



DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DO VÍRUS ZIKA USANDO FIBRAS DE HIDROGEL PVA/ALGINATO HIERARQUIZADAS COM POLIANILINA

Isaac A. M. Frías^{1*}, Danilo M. Silva¹, Jessica M. Oliveira¹

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, UFPE

*Isaac.frias@pq.cnpq.br

INTRODUÇÃO

O uso de polímeros biocompatíveis para criação de nanofibras é muito limitada devido à sua notável interação com a água. Por exemplo, a hidratação do PVA resulta na sua pronta solubilização, pelo que mesmo podendo ser eletrofiado, ao molhar uma fibra pronta, esta será desintegrada imediatamente; por sua vez, o Alginato sofre uma expansão instantânea, e a formação de gel impede que seja eletrofiado. Por estes motivos, a formação de blendas é um processo que vem sendo empregado para permitir a eletrofiação de materiais gelatinosos como o alginato e a manipulação de materiais altamente higroscópicos como o PVA. O uso de este tipo de materiais catalogados como hidrogéis é muito versátil, e embora não venham sendo empregados na forma de nanoestruturas, seu uso abrange a imobilização de microorganismos (Yang *et al.*, 2016), remoção de moléculas contaminantes da água (Lai *et al.*, 2016) ou enriquecimento de biomoléculas (Mahdavinia *et al.*, 2016). Devido à dificuldade de funcionalização de estes materiais, sua aplicação para detecção de moléculas específicas vem sendo pouco explorado, sendo eles empregados para captura eletrostática inespecífica de biomoléculas. O desafio de imobilizar biomoléculas está relacionada à suavidade relativa das reações químicas usadas à maneira de conservar a atividade biológica, muitas vezes ligada à estrutura e grupos funcionais da biomolécula. Neste trabalho estudamos a constituição de uma blenda polimérica de PVA/Alginato empregada para criação de membranas de nanofibras eletrofiadas. As membranas foram estabilizadas com um tratamento de reticulação (crosslinking) realizado com glutaraldeído. Após este tratamento, as membranas formaram um hidrogel capaz de reter água em seus poros mas resistindo sua desintegração, assim, diversas reações químicas realizadas em médio aquoso foram empregadas para recobrir as nanofibras com materiais manométricos (hierarquização). Das membranas hierarquizadas, aquelas com polianilina serviram para imobilizar o anticorpo PAb pela metodologia EDC/NHS com maior sucesso e reprodutibilidade. Esta membrana PValg/PAni/PAb foi empregada para estudar a captura específica do envelope ZV.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Preparo das soluções de PVA/Alginato

A produção de nanofibras PVA + Alginato foi realizada a partir da mistura de duas soluções, uma de PVA e outra de alginato. Para a solução de PVA, 16g de PVA foram solubilizados em 100g de água milli-Q sob aquecimento até 80°C. Para a solução de alginato, 2g de alginato foram solubilizados em 100 g de água milli-Q em temperatura ambiente. Finalmente, ambas as soluções foram misturadas nas seguintes proporções 10g PVA para 10g alginato,

13.34g da solução de PVA para 6.66g da solução de alginato, e 6.66g PVA para 13.34g alginato.

- Parâmetros de eletrofiação

O sistema de eletrofiação consta de uma fonte de alta tensão, uma placa coletora metálica aterrada recoberta com papel alumínio, e uma agulha de injeção (spinnerette) cilíndrica sem ponta, conectada a uma mangueira de alimentação acoplada a uma bomba de infusão. Os parâmetros de eletrofiação foram variados em combinações de 3 níveis (alto, médio, baixo). Voltagem variou entre 24, 12 e 5 KV, distância entre o spinnerette e a placa coletora variou entre 20, 15 e 5 cm e o diâmetro do spinnerette variou entre 18, 16 e 14 G. Um dos melhores parâmetros, útil para todas as soluções testadas foi 24 KV, 15 ou 13 cm de distância e diâmetro 16G. Com estes parâmetros, as amostras foram eletrofiadas com um tempo de processamento de 15 horas, numa velocidade de injeção de 1µL/min. A distância de trabalho entre a agulha e a placa coletora foi de 15 cm.

- Estabilização das fibras PVA + Alginato

As membranas PVA + Alginato foram modificadas pelo processo de reticulação utilizando uma solução contendo 99 mL de metanol, 1 mL de glutaraldeído e 100 µL de ácido clorídrico puro. A solução foi previamente resfriada durante 30 min. As nanofibras foram colocadas na solução e deixadas sob refrigeração. Após 72 horas, as fibras foram retiradas da solução e colocadas em um béquer com água milli-Q. Foi realizada agitação manual, trocando-se a água do béquer, até a observação de pouca formação de espuma.

- Hierarquização das fibras PVA + Alginato

As membranas foram simultaneamente hierarquizadas submersas. Uma vez hidratadas, as fibras foram colocadas na solução do agente redutor para dar início à reação de síntese ou polimerização. As soluções empregadas para PValg/PAni foram as seguintes: sol 1) 15 mL água milliQ+221 µL anilina+ 1.25 mL de ácido clorídrico concentrado; sol 2) 15 mL água milliQ+ 115 mg de APS+ 417 µL de ácido clorídrico.

- Caracterização das membranas

A porosidade foi calculada pelo método de substituição de solvente, para isto, as membranas foram cortadas e deixadas a secar dentro de um dessecador por 7 dias. As fibras foram pesadas em dois tempos, a primeira vez secas e logo após terem passado 1h submersas em água para permitir sua completa hidratação. A composição química das membranas foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho de refletância atenuada (FTIR-ATR), usando um espectrofotômetro UVVIS (Shimadzu UV2600) com suporte de um cristal de seleneto de zinco (ZnSe) e medindo a porcentagem de transmitância (%T) de 700 a 4000 cm⁻¹ com um passo de 4 cm⁻¹.

A topografia e morfologia das membranas foi estudada por microscopia de força atômica (AFM, Shimadzu SPM-9700) com

cantilêvers Tap190Al-G (48 N/m e f_q 190kHz) Budget Sensors, Bulgária. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um microscópio Shimadzu Tescan MIRA3.

- Imobilização de PAB

Antes de começar a imobilização, as fibras a serem empregadas foram lavadas individualmente em volumes de 500 μ L de tampão PBS pH 7.14 até zerar absorção em 280 nm (comprimento de onda para quantificação de proteína). Os métodos de funcionalização explorados foram os seguintes:

- As fibras PVA/Alg pristine e com Pani foram funcionalizadas por imersão em uma solução pH 3.13 de EDC 0.05M / NHS 0.1M (1:1). Passados 30 minutos as fibras foram lavadas individualmente em volumes de 1 mL de PBS pH 3.15 até zerar absorção em 280 nm. A solução de PAB empregada tinha uma concentração inicial de 471.8 μ g/mL e a redução na concentração de proteína na solução foi monitorada por espectroscopia UVvis em 280 nm.

- Captura e Dessorção do Envelope Viral

Uma vez obtidas as membranas hierarquizadas funcionalizadas com o PAB específico para o reconhecimento do envelope viral, cada fibra foi individualmente lavada em 500 μ L de tampão PBS pH 3.14 para liberar qualquer proteína adsorvida por interações inespecíficas, mantendo assim unicamente PAB imobilizado covalentemente. Logo após, a membrana foi equilibrada em tampão PBS 7.14 antes de ser exposta a solução de Envelope viral (CapsZV) em tampão PBS pH 7.14 com uma concentração inicial de 412.7 μ g/mL, e sua captura foi monitorada por espectroscopia UVvis em 280 nm. A dessorção foi realizada lavando as membranas PVA/Alg/Pani/PAB/CapZV em uma solução de glicina:HCl 0.1 M com pH ajustado em pH=2.75. A dessorção foi monitorada por espectroscopia UVvis em 280 nm.

- Medidas Electroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata em um Potenciostato / galvanostato PGSTAT 128 N (Metrohm Autolab Inc., Países Baixos). Os experimentos foram realizados utilizando três eletrodos, um contra eletrodo de platina, um de referência Ag / AgCl saturado com uma solução de KCl e o sensor de trabalho a membrana PVA/Alg/Pani. Todas as medidas foram realizadas na presença de 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}$ / $K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ utilizado como par redox (1: 1, v / v). A resposta da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi analisada em uma faixa de frequência entre 100 mHz e 100 kHz com um potencial de 10 mV. A voltametria cíclica foi realizada em uma faixa de potencial entre -0,2 e +0,7 V com uma taxa de varredura de 50 mV.s⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro foi imobilizado o anticorpo PAB para depois capturar especificamente o CapZV e o método de monitoramento de imobilização continuou sendo a medida de absorção em 280 nm. Realizado desta forma, a membrana PVA/Alg hierarquizada com Pani foi a única que apresentou reprodutibilidade no processo de imobilização do PAB, e são estes os resultados que apresentamos a continuação.

Na **Figura 1** são mostrados os resultados de imobilização de anticorpo, captura e liberação de envelope viral. Na **Figura 1a** pode ser observada uma diminuição gradual da concentração de PAB em relação ao tempo de interação com a membrana PVA/Alg/Pani. A imobilização covalente de 18.66 μ g mL⁻¹ demorou 3.3h apresentando um platô de saturação. Após a imobilização a membrana foi lavada 3 vezes com volumes de 500 μ L de PBS pH 3.15, mesmos que foram analisados por UVvis a 280nm por material desprendido. Nestes lavados só houve um pouco material desprendido no primeiro lavado, no segundo e terceiro não houve mais separação. Após as membranas serem reequilibradas para pH

7.14, estas foram imersas em uma solução de envelope viral concentração inicial de 410 μ g/mL em PBS 7.4.

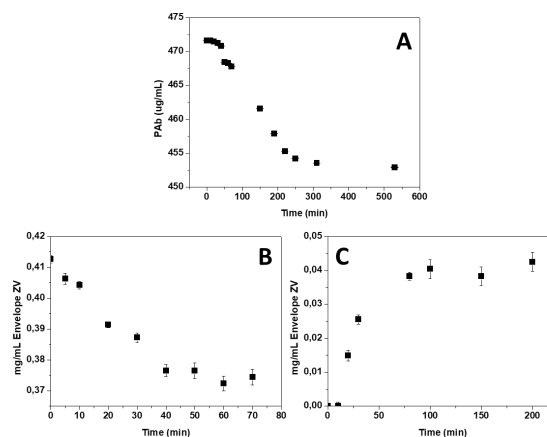


Figura 1. Cinéticas de (A) imobilização de PabZV, (B) captura de EnvelopeZV, e (C) dessorção do Envelope capturado.

Na **Figura 1b** pode ser observado que a captura específica ocorreu gradualmente no período de uma hora, a partir da qual não houve diferença significativa na medida, ao mais provável devido à saturação do PAB. No total foram capturados 38.7 ± 2.5 μ gCaps. Devido a que a interação que ocorre entre o anticorpo e o envelope viral está baseado em forças físico-químicas fracas, procedemos a monitorar a remoção de capsídeo capturado lavando a membrana em 500 μ L de solução de glicina. Na **Figura 1c** pode ser observado que a dessorção demora aproximadamente 1.67h (100 min), com este tempo a dessorção calculada foi de 99.97% (38.29 ± 2.7 μ gCaps). Uma vez ocorrida a dessorção a mesma membrana foi empregada no mesmo processo de captura e dessorção por duas vezes mais, conseguindo as mesmas porcentagens toda vez.

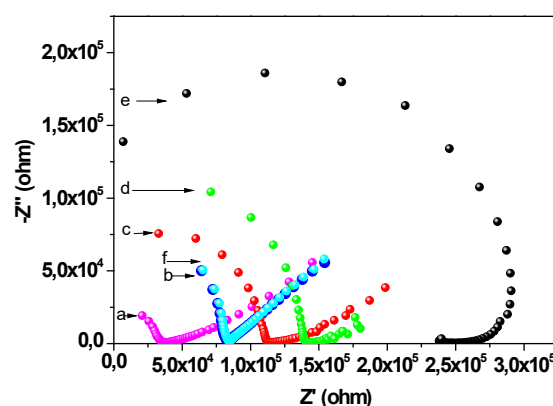


Figura 2. Resposta impedimétrica não-Faradaica da imobilização do anticorpo e captura do envelope viral.

Na **Figura 2** mostramos o processo de captura e dessorção estudado pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. No geral pode ser observado que após a imobilização do Pab e captura do CapZV o tamanho dos semicírculos aumentam; os mesmos estão relacionados com a quantidade de material imobilizado na superfície. Inicialmente o sinal da membrana PAV/Alg/Pani (a) aumenta para (b) após a imobilização do PAB. A interação com amostras de envelope viral (c, d, e) resultam no aumento do tamanho do semicírculo conjuntamente com o aumento na concentração do CapZV. Após a lavagem com a solução de glicina-HCl a resposta da membrana (f) volta próxima da inicial contendo unicamente o PAB (b). Estes

resultados confirmam o processo de imobilização de PAb, captura e liberação de CapZV observados por espectroscopia UVVis. As concentrações das amostras testadas não são conhecidas, pelo que novos testes estão sendo feitos na plataforma eletroquímica para quantificar o limite de detecção e calcular o desvio padrão das medidas realizadas por esta técnica.

CONCLUSÕES

Os tratamentos de estabilização e síntese de nanopartículas oferecem uma ampla variedade de grupos funcionais e superfícies de imobilização que são necessários para explorar a segunda etapa do cronograma, referente à imobilização de capsídeos virais ou moléculas de reconhecimento viral. Neste segundo item, exploramos diferentes características físico-químicas (pH e força iônica) para conseguir realizar a imobilização do anticorpo policlonal IgG anti-ZikaV (PAbZV) e envelope de ZikaV (CapZV) em membranas hierarquizadas de PVA/Alginato. A captura específica e dessorção do CapZV foram monitoradas por espectroscopia ultravioleta visível (U-vis) e de impedância eletroquímica (EIS). Os nossos resultados mostram que a membrana hierarquizada com Pani exibe uma capacidade de captura (microgramas de envelope viral de ZikaV capturado por miligrama de membrana) de 2.72 µgCaps/mg. Desta maneira, 1 cm² de membrana PVAIg/Pani consegue capturar 38.7 ± 2.5 µgCaps com uma dessorção de 99.97% (38.29 ± 2.7 µgCaps), mesmo após ser reutilizada 3 vezes.

REFERÊNCIAS

- LAI, Y.-C. et al. Poly(vinyl alcohol) and alginate cross-linked matrix with immobilized Prussian blue and ion exchange resin for cesium removal from waters. *Bioresource Technology*, v. 214, p. 192-198, 2016/08/01/ 2016. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416305922> >.
- MAHDAVINIA, G. R. et al. Magnetic hydrogel beads based on PVA/sodium alginate/laponite RD and studying their BSA adsorption. *Carbohydrate Polymers*, v. 147, p. 379-391, 2016/08/20/ 2016. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486171630385X> >.
- YANG, J. M. et al. Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly(γ-glutamic acid) electrospun fiber. *Materials Science and Engineering: C*, v. 66, p. 170-177, 2016/09/01/ 2016. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116303769> >.