

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biotecnologia
Curso de Biotecnologia

FABIO BUZATTI NOGUEIRA

Desenvolvimento de sensor eletroquímico para Cromogranina A na saliva.

Uberlândia-MG
2022

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biotecnologia
Curso de Biotecnologia

FABIO BUZATTI NOGUEIRA

Desenvolvimento de sensor eletroquímico para Cromogranina A na saliva.

Monografia apresentada à Coordenação de Biotecnologia
, da Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
Co-orientadora: Dra. Ana Flávia Oliveira Notário

Uberlândia-MG
2022

Agradecimentos:

Gostaria de começar agradecendo à minha família, por ter me apoiado durante toda a graduação. Aos meus colegas de curso pela companhia e suporte durante a graduação. Ao meu orientador, o Prof. Dr. Foued Salmen Espindola e a co-orientadora a Dra. Ana Flávia Oliveira Notário, pela extrema paciência e ajuda para terminar esse trabalho mesmo com todos os trancos e barrancos da pandemia. Às equipes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e do Laboratório de Nanobiotecnologia, sempre dispostos em me ajudar com materiais, metodologia e realização dos experimentos.

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para análise da proteína cromogranina A (sCgA) na saliva. A saliva como fluido de diagnóstico oferece boas vantagens sobre outros fluidos, tais como aspecto econômico, método de coleta não invasivo e biossegurança. O diagnóstico pela saliva pode ser aplicado para o monitoramento da saúde oral e sistêmica, progressão de doenças e avaliação dos estados fisiológicos alterados pelo estresse e exercício físico. No fluido salivar, a sCgA é co-liberada pela glândula submandibular e possui funções anti-fúngicas e anti-microbianas. Alguns estudos mostraram uma dinâmica similar na secreção de sCgA em comparação à alfa-amilase salivar durante situações estressantes. Outro objetivo foi validar o sensor testando em amostra de saliva de voluntários que realizaram o protocolo de exercício para um treinamento policial avançado. Após a padronização, foi possível relacionar as variações da quantidade de sCgA e das leituras dos biossensores, indicando a viabilidade do biossensor.

Palavras-chave: Biossensor, Cromogranina A, Saliva, Estresse, Biomarcador.

Abstract

In this paper we developed an eletrochemical sensor for the analysis of the Chromogranin A protein (sCgA) in saliva. Saliva, as a diagnostics fluid, offer advantages over other fluids, like it's low cost, non-invasive gathering method and safety. Saliva based diagnosis can be applied in the monitoring of oral and systemic health, progression of diseases and evaluation of the alteration caused by stress and physical exercise. In the salivary fluid, sCgA is co-released by the submandibular gland and has antifungal and antimicrobial functions. Some studies have shown a similarity in the dynamics of sCgA secretion when compared with alpha-amylase during stressful situations. Another objective was to validate the sensor by testing in saliva sampled from volunteers who performed an advanced police training exercise. After the standardization we have compared the variation in the quantity of sCgA and the biosensor readings, showing that it is a viable biosensor.

Key Words: Biosensor, Chromogranin A, Stress, Saliva, Biomarker.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Estresse, um processo biológico.....	1
1.2 Cromogranina A.....	2
1.3 Biossensores.....	3
1.4 Biossensores de Cromogranina.....	5
2. Objetivos	
2.1 Objetivos Gerais.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3. Metodologia	
3.1 Coleta de saliva de participantes de treinamento físico.....	10
3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	11
3.3 Ensaio Eletroquímico	11
4. Resultados e Discussão	
4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	12
4.2 Ensaio Eletroquímico.....	13
5. Conclusão	19
6. Referências Bibliográficas	20

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração representado o esquema geral de um biossensor.	4
Figura 2. Detecção simultânea de Cromograninas como múltiplos marcadores tumorais neuroendócrinos no soro do paciente com um imunossensor eletroquímico ultrasensível e anti-incrustante	6
Figura 3. Forma Molecular da Rodamina 6G.....	7
Figura 4. Avaliação da variação individual dos níveis de sCgA dos participantes ao longo do dia	12
Figura 5. Comparação entre voltametrias cíclicas após a limpeza.....	15
Figura 6. Comparação de voltametrias cíclicas de eletrodos novos padronizados.....	15
Figura 7: Comparação das voltametrias da amostra e da amostra com anticorpo.....	16
Figura 8. Comparação da voltametria cíclica entre a amostra e amostra com o anticorpo.....	16
Figura 9. Destaque para o pico de oxidação.....	17
Figura 10. Comparação entre os gráficos do teste ELISA para quantificar a sCgA nas amostras de saliva e o resultado dos testes com o biossensor.....	18

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse, um processo biológico

Com o aumento do ritmo da vida urbana atual, junto com cobranças cada vez mais imediatas e constantes, o estresse tem se tornado um problema de saúde pública crescente, apresentando vários efeitos negativos tanto no aspecto físico quanto no mental. É uma constante sobrecarga sobre as relações humanas, causando uma diminuição na percepção de autossatisfação e uma deficiência no ajuste psicológico (KANNER et al, 1981, LINN e ZEPPA, 1984). O estresse ocupacional é visto como um problema emergente graças ao custo financeiro que seu tratamento acarreta aos indivíduos e organizações. Sem uma estratégia adequada para lidar com o estresse ocupacional, os casos de tensão, ansiedade, hostilidade e depressão tendem a aumentar. (TEIXEIRA et al 2015).

Em resposta ao estresse, o organismo gera uma série de respostas, a fim de se proteger e garantir sua sobrevivência (CHROUSOS e GOLD, 1992). Porém, quando o estado de estresse é constante, a resposta deixa de ser saudável e passa a ser mal adaptativa, com consequências negativa ao organismo. Muitos aspectos da vida que, mesmo não qualificando como estresse, tem efeitos negativos sobre a saúde. (MCEWEN, 1998). Respostas ao estresse de maneira aguda ou crônica podem comprometer várias funções fisiológicas essenciais ao organismo, impactando negativamente o crescimento, a regulação do organismo, reprodução etc.

Quando sujeito a estresse decorrente do exercício físico, o organismo libera vários componentes, tanto na saliva quanto no sangue, que podem ser usados como marcadores de intensidade (BESSA et al., 2013; BOCANEGRA et al., 2012). Usar a saliva como fluido de diagnóstico oferece vantagens em relação aos outros fluidos, primeiramente por ser um método de coleta não invasivo e oferecer maior biossegurança ao profissional que realiza a coleta, além de aspectos econômicos, devido a sua facilidade de transporte, coleta e armazenamento (MALAMUD, 2011). Tal diagnóstico pode ser aplicado no monitoramento da saúde oral, sistêmica, avaliação dos estados fisiológicos e progressão de doenças alteradas pelo estresse (MALATHI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015).

1.2 Cromogranina A

No ser humano a principal fonte de cromogranina A (CgA) é a medula supra-renal. Outros locais neuroendócrinos como axônios simpáticos e várias glândulas endócrinas parecem influenciar a concentração basal circulante da CgA. A secreção da CgA por exocitose ocorre a partir dos terminais nervosos simpáticos e as células cromafins, quando as catecolaminas são liberadas. Perturbações no funcionamento do sistema nervoso simpático resultam em alterações correspondentes nos níveis de CgA no plasma (KANNO, ASADA, YANASE, IWANAGA, & YANAIHARA, 2000). Durante exercícios de alta intensidade, as concentrações de norepinefrina plasmática e a CgA estiveram correlacionadas, sugerindo a CgA como um marcador da atividade simpática periférica (TAKIYYUDDIN et al (1991).

A saliva é constituída por água e uma mistura complexa de proteínas, enzimas, hormônios, íons e outros compostos. Em relação ao conteúdo protéico, podemos destacar a amilase, lipase, aldolase, anidrase carbônica, mucinas, histatinas, imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, cistatinas, proteínas ricas em prolina, albumina, fibronectina e cromogranina A (HUQ et al., 2007)

No fluido salivar, a cromogranina A (sCgA) é co-liberada pela glândula submandibular e possui funções anti-fúngicas e anti-microbianas. Alguns estudos mostraram uma dinâmica similar na secreção de sCgA em comparação à alfa-amilase salivar (sAA) durante situações estressantes como na apresentação de aulas para cursos de graduação (FILAIRE et al., 2009), exercício moderado (ALLGROVE, GOMES, HOUGH, & GLEESON, 2008) e provas de desempenho cognitivo (KANAMARU, KIKUKAWA, & SHIMAMURA, 2006).

No estudo realizado pela equipe do Laboratório (BOCANEGRA et al., 2012) ressalta que variações nas concentrações de CgA sanguínea e salivar após o exercício também foi atribuído a um maior impulso simpático e ativação da medula adrenal. Considerando que tanto que a sAA quanto sCgA são responsivas às mudanças na atividade autonômica, eles especularam que um aumento nas concentrações de sCgA, como de sAA, também refletiria a cinética do lactato sanguíneo durante o exercício incremental. Desse modo, nesta pesquisa (BOCANEGRA et al., 2012) foi investigado a variação nos níveis de lactato salivar (sLac) e sanguíneo (bLac), sAA e sCgA durante um teste incremental em nadadores e compararam sua dinâmica com a taxa de acumulação de bLac. A hipótese testada foi que (1) sangue e lactato salivar mostram um padrão

semelhante de variação durante e após exercício e (2) o limiar de lactato seria representado também pela variação de sAA e sCgA. Os resultados desta pesquisa mostraram que a concentração de bLac é altamente correlacionada com sLac durante o exercício incremental, mesmo com rápidos aumentos no ritmo de trabalho. Além disso, que as concentrações de sCgA, como com sAA, mostraram um ponto de inflexão durante o exercício incremental. Os pontos de inflexões relatados para sCgA e sAA ocorreram em a mesma taxa de trabalho que a do bLac e foram comprovadamente úteis para a determinação do limiar de lactato. Os achados deste estudo (BOCANEGRA et al., 2012) forneceram evidências para o valor da sCgA como um marcador de intensidade de exercício em homens bem treinados.

A partir da semelhança nessas dinâmicas, a sCgA tem o potencial de ser um bom biomarcador, incentivando o aperfeiçoamento de sua detecção.

1.3 Biossensores

Biossensores são dispositivos capazes de converter um sinal biológico em um outro tipo de resposta, a qual pode ser quantificada com o auxílio de dispositivos eletrônicos. As pesquisas envolvendo sistemas mais eficientes e para diversas aplicações tem aumentado nos últimos anos. Isso porque esse tipo de sistema permite a obtenção de diagnósticos clínicos e laboratoriais de maneira mais rápida e específica. Além disso possuem vantagens no manuseio e transporte, quando comparados aos robustos equipamentos atuais (WANG, 2006). Os biossensores estão sendo estudados para realizar análises rápidas, sensíveis e não invasivas, podendo contribuir para o tratamento e acompanhamento da evolução da doença (WANG, 2006).

Uma detecção precoce aumenta consideravelmente as chances de tratamento de muitas doenças, logo um equipamento com uma alta sensibilidade, capaz de detectar os marcadores de interesse ainda no estágio inicial, é de vital importância para garantir a eficiência do tratamento. Diante de tais fatos, os biossensores se mostram uma alternativa barata e de baixo custo capaz de tornar mais eficaz o diagnóstico e análise laboratorial, podendo detectar várias moléculas biológicas diferentes, com eficácia e sensibilidade altas.

Biossensores podem ser classificados pelo princípio de funcionamento do transdutor e pelos elementos biológicos de reconhecimento. O transdutor é o equipamento que traduz o sinal biológico para um sinal legível e processável. O tipo de sinal classifica os biossensores como óticos, piezoelétricos, térmicos e eletroquímicos. E na categoria de biossensores eletroquímicos, existem os amperométricos, baseados na corrente mensurável, os potenciométricos baseados no potencial ou acúmulo de carga na superfície e os condutimétricos que medem a variação na condutividade do meio (THÉVENOT et al., 2007).

Os elementos biológicos de reconhecimento podem classificar um biossensor como catalítico, se baseado em enzimas ou elementos biológicos baseados em enzimas. Se o biossensor for baseado em anticorpos, ligantes sintéticos, lectinas e ácidos nucleicos é classificado como biossensor com reconhecimento por afinidade. Imunossensores são biossensores com reconhecimento por afinidade de anticorpos somente (PALCHETTI & MASCINI, 2010).

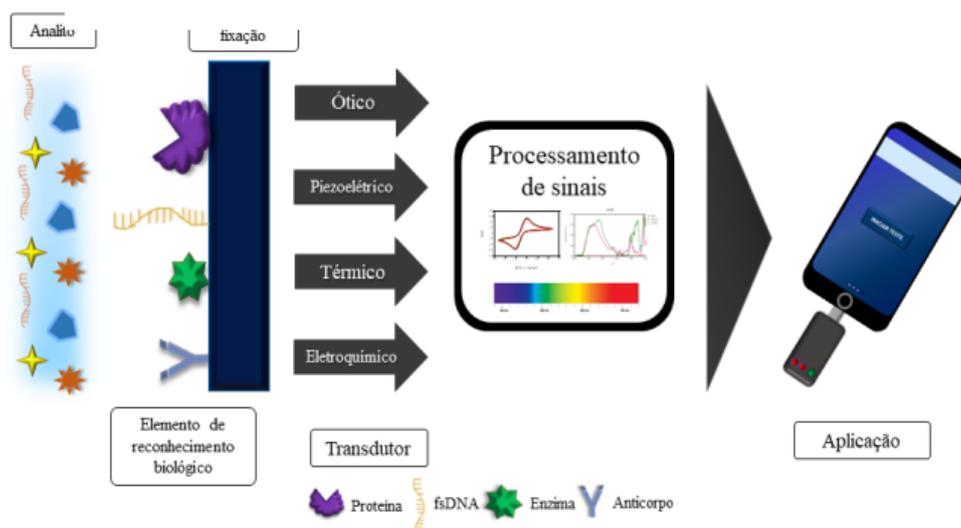


Figura 1: Esquema geral de um biossensor. (Fonte: Notário, A.F.O (2020))

O sensor utilizado nesse estudo é o eletroquímico, que tem como princípio o movimento de íons e difusão de espécies eletroativas. No reconhecimento por afinidade a detecção dessas espécies é feita durante a oxidação e redução de uma sonda eletroquímica utilizada (MEHRVAR & ABDI, 2004).

O sistema é formado por um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de trabalho. Nos sensores utilizados, os eletrodos são feitos de grafite. O eletrodo

de trabalho funciona como um elemento transdutor da reação, além de ser o local onde ocorre a fixação das moléculas de reconhecimento biológico. O eletrodo de referência mantém o potencial de trabalho estável (GRIESHABER et al., 2008). Nesse sistema, os eletrodos são conectados à um potenciostato, e a corrente elétrica é transmitida através de uma solução contendo o objeto de interesse e uma solução de suporte inerte à reação. É esse eletrólito o responsável pelo controle difusional das espécies (GANDRA et al., 2004).

Dentre as técnicas amperométricas mais utilizadas está a voltametria, com todas as suas variações de forma de leitura e captação de dados. É baseada nos fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho. A interface é a região formada pela superfície desse eletrodo e uma camada de solução adjacente. É uma técnica considerada dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de uma corrente elétrica, medida em função de um potencial controlado aplicado entre o eletrodo de trabalho e o de referência (ALEIXO LM, 2018). A informação é obtida em função da variação da corrente elétrica que surge entre os sensores de trabalho e auxiliar. Essa corrente é proporcional à concentração da espécie eletroativa, permitindo a elaboração de um sensor qualitativo e quantitativo (PACHECO et al., 2013).

1.4 Biossensores de Cromoganina

O ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio imunorradiométrico (IRMA) e radioimunoensaio (RIA) são amplamente utilizados na quantificação de CgA em soro/plasma (VERDERIO et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2015). Limitações próprias destes métodos dificultam sua utilização para exames clínicos de rotina. Por isso pesquisas que visam a determinação de CgA de forma direta e em tempo real são necessárias (DRESCHER et al., 2018; JEBELLI et al., 2020). O desenvolvimento de um chip sensor CgA com o anticorpo CgA (CgA-Ab) foi imobilizado no chip sensor CM5 (CgA-Ab-CM5) em condições ideais (pH 5,0, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por ressonância plasmônica de superfície (SPR), foi validada como uma técnica simples e livre de marcadores, para quantificar CgA (XIAO et al., 2021). O biossensor apresentou simplicidade de operação, alta sensibilidade e confiabilidade na detecção de CgA com uma faixa de detecção de 0,2-187 ng mL^{-1} , que cobre a variedade da maioria das doenças. Além disso, o chip sensor CgA-Ab-CM5 pode obter os resultados em tempo real e ser reutilizado mais de 300 vezes o que atende aos requisitos para monitorar o nível de CgA em amostras clínicas (XIAO et al., 2021).

A imunodeteccção de CgA por biossensor foi desenvolvida também no estudo de MINAMIKI et al., (2016). Eles realizaram o biossensor de transistores orgânicos de efeito de campo (OFETs) e apontaram como um dos melhores candidatos para dispositivos químicos/biossensores devido à sua processabilidade de baixo custo e flexibilidade mecânica sem marcação elétrica. Usaram um dispositivo OFET com portão estendido imobilizado com anticorpo anti-CgA. O limite de deteção (0,11 $\mu\text{g/mL}$ na saliva artificial) foi comparável ao do sensor baseado em OFET já relatados na literatura. Consideraram também que embora o valor do limite de deteção (LOD) estimado (~ 2 nM) seja sete vezes maior que o nível fisiológico de hCgA ($\sim 0,3$ nM), a sensibilidade pode ser melhorada por circuitos elétricos baseados em OFET. Preconizaram também que o dispositivo fabricado é muito mais simples e rápido do que o imunoenensaio convencional (por exemplo, ELISA) para deteção de hCgA (o tempo de ensaio é de ~ 30 min). Estes resultados ainda que preliminares sobre os imunossensores baseados em OFET podem abrir caminho para uma nova abordagem no monitoramento dos níveis de hCgA para condições de saúde humana na vida diária.

No estudo de Liu et al., (2021) um imunossensor eletroquímico sem rótulo ultrasensível e anti-incrustante foi construído para análise simultânea dos biomarcadores de tumores neuroendócrinos, a cromogranina A (CgA) e cromogranina B (CgB).

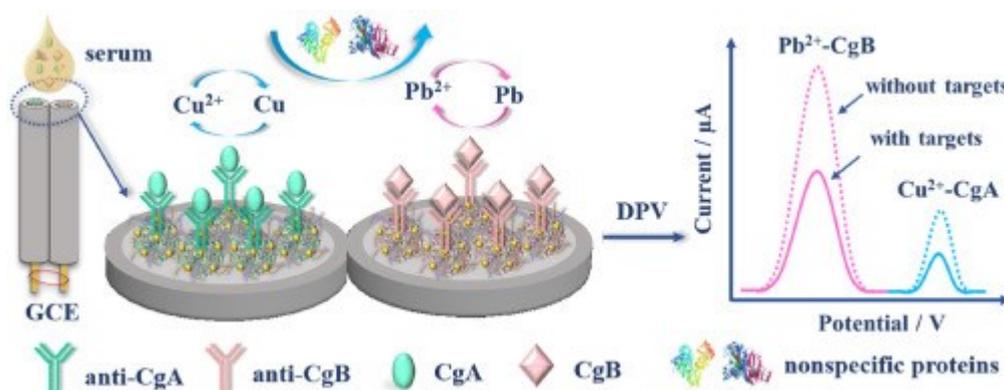


Figura 2. Deteção simultânea de Cromograninas como múltiplos marcadores tumorais neuroendócrinos no soro do paciente com um imunossensor eletroquímico ultrasensível e anti-incrustante (LIU et al., 2021).

Para alcançar a deteção eletroquímica múltipla, sinais eletroquímicos devem ser obtidos de forma apropriados e distinguíveis em diferentes potenciais para diferenciar os biomarcadores correspondentes. Entre muitas espécies eletroativas, íons metálicos, como íons Cd, Zn Cu e Pb, que possuem potenciais de pico independentes, seriam uma escolha ideal para realizar análises de múltiplos analitos devido à sua resposta eletroquímica

altamente sensível e processo de detecção simples (PUTNIN et al., 2019). O imunossensor fabricado (LIU et al., 2021) apresentou excelente sensibilidade, boa seletividade, estabilidade satisfatória e amplas faixas lineares em 6 ordens de magnitude. Os autores destacaram que também, este biossensor foi viável para detectar níveis de CgA e CgB em amostras de soro reais obtidas de pacientes clínicos com tumores neuroendócrinos, que tiveram boa consistência com o ELISA.

Para o desenvolvimento do biossensor de sCgA proposto neste estudo, investigou o uso de rodamina 6G. Rodamina 6G é um corante altamente fluorescente da família rodamina. É frequentemente usado como um corante traçante em água para determinar a taxa e direção de fluxo e correntes. Corantes rodamina fluorescem e, portanto, podem ser detectados facilmente e de forma barata com instrumentos chamados fluorômetros. A fórmula molecular da Rodamina 6G ($C_{28}H_{29}ClN_2O_3$) é indicada abaixo. A rodamina 6G é solúvel em água e em diversos solventes orgânicos. Seu peso molecular é 479,02g/mol e possui densidade de 1,26.

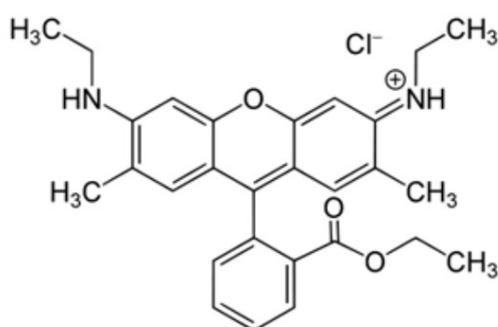


Figura 3. Forma molecular da Rodamina 6G.

Normalmente corantes catiônicos deste tipo são usados em lasers e como moléculas de prova em diversas aplicações biológicas, principalmente por causa de sua baixa toxicidade, eficiência quântica, pequena dependência de fatores ambientais, e suas características fluorescentes não se alteram ao longo de várias horas se sua solução aquosa for continuamente agitada. Sua solubilidade em água é baixa e dessa maneira há uma tendência à formação de agregados que chamamos de dímeros. A formação de dímeros é caracterizada por uma mudança no espectro de absorção em torno do seu pico principal no espectro visível. Uma maneira de resolver este problema é através do uso de surfactantes iônicos com carga oposta, neste caso, um surfactante aniônico, que devido à sua forte interação com o corante promoverá micelas mistas na solução (MACEDO 2012). Patente de pesquisa realizada no LabNanos/IBTEC/UFU pela Dra. Ana Flavia Oliveira Notário e equipe desenvolveu uma técnica para modificar, estabilizar,

funcionalizar e reutilizar a superfície de eletrodos serigrafados aplicando a rodamina 6g como um composto orgânico que modifica a área de trabalho, possibilitando a criação de imunossensores que utilizam proteínas ou seus fragmentos biológicos ou sintéticos, antígenos, anticorpos, peptídeos, enzimas DNA, RNA e aptâmeros como analitos ou como elemento de reconhecimento biológico (Patente Nº: BR 102019006678-4 A2).

Com isso, o sensor desenvolvido nesse estudo é um biossensor de reconhecimento por afinidade. Um imunossensor eletroquímico baseado na utilização de anticorpos anti-cromogranina A para a detecção dessa proteína através de voltametrias cíclicas. Tem como base a imobilização de anticorpos nos eletrodos screen-printed modificados com rodamina 6G.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um biossensor eletroquímico para a detecção de Cromogranina A (CgA) em amostras de indivíduos sob estresse.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Recuperar eletrodos utilizados.
- 2 - Desenvolver uma plataforma eficiente para a adsorção de proteínas.
- 3 - Padronizar processamento e diluição das amostras de saliva.
- 4 - Utilizar amostras coletadas para validar o sensor construído.
- 5- Comparar os resultados obtidos utilizando o novo biossensor com resultados obtidos por metodologia padrão de reconhecimento de Cromogranina A

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta de saliva de participantes de treinamento físico.

Foram coletadas amostras de saliva não estimulada de três policiais (amostras que serão denominadas de indivíduos A, B e C) por meio de dispositivos absorventes Salivette® (Sarstedt, Newton, NC, EUA) durante um treinamento físico de policiais do 17º Batalhão da Polícia Militar do Estado de Minas Gerais em Uberlândia. As coletas foram realizadas no dia da pré-prova e prova de habilidade de tiro, e cada coleta durou em média 3 minutos. As amostras salivares foram coletadas durante o treinamento, no dia em que houve a prova de tiro: antes de iniciar a prova, após o intervalo do almoço e após a prova de habilidade de tiro. Logo após as coletas, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados em freezers a -80°C até a realização das análises. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer CEP nº: 1.067.144).

3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay -(ELISA)

A técnica de ELISA do tipo indireto foi realizada como metodologia padrão-ouro para a identificação de sCgA nas amostras de saliva. A detecção se deu por meio de anticorpo comercial monoclonal para CgA (anti-CgA) e a revelação do ensaio foi feita utilizando anticorpo secundário espécie-específico conjugado com biotina para revelação pelo complexo biotina-estreptoavidina-HRP e OPD. A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro leitor de placas em comprimento de onda 492 nm.

3.3. Ensaio Eletroquímico

Para a construção do biossensor foram utilizados eletrodos *screen printed* de grafite (C110, Dropsens). O potenciostato utilizado foi o modelo PalmSens 3 (PalmSens®) com o software PsTrace® fornecido pela empresa fabricante do equipamento. Neste estudo será utilizado o anticorpo monoclonal anti- Cromogranina A para realização do biossensor (Millipore, Temecula, CA).

A saliva foi diluída na proporção de 1:5 em água MilliQ, o anticorpo anti-cromogranina A em 1:50 em água MilliQ. Para a rodamina 6G (R6G), foi feita uma

solução de 500 $\mu\text{g/mL}$ em água MilliQ. Os eletrodos foram modificados com R6G e armazenados para serem usados nos testes.

Duas estratégias foram testadas, na primeira delas, após a modificação os eletrodos foram incubados com o anticorpo anti-CgA, lavados e depois incubados com a saliva. A segunda estratégia foi feita colocando esses elementos em ordem inversa, primeiro a saliva foi colocada sobre o eletrodo e depois foram incubados com o anticorpo anti-CgA, lavado e lido.

Além de testes de padronização, foram feitos testes para recuperação do eletrodo, depois de utilizados esses eletrodos eram lavados com álcool 70% e submetidos a novas leituras eletroquímicas.

Todas as leituras foram feitas utilizando as técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. A solução de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; $\text{F}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), chamada de ferro-ferri, foi utilizada como eletrólito suporte para as leituras. Os padrões de leitura como janela de potencial e velocidade de varredura foram otimizados ao longo da construção do sensor.

Com a padronização feita, os testes foram executados. Primeiro, os eletrodos eram limpos com água MilliQ e sensibilizados com rodamina 6G, para facilitar a adesão do anticorpo anti-Cromogranina A. Em cada uma das voltametrias é utilizado 80 μL de ferro-ferri como eletrólito de suporte. O primeiro teste consistia numa voltametria cíclica do eletrodo limpo, a fim de obter o valor de controle. Após a limpeza, era pingado 2 μL da amostra e deixado secar sobre o sensor. Com a amostra seca, era feita mais uma voltametria. Por fim, era pingado 2 μL de anticorpo anti-Cromogranina A e deixado secar. A terceira voltametria cíclica era então feita. Os dados obtidos eram salvos e os eletrodos limpos e armazenados. Os testes eram feitos em duplicata.

3.4 Análise estatística

Todos os dados foram tratados utilizando a versão 9.0 do software GraphPad Prism®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* -(ELISA),

O teste ELISA foi realizado utilizando amostras dos voluntários durante o dia da prova de tiro. Como já mencionado, as amostras foram coletadas de manhã, tarde e após a prova de tiro no fim do dia. Dessa forma, foi feito um gráfico com uma curva para avaliação da presença da sCgA ao longo do dia nesses indivíduos, utilizando a média dos valores do teste feito em triplicata. O marcador foi avaliado somente em relação à presença e ausência nas amostras, portanto, os gráficos permitem avaliar quando houve aumento ou diminuição comparando o indivíduo com ele mesmo. (Figura 4)

É possível observar que na primeira coleta os indivíduos B e C tinham quantidades maiores de sCgA quando comparados com o indivíduo A. Ao longo do dia, os níveis de sCgA detectados variaram para o indivíduo C, que teve uma queda significativa, comparando aos níveis iniciais. Os voluntários A e B mantiveram níveis menos variáveis ao longo do dia.

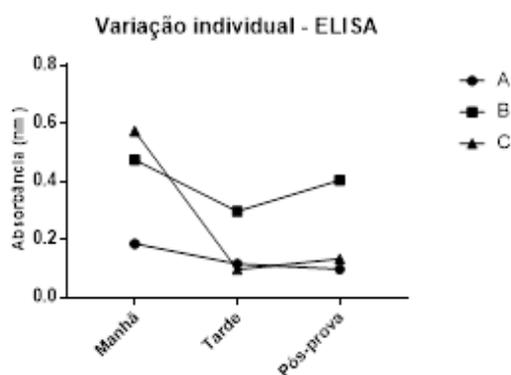


Figura 4. Avaliação da variação individual dos níveis de sCgA dos participantes ao longo do dia. (Fonte: Próprio autor)

Existe uma variação perceptível nos níveis de sCgA na saliva dos participantes ao longo do dia e que também difere de pessoa para pessoa. Tal variação pode ter várias razões, desde particularidades da fisiologia de cada participante até como respostas a situações estressantes. Todos os participantes começaram o dia com uma quantidade maior de sCgA, diminuindo ao longo do dia e voltando a aumentar após a prova de tiro. A sCgA tem capacidade de ser um bom biomarcador para situações de estresse, tanto na questão física quanto na psicológica (ALLGROVE, GOMES, HOUGH, & GLEESON,

2008;BOCANEGRA et al , 2012). Uma hipótese provável é que os participantes tenham acordado mais estressados e foram se acalmado durante o dia, para então voltarem a se preocupar com a bateria final de testes culminando na prova de tiro.

Esta hipótese estaria de acordo com os dados de pesquisa realizado pelo grupo do Laboratório (DIAZ et al., 2013) que investigaram as associações da vida real entre cortisol, estados de humor e desempenho, avaliando 11 atletas profissionais durante os primeiros 2 dias de uma das principais competições de natação do calendário brasileiro de natação. Eles descobriram que distúrbios de humor mais altos estavam relacionados a níveis mais altos de cortisol antes da competição. Os autores apontam como aplicações práticas do estudo realizado que a capacidade de lidar com situações estressantes é essencial para um desempenho no mais alto nível de competição. Os dados deste estudo sugerem que quando o cortisol é incluído na avaliação psicofisiológica de atletas, treinadores e psicólogos esportivos devem considerar a obtenção de amostras antes e em resposta à competição, pois a concentração de cortisol nesses pontos certamente fornece informações mais precisas sobre como os atletas lidam com estresse. Considerando que a resposta ao estresse é adaptativa, tais perfis de cortisol fornecem informações prognósticas úteis sobre os estilos de enfrentamento. Tem sido documentado que o treinamento sob pressão aumenta o desempenho durante os períodos de ansiedade. Estas informações podem contribuir para o entendimento dos níveis de sCgA observado nestes voluntários, que apesar de um n amostral muito pequeno, poderá servir de base para a prova de conceito do biossensor de CgA desenvolvido nesta pesquisa.

4.2 Ensaio Eletroquímico

Primeiramente, foi feita a padronização dos eletrodos e dos testes. Esse processo consistiu em testes que variaram as concentrações de amostra (saliva), anticorpo, rodamina 6G etc. Esses testes foram fundamentais para determinar o protocolo a ser seguido durante as medições finais para obter os melhores resultados. Além dos testes de padronização, foram feitas várias tentativas de limpeza para determinar se seria possível reaproveitar os eletrodos, e o quão forte era a adesão das proteínas aos eletrodos de grafite.

Um dos maiores desafios iniciais foi estabilizar as leituras devido à sensibilidade de leitura dos eletrodos. Foram vários testes até elaborar a maneira correta de preparo e manuseio dos equipamentos afim de eliminar o máximo de variações possíveis. Incluso

nesse desafio estava a limpeza e tentativa de reutilização dos eletrodos, para aproveitar o máximo possível os eletrodos disponíveis.

As figuras 5 e 6 mostram a diferença de resposta dos eletrodos após a limpeza, onde dois eletrodos tiveram que ser descartados, e uma leitura padronizada feita com eletrodos virgens. Na figura 5 estão as leituras de eletrodos usados selecionados aleatoriamente após a limpeza, o que resultou na mistura de grupos diferentes. Apresentam leituras bastante divergentes entre si. Como essas leituras foram feitas utilizando apenas o ferro-ferri como eletrólito de suporte, essas variações fora do padrão esperado indicam que a limpeza não foi eficaz. Como não foi possível recuperar esses eletrodos, nem confirmar a causa dessas variações, eles foram descartados. Já a figura 6 mostra a leitura inicial de eletrodos novos, também utilizando apenas ferro-ferri como eletrólito de suporte. O segundo eletrodo (E2) foi descartado por apresentar problemas de leitura, provavelmente devido à mal contatos ou acidentes durante o processo.

Além de todas as leituras saírem dentro dos valores esperados, todas seguem o mesmo comportamento, com picos de oxidação e redução bem distintos, que é o ideal na elaboração do biossensor.

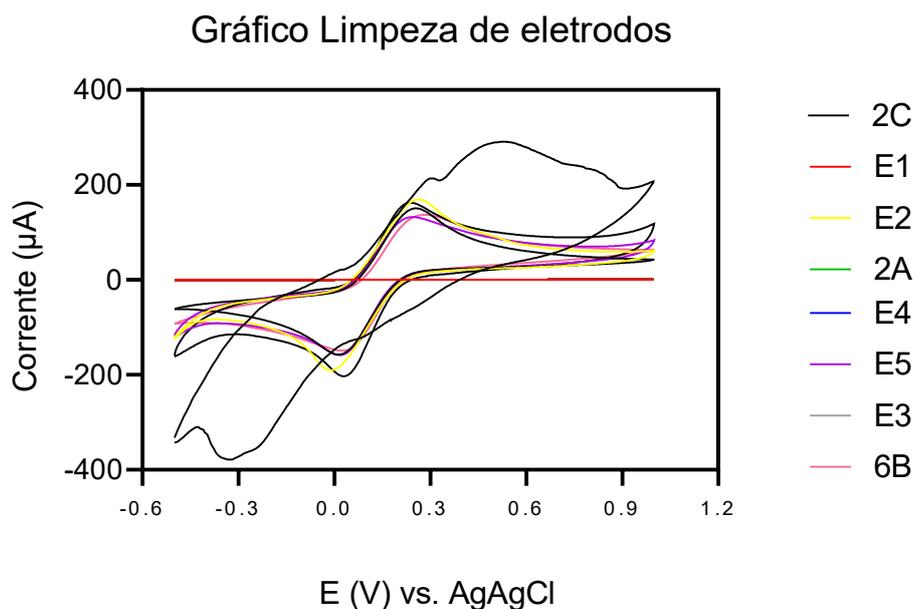


Figura 5. Voltametrias de eletrodos após a limpeza. (Fonte: Próprio autor)

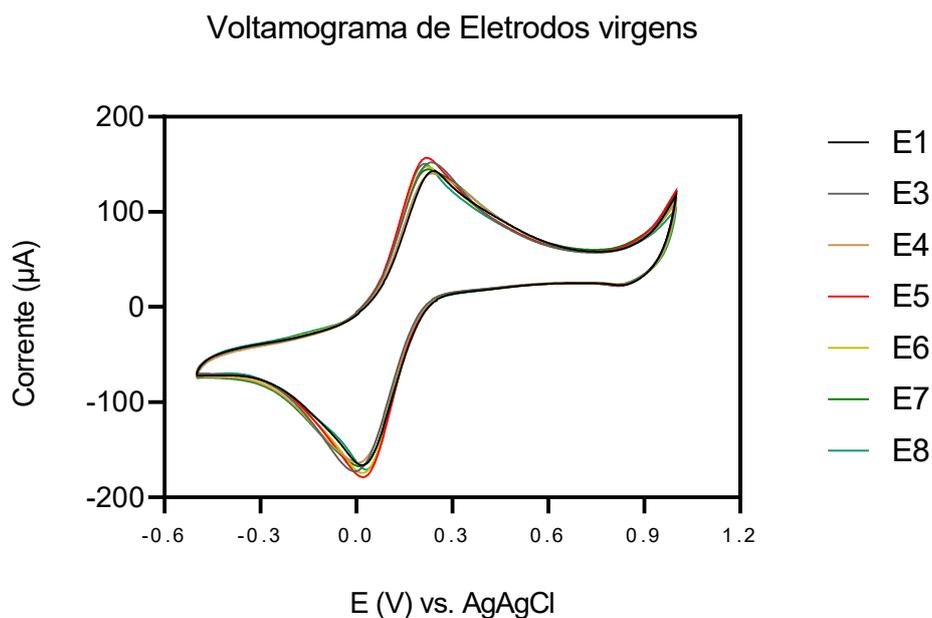


Figura 6. Voltametrias de eletrodos virgens padronizados. Fonte: Próprio autor

Durante a padronização, percebeu-se que o anticorpo sozinho não conseguia aderir adequadamente ao eletrodo de carbono. Para corrigir isso foi necessária a inversão da ordem usual de preparação, fixando primeiro a amostra ao eletrodo para depois incubar uma solução contendo o anticorpo. Essa estratégia melhorou a sensibilidade e detecção dos testes, resultados observados nos gráficos de voltametria analisados.

Com os eletrodos padronizados, foram então feitos os testes utilizando as amostras de saliva e anticorpos anti-Cromogranina A. O gráfico a seguir é um exemplo dos testes realizados, e mostra a diferença entre a voltametria de um eletrodo com salive e um com saliva e anticorpo.

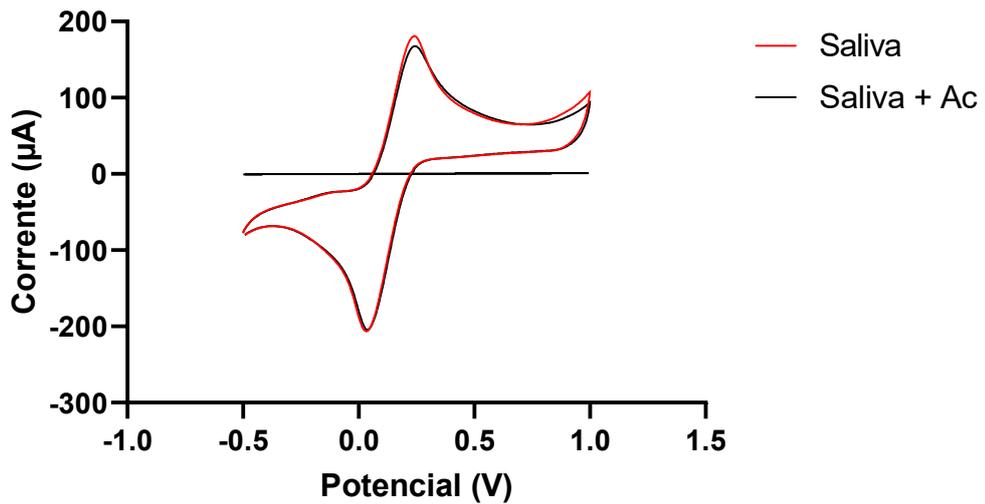


Figura 7: Comparação das voltametrias da amostra e da amostra com anticorpo

Os gráficos foram montados utilizando a média da duplicata das amostras de um dos participantes.

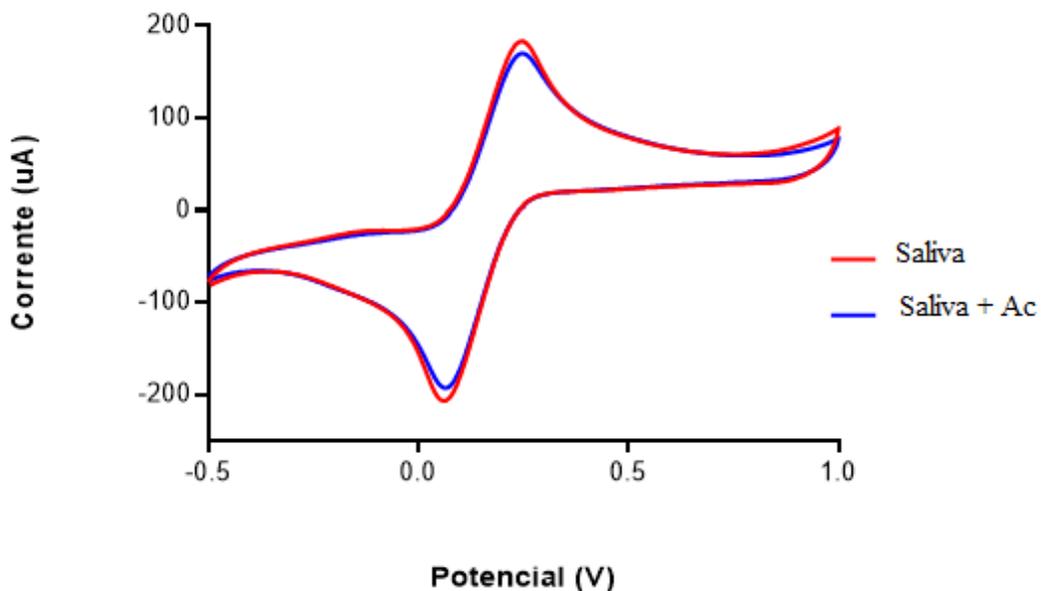


Figura 8: Gráfico comparando a média entre as voltametrias cíclicas das amostras de saliva e saliva+anticorpo. (Fonte: Próprio autor)

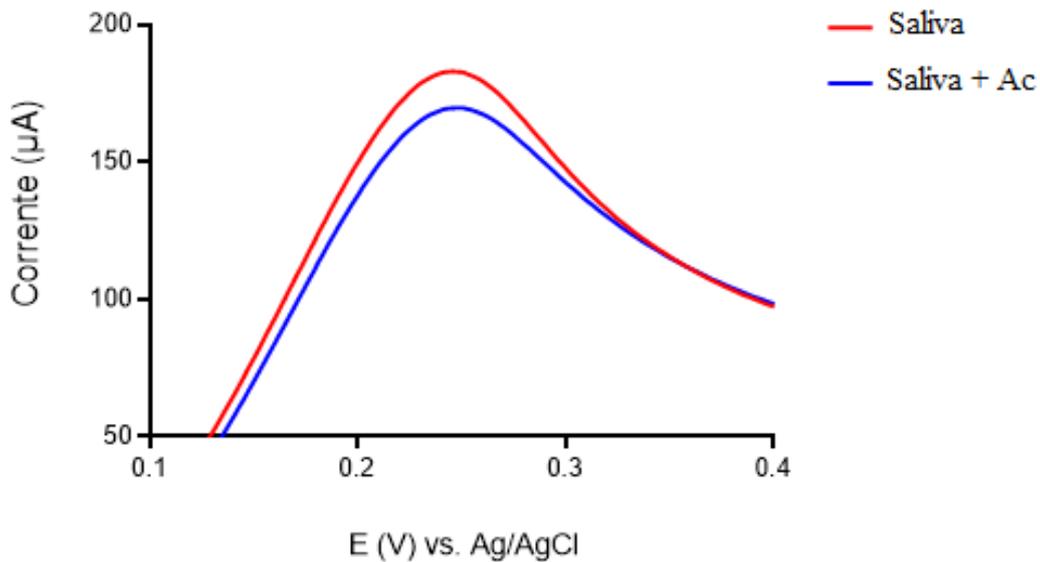


Figura 9: Destaque do pico de oxidação da figura 7. (Fonte: Próprio autor.)

Os gráficos da figura 8 demonstram a variação da corrente captada pelo biossensor de uma amostra contendo apenas saliva e de uma contendo saliva e anticorpo anti-CgA, com a figura 9 sendo o zoom no pico de oxidação para destacar a diferença de corrente entre as amostras. Essa diferença de corrente é importante, pois a diminuição dos valores de corrente nos picos de oxidação é resultado da adesão de mais material ao eletrodo. Logo, como a corrente do pico de oxidação da leitura de amostra mais o anticorpo é menor que o da leitura da amostra sozinha, isto indica a adesão com sucesso do anticorpo ao eletrodo. Com o sucesso da adesão do anticorpo ao eletrodo, se torna possível a elaboração do biossensor.

Com isso, podemos comparar as variações de sCgA detectadas pelo ELISA e com os dados obtidos pelos biossensores. Na figura 10 os gráficos estão lado a lado, com o gráfico A sendo a variação detectada pelo ELISA e B a comparação da variação de corrente detectada pelos biossensores nas amostras. O gráfico B foi montado com as diferenças de correntes entre as amostras com e sem anticorpos, como a demonstrada na figura 8.

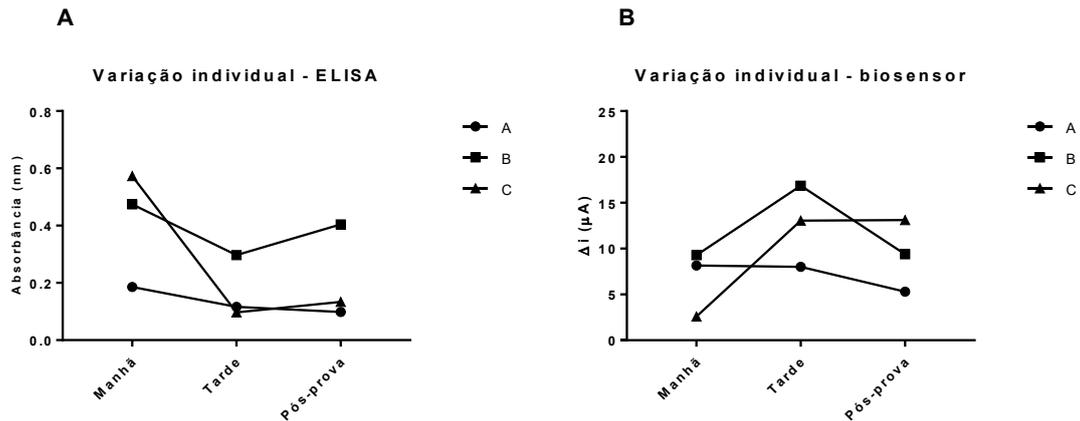


Figura 10: Gráficos comparando os resultados obtidos pelo ELISA em A e pelo biossensor em B (Fonte: Próprio Autor)

O gráfico B utiliza a variação das correntes lidas nas voltametrias cíclicas. Logo, quanto maior essa diferença, menor é a corrente após a adsorção material nos sensores. Isso indica uma maior quantidade de material adsorvidos na superfície do eletrodo. Porém, esse resultado saiu o contrário dos obtidos pela ELISA. Isso pode ser devido às técnicas utilizadas na montagem do sensor, ou outras razões. Seriam necessários mais testes para elucidar essa questão, mas não foi possível.

Mesmo não dando um bom resultado quantitativo, ainda podemos extrapolar um resultado qualitativo do biossensor. Nesses estágios iniciais ele já se demonstra capaz de detectar tanto a presença quanto as variações dos níveis de sCgA nas amostras.

Mais estudos são necessários para aprimorar a plataforma que foi desenvolvida e estudar as formas de interação entre as amostras biológicas e a modificação de superfície proposta. É importante também que mais amostras sejam utilizadas para elucidar as diferenças nas concentrações que foram encontradas quando os dois métodos são comparados.

Estudos recentes, como Liu et al, (2021) e Xiao et al,(2021) citados anteriormente demonstraram ser possível a elaboração desse tipo de sensor, apesar de utilizarem metodologias diferentes. O que demonstraria que a elaboração completa do sensor para sCgA é possível com mais amostras e testes.

5. CONCLUSÃO

Com o protocolo de limpeza seguido, foi possível a reutilização de alguns dos eletrodos. Porém sucessivas reutilizações e limpezas fizeram a qualidade das leituras cair. Portanto, somente a primeira limpeza e reutilização é recomendada.

Após o sucesso da padronização, o sensor foi validado indicando a sua capacidade de perceber tanto a presença quanto a variação de Cromogranina A nas amostras de saliva analisadas. Isso se deu através da comparação dos resultados apresentados com os dados obtidos através do teste ELISA feito nas mesmas amostras de saliva. Porém não foi possível a quantificação dessas variações com os testes realizados.

Essa plataforma de análise para sCgA é promissora e esses resultados preliminares sugerem que um número maior de amostras e testes forneceriam uma base suficiente para a elaboração de um biossensor quantitativo para a detecção de sCgA na saliva humana

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.Jebelli, F.Oroojalian, F. Fathi, A. Mokhtarzadeh and M. Guardia, *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 169, 112599.

Aleixo LM. Voltametria: conceitos e técnicas. *Rev. Chemkeys* [Internet]. 17º de setembro de 2018 ;(3):1-21. Disponível em: <https://econtents.bc.unicamp.br/inpec/index.php/chemkeys/article/view/9609>

Allgrove, J. E., Gomes, E., Hough, J., & Gleeson, M. (2008). Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men. *Journal of Sports Sciences*, 26(6), 653-661. doi:10.1080/02640410701716790

Bessa A, Oliveira VN, De Agostini GG, Oliveira RJ, Oliveira AC, White G, Wells G, Teixeira DN, Espindola FS. Exercise intensity and recovery: Biomarkers of injury, inflammation and oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2013, Apr 18.

Bocanegra OL, Diaz MM, Teixeira RR, Soares SS, Espindola FS. Determination of the lactate threshold by means of salivary biomarkers: chromogranin A as novel marker of exercise intensity. *Eur J Appl Physiol*. 2012, 112:3195-203.

Bortolini MJ, De Agostini GG, Reis IT, Lamounier RP, Blumberg JB, Espindola FS. Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. *Res Q Exerc Sport*. 2009, 80:604-10.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992 Mar 4;267(9):1244-52.

Díaz MM, Bocanegra OL, Teixeira RR, Tavares M, Soares SS, Espindola FS. The relationship between the cortisol awakening response, mood states, and performance. *J Strength Cond Res*. 2013 May;27(5):1340-8. doi: 10.1519/JSC.0b013e318267a612.

Díaz Gómez, M. M., Bocanegra Jaramillo, O. L., Teixeira, R. R. & Espindola, F. S. Salivary Surrogates of Plasma Nitrite and Catecholamines during a 21-Week Training Season in Swimmers. *PLoS ONE*. 2013b, 8, e64043.

Díaz MM, Bocanegra OL, Teixeira RR, Soares SS, Espindola FS. Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load. *Int J Sports Med*. 2013a,34:8-13.

D. G. Drescher, D. Selvakumar and M. J. Drescher, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 2018, 110, 1–30.

Gandra, Paulo Guimarães et al. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. *Química nova*. v. 27, n. 6, p. 6, 2004.

J. Gao, H. Tong, Z. Huang, R. Liu, X. Li, O. Qiang and C. Tang, *Anal. Methods*, 2013, 5, 3201–3206.

Kanamaru, Y., Kikukawa, A., & Shimamura, K. (2006). Salivary chromogranin-A as a marker of psychological stress during a cognitive test battery in humans. *Stress* (Amsterdam, Netherlands), 9(3), 127-131. doi:10.1080/14769670600909594

Kanner AD, Coyne JC, Schaefer C, Lazarus RS. Comparison of two modes of stress measurement: daily hassles and uplifts versus major life events. *J Behav Med* 1981 Mar;4(1):1-39

Kanno, T., Asada, N., Yanase, H., Iwanaga, T., & Yanaihara, N. (2000). Salivary secretion of chromogranin A. Control by autonomic nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 482, 143-151. doi:10.1007/0-306-46837-9_11

Linn BS, Zeppa R. Stress in junior medical students: relationship to personality and performance. *J Med Educ*. 1984 Jan;59(1):7-12

Liu, X., Li, Y., He, L., Feng, Y., Tan, H., Chen, X., & Yang, W. (2021). Simultaneous detection of multiple neuroendocrine tumor markers in patient serum with an ultrasensitive and antifouling electrochemical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 194, 113603. doi:10.1016/j.bios.2021.113603

Macedo, E. R. *Fotofísica das Rodaminas B e 6G: Processos Fotocatalíticos e de Engrandecimento da Fluorescência*. Juazeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais – UNIVASF, 2012. Dissertação de Mestrado, 3 p.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am*. 2011, 55(1):159-78. PMID: 21094724.

Malathi N, Mythili S, Vasanthi HR. Salivary diagnostics: a brief review. *ISRN Dent*. 2014, 158786.

McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann NY Acad Sci*. 1998 May 1;840:33-44

Mehrvar, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Anal Sci*. v. 20, n. 8, p. 1113-26, 2004.

Minamiki T, Minami T, Sasaki Y, Wakida SI, Kurita R, Niwa O, Tokito S. Label-Free Detection of Human Glycoprotein (CgA) Using an Extended-Gated Organic Transistor-Based Immunosensor. *Sensors (Basel)*. 2016 Nov 30;16(12):2033. doi: 10.3390/s16122033.

Notário, Ana Flávia Oliveira. *Modificações de eletrodos com nanomateriais para detecção de infarto agudo do miocárdio em biossensor eletroquímico*. 2020. 73 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.550>

Filho, Luiz Ricardo Goulart *et al.* **PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODOS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS**. Depositante: Universidade Federal de Uberlândia. Procurador:

CIRINO ALBERTO GOULART EIRELI. BR nº 102019006678-4 A2. Depósito: 02 de abril de 2019. Concessão: 06 de outubro de 2020

Palchetti, I.; Mascini, M. Biosensor Technology: A Brief History. In: Sensors and Microsystems: ed., v. cap. Chapter 2, p.15-23, 2010.

Pacheco, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. Revista Virtual de Química. v. 5, n. 4, 2013.

Putnin, T., Ngamaroonchote, A., Wiriyakun, N., Ounnunkad, K., Laocharoensuk, R., 2019. Microchimica Acta 186, 1–12.

Verderio, R. Dittadi, E. Marubini, S. Pizzamiglio, M. Gion, L. De Apollonia, A. Paradiso and G. Italian, Network for Quality Assessment of Tumor Biomarkers, Clin. Chem. Lab. Med., 2007, 45, 1244–1250.

Ramachandran, P. Bech, K. G. Murphy, M. E. Caplin, M. Patel, S. Vohra, M. S. Khan, W. S. Dhillon, R. Sharma, F. F. Palazzo, Z. Win, T. Tan, B. Khoo, K. Meeran, A. Frilling, M. A. Ghatei, S. R. Bloom and N. M. Martin, J. Clin. Endocrinol. Metab., 2015, 100, 1520–1528

Takiyyuddin, M. A., Baron, A. D., Cervenka, J. H., Barbosa, J. A., Neumann, H. P., Parmer, R. J., Sullivan, P. A., et al. (1991). Suppression of chromogranin-A release from neuroendocrine sources in man: pharmacological studies. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 72(3), 616-622.

Thévenot, Daniel R. et al. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. Analytical Letters. v. 34, n. 5, p. 635-659, 2007.

Teixeira RR, Díaz MM, Santos TV, Bernardes JT, Peixoto LG, Bocanegra OL, Neto MB, Espindola FS. Chronic stress induces a hyporeactivity of the autonomic nervous system in response to acute mental stressor and impairs cognitive performance in business executives. PLoS One. 2015, 10(3):e0119025.

Wang, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. Biosensors and Bioelectronics, v.21, p.1887-1892, 2006

Xiao Y, Tai Y, Quan X, Zhao C, Liu R, Tong H, Huang Z, Tang C, Gao J. Quantification of chromogranin A using a surface plasmon resonance-based biosensor. Anal Methods. 2021 Sep 2;13(34):3772-3778. doi: 10.1039/d1ay00782c.