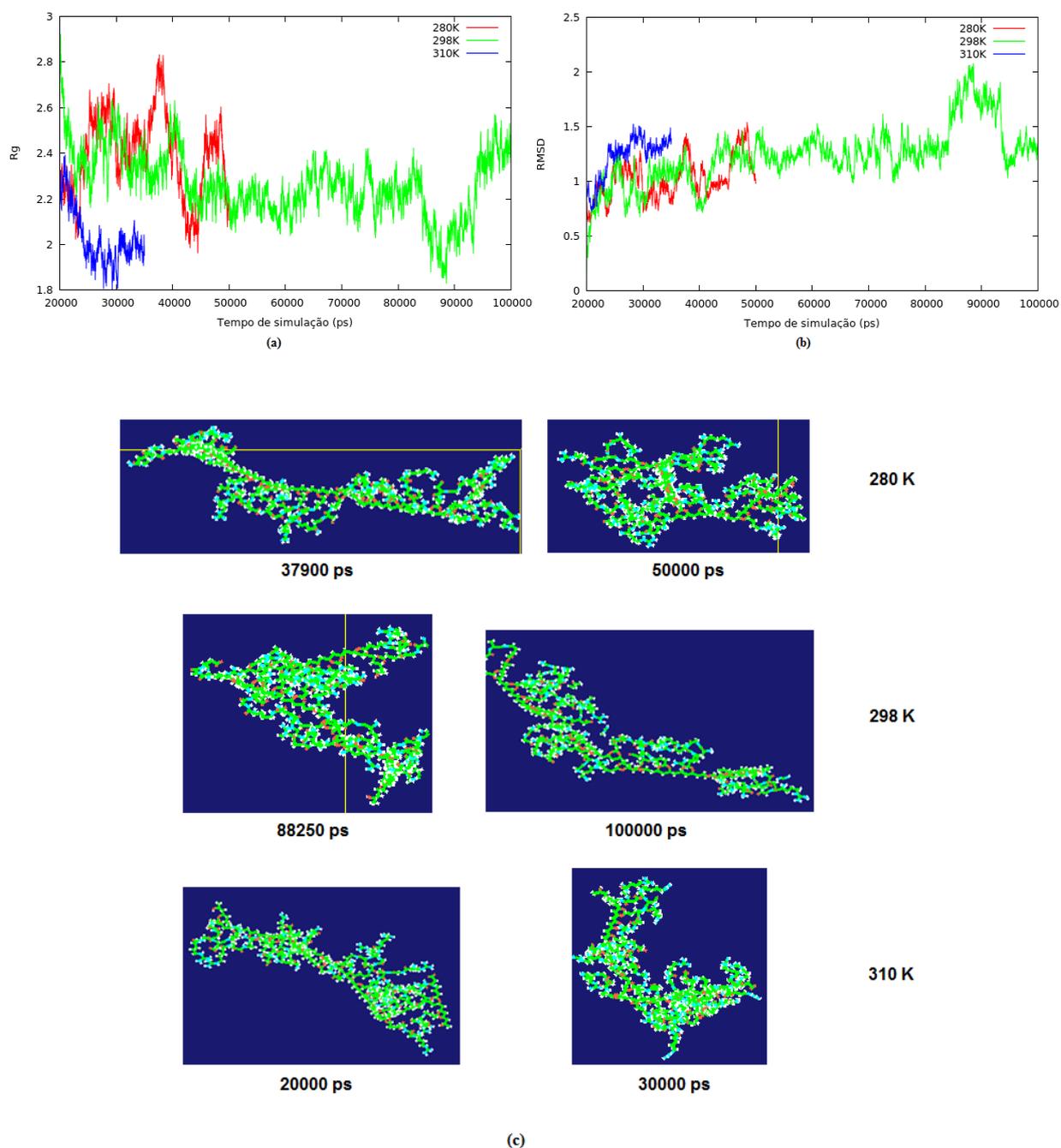


Figura 33. Gráficos do (a) Raio de giro, (b) RMSD do sistema polipva-rgd para as três temperaturas até o tempo final de simulação e (c) conformações da molécula em tempos de simulação diferentes para as três temperaturas.

Pode ser observado que mesmo com um tempo maior de simulação ainda são vistas mudanças em ambos os gráficos (a e b). A diminuição no valor de R_g vista na figura 33 para a temperatura de 310K indica uma estrutura mais colapsada para esta temperatura, o que pode ser indício de um comportamento responsivo do material à temperatura e pode ser visto na figura 33 (c). Esse tipo de comportamento também foi observado por Wang et al. ⁽⁷⁷⁾

Nas figuras 34 e 36 são apresentadas análises de RDF correspondentes ao O(polímero) – H(água) e H(polímero) – O(água). No caso da figura 34, o oxigênio apresentado é denominado O1e (figura 35), e apresenta o pico mais intenso entre os oxigênios do PVA. Nesta figura o pico aparece entre as distâncias de 0,184 nm (298K) e 0,195 nm (280K). No caso da figura 36, o hidrogênio considerado é o HO1e (figura 35), e pico aparece na distância de 0,188 nm (280K/298K) e 0,195 (310K).

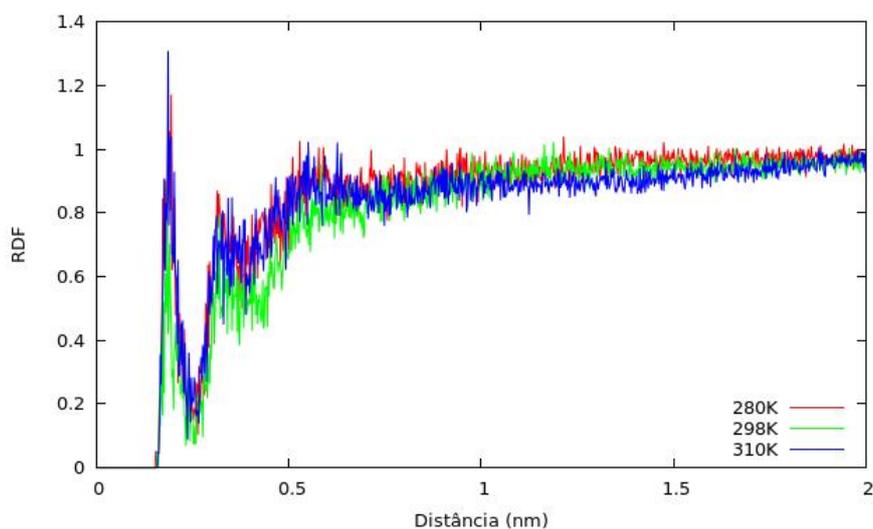


Figura 34. RDF do O(polímero) – H(água) para as três temperaturas estudadas.

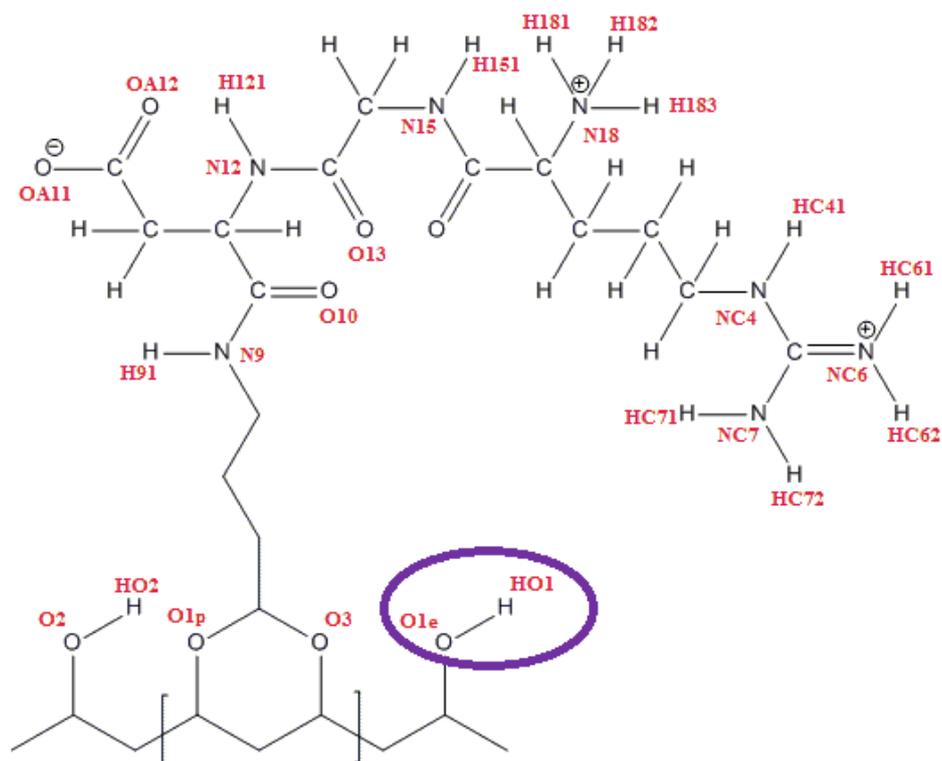


Figura 35. Estrutura e nomenclatura dos átomos em polipva-rgd.

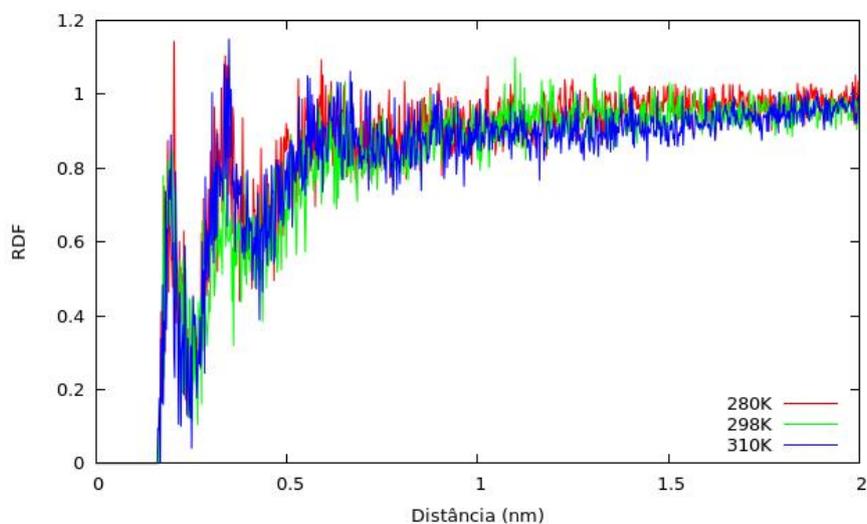


Figura 36. RDF do H(polímero) – O(água) para as três temperaturas estudadas.

As distâncias encontradas até agora, tanto para o sistema PVA-42 quanto para o sistema polipva-rgd, são próximos ao valor de distância tido como referência para a ligação de hidrogênio, que é de 0,2 nm.^{(118) (119)} Novamente, não são percebidas mudanças significativas no comportamento da RDF com a alteração da temperatura. No entanto, para este sistema, por já possuir o tripeptídeo, os hidrogênios da parte central (HO1p e HO3) não pertencem mais a

molécula. Na figura 37 são apresentadas as RDF para os outros pares de átomos. Pode ser visto que diferentemente do sistema anterior, os picos mais intensos referem-se aos átomos das pontas do PVA, enquanto os átomos da parte central apresentam picos menos intensos. Embora esses últimos continuem em maior quantidade na molécula, a presença do tripeptídeo pode atrapalhar a aproximação de outros átomos para a interação.

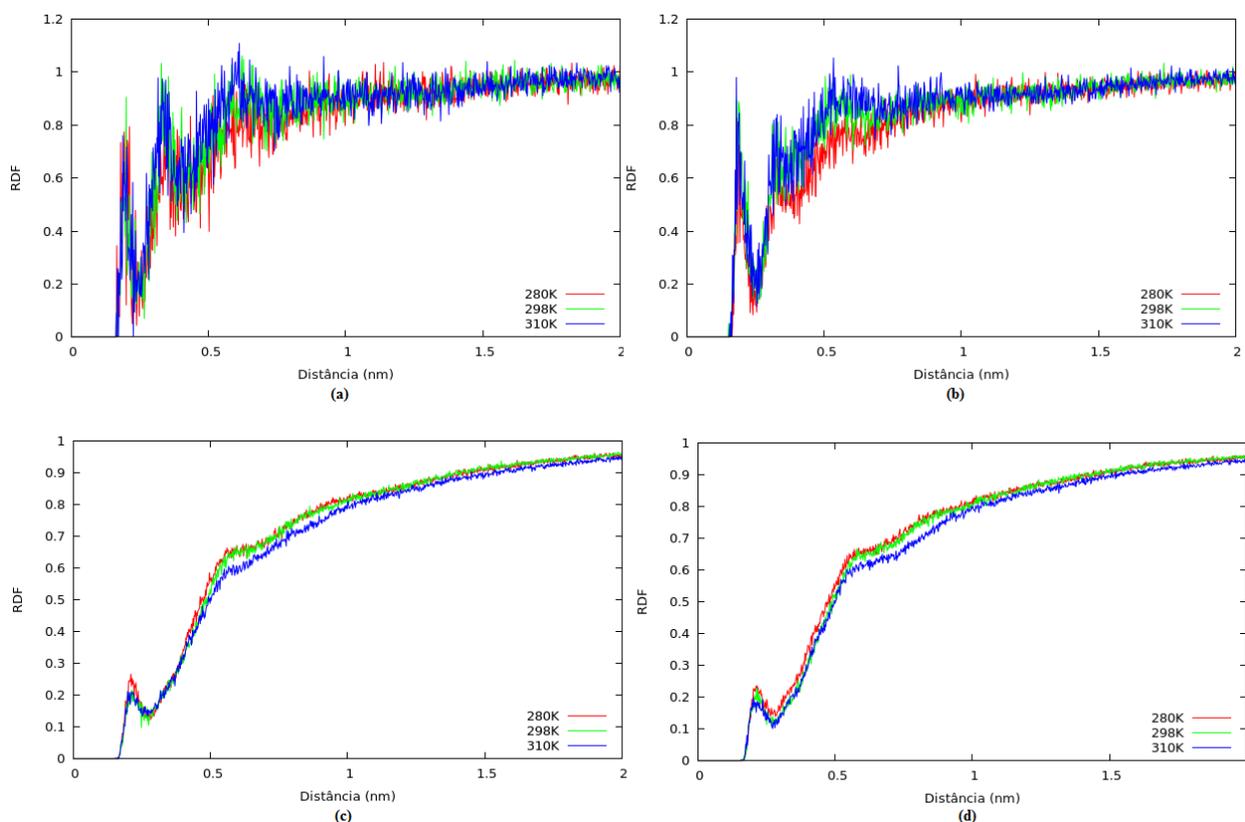


Figura 37. RDF do par (a) HO2-OW, (b) O2-HW, (c) O1p-HW e (d) O3-HW para as três temperaturas estudadas.

5.3 SISTEMA RGD

Antes de funcionalizar o polímero com o RGD, este último foi simulado individualmente, a fim de garantir sua estabilidade frente a mudanças de pH. Foram simulados dois sistemas (pH neutro e ácido) contendo o tripeptídeo RGD solvatado. Ambas as simulações foram levadas até o tempo final de 30 ns, para obter a estrutura estabilizada da molécula, e mais tarde acoplá-la ao polímero para nova simulação. Foram analisados os gráficos de RMSD (figura 38) e R_g (figura 39) para os dois sistemas.

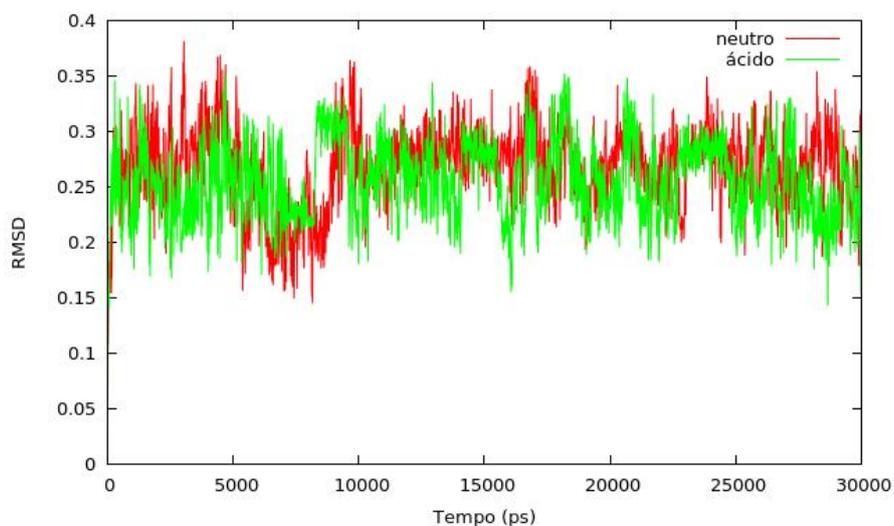


Figura 38. RMSD do tripeptídeo em pH neutro e ácido ao longo da simulação.

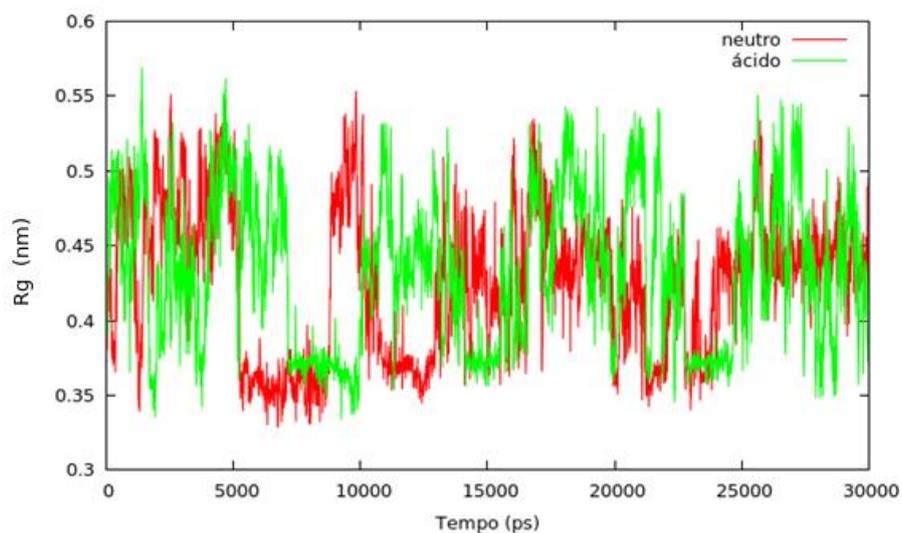


Figura 39. Raio de giro do tripeptídeo em pH neutro e ácido ao longo da simulação.

Percebe-se que ocorrem flutuações no valor do raio de giro vista na figura 39, mas estas permanecem dentro do mesmo intervalo ao longo da simulação e deve-se às mudanças de conformação adotadas pela molécula, para os dois valores de pH. Assim, em valores menores de Rg a estrutura encontra-se mais colapsada, e para valores maiores, mais alongada. Este efeito também é percebido na figura 38, especialmente no intervalo entre 5 e 10 ns.

5.4 SISTEMAS 9PRGD e 9PRGDA

5.4.1 No vácuo

Inicialmente, o sistema contendo 9 cadeias poliméricas com o tripeptídeo acoplado foi simulado em pH neutro (9prgd) e ácido (9prgda) e em ambiente vácuo. Estas simulações foram mantidas por 15 ns para que fosse obtida uma estrutura equilibrada. Para verificar o comportamento dos sistemas durante esse tempo, foram gerados os gráficos de RMSD (figura 40) e raio de giro (figura 41) ao longo do tempo total de simulação. Percebe-se que não ocorrem variações significativas no valor do RMSD, indicando que a estrutura se encontra equilibrada.

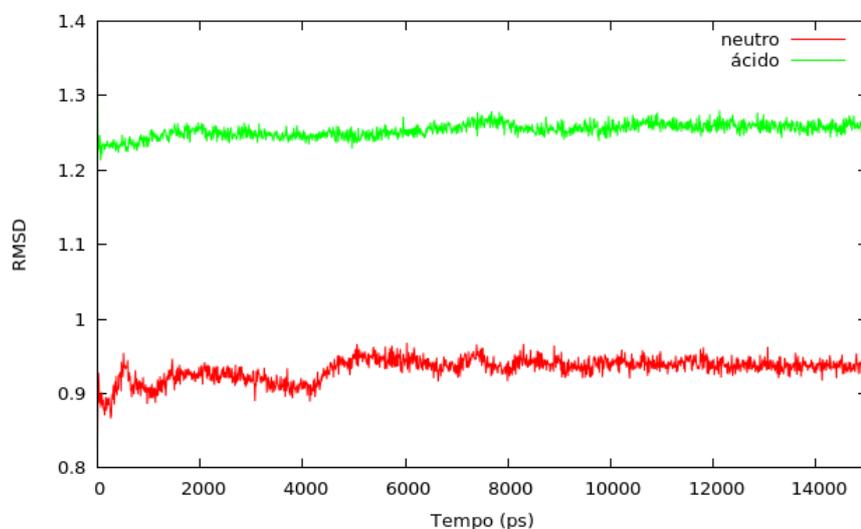


Figura 40. RMSD dos sistemas em pH neutro e ácido.

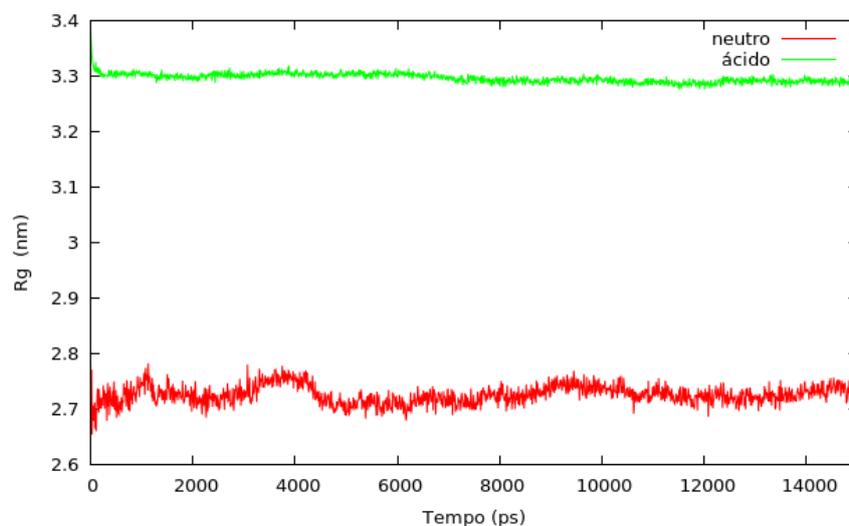


Figura 41. Raio de giro dos sistemas em pH neutro e ácido.

Nas figuras 40 e 41 é possível notar que foram obtidas estruturas equilibradas para os dois sistemas, visto que não são observadas mudanças consideráveis nos valores de RMSD e raio de giro. Também pode ser visto que o valor encontrado para a estrutura em pH ácido é maior ao longo de todo tempo de simulação. A diferença entre as estruturas em diferentes valores de pH está na adição de um átomo de hidrogênio na unidade de repetição para o pH ácido. No entanto, este maior número de átomos no pH ácido não seria suficiente para gerar o aumento de valor observado nas figuras 40 e 41. Este aumento possivelmente deve-se as ligações de hidrogênio entre os átomos, e que são analisadas através das funções de distribuição radial.

Foram então gerados gráficos de RDF para os pares de átomos possíveis de formar ligações de hidrogênio, contidos na molécula. Nas análises de função de distribuição radial foi utilizada uma nomenclatura específica para cada um dos átomos da molécula, baseada na nomenclatura atribuída aos mesmos no pacote gromacs. Na figura 42 é mostrada a molécula completa e a nomenclatura utilizada para os átomos analisados. Somente um átomo é mostrado em cor diferente (HA11) e corresponde ao átomo adicionado quando o sistema é simulado em pH ácido.

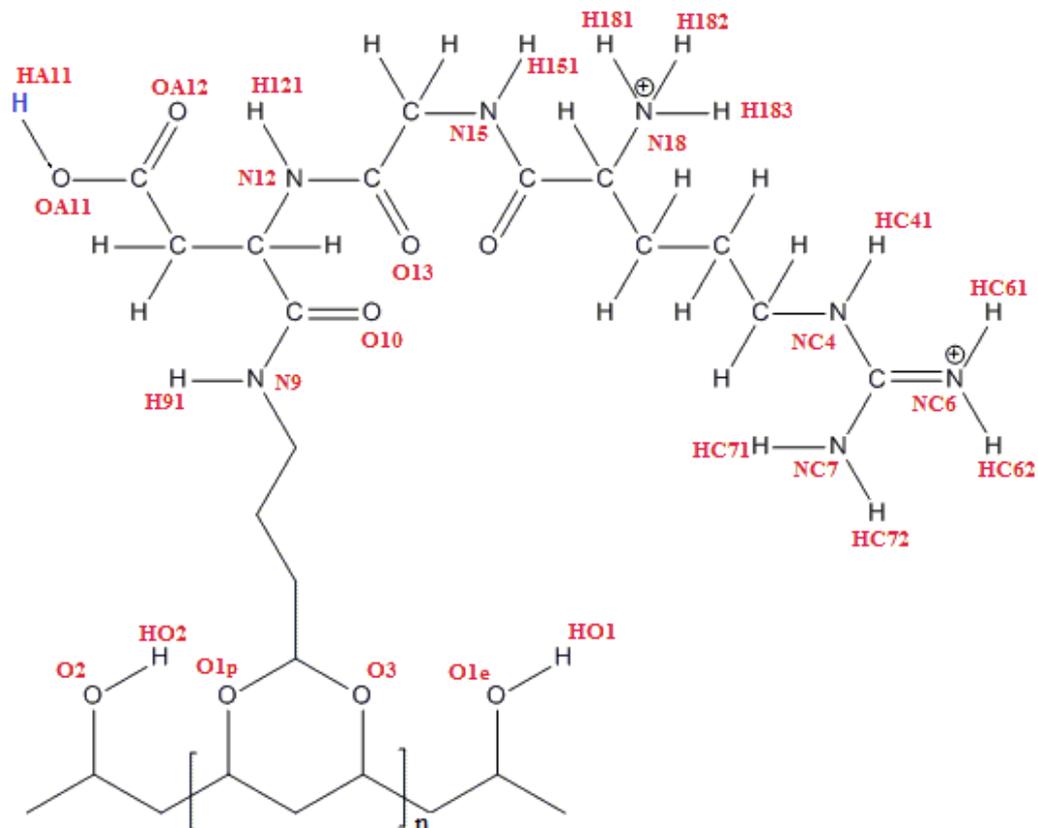


Figura 42. Estrutura e nomenclatura do 9prgd.

Na figura 43 são mostradas as RDF do sistema em pH neutro. Nos gráficos a e b (da figura 43) observa-se um pico bastante intenso para a distância 0,191 nm e 0,197 nm, respectivamente. Por se tratarem, nos dois casos, de átomos que estejam próximos entre si na estrutura da molécula, essa ligação de hidrogênio pode estar sendo formada intramolecularmente.

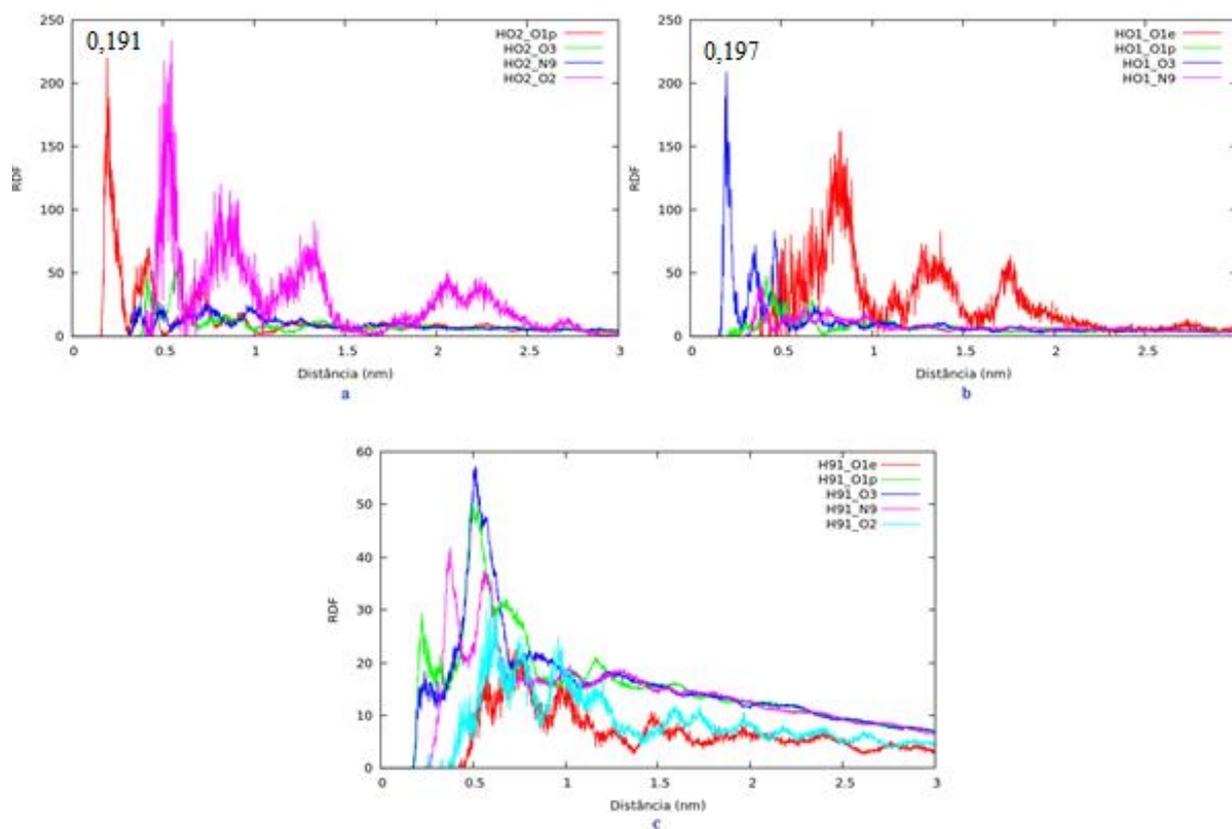


Figura 43. RDF do sistema 9prgd no vácuo: (a) HO2 com oxigênios da molécula, (b) HO1 com oxigênios da molécula e (c) H91 com oxigênios da molécula.

Na tabela 12 são mostradas as distâncias encontradas para o primeiro pico de cada par de átomos mostrados na figura 43. Na tabela também são apresentados pares de átomos com distância próxima a referência para a ligação de hidrogênio (0,2 nm), e que contenham átomos pertencentes ao RGD. Uma segunda medida (integral da RDF) é mostrada na tabela 12, e corresponde ao número de vizinhos até uma determinada distância r . Para as análises feitas nesse trabalho, foi utilizada a distância máxima de 0,3 nm. Para a tabela 12 foi considerado o tempo de 20 ns para gerar a integral de cada RDF, no entanto, em alguns casos o valor era maior que 0,3 nm e não aparece na tabela.

Tabela 12. Pares de átomos analisados e distâncias encontradas nas RDF.

Par de átomos	Distância (nm)	Integral (n° de vizinhos)	Par de átomos	Distância (nm)	Integral (n° de vizinhos)
HO2_O1p	0,191	0,3378	O10_HC6x	0,183	0,1689
HO2_O2	0,547		O10_HC7x	0,189	0,1423
HO2_O3	0,415		O10_H151	0,189	0,0831
HO2_N9	0,372		O10_H18x	0,189	0,1465
HO1_O1e	0,820		OA11_HC41	0,181	0,5309
HO1_O3	0,197	0,2219	OA11_HC7x	0,181	0,5682
HO1_O1p	0,410		OA11_H151	0,181	0,2166
HO1_N9	0,388		OA11_HC6x	0,181	0,2589
H91_O1e	0,582		OA11_H121	0,191	0,3338
H91_O2	0,593		OA11_H91	0,191	0,1330
H91_N9	0,372		OA11_H18x	0,181	0,5434
O1p_HC7x	0,205	0,0878	OA12_H121	0,199	0,2794
O3_HC7x	0,221	0,0961	OA12_HO1	0,186	0,0058
O10_H91	0,191	0,2672	OA12_H91	0,186	0,1023
O10_H01	0,199	0,0107	OA12_HC41	0,183	
O10_HO2	0,186	0,0055	OA12_H151	0,183	0,3076
O13_H121	0,197	0,1016	OA12_HC7x	0,181	0,5593
O13_H91	0,205	0,1136	OA12_H18x	0,183	0,5593
O13_HC6x	0,186	0,1172	O13_H151	0,189	0,1039
O10_HC41	0,191	0,0218	O13_H18x	0,189	0,2956
			O13_HC7x	0,191	0,0904

A fim de verificar se ocorriam ligações intramoleculares, como mencionado anteriormente, foram verificados os pares da tabela 12 que apresentaram distância entre 0,189 nm e 0,205 nm e poderiam formar uma ligação intramolecular. Para isso, foram geradas RDF para cada par em cada uma das nove cadeias. Na tabela 13 são apresentados os dados obtidos com essas medidas. Os valores numéricos apresentados na tabela estão em nm e correspondem ao primeiro pico em cada gráfico. Os espaços que não contem valor numérico representam gráficos que não possuem sinal próximo a 0,2 nm ou que possuem sinal, mas não é formado um pico nesse intervalo de distância. Também foram analisados os mesmos pares entre cadeias

diferentes, a fim de verificar a ocorrência de ligações entre as cadeias (intermoleculares), e foram encontrados gráficos que apresentaram pico próximo a distância de 0,2 nm, como mostrado na figura 44. A presença de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas é um indício da formação de um hidrogel de PVA reticulado fisicamente.

Tabela 13. Medidas das ligações de hidrogênio intramoleculares em cada uma das cadeias.

	CADEIA								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HO1-O3				0,202			0,200		0,191
O10-H91	0,202	0,189	0,197	0,205	0,186	0,194	0,200	0,189	0,183
HO2-O1p		0,197	0,197						
O13-H121	0,189	0,197	0,186	0,206		0,186	0,197	0,194	0,197
O13-H151					0,186			0,191	
OA11-H121	0,186	0,189	0,197	0,194		0,200	0,189	0,192	

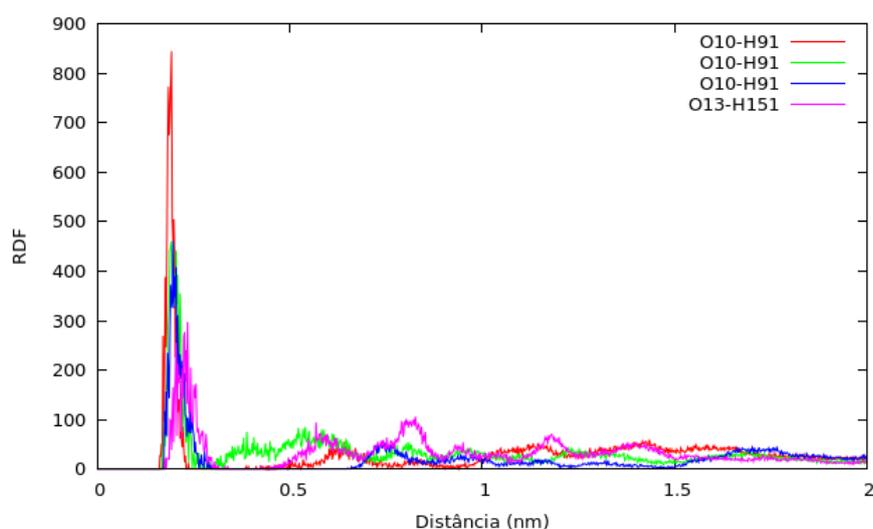


Figura 44. RDF do sistema 9prgd com pares entre as cadeias de PVA.

5.4.2 Solvatado

Tendo sido obtidos os sistemas equilibrados com múltiplas cadeias de PVA, seguiu-se para o passo seguinte, que consiste na simulação de sistemas contendo as 9 cadeias do sistema anterior, num ambiente com solvente (água), para dois valores de pH (neutro e ácido), como mostram as tabelas 10 e 11. Os sistemas solvatados foram levados até 100 ns para que se

observasse as mudanças do sistema ao longo da simulação, a fim de observar o comportamento e interações do polímero com a água. As primeiras análises feitas foram de RMSD (figura 45) e raio de giro (figura 46) para verificar o comportamento da estrutura com a mudança do pH, sendo a medida feita para cada uma das 9 cadeias individualmente.

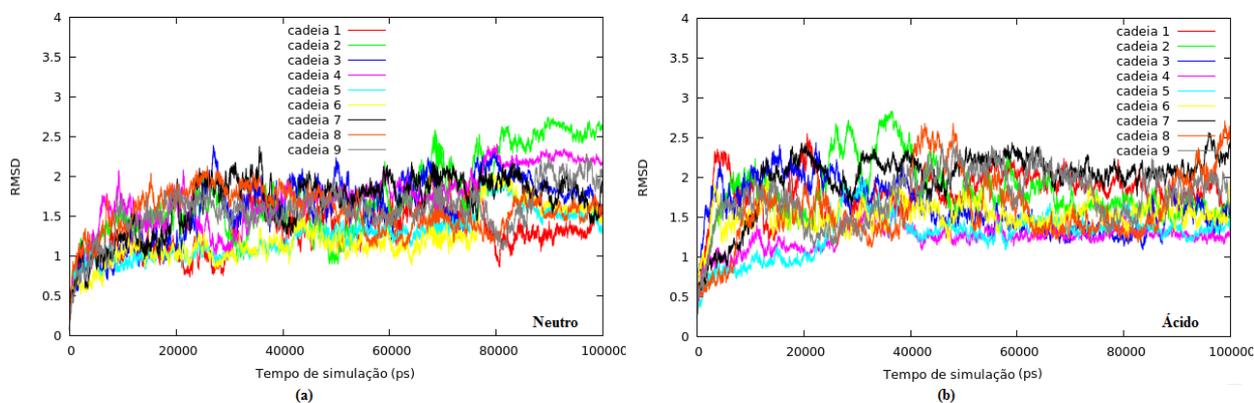


Figura 45. RMSD dos sistemas (a) 9prgd (pH neutro) e (b) 9prgda (pH ácido) ao longo da simulação.

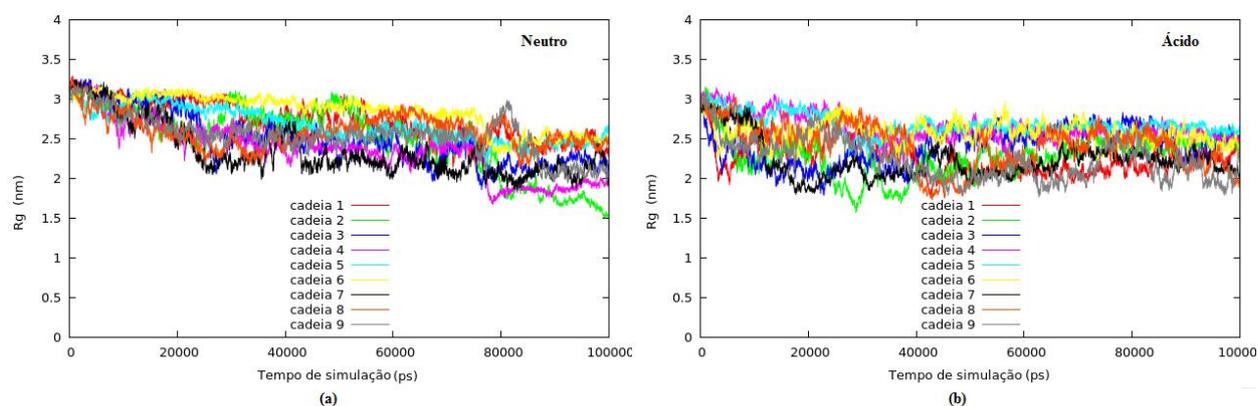


Figura 46. Raio de giro dos sistemas (a) 9prgd (pH neutro) e (b) 9prgda (pH ácido) ao longo da simulação.

Na figura 45 percebe-se uma certa estabilidade, pois os valores para a maioria das cadeias flutuam dentro do mesmo intervalo. Também pode ser observado que os valores flutuam entre 1 e 2,5, para ambas as condições de pH. Comparando-se os valores encontrados na figura 45 com aqueles apresentados nas figuras 31 e 33, que correspondem ao sistema polipva-rgd, percebe-se que os valores encontrados são semelhantes.

Ao analisar os gráficos da figura 46, pode ser observado uma leve queda no valor de Rg para (a) e (b). Quando se analisa o Rg por cadeia, observa-se que em quase todos os casos o valor do raio de giro é maior em pH neutro do que no ácido. Com isso, apesar de ocorrer a

diminuição de valor para os dois valores de pH, a maior mudança ocorre no pH ácido, levando a uma estrutura mais colapsada, que por sua vez, possui menor capacidade de reter água. Esse comportamento em pH ácido está de acordo com o que se encontra na literatura. Novamente, ao efetuar a comparação da figura 46 com o Rg do sistema polipva-rgd (figura 33), observa-se que este último também possui esta leve queda o valor de Rg no tempo de 0 a 20 ns. Quanto aos valores, o intervalo de 2 a 3,2 nm observado na figura 46, é o mesmo que para o sistema polipva-rgd. Assim, pode-se concluir que a presença de mais cadeias do tipo polipva-rgd não modificam estas propriedades da estrutura.

Para as RDF foram analisados todos os pares possíveis de formar ligações de hidrogênio, tanto entre átomos da cadeia pva-rgd quanto com a água. Para verificar se ocorriam mudanças nas interações ao longo do tempo de simulação, foram feitas quatro análises para cada sistema, nos tempos de simulação igual a 25 ns, 50 ns, 75 ns e 100 ns. Na tabela 14 são apresentadas as RDF entre átomos pertencentes a parte do PVA (O1p, O1e, O2, O3, HO1 e HO2), apresentados na figura 42, com átomos de toda a estrutura polipva-rgd. Somente os pares que apresentaram pico próximo a distância de 0,2 nm são mostrados na tabela 14. Nos demais espaços e para os pares que não aparecem na tabela, os gráficos não possuem sinal para a distância de referência, ou não ocorre a formação de um pico. Uma segunda medida, a integral da RDF, é mostrada nas tabelas 14 e 15, e, assim como na tabela 12, corresponde ao número de vizinhos até uma determinada distância r . Para as análises feitas nesse trabalho, foi utilizada a distância máxima de 0,3 nm. Para as tabelas 14 e 15 foram consideradas as RDF no tempo de 100 ns para gerar cada integral. Assim, só foram gerados os gráficos de integral para os pares que apresentaram valor numérico na tabela para 100 ns. Em alguns casos o valor encontrado é maior que 0,3 nm e, portanto, não é mostrado nas tabelas.

Na tabela 14 podem ser vistos alguns pares mais propensos a formar ligações de hidrogênio, como O1p-HO2 e O3-HO1, que possuem valores para os quatro tempos analisados em ambos os valores de pH. Comparando-se os sistemas (pH neutro e ácido) para um mesmo tempo de simulação, os números de ligações de hidrogênio são parecidos. Na figura 47 é possível ver a RDF do par O1p-HO2 da tabela 14, que apresentou a maior intensidade entre os pares analisados.

Tabela 14. Resultados das RDF de átomos do PVA com átomos das cadeias pva-rgd dos sistemas 9prgd e 9prgda em diferentes tempos de simulação.

	Neutro					Ácido				
	25 ns	50 ns	75 ns	100 ns	Integral	25 ns	50 ns	75 ns	100 ns	Integral
O2										
H91									0,186	0,0792
H121						0,194	0,202	0,189		
H151	0,195			0,199	0,0481	0,207				
H18x		0,199	0,203					0,191	0,204	0,0068
HC41			0,192				0,181			
HC6x			0,185				0,197	0,191		
HC7x		0,210	0,206			0,191	0,191	0,202		
O1p										
HO2	0,188	0,195	0,198	0,199	0,0210	0,194	0,189	0,189	0,194	0,0240
H91				0,199	0,0214	0,215	0,215			
H151									0,207	0,0029
HC41		0,203	0,210			0,202	0,199	0,207	0,202	0,0025
HC6x	0,203	0,210	0,206	0,206	0,0342				0,207	0,0067
HC7x	0,199	0,206	0,199	0,206	0,0321			0,204	0,207	0,0045
O1e										
HO1	0,188	0,184	0,188	0,181			0,191			
H91	0,199		0,202			0,199	0,202			
H121				0,199	0,0419	0,202	0,207	0,202		
H151							0,197	0,210	0,210	0,0315
H18x				0,196	0,0601	0,191	0,191	0,197	0,204	0,0329
HC41		0,199	0,189				0,189	0,183	0,197	0,0074
HC6x		0,196	0,199	0,206	0,0249	0,191	0,207	0,199	0,210	0,0125
HC7x		0,199	0,192				0,194	0,191	0,197	0,0089
O3										
HO2			0,189							
HO1	0,202	0,202	0,198	0,199		0,194	0,202	0,199	0,202	0,0115
H91	0,209	0,217	0,213	0,220	0,0281	0,207				
H18x	0,199	0,203	0,206	0,213	0,0091					
HC41	0,203	0,213								

HC6x	0,199	0,199	0,203	0,206	0,0282					
HC7x	0,210			0,203	0,0303					
HO1										
O10						0,183	0,186	0,186		
OA11				0,181	0,0480					
OA12							0,199			
O13								0,183		
O16			0,182							
HO2										
O10						0,191	0,183	0,191	0,189	0,0389
OA11		0,182		0,184	0,0415					
OA12		0,182		0,185	0,0464					
O13	0,192		0,189	0,203	0,0186					
N15										
O16	0,185									

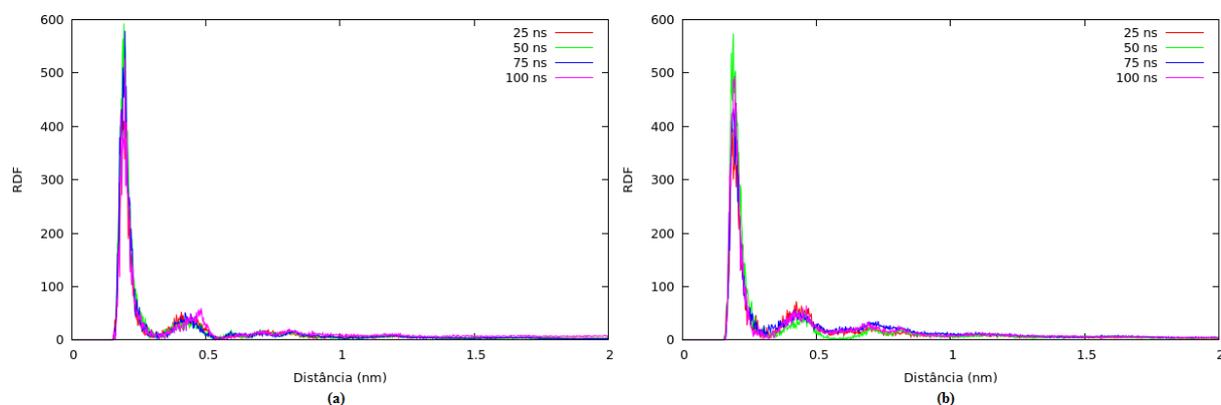


Figura 47. RDF do par O1p-HO2 para os 4 tempos de simulação analisados em (a) pH neutro e (b) pH ácido.

Na figura 47 percebe-se uma intensidade bastante alta para o par O1p-HO2, e que pouco se altera com o passar do tempo. O que ocorre, é um aumento na intensidade para tempos maiores. Na tabela 15 são mostradas as RDF entre átomos pertencentes a cadeia do peptídeo. Novamente, como na tabela 14, somente são mostrados valores para os pares que atingiram distância próxima a 0,2 nm. Os demais pares ou não possuem sinal para esta distância, ou não ocorre a formação de um pico.

Tabela 15. Resultados das RDF entre átomos do RGD dos sistemas 9prgd e 9prgda em diferentes tempos de simulação.

	Neutro					Ácido				
	25 ns	50 ns	75 ns	100 ns	Integral	25 ns	50 ns	75 ns	100 ns	Integral
O10										
H91	0,191	0,191	0,191	0,188	0,1399	0,194	0,191	0,197	0,199	0,0607
H151	0,188	0,189	0,192	0,189	0,0270	0,191		0,189		
H18x	0,192	0,185	0,189	0,185	0,0641	0,191	0,184	0,184	0,191	0,0436
HC41	0,182	0,192	0,189	0,189	0,0425	0,191	0,191	0,191	0,189	0,0117
HC6x	0,189	0,185	0,185	0,185	0,0460	0,184	0,184	0,189	0,186	0,0231
HC7x	0,182	0,196	0,185	0,189	0,0375	0,189	0,191	0,194	0,191	0,0163
O13										
H91	0,192	0,206	0,199	0,203	0,0713					
H121	0,192	0,203	0,196	0,196	0,0267	0,194	0,186	0,194	0,199	0,0167
H151	0,184	0,191	0,184							
H18x	0,189		0,192	0,196	0,0996					
HC41	0,189	0,182	0,196	0,189	0,0240	0,191		0,186	0,189	0,0107
HC6x	0,189	0,185	0,189	0,185	0,0608	0,181	0,186	0,184	0,189	0,0124
HC7x	0,189	0,196	0,185	0,192	0,0578	0,191		0,186		
O16										
H91	0,213	0,206	0,206	0,217		0,207	0,207	0,210	0,207	
H121		0,189	0,192							
H151	0,199	0,196	0,203	0,199	0,0327	0,197	0,191	0,189	0,191	0,0083
HC41			0,189	0,196	0,0107					
HC6x	0,192	0,189	0,185	0,185	0,0291		0,184	0,189	0,184	0,0137
HC7x	0,185	0,192	0,189	0,189	0,0205		0,184	0,184	0,194	0,0085
OA11										
H91	0,196	0,203	0,203	0,210	0,0641					
H121	0,195	0,206	0,202	0,202	0,2772					
H151	0,182	0,181	0,185	0,185	0,0765					
H18x	0,184	0,184	0,185	0,185	0,2324					
HC41	0,184	0,181	0,181	0,188						
HC6x			0,184	0,181	0,1265	0,191	0,204			
HC7x			0,181	0,184	0,2985	0,194	0,197	0,202	0,197	0,0267

	OA12									
H91	0,199	0,203	0,203	0,196	0,0594					
H121	0,195	0,199	0,202	0,202	0,3092					
H151	0,185	0,185	0,185	0,189	0,0605	0,194	0,197	0,194	0,191	0,0353
H18x		0,184	0,184	0,188	0,2276	0,197	0,197	0,199	0,199	0,1611
HC41	0,184	0,181	0,181	0,188		0,191	0,186	0,189	0,189	
HC6x			0,181	0,184	0,1369	0,194	0,184	0,199	0,186	0,0208
HC7x	0,181	0,181	0,181	0,181	0,3110	0,191	0,184	0,194	0,186	0,0488

Para a tabela 15, percebe-se uma dependência maior das ligações de hidrogênio. Neste caso, para um mesmo tempo de simulação, a diferença no número de ligações de hidrogênio é maior, sendo que o sistema em pH neutro possui o maior número destas ligações. Esse efeito é bastante visível quando se compara as ligações de hidrogênio dos sistemas para o átomo OA11. Isso é compreensível, uma vez que o átomo adicionado para pH ácido (HA11) encontra-se ligado ao átomo OA11. Além do menor número de ligações de hidrogênio para OA11, pode ser observado na figura 48 que a intensidade da RDF para pH neutro é cerca de 10 vezes maior que para pH ácido. O mesmo efeito pode ser visto na tabela 15 e na figura 49 para o átomo OA12, no entanto, a perda no número de ligações de hidrogênio para este átomo é significativamente menor. O fato do sistema apresentar um maior número de ligações de hidrogênio em pH neutro pode contribuir para o comportamento visto na figura 46, uma vez que o número de reticulações possui influência nas propriedades de um hidrogel.

Na figura 48 e 49 são apresentadas as RDF em pH ácido e neutro dos pares OA11-HC7x e OA12-HC7x, respectivamente.

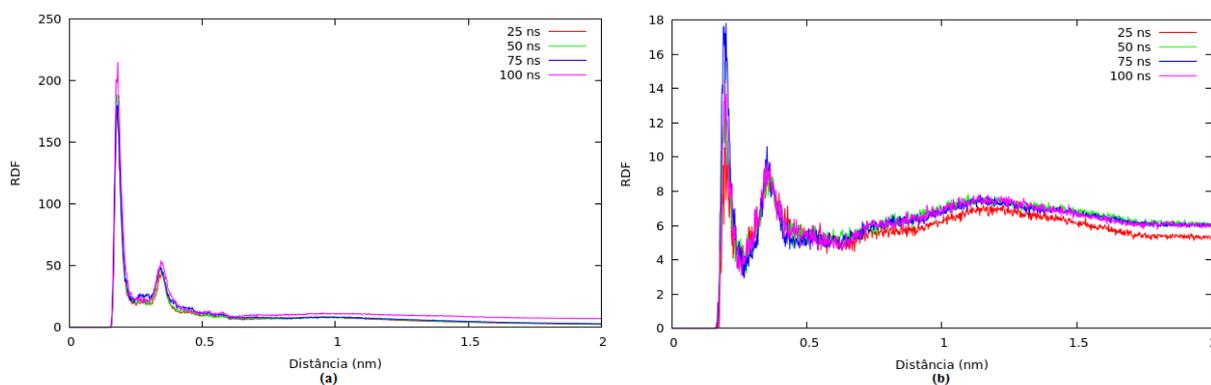


Figura 48. RDF do par OA11-HC7x para os 4 tempos de simulação analisados em (a) pH neutro e (b) pH ácido.

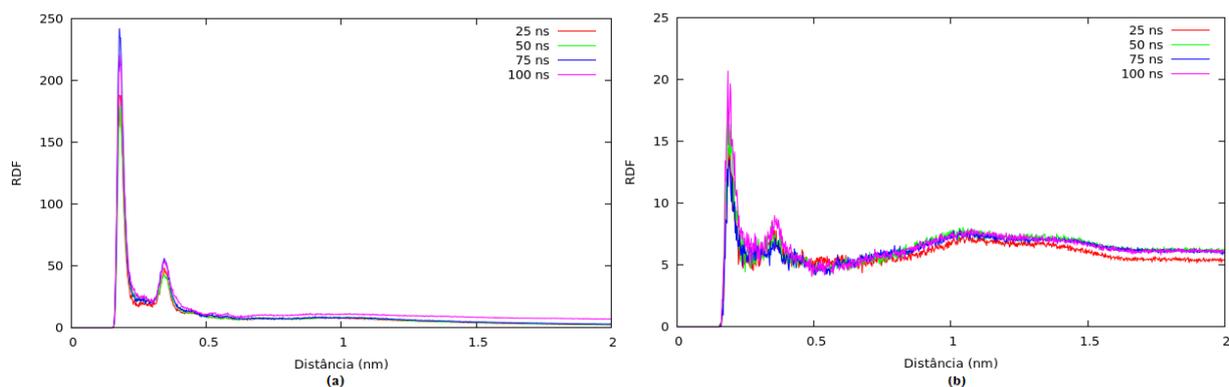


Figura 49. RDF do par OA12-HC7x para os 4 tempos de simulação analisados em (a) pH neutro e (b) pH ácido.

Foram analisados os gráficos de RDF dos átomos da molécula capazes de formar ligação de hidrogênio com o átomo HA11, no entanto, nenhum dos gráficos analisados apresentou sinal em torno de 0,2 nm. Por último, foram geradas as funções que relacionam os hidrogênios e oxigênios da molécula com a água. Os dados são apresentados na tabela 16. Enquanto nas figuras 50 e 51 podem ser vistas as RDF dos átomos do PVA com a água.

Tabela 16. Resultados das RDF dos oxigênios e hidrogênios do pva-rgd com a água.

	Neutro				Ácido			
	25 ns	50 ns	75 ns	100 ns	25 ns	50 ns	75 ns	100 ns
HW								
O2	0,191	0,188	0,188	0,191	0,191	0,186	0,191	0,183
O1p	0,209	0,213	0,213	0,209	0,210	0,213	0,213	0,207
O1e	0,188	0,188	0,191	0,188	0,189	0,186	0,186	0,194
O3	0,213	0,209	0,209	0,209	0,210	0,205	0,207	0,207
O10	0,181	0,181	0,181	0,181	0,183	0,186	0,183	0,181
O13			0,184	0,181		0,181	0,183	0,183
O16	0,181	0,181	0,181		0,181	0,181	0,181	0,181
OA11					0,199	0,202	0,197	0,202
OA12					0,184	0,186	0,186	0,186
OW								
HO1	0,195	0,191	0,191	0,199	0,189	0,194	0,197	0,197
HO2	0,195	0,191	0,191	0,202	0,194	0,194	0,199	0,183
H91	0,202	0,213	0,206	0,206	0,202	0,205	0,202	0,202
H121	0,202	0,209	0,202	0,206	0,199	0,199	0,202	0,199

H151	0,191	0,195	0,195	0,195	0,194	0,202	0,197	0,194
H18x	0,195	0,191	0,195	0,191	0,194	0,194	0,194	0,197
HC41	0,191	0,195	0,195	0,195	0,194	0,194	0,191	0,194
HC6x	0,191	0,191	0,191	0,191	0,191	0,189	0,191	0,194
HC7x	0,191	0,191	0,191	0,191	0,194	0,194	0,191	0,191

A tabela 16 mostra que praticamente todos os hidrogênios e oxigênios da molécula possuem boa interação com a água. Os átomos que não apresentam valores em nenhum dos tempos analisados são OA11 e OA12. Mas para ambos os casos aparecem picos em torno de 0,170 nm para os quatro tempos nas RDF.

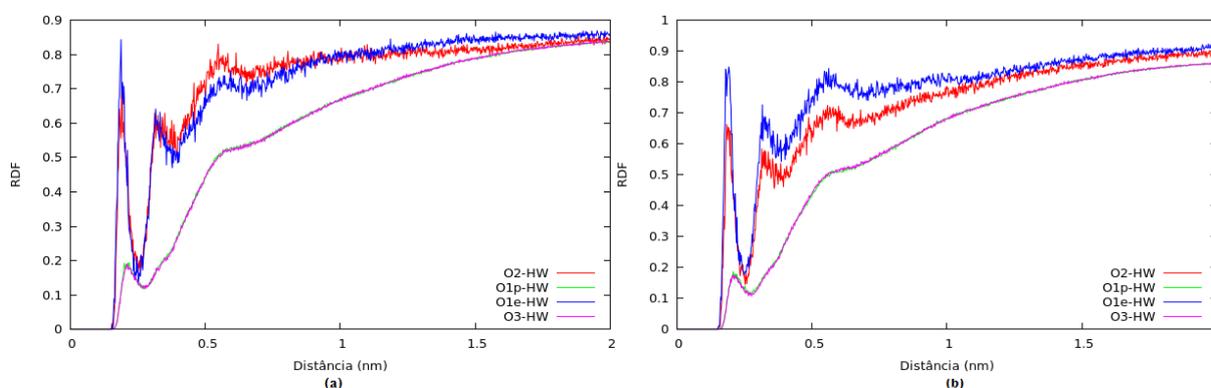


Figura 50. RDF dos átomos O2, O1p, O1e e O3 do polímero com o HW da água no tempo de 100 ns de simulação para (a) pH neutro e (b) pH ácido.

Na figura 50 não ocorrem mudanças significativas na intensidade e distância para o mesmo par em função da alteração do pH. No entanto, observa-se que os picos são mais intensos para os átomos pertencentes as partes laterais do polímero (O2 e O1e). Isso pode ocorrer pois estes oxigênios estão menos impedidos estericamente que os demais, visto que os átomos O1p e O3 estão ligados ao segmento que contém o tripeptídeo. No caso da figura 51 tem-se somente os hidrogênios das partes laterais do polímero, e estes não apresentam mudanças significativas na RDF entre si ou com a mudança de pH.

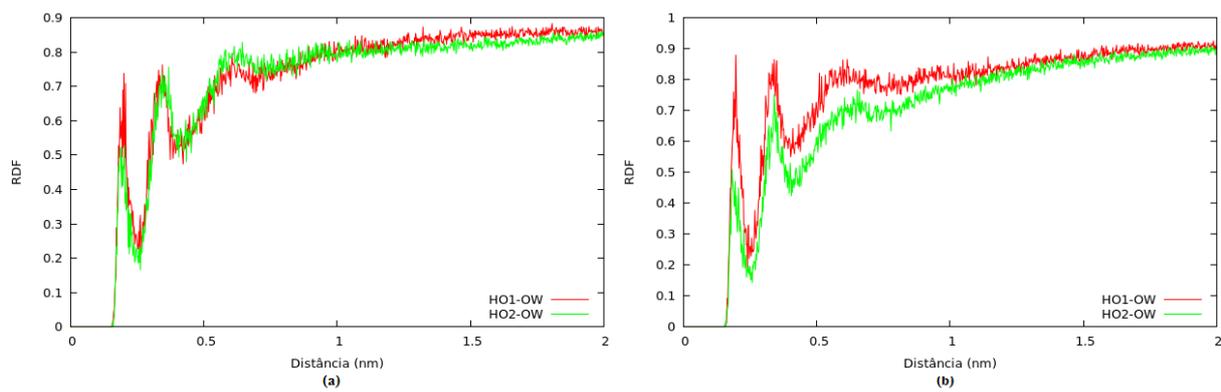


Figura 51. RDF dos átomos HO1 e HO2 do polímero com o OW da água no tempo de 100 ns de simulação para (a) pH neutro e (b) pH ácido.

6. CONCLUSÕES

Conseguiu-se construir as estruturas iniciais do polímero no programa Gaussian e obter suas cargas atômicas, que possibilitaram construir as topologias e realizar as simulações desejadas para cada sistema. Somente a sequência peptídica foi obtida de um banco de dados e isolada.

A mudanças de temperatura para o sistema PVA-42 (280 K, 298 K e 310 K) e de pH para o sistema RGD (neutro e ácido) não apresentaram mudanças significativas na estrutura das moléculas. Os sistemas PVA-42 e RGD apresentaram resultados satisfatórios, como nos casos do RMSD e Rg, que mostraram que o equilíbrio das moléculas foi atingido, embora com algumas mudanças conformacionais. Esses resultados possibilitaram sua utilização nos sistemas mais complexos. Além disso, a estrutura do PVA apresentou boa interação com a água nas funções de distribuição radial analisadas.

Para o estudo das ligações de hidrogênio foram analisados todos os pares possíveis de formar este tipo de ligação. Após os primeiros resultados dessa análise para o sistema 9prgd, surgiu a hipótese de que estas ligações poderiam estar ocorrendo intramolecularmente. Após novas análises de RDF, constatou-se que os dois tipos de ligação (intramolecular e intermolecular) estão presentes. A formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas é um indício da formação de um hidrogel.

Quanto ao sistema que funcionalizava o polímero com o RGD (sistema polipva-rgd), a variação de temperatura não mostrou mudanças significativas para o Rg ou RDF. No entanto, para a temperatura de 310 K, o resultado obtido apresenta indícios de um comportamento termorresponsivo. Para confirmar esse resultado, mais análises e um maior tempo de simulação se fazem necessários. Partindo da molécula de polipva-rgd foi construído o possível hidrogel de PVA, contendo 9 cadeias poliméricas. Análises de Rg e RMSD mostraram que em pH ácido a estrutura se encontra em uma forma mais colapsada, e por consequência, com menor capacidade de reter água. Quanto as ligações de hidrogênio, foram observadas mudanças com a alteração do pH, principalmente na região em que ocorre a adição do HA11.

As mudanças conformacionais de hidrogéis inteligentes são de fundamental importância no desenvolvimento de materiais para utilização em medicina. Diversas mudanças conformacionais de hidrogéis responsivos observadas experimentalmente são difíceis de serem observadas em simulações computacionais devido ao tempo de resposta necessário. O tempo

de simulação é curto (na ordem de nanosegundos) e demora vários dias para ser simulado. Enquanto o tempo necessário para observar tais mudanças experimentalmente pode levar minutos, horas ou até mesmo dias. Mesmo assim, foi possível perceber algumas mudanças na estrutura devido a modificação com o RGD e alteração do pH.

Quando se utiliza esses tipos de materiais em estudos experimentais, alguns resultados são inconclusivos. É difícil afirmar com certeza sobre a quantificação e localização do peptídeo, das reticulações físicas e da interação com a água. Por isso, estudos computacionais de polímeros, sistemas biológicos e outros se fazem tão importantes. Através desse tipo de metodologia é possível elucidar diversas questões levantadas por trabalhos experimentais. A utilização de técnicas computacionais pode trazer novas perspectivas e ajudar na elaboração de novos materiais para a área de biomateriais.

7. PERSPECTIVAS

Mas, para resultados mais concretos, um maior tempo de simulação e análises complementares se fazem necessárias. Outro ponto a ser ressaltado é que foi utilizado apenas um método de reticulação e apenas uma configuração para o sistema que deveria formar o hidrogel. Para um estudo mais completo, poderiam ser feitas as seguintes alterações: utilizar diferentes métodos de reticulação, diferente número de reticulações, variação do número de peptídeos e de unidades de repetição na estrutura. Além disso, pode-se utilizar um método chamado Cross-grained, que é mais simples e possui menor custo computacional, para obter resultados preliminares mais rapidamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Almeida, J. F. S. L.** Preparação e caracterização de Hidrogéis para aplicações biomédicas. *Tese de Doutorado*. s.l. : Universidade de Coimbra, 2010. p. 308.
2. American Chemical Society National Historic Chemical Landmarks. Bakelite: The World's First Synthetic Plastic. *Disponível em* www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/bakelite.html. [Online] [Citado em: 16 de 09 de 2016.]
3. **Rawls, H. R.** Polímeros Dentários. [A. do livro] K. J. Anusavice, C. Shen e H. R. Rawls. *Philips Materiais Dentários*. 12 . Rio de Janeiro : Elsevier, 2013, Capítulo 6, p. 592 p.
4. **Billmeyer, F. W.** The Science of Large Molecules. *Textbook of polymer science*. New York : John Wiley, 1984, Vol. 3rd, pp. 3-21.
5. **Oliveira, Michelle.** Polímeros: o que são, suas aplicações e as áreas de formações técnicas e acadêmicas. *Disponível em* <http://www.ima.ufrj.br/wp-content/uploads/2013/11/30-10.15-Pol%C3%ADmeros-o-que-s%C3%A3o.pdf>. [Online] 2013. [Citado em: 29 de 09 de 2016.]
6. **Mano, E. B. e Mendes, L. C.** Classificação de Polímeros. *Introdução a polímeros*. 2ª. São Paulo : Edgard Blücher, 1999, pp. 13-15.
7. **Stevens, M. P.** *Polymer Chemistry: An Introduction*. 3rd. New York : Oxford, 1999. p. 551.
8. **Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S. e Phillips, G. O.** Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. [ed.] Angelo Carpi. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. Rijeka : InTech, 2011, pp. 117-150.
9. **Kahn, S. e Ranjha, N. M.** Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Polym. Bull.* 2014, Vol. 71, 8, pp. 2133-2158.
10. **Bajpai, S. K., Chand, N. e Soni, S.** Controlled release of anti-diabetic drug Gliclazide from poly(caprolactone)/poly(acrylic acid) hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2015, Vol. 26, 14, pp. 947-962.
11. **Lian, Z. e Ye, L.** Synthesis and properties of carboxylated poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressings. *J. Polym. Res.* 22:72, Vol. 5.

12. **Wei, D., Xiao, W., Sun, J., Zhong, M., Guo, L., Fan, H. e Zhang, X.** A biocompatible hydrogel with improved stiffness and hydrophilicity for modular tissue engineering assembly. *J. Mater. Chem. B.* 2015, Vol. 3, 14, pp. 2753-2763.
13. **Arndt, K-F., Richter, A. e Mönch, I.** Synthesis of Stimuli-Sensitive Hydrogels in the μm and sub- μm Range by Radiation Techniques. [A. do livro] R. Barbucci. *Biological Properties and their Applications.* Milan : Springer, 2009, pp. 121-140.
14. **Sun, T-Y., Liang, L., Wang, Q., Laaksonen, A. e Wu, T.** A molecular dynamics study on pH response of protein adsorbed on peptide-modified polyvinyl alcohol hydrogel. *Biomater. Sci.* 2014, Vol. 2, pp. 419-426.
15. **Crispim, E. G., Piai, J. F., Fajardo, A. R., Ramos, E. R. F., Nakamura, T. U., Nakamura, C. V., Rubrira, A. F. e Muniz, E. C.** Hydrogels based on chemically modified poly(vinyl alcohol)(PVA-GMA) and PVA-GMA/chondroitin sulfate: Preparation and characterization. *eXPRESS Polymer Letters.* 2012, Vol. 6, 5.
16. **de Lima, G. G., Devine, D., de Alencar, C. M., Junqueira, A., Emanuel, R. e Nugent, M. J. D.** Preparation and Characterization of Novel Poly(Vinyl Alcohol) (PVA) and Poly(Acrylic Acid) (PAA) Hydrogels for Sensitive Hydrogels. *1st International Electronic Conference on Materials.* 2014.
17. **Piest, M., Zhang, X., Trinidad, J. e Engbersen, J. F. J.** pH-responsive, dynamically restructuring hydrogels formed by reversible crosslinking of PVA with phenylboronic acid functionalised PPO–PEO–PPO spacers (Jeffamines®). *Soft Matter.* 2011, Vol. 7, 23, pp. 11111-11118.
18. *Clinical Applications of Biomaterials.* NIH. Nov 1-3. NIH Consens Statement 1982. pp. 1-19.
19. **Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K. e Moraes, A. M.** Biomaterials: Types, Applications, and Market. *Química Nova.* 2015, Vol. 38, 7, pp. 957-971.
20. **Homsy, C. A. Ansevin, K. D., O'bannon, W., Thompson, S. A., Hodge, R. e Estrella, M. E.** Rapid in Vitro Screening of Polymers for Biocompatibility. 1970, Vol. 4 (3), p. 615.
21. **Williams, D.F.** *Williams dictionary of biomaterials.* 1st ed. Liverpool : Liverpool University Press, 1999. p. 368.
22. **Ratner, B. D.** The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2011, Vol. 4, 5, pp. 523-527.

23. **Ratner, B. D. e Bryant, S. J.** Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2004, Vol. 6, p. 41.
24. **Wichterle, O. e Lim, D.** Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature.* 1960, Vol. 185, pp. 117-118.
25. **Ratner, B. D.** Biomaterials Science: An Interdisciplinary Endeavor. [ed.] B. D. Ratner, et al., et al. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine.* 1st ed. San Diego : Academic Press, 1996, pp. 1-8.
26. **McNaught, A. D. e Wilkinson, A.** *IUPAC Compendium of Chemical Terminology - "The Gold Book"*. 2nd. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1997.
27. **Okay, O.** General Properties of Hydrogels. [A. do livro] G. Gerlach e K.-F. Arndt. *Hydrogels Sensors and Actuators - Engineering and Technology.* Berlin : Springer, 2009, Vol. 6, pp. 1-14.
28. **De, S. K. Aluru, N. R., IEEE, Member, Johnson, B., Crove, W. C., Beebe, D. J., IEEE, Member e Moore, J.** Equilibrium Swelling and Kinetics of pH-Responsive Hydrogels: Models, Experiments, and Simulations. *Journal of Microelectromechanical Systems.* 2002, Vol. 11, 5, pp. 544-555.
29. **Ebara, M. Kotsuchibashi, Y., Uto, K., Aoyagi, T., Kim, Y., Narain, R., Idota, N. e Hoffman, J. M.** Smart Hydrogels. *Smart Materials.* Japan : Springer, 2014, p. 373.
30. **Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. e Akil, H. M.** Classification, processing and application of hydrogels: A Review. *Materials Science and Engineering C.* 2015, Vol. 57, pp. 414-433.
31. **Petka, W. A. Harden, J. L., McGrath, K. P., Wirtz, D. e Tirrell, D. A.** Reversible Hydrogels from Self-Assembling Artificial Proteins. *Science.* 1998, Vol. 281, 5375, pp. 389-392.
32. **Rosiak, J. M. e Yoshii, F.** Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 1999, Vol. 151, 1-4, pp. 56-64.
33. **Hennink, W. E. e van Nostrum, C. F.** Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2002, Vol. 54, pp. 13-36.
34. **Teixeira, L. S. M. Feijen, J., Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J. e Karperien, M.** Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials.* 2012, Vol. 33, 5, pp. 1281-1290.

35. **Omidian, H. e Park, K.** Hydrogels. [A. do livro] J. Siepmann, Siegel, R. e Rathbone, M. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. New York : Springer, 2012, 4, pp. 75-106.
36. **Berger, J. Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A. e Gurny, R.** Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004, Vol. 57, 1, pp. 19-34.
37. **Muzzarelli, R. A. A.** Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*. 2009, Vol. 77, pp. 1-9.
38. **Rauci, M. G., Alvarez-Perez, M. A., Demitri, C., Giugliano, D., De Benedictis, V. e Sannino, A., Ambrosio, L.** Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2015, Vol. 103, 6, pp. 2045-2056.
39. **Abad, L. V., Saiki, S., Kudo, H., Muroya, Y., Katsumura, Y. e de la Rosa, A. M.** Rate constants of reactions of j-carrageenan with hydrated electron and hydroxyl radical. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*. 2007, Vol. 265, 1, pp. 410-413.
40. **Yoshii, F., Zhao, L., Wach, R. A., Nagasawa, N., Mitomo, H. e Kume, T.** Hydrogels of polysaccharide derivatives crosslinked with irradiation at paste-like condition. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*. 2003, Vol. 208, pp. 320-324.
41. **Wach, R. A., Mitomo, H., Nagasawa N. e Yoshii, F.** Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solution of neutral pH. *Radiation Physics aand Chemistry*. 2003, Vol. 68, pp. 771-779.
42. **Bhattacharya, A. e Misra, B. N.** Grafting: a versatile means to modify polymers - Techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci*. 2004, Vol. 29, pp. 767-814.
43. **Said, H. M., Abd Alla, S. G. e El-Nagger, A. W. M.** Synthesis and characterization of novel gels based on carboxymethyl cellulose/acrylic acid prepared by electron beam irradiation. *Reactive & Functional Polymers*. 2004, Vol. 61, pp. 397-404.
44. **Muir, B. V. O., Myung, D. Knoll, W. e Frank, C. W.** Grafting of Cross-Linked Hydrogel Networks to Titanium Surfaces. *Appl. Mater. Interfaces*. 2014, Vol. 6, 2, pp. 958-966.
45. **Funami, T., Hiroe, M., Noda, S., Asai, I., Ikeda, S. e Nishinari, K.** Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids*. 2007, Vol. 21, pp. 617-629.

46. **Cong, H.-P. Wang, P., e Yu, S-H.** Stretchable and self-healing graphene oxide-polymer composite hydrogels: a dual-network design. *Chem. Mater.* 2013, Vol. 25, pp. 3357-3362.
47. **Yalpani, M.** *Polycaccharides: Sytheses, Modifications and Structure/Porperty Relations.* New York : Elsevier, 2013.
48. **Patel, A. e Mequanint, K.** Hydrogel Biomaterials. [A. do livro] R. Fazel-Rezai. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges.* Rijeka : InTech, 2011, 14, pp. 275-296.
49. **Kozlovskaya, V. Chen, J., Tedjo, C., Liang, X., Campos-Gomez, J., Oh, J., Saeed, M., Lungu, C. T. e Kharlampieva, E.** pH-rsponsive hydrogel cubes for release of doxorubicin in cancer cells. *J. Mater. Chem. B.* 2014, Vol. 2, 17, pp. 2494-2507.
50. **Kim, S. J., Park, S. J. e Kim, S. I.** Properties of smart hydrogels composed of polyacrylic acid/poly(vinyl sulfonic acid)responsive to external stimuli. *Smart Materials and Structures.* 2004, Vol. 13, 2, p. 317.
51. **Singh, V., Bushetti, S. S., Appala, R., Shareef, A., Imam, S. S. e Singh, M.** Stimuli Sensitive Hydrogels: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research.* 2009, Vol. 43, 3, pp. 241-250.
52. **Ende, M. e Peppas, N.** Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels.1. Polymer characterization. *Journal od Applied Polymer Science.* 1996, Vol. 59, 4, pp. 673-685.
53. **Durmaz, S. e Okay, O.** Acrylamide/2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid sodium salt-based hydrogels: synthesis and characterization. *Polymer.* 2000, Vol. 41, pp. 3693-3704.
54. **Baker, J., Stephens, D. R., Blanch, H. W. e Prausnitz, J. M.** Swelling Equilibria for Acrylamide-Based Polyampholyte Hydrogels. *Macromolecules.* 1992, Vol. 25, 7, pp. 1955-1958.
55. **Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. e Ichikawa, H.** Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2000, Vol. 50, pp. 27-46.
56. **Zhang, X., Xu, L., Wei, S., Zhai, M. e Li, J.** Stimuli responsive deswelling of radiation synthesized collagen hydrogel in simulated physiological environment. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2013, Vol. 101, 8, pp. 2191-2201.
57. **Gao, L., Sun, Y., Zhang, W., Li, D., Hou, C. e Liu, Y.** Mechanical behavior of a terpolymer-based pH- and temperature-responsive hydrogel. *J. Polym. Res.* 2015, Vol. 22:221.

58. **Chassenieux, C., Tsitsilianis, C.** Recent trends in pH/thermo-responsive self-assembling hydrogels: from polyions to peptide-based polymeric gelators. *Soft Matter*. 2016, Vol. 12, pp. 1344-1359.
59. **Wang, R-C., Liu, H-J., Tong, J-G. e Chen, Y.** Thermoresponsive poly(vinyl alcohol) derivatives: preparation, characterization and their capability of dispersing gold nanoparticles. *Polym. Chem.* 2014, 5, pp. 2417-2424.
60. **Omidian, H. e Park, K.** Introduction to Hydrogels. [A. do livro] R. M. Ottenbrite, H. Park e T. Okano. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York : Springer-Verlag, 2010, pp. 1-16.
61. **Lin, C.-C. e Metters, A. T.** Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, Vol. 58, pp. 1379-1408.
62. **Peppas, N. A., Hiltz, J. Z., Khademhosseini, A. e Langer, R.** Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* 2006, Vol. 18, pp. 1345-1360.
63. **Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H. e Zhang, J.** Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2000, 02, pp. 9-29.
64. **Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. e Osada, Y.** Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* 2003, Vol. 15, 14, pp. 1155-1158.
65. **Nonoyama, T. e Gong, J-P.** Double-network hydrogel and its potential biomedical application: A review. *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* 2015, Vol. 229(12), pp. 853-863.
66. **Beddoes, C. M., Whitehouse, M. R., Briscoe, W. H. e Su, B.** Hydrogels as a Replacement Material for Damaged Articular Hyaline Cartilage. *Materials*. 2016, Vol. 9, p. 443.
67. **Peppas, N. A. e Merrill, E. W.** Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977, Vol. 11, 3, pp. 423-434.
68. **Martens, P. J., Bryant, S. J. e Anseth, K. S.** Tailoring the degradation of hydrogels formed from multivinyl poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) macromers for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2003, Vol. 4, 2, pp. 283-292.
69. **Nuttelman, C. R., Henry, S. M. e Anseth, K. S.** Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2002, Vol. 23(17), pp. 3617-3626.

70. **Shaheen, S. M. e Yamaura, K.** Preparation of theophylline hydrogels of atactic poly(vinyl alcohol)/NaCl/H₂O system for drug delivery system. *J. Control. Release* . 2002, Vol. 81, 3, pp. 367-377.
71. **Hua, S., Ma, H., Li, X., Yang, H. e Wang, A.** pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010, Vol. 46, 5, pp. 517-523.
72. **Wan, W. K., Campbell, G., Zhang, Z. F., Hui, A. J. e Boughner, D. R.** Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. *J. Biomed. Mater. Res*. 2002, Vol. 63, 6, pp. 854-861.
73. **Tripathi, S., Mehrotra, G. K. e Dutta, P. K.** Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009, Vol. 45, pp. 372-376.
74. **Swartzlander, M. D., Barnes, C. A., Blakney, A. K., Kaar, J. L., Kyriakides, T. R. e Bryant, S. J.** *Biomaterials*. 2015, Vol. 41, pp. 26-36.
75. **Schmedlen, R. H., Masters, K. S. e West, J. L.** Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials*. 2002, Vol. 23(22), pp. 4325-4332.
76. **Kawase M., Miura, N., Kurikawa, N., Masuda, K., Higashiyama, S., Yagi, K. e Mizoguchi, T.** Immobilization of tripeptide growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine on poly(vinylalcohol)-quarternized stilbazole (PVA-SbQ) and its use as a ligand for hepatocyte attachment. *Biol. Pharm. Bull.* 1999, Vol. 22(9), pp. 999-1001.
77. **Wang, R-C., Liu, H-J., Tong, J-G. e Chen, Y.** Thermoresponsive poly(vinyl alcohol) derivatives: preparation, characterization ad their capability of dispersing gold nanoparticles. *Polym. Chem.* 2014, Vol. 5, pp. 2417-2424.
78. **Chiessi, E., Cavalieri, F. e Paradossi, G.** Water and Polymer Dynamics in Chemically Cross-Linked Hydrogels of Poly(vinyl alcohol): A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Phys. Chem. B*. 2007, Vol. 111, pp. 2820-2827.
79. **Altei, Wanessa Fernanda.** <http://www.m3c.ufscar.br/pt-br/difusao/matriz-extracelular>. *A Matriz Extracelular*. [Online] 16 de 12 de 2014. [Citado em: 03 de 10 de 16.]

80. **Frantz, C., Stewart, K. M. e Weaver, V. M.** The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* 2010, Vol. 123, pp. 4195-4200.
81. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P.** *Molecular Biology of the Cell.* 4th. New York : Garland Science, 2002. p. 1392.
82. **Campbell, N. A. e Reece, J. B.** A Tour of a cell. *Biology.* San Francisco : Benjamin Cummings, 2002, Vol. 6th ed, p. 1175.
83. **Nafea, E. H., Poole-Warren, L. A. e Martens, P. J.** Bioactivity of permselective PVA hydrogels with mixed ECM analogues. *Journal of Biomedical Materials Research A.* 2015, Vol. 103A, 12, pp. 3727-3735.
84. Proteínas. [A. do livro] A. Blanco e G. Blanco. *Química Biológica.* 9. Buenos Aires : El Ateneo, 2011, p. 728.
85. **Nagai, R. e Taniguchi, N.** Aminoácidos e Proteínas. [A. do livro] J. W. Baynes e M. H. Dominiczak. *Bioquímica Médica.* 4ª. Rio de Janeiro : Elsevier, 2015.
86. **Nelson, D. L. e Cox, M. M.** Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* 5. Porto Alegre : Artmed, 2011, p. 1274.
87. **Panini, S. R.** Amino Acids and Proteins. *Medical Biochemistry: An Illustrated Review.* New York : Thieme, 2005, p. 453.
88. **Voet, D., Voet, J. G. e Pratt, C. W.** *Fundamentals of Biochemistry.* 4th. Hoboken : Wiley, 2013. p. 1200.
89. **Russel, P. J.** *iGenetics.* 3rd. São Francisco : Benjamin Cummings, 2009. p. 828.
90. **Rodwell, V. W.** Aminoácidos. [A. do livro] R. K. et al Murray. *Harper: Bioquímica.* 8. São Paulo : Atheneu, 1998, p. 860.
91. **Pierschbacher, M. D. e Ruoslahti, E.** Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 1984, Vol. 309, 3, pp. 30-33.
92. **Ortega-Velázquez, R., Díez-Marqués, M. L., Ruiz-Torres, M. P. e Puyol, D. R.** Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide stimulates transforming growth factor β 1 transcription and secretion through integrin activation. *The FASEB Journal.* 2003, Vol. 17, 11, pp. 1529-1531.

93. <http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=9004&showAllSites=true>. *PhosphoSitePlus*. [Online] [Citado em: 03 de 10 de 16.]
94. **Balacheva, A., Illiev, I., Detcheva, R., Dzimbova, T., Pajpanova, T. e Golovinsky, E.** In vitro assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues. *BioDiscovery*. 2012, 4, pp. 1-6.
95. **Guido, R. V. C.** Modelagem e Engenharia de Proteínas. www.gradadm.ifsc.usp.br/dados/20102/FFI0776-1/Aula_05_Campo_de_Forca_dinamica_molecular.pdf. [Online] [Citado em: 11 de 11 de 2016.]
96. **Martínez, L., Borin, I. A. e Skaf, M. S.** Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. [A. do livro] N. H. Morgon e K. Coutinho. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo : Livraria da Física, 2007, p. 539.
97. **Walter, J., Ermatchkov, V., Vrabec, J. e Hasse, H.** Molecular dynamics and experimental study of conformation change of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels in water. *Fluid Phase Equilibria*. 2010, Vol. 296, pp. 164-172.
98. **Berendsen, H. J. C.** Molecular dynamics. *Simulating the Physical World*. Cambridge : Cambridge University Press, 2007, pp. 139-210.
99. **Bielscki, E., Böes, E. S., Strassen, H. e de Andrade, J.** Techniques for force field parametrization. [A. do livro] H. Verli. *Strategies for the Determination of Carbohydrates Structure and Conformation*. Kerala : s.n., 2010, pp. 39-83.
100. **Barsegov, V.** faculty.uml.edu/vbarsegov/teaching/bioinformatics/lectures/ForceFieldModified.pdf. *University of Massachusetts Lowell*. [Online] [Citado em: 21 de 12 de 2016.]
101. **Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. e Kollman, P. A.** A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* 1993, Vol. 97, pp. 10269-10280.
102. **Leland, B., Paul, D., Krueger, B. e Walker, R.** ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial1/section1.htm. *Amber Advanced Tutorials - Tutorial 1*. [Online] 2008. [Citado em: 07 de 11 de 2016.]
103. www.gromacs.org. *GROMACS*. [Online] [Citado em: 18 de 11 de 2016.]
104. **Hess, B., van der Spoel, D. e Lindahl, E.** *Gromacs Users Manual version 4.5.6*. 2010.

105. www.gaussian.com. *The Official Gaussian Website*. [Online] [Citado em: 18 de 11 de 2016.]
106. **Keller, J.** www.uaf.edu/files/chem/ARSCSeminar.pdf. *Introduction to Gaussian*. [Online] 2008. [Citado em: 18 de 11 de 2016.]
107. **Lynch, B. J.** www.comp.chem.umn.edu/chem8021/gv.pdf. *Introduction to GaussView and Gaussian*. [Online] [Citado em: 18 de 11 de 2016.]
108. **Früchtli, H.** www.st-andrews.ac.uk/media/school_of_chemistry/documents/Gaussian.pdf. *Molecular Quantum Chemistry - Gaussian and all that*. [Online] [Citado em: 18 de 11 de 2016.]
109. **Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig H., Shindyalov, I. N. e Bourne, P. E.** The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* 2000, Vol. 28, 1, pp. 235-242.
110. **Rasia, G. M.** *Síntese e Funcionalização de Hidrogéis de poli (álcool vinílico)*. Porto Aegre : s.n., 2014.
111. **Cornell, W. D., Cieplak, P. Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W. e Kollman, P. A.** A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, Vol. 117, pp. 5179-5197.
112. **Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B. e Lindahl, E.** GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013, Vol. 29, 7, pp. 845-854.
113. **Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O. e Shaw, D. E.** Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*. 2010, Vol. 78, 8, pp. 1950-1958.
114. **Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M. e van Gunsteren, W. F. and Hermans, J.** Interactions Models for Water in relation to Protein Hydration. [A. do livro] B. Pullmann. *Intermolecular Forces*. Dordrecht : Springer, 1981, pp. 331-342.
115. **Bussi, G., Donadio, D. e Parrinello, M.** Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007, Vol. 126, 1, p. 014101.
116. **Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. e Pedersen, L. G.** A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 1995, Vol. 103, 19, p. 8577.
117. **Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. e Fraaije, J. G. E. M.** LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 1997, Vol. 18, 12, pp. 1463-1472.

118. www.science.uwaterloo.ca/~cchieh/cact/c120/bondel.html. *Bond Lengths and Energies*. [Online] [Citado em: 06 de 01 de 2017.]
119. **Chaplin, M.** www1.lsbu.ac.uk/water/water_molecule.html. *Water structure and science*. [Online] [Citado em: 06 de 01 de 2017.]
120. **Crescenzi, V. Paradossi, G., Desideri, P., Dentini, M., Cavalieri, F., Amici, E. e Lisi, R.** New hydrogels based on carbohydrate and on carbohydrate-synthetic polymer networks. *Polymer Gels and Networks*. 1997, Vol. 5, pp. 225-239.
121. **Singh, C. U. e Kollmann, P. A.** An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 1984, Vol. 5, 2, pp. 129-145.
122. **Vermonden, T., Censi, R. e Hennink, W. E.** Hydrogels for Protein Delivery. *Chem. Rev.* 2012, Vol. 112, pp. 2853-2888.