



Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico à base de nanozimas para deteção de lactato, no contexto da prática desportiva

RAFAELA MOREIRA TERESO

outubro de 2025

**Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico
à base de nanozimas para deteção de lactato, no
contexto da prática desportiva**

Rafaela Moreira Tereso

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica**

Orientador: Gabriela Ferreira de Vasconcelos Martins

Co-orientador: Felismina Teixeira Coelho Moreira

Júri:

Presidente:

Joaquim Alves, Professor Adjunto, ISEP

Vogais:

Doutora Gabriela Martins, Investigadora, CIETI/LabRISE, ISEP

Doutora Ana Patrícia Moreira, Investigadora, Centi

Resumo

O lactato é um importante metabolito do organismo humano, mais conhecido como uma fonte energética valiosa formada durante o exercício físico. No músculo, o lactato é formado em condições de falta de oxigênio e, após ser sintetizado, caracteriza-se também por transmitir informações valiosas sobre a fisiologia corporal. Por este motivo, é monitorizado regularmente para avaliar o desempenho atlético e apoiar as decisões de treino, prevenindo eventuais lesões. A detecção de lactato no suor surge como uma alternativa não invasiva à análise sanguínea. No entanto, os dispositivos de detecção convencionais são complexos, dispendiosos e inadequados para utilização contínua e em tempo real. Assim, torna-se crucial melhorar os métodos de monitorização do lactato de forma a que estes sejam rápidos, precisos e também viáveis para aplicações desportivas.

Os biossensores eletroquímicos surgem como uma nova abordagem, permitindo uma análise de baixo custo, precisa e em tempo real. No presente estudo, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico modificado com nanoenzimas, mais especificamente nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4), otimizado para a detecção de lactato no suor. Para o desenvolvimento deste biossensor o material de suporte utilizado foi um elétrodo serigrafado impresso de carbono.

Os elétrodos foram inicialmente modificados com nanopartículas magnéticas e diversos polímeros, como alginato, Nafion e quitosano. A resposta eletroquímica foi avaliada através da técnica de voltametria cíclica (CV), utilizando calibrações de lactato em soluções de pH neutro, alcalino e ácido. O sensor foi otimizado tendo em conta diversos parâmetros, incluindo concentração das nanopartículas, número de camadas aplicadas no elétrodo, temperatura da mufla e velocidade de varrimento utilizada nas medições. De seguida, as nanopartículas magnéticas foram funcionalizadas com β -ciclodextrina, de forma a aumentar a afinidade pelo analito. Por fim, foram realizados estudos de interferência com outros compostos presentes no suor, incluindo calibrações de lactato em amostras de suor sintético, de modo a avaliar o desempenho e o potencial de utilização do sistema em condições reais.

O biossensor otimizado apresentou uma resposta linear no intervalo de concentrações entre $50 \mu\text{mol/L}$ e 2mmol/L , com um limite de detecção (LoD) de $7,1 \mu\text{mol/L}$ e um R^2 de 0,9988. Adicionalmente, o sensor demonstrou seletividade na presença de potenciais interferentes do suor, como a creatinina, a ureia e a glucose, bem como uma boa resposta nos ensaios realizados em suor sintético.

Este biossensor revelou ser sensível, seletivo e reprodutível para a detecção do lactato no suor, podendo a sua abordagem ser aplicada em futuras investigações para sistemas de monitorização contínua.

Palavras-chave: Lactato, Biossensor, Nanoenzimas, Eletroquímica, Nanopartículas magnéticas de ferro, Suor, Polímeros, β -ciclodextrina

Abstract

Lactate is an important metabolite in the human body, best known as a valuable energy source formed during physical exercise. In muscles, lactate is formed in conditions of oxygen deprivation and, after being synthesized, it also transmits valuable information about the body's physiology. For this reason, it is regularly monitored to assess athletic performance and support training decisions, preventing possible injuries. The detection of lactate in sweat emerges as a non-invasive alternative to blood analysis. However, conventional detection devices are complex, expensive, and unsuitable for continuous, real-time use. It is therefore crucial to improve lactate monitoring methods so that they are fast, accurate, and also viable for sports applications.

Electrochemical biosensors offer a new approach, enabling low-cost, accurate, real-time analysis. In the present study, an electrochemical biosensor modified with nanoenzymes, more specifically magnetic iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles, was developed and optimized for the detection of lactate in sweat. For the development of this biosensor, the support material used was a screen-printed carbon electrode.

The electrodes were initially modified with magnetic nanoparticles and various polymers, such as alginate, Nafion, and chitosan. The electrochemical response was evaluated using cyclic voltammetry (CV), using lactate calibrations in neutral, alkaline, and acidic solutions. The sensor was optimized taking into account several parameters, including nanoparticle concentration, number of layers applied to the electrode, muffle temperature, and scan rate used in the measurements. Next, the magnetic nanoparticles were functionalized with β -cyclodextrin to increase their affinity for the analyte. Finally, interference studies were performed with other compounds present in sweat, including lactate calibrations in synthetic sweat samples, in order to evaluate the performance and potential use of the system under real conditions.

The optimized biosensor showed a linear response in the concentration range between 50 $\mu\text{mol/L}$ and 2 mmol/L , with a limit of detection (LoD) of 7.1 $\mu\text{mol/L}$ and an R^2 of 0.9988. In addition, the sensor demonstrated selectivity in the presence of potential sweat interferents, such as creatinine, urea, and glucose, as well as a good response in tests performed on synthetic sweat.

This biosensor proved to be sensitive, selective, and reproducible for the detection of lactate in sweat, and its approach could be applied in future research for continuous monitoring systems.

Keywords: Lactate, Biosensor, Nanoenzymes, Electrochemistry, Magnetic iron nanoparticles, Sweat, Polymers, β -cyclodextrin

Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças ao apoio, dedicação e incentivo de várias pessoas, às quais não posso deixar de expressar o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de manifestar a minha gratidão à minha orientadora, Gabriela Martins, pela sua constante disponibilidade, pelos ensinamentos transmitidos e pela orientação rigorosa e atenciosa ao longo de todo este percurso. A sua dedicação, paciência e incentivo foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Agradeço igualmente a toda a equipa do LabRISE, pela forma calorosa com que me acolheram e por todo o ambiente de entreatajuda e partilha que tornaram esta experiência tão enriquecedora. Um agradecimento especial à Inês Vinagre e à Jacinta Ricardo, pelo apoio, pela disponibilidade constante e por todos os momentos de aprendizagem e companheirismo.

Aos meus amigos da faculdade - Maria, Mariana, Inês (loira), Rafael, AP, Gonçalo e Ricardo - agradeço por todos os momentos partilhados, pelas conversas, pelas gargalhadas e por tornarem este percurso muito mais leve. Um agradecimento muito sentido e especial à Inês, ao Vasco e à Ana, por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais exigentes. Obrigada pela paciência, pelo apoio incondicional e por me lembrarem, mesmo nos dias mais difíceis, que era capaz. A vossa amizade foi (e é) essencial para manter a força e o equilíbrio.

Às minhas amigas de infância - Dias, Mariana, Sofia, Bruna e Filipa - agradeço por continuarem a ser um porto seguro, por acreditarem em mim e por todo o carinho e apoio incondicional que me têm dado ao longo dos anos. A vossa presença constante foi um verdadeiro conforto.

Por fim, e de forma muito especial, quero expressar o meu mais profundo agradecimento aos meus pais. Obrigada por todo o amor, paciência e incentivo que sempre me deram. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu duvidava, e por me ensinarem o valor do esforço e da perseverança. Todo este caminho, e esta conquista, são tanto meus como vossos.

A todos, o meu mais sincero obrigada!

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e pertinência	1
1.2	Questão e objetivos de investigação	2
1.3	Metodologia	2
1.4	Apresentação do laboratório de investigação	3
1.5	Estrutura do documento	3
2	Revisão de Literatura	5
2.1	Fundamentos do lactato	5
2.1.1	Lactato como molécula sinalizadora	6
2.1.2	Fluidos na monitorização do lactato	8
2.1.3	Métodos de deteção	10
2.2	Biossensores	12
2.2.1	Estrutura de um biossensor	12
2.2.2	Características de um biossensor	13
2.2.3	Classificação de biossensores de acordo com a tipologia do elemento de biorreconhecimento	14
2.2.4	Nanoenzimas	18
2.2.5	Classificação de biossensores de acordo com a tipologia de transdutor	21
a.	Sensores potenciométricos	25
b.	Sensores amperométricos	25
c.	Sensores voltamétricos	26
d.	Sensores impedimétricos	27
2.3	Biossensores eletroquímicos para deteção de lactato no suor	29
3	Procedimento Experimental	32
3.1	Material e equipamento	32
3.2	Soluções	34
3.3	Síntese das partículas magnéticas	34
3.4	Medições eletroquímicas	35
3.5	Preparação e modificação dos elétrodos	36
3.6	Incorporação de β -ciclodextrina nas partículas magnéticas e calibração do biossensor	39
3.7	Cálculo da área eletroativa dos elétrodos	40
3.8	Estudos dos interferentes e do suor sintético	40
3.9	Estudos de caracterização	41
3.9.1	SEM	41

3.9.2	TEM.....	41
3.9.3	FTIR	41
4	Resultados e Discussão	43
4.1	Caracterização eletroquímica dos elétrodos	43
4.2	Efeito de diferentes polímeros a diferentes pHs na detecção do lactato	47
4.2.1	pH neutro	47
4.2.2	pH básico	49
4.2.3	pH ácido	51
4.3	Otimização de parâmetros experimentais.....	53
4.3.1	Concentração de partículas magnéticas	54
4.3.2	Número de camadas	54
4.3.3	Temperatura da mufla	55
4.3.4	Velocidade de varrimento	56
4.3.5	Calibrações.....	57
4.4	Funcionalização das partículas magnéticas	59
4.5	Cálculo da área eletroativa.....	60
4.6	Intervalo linear e limite de detecção	63
4.7	Caracterização morfológica e físico-química	65
4.7.1	SEM.....	65
4.7.2	TEM.....	66
4.7.3	FTIR	67
4.8	Estudo de interferentes	68
4.9	Suor sintético: estudo e calibrações	69
5	Conclusão	71
6	Referências	73

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática do metabolismo da glicólise e formação de lactato. Imagem adaptada de (Phypers & Pierce, 2006).....	6
Figura 2- Representação da fração molar entre a forma protonada (ácido láctico) e a forma desprotonada (lactato) em função do pH. Imagem adaptada de (Payan et al., 2023).....	7
Figura 3- Relação entre intensidade do exercício, a disponibilidade de oxigênio e produção de lactato. Imagem adaptada de (T. Huang et al., 2025).....	8
Figura 4- Fluidos biológicos utilizados para a monitorização de lactato: invasivo (sangue) e não invasivos (lágrimas, saliva, suor). Imagem adaptada de (G. Yang et al., 2024).....	9
Figura 5- Comparação entre métodos tradicionais e métodos avançados de monitorização contínua. Imagem adaptada de (Luo et al., 2021).	11
Figura 6- Componentes principais de um biossensor. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i> ..	13
Figura 7- Classificação dos biossensores de acordo com os elementos de biorreconhecimento. Imagem adaptada de (Tetyana et al., 2021).	15
Figura 8- Estrutura de um anticorpo. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i>	16
Figura 9- Esquema do processo SELEX. Imagem adaptada de (Stangherlin et al., 2025).	18
Figura 10- Principais classes de nanoenzimas. Imagem adaptada de (R. Yang et al., 2025).....	19
Figura 11- Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores. Imagem adaptada de (Tetyana et al., 2021).....	22
Figura 12- Esquema de funcionamento de um biossensor ótico. Imagem adaptada de (Damborský et al., 2016).	23
Figura 13- Esquema de uma célula eletroquímica de três elétrodos (C-SPE). Imagem adaptada de (Metrohm DropSens, 2025b).	25
Figura 14- Exemplo de um voltamograma cíclico reversível. Imagem adaptada de (Dickinson, 2013).....	27
Figura 15- Gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de (Leva-Bueno et al., 2020).	28
Figura 16- Caixa de ligação DropSens (Metrohm DropSens, 2025a) e potencióstato Metrohm Autolab (Metrohm, 2025), respetivamente.....	32
Figura 17-Síntese de nanopartículas magnéticas por co-precipitação química. Imagem adaptada de (Khosravi et al., 2023).	35
Figura 18- Diluição de partículas magnéticas em diferentes polímeros com uma razão de volume de 1:10. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i>	36
Figura 19- Diluição de partículas magnéticas em alginato com uma razão de volume de 1:10 e 1:2, respetivamente. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i>	38
Figura 20- Estrutura química da β -ciclodextrina (ChemWhat, 2025).....	39
Figura 21- Esquema do processo de funcionalização das nanopartículas magnéticas com β -ciclodextrina e posterior deposição nos elétrodos de carbono. Imagem adaptada de (Khosravi et al., 2023).....	40
Figura 22- Voltamograma de limpeza eletroquímica do C-SPE.....	44

Figura 23- Comparação dos voltamogramas (a) e dos diagramas de <i>Nyquist</i> (b) dos elétrodos C-SPE antes (linha laranja) e após a limpeza eletroquímica (linha azul).....	44
Figura 24- Estrutura química do quitosano (López-García et al., 2014), alginato (Foroughi et al., 2018) e Nafion (Sahu et al., 2009), respetivamente.	45
Figura 25- Voltamogramas obtidos através de medições em solução <i>redox</i> de ferro, comparando os elétrodos C-SPE após a limpeza eletroquímica (linha azul) e após a modificação com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion (linha vermelha).	45
Figura 26- Diagramas de <i>Nyquist</i> através de medições em solução <i>redox</i> de ferro, comparando os elétrodos C-SPE após a limpeza eletroquímica (linha azul) e após a modificação com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion (linha vermelha).	46
Figura 27- Voltamogramas obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução tampão (10 $\mu\text{mol/L}$ – 50 mmol/L), para elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion.	47
Figura 28- Voltamogramas obtidos em solução de NaOH e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução (500 $\mu\text{mol/L}$ – 50 mmol/L), para elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion.	49
Figura 29- Voltamogramas obtidos em solução de KCl e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução (500 $\mu\text{mol/L}$ – 50 mmol/L), para elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion.	51
Figura 30- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG em diferentes razões de volume (1:10 e 1:2). Os elétrodos foram preparados em triplicado, com uma única camada de MNPs-ALG, submetidos a mufla a 60 °C, e analisados por CV a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.....	54
Figura 31- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG (razão de volume 1:2) com diferentes números de camadas (1, 2 e 3). Os elétrodos foram preparados em triplicado, submetidos a mufla a 60 °C e analisados por CV a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.	55
Figura 32- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG (razão 1:2) com três camadas, submetidos a diferentes temperaturas de mufla (50, 60 e 70 °C). Os elétrodos foram preparados em triplicado e analisados por voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.....	56
Figura 33- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG (razão de volume 1:2), três camadas, submetidos a mufla a 70 °C e analisados por CV em velocidades de varrimento de 0,02 V/s; 0,05 V/s e 0,1 V/s. Os elétrodos foram preparados em triplicado. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.	57
Figura 34- Voltamograma obtido após otimização dos parâmetros experimentais, medido em solução de KCl (branco) e em diferentes concentrações de lactato (100 $\mu\text{mol/L}$ a 10 mmol/L), utilizando elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG com um ratio 1:2 (3 camadas),	

submetidos a mufla a 70 °C e analisados a uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s (a). Curva de calibração com a corrente média dos ensaios realizados em triplicado, com a equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2) e barras de desvio padrão dos triplicados (b) .	58
Figura 35-Voltamograma obtido através de medições em solução de KCl (branco) e em diferentes concentrações de lactato (50 μ mol/L a 2 mmol/L), utilizando C-SPEs modificados com MNPs funcionalizadas com β -ciclodextrina e alginato (ratio 1:2; 3 camadas), submetidos à mufla a 70 °C e analisados a uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s (a). Curva de calibração construída a partir da corrente média dos ensaios realizados em triplicado, com a equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2) e barras de desvio padrão dos triplicados (b).	59
Figura 36-Voltamograma obtido através de medições de CV para os elétrodos modificados com 3 camadas de MNPs funcionalizadas com β -ciclodextrina e alginato, na gama de potencial de -0,6 V a +0,8 V, durante 10 ciclos, com diferentes velocidades de varrimento (0,250; 0,150; 0,100; 0,050 e 0,025 V/s).	61
Figura 37- Análise SEM obtida para o C-SPE, C-SPE+ MNPS, C-SPE+ MNPs+ Alginato e C-SPE+ MNPS + Alginato + β -ciclodextrina, em diferentes ampliações.	65
Figura 38- Análise TEM obtida para MNPs e MNPs funcionalizadas com β -ciclodextrina, em diferentes ampliações.	66
Figura 39-Espetros ATR-FTIR correspondentes a C-SPE (linha preta), C-SPE + MNPs (linha laranja), C-SPE + MNPs + Alginato (linha verde) e C-SPE + MNPs + Alginato + β -ciclodextrina (linha azul).	67
Figura 40-Voltamogramas obtidos em solução de KCl (linha verde) e na presença de potenciais interferentes a 1 mmol/L: (a) creatinina, (b) glucose e (c) ureia (linhas vermelhas). A imagem (d) mostra a comparação entre KCl (linha verde) e lactato a 1 mmol/L (linha rosa).	68
Figura 41-Voltamograma obtido em suor sintético e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução (50 μ mol/L a 1 mmol/L), utilizando C-SPEs modificados com MNPs-ALG numa razão 1:2 (3 camadas), submetidos à mufla a 70 °C e analisados a uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s (a). Curva de calibração com a corrente média dos ensaios realizados em triplicado, com a equação de regressão linear, o coeficiente de determinação (R^2) e barras de desvio padrão dos triplicados (b).	69

Lista de Tabelas

Tabela 1- Comparação entre os métodos laboratoriais tradicionais utilizados para detecção do lactato, com indicação das respectivas vantagens e limitações.	10
Tabela 2- Exemplos de biossensores eletroquímicos para a detecção de lactato no suor.	29
Tabela 3- Lista de reagentes utilizados e a sua respectiva origem.	33
Tabela 4- Concentrações das soluções padrão de lactato preparadas em PBS e NaOH/KCl.	37
Tabela 5- Valores de potencial e corrente obtidos dos picos de oxidação para os diferentes sistemas modificados (MNPs, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion), em PBS (branco) e na presença de lactato (10 mmol/L). Os valores de Δ Corrente/Branco representam a diferença entre as correntes obtidas nas duas condições sobre o valor do branco.	48
Tabela 6- Valores de potencial e corrente obtidos dos picos de oxidação para os diferentes sistemas modificados (MNPs, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion), em NaOH (branco) e na presença de lactato (10 mmol/L). Os valores de Δ Corrente/Branco representam a diferença entre as correntes obtidas nas duas condições sobre o valor do branco.	50
Tabela 7- Valores de potencial e corrente obtidos dos picos de oxidação para os diferentes sistemas modificados (MNPs, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion), em KCl (branco) e na presença de lactato (10 mmol/L). Os valores de Δ Corrente/Branco representam a diferença entre as correntes obtidas nas duas condições sobre o valor do branco.	52
Tabela 8- Valores de diâmetro e área geométrica do C-SPE comercial.	60
Tabela 9- Parâmetros eletroquímicos atribuídos para a determinação da área eletroativa (Aa) e resultado da mesma para os elétrodos C-SPE não modificados, C-SPE modificados com MNPs e C-SPE modificados com MNPs+ Alginato+ β -ciclodextrina. Aa/Ag corresponde à razão entre a área ativa e a área geométrica do elétrodo.	62

Acrónimos e Símbolos

Lista de Acrónimos

ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
CE	<i>Counter Electrode</i>
C-SPE	<i>Carbon Screen-Printed Electrode</i>
CV	<i>Cyclic Voltammetry</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GLAD	<i>Glancing Angle Deposition</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto
LabRISE	<i>Laboratory for Research and Innovation in Sensors and Engineering</i>
LoD	<i>Limit of Detection</i>
MCT	<i>Monocarboxylate Transporters</i>
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
MNPs	<i>Magnetic Nanoparticles</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
RE	<i>Reference Electrode</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SPE	<i>Screen-Printed Electrode</i>

TEM *Transmission Electron Microscopy*

WE *Working electrode*

Lista de Símbolos

ΔE	Diferença de potencial aplicado
v	Velocidade de varrimento
ϕ	Ângulo de fase
I	Corrente
Z	Impedância complexa
w	Frequência angular
A	Área eletroativa
n	Número de elétrons
D	Coefficiente de difusão
I_p	Corrente do pico de oxidação
C	Concentração
σ	Desvio padrão
R_{ct}	Resistência à transferência de carga
R_s	Resistência da solução eletrolítica
S	Declive da reta de calibração
Δt	Intervalo de tempo

1 Introdução

No presente capítulo é apresentada uma breve introdução à necessidade da monitorização do lactato no contexto da prática desportiva e a sua relevância para a avaliação do desempenho e prevenção da fadiga muscular. São também descritos os principais objetivos do presente estudo, a metodologia adotada e uma breve caracterização do centro de investigação onde foi conduzido o trabalho experimental. Por último, apresenta-se a estrutura geral seguida ao longo do estudo.

1.1 Enquadramento e pertinência

Atualmente, existe uma necessidade crescente de soluções simples, acessíveis e rápidas para a monitorização de parâmetros de saúde essenciais para atletas, alinhadas com as tendências do mercado de tecnologias vestíveis (*wearables*). Atletas e treinadores procuram constantemente técnicas inovadoras que permitam otimizar o desempenho e prevenir lesões.

Neste contexto, o lactato é um produto intermédio do metabolismo energético, formado principalmente a partir da glicólise anaeróbia. Durante períodos de maior exigência física, quando a disponibilidade de oxigénio é limitada, o piruvato é convertido em lactato, o que permite a continuidade da produção de energia através da regeneração do NAD⁺ (Gladden, 2004). Durante muito tempo, o lactato foi considerado apenas um subproduto do metabolismo anaeróbico, mas atualmente reconhece-se que o lactato desempenha funções centrais como intermediário energético e sinalizador metabólico no organismo (Nalbandian & Takeda, 2016).

A monitorização do lactato é particularmente relevante no contexto da prática desportiva. Os níveis de lactato refletem a intensidade do exercício, a capacidade de recuperação e permitem adaptar o exercício às necessidades individuais (Goodwin et al., 2007). Tradicionalmente, a deteção do lactato tem sido realizada através da recolha de sangue, um método invasivo e pouco adequado para medições contínuas, rotineiras e em tempo real. Desta forma, o suor constitui uma alternativa promissora ao sangue no contexto desportivo, uma vez que é produzido naturalmente durante a atividade física e a sua recolha é não invasiva (Xuan et al., 2023).

Deste modo, existe uma necessidade crescente de melhorar os meios de monitorização do lactato, particularmente no suor, de forma a obter medições mais frequentes e em tempo real. O desenvolvimento de sensores simples, de resposta rápida e de fácil manuseamento pode ser uma solução para este problema.

Os biossensores eletroquímicos surgem como uma solução para a monitorização do lactato no contexto desportivo, dado o seu potencial para oferecer medições rápidas, sensíveis e seletivas. Estes dispositivos baseiam-se em reações químicas específicas entre um elemento de reconhecimento biológico e o composto específico que se pretende detetar, no caso o lactato, resultando num sinal detetável. A incorporação de nanomateriais no desenvolvimento de novos biossensores eletroquímicos para a deteção do lactato não só potencia o seu desempenho, como também permite mimetizar a atividade catalítica típica de elementos de biorreconhecimento (Saputra & Karim, 2025).

1.2 Questão e objetivos de investigação

A presente dissertação tem como objetivo principal desenvolver um biossensor eletroquímico utilizando uma nanozima, especificamente nanopartículas magnéticas (MNPs, do inglês, *Magnetic Nanoparticles*) de Fe_3O_4 , capazes de mimetizar e substituir enzimas naturais, para a deteção do analito lactato. Pretende-se que o sensor desenvolvido seja sensível, reprodutível, seletivo, simples de utilizar e não invasivo.

De forma a atingir esse objetivo, utilizaram-se elétrodos serigrafados descartáveis de carbono (C-SPE, do inglês *Carbon Screen-Printed Electrodes*), que foram modificados com as nanopartículas magnéticas de ferro. Seguidamente, estudou-se a incorporação de diferentes polímeros, quitosano, alginato e Nafion, diluídos juntamente com as nanopartículas em distintas condições de pH, com o intuito de avaliar a sua influência no desempenho do sensor. Após a otimização de parâmetros experimentais, nomeadamente a concentração de nanopartículas magnéticas, o número de camadas aplicadas no elétrodo, a temperatura da mufla e a velocidade de varrimento utilizada nas medições, procedeu-se à funcionalização das nanopartículas magnéticas com β -ciclodextrina.

1.3 Metodologia

Para o desenvolvimento do sensor eletroquímico foi desenvolvida a seguinte metodologia:

- Síntese das partículas magnéticas;
- Utilização de plataformas condutoras do tipo C-SPEs para a deposição das MNPs por *drop-casting*;
- Estudo do efeito da incorporação das MNPs com diferentes polímeros, incluindo quitosano, alginato e Nafion;
- Otimização dos parâmetros experimentais e avaliação da resposta do sensor na deteção de lactato utilizando a técnica de voltametria cíclica;
- Incorporação da β -ciclodextrina nas partículas magnéticas de ferro e, novamente, avaliação da resposta do sensor à deteção do lactato.

- Avaliação da seletividade do sensor a possíveis interferentes do suor, creatinina, glucose e ureia, e realização de estudos de calibração em suor sintético.

1.4 Apresentação do laboratório de investigação

A presente dissertação foi desenvolvida no *Laboratory for Research and Innovation in Sensors and Engineering* (LabRISE), um laboratório de investigação científica do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

O LabRISE dedica-se ao desenvolvimento de biossensores que utilizam diferentes (nano)materiais e tecnologias de transdução. A investigação realizada no laboratório centra-se em aplicações multidisciplinares, especificamente na área da saúde, ambiental e no setor alimentar, desenvolvendo tecnologias portáteis e de baixo custo para alcançar a deteção rápida e seletiva de (bio)marcadores relevantes.

1.5 Estrutura do documento

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos. No presente capítulo é descrita uma breve introdução ao tema abordado, com o objetivo de contextualizar a sua relevância no âmbito da investigação.

No segundo capítulo são apresentadas as considerações teóricas fundamentais para o desenvolvimento do estudo. São abordados conceitos relacionados com o lactato, incluindo a sua definição, os mecanismos responsáveis pela sua formação no organismo humano e a sua influência na prática desportiva. Para além disso, o capítulo foca-se nos biossensores, destacando as suas vantagens relativamente a outros métodos de deteção e descrevendo os seus principais componentes, com foco nos elementos de biorreconhecimento e nos diferentes tipos de transdutores disponíveis.

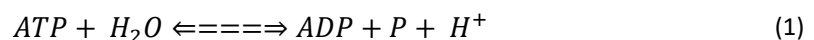
No terceiro capítulo é descrito o procedimento experimental para a construção e otimização do sensor, bem como todos os equipamentos, materiais e reagentes utilizados no estudo. No quarto capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos ao longo do desenvolvimento do sensor eletroquímico, acompanhados de uma análise crítica da sua construção e da avaliação do seu desempenho analítico. Por último, o quinto capítulo apresenta as considerações finais relativas ao trabalho desenvolvido, bem como as perspetivas para investigações futuras.

2 Revisão de Literatura

2.1 Fundamentos do lactato

O lactato ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$), ou a sua forma protonada ácido láctico ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$), sofreu uma mudança significativa na compreensão científica desde a sua descoberta em 1780. Inicialmente era considerado um produto residual e a principal causa de fadiga muscular. No entanto, hoje é reconhecido como uma fonte vital de energia e também uma molécula sinalizadora com diversas funções no corpo, particularmente durante o exercício. A teoria predominante era que o ácido láctico, ao libertar um ião hidrogénio (H^+), diminuiria o pH e causaria acidose muscular, levando à fadiga durante o exercício de alta intensidade.

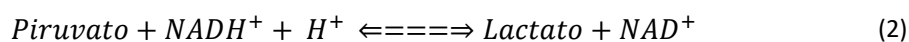
Desde a década de 1980, a compreensão do lactato mudou drasticamente. É agora aceite que o lactato não é responsável pela acidose muscular. Durante o exercício, o ATP é constantemente degradado para fornecer energia e este processo gera protões (H^+) (equação 1). A responsabilidade da acidose muscular é atribuída à produção de H^+ a partir da hidrólise do ATP (Nalbandian & Takeda, 2016).



Durante o processo de glicólise, a glucose é convertida em piruvato no citoplasma celular. Em condições aeróbicas, esse piruvato é transportado para as mitocôndrias onde é oxidado em acetil-CoA e entra no ciclo de Krebs (Figura 1). Este processo é fundamental porque fornece ATP de forma rápida e garante energia imediata para a contração muscular. Esta energia é especialmente importante em situações de esforço intenso em que a necessidade energética aumenta (Phypers & Pierce, 2006).

No entanto, quando a exigência energética é elevada, existe uma redução na disponibilidade de O_2 nos músculos. Esse estado é denominado hipóxia. Nesses casos, o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase A (LDH_A) (equação 2). Este processo regenera NAD^+ e permite dar continuidade à glicólise. O lactato é transportado para as fibras oxidativas dos músculos, coração, fígado, tecido adiposo e cérebro. Nesses locais é convertido novamente em piruvato pela lactato desidrogenase B (LDH_B) e metabolizado aerobicamente na

mitocôndria. Quando o piruvato não é completamente metabolizado pela oxidação aeróbia, a LDH_A favorece a sua transformação para lactato. Em contrapartida, quando o piruvato está reduzido, a LDH_B promove a conversão de lactato em piruvato (Della Rocca et al., 2022; Nalbandian & Takeda, 2016).



A produção de lactato envolve o consumo de duas moléculas de hidrogénio e resulta na formação de NAD^+ . O lactato também auxilia no equilíbrio do pH ao ser co-transportado com iões H^+ através de transportadores monocarboxilatos (MCTs, do inglês, *Monocarboxylate Transporters*) (S. Huang et al., 2025).

Posto isto, o lactato não é a principal causa de acidose muscular ou fadiga. Em vez disso, a investigação atual identifica a hidrólise de ATP, a insuficiência de oxigénio, a acumulação de fosfato e os mecanismos neurais como principais contribuintes para a fadiga muscular (Mandadzhiev, 2025).

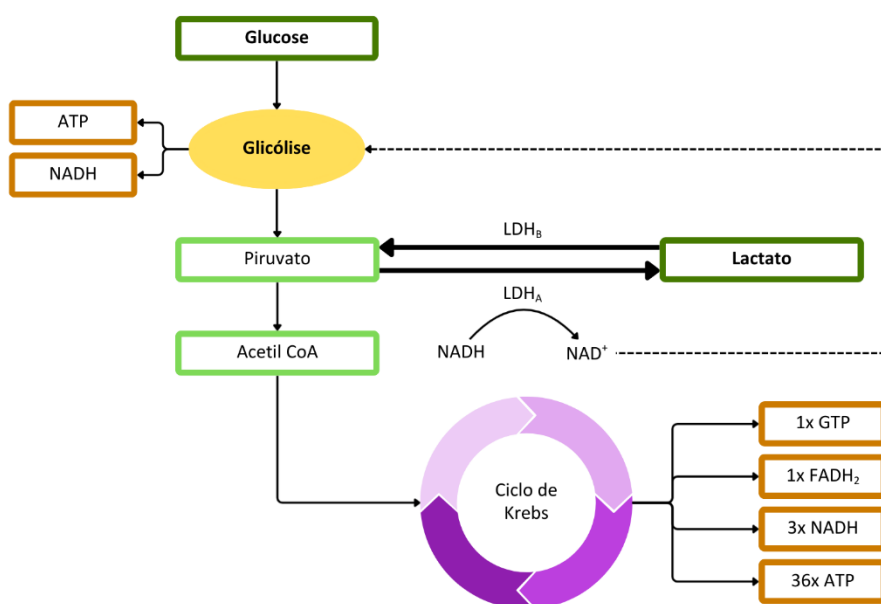


Figura 1- Representação esquemática do metabolismo da glicólise e formação de lactato. Imagem adaptada de (Phypers & Pierce, 2006).

2.1.1 Lactato como molécula sinalizadora

No organismo humano, o denominado “ácido láctico” encontra-se praticamente todo dissociado na forma de lactato, dado que se trata de um ácido fraco ($\text{pK}_a \approx 3.9$) e geralmente encontra-se num meio fisiológico cujo pH está muito acima do seu valor de dissociação (Phypers & Pierce, 2006). Em condições nas quais o pH do meio é significativamente superior ao pK_a de um ácido, predomina a forma iónica (Figura 2). Por essa razão, embora a designação 'ácido láctico' seja frequentemente utilizada, a espécie predominante no sangue e nos tecidos é o lactato (Lee, 2021). Embora o ácido láctico e o lactato partilhem a mesma estrutura molecular, diferem nas

suas propriedades químicas, particularmente no que diz respeito à carga elétrica e ao modo de transporte celular (Rabinowitz & Enerbäck, 2020).

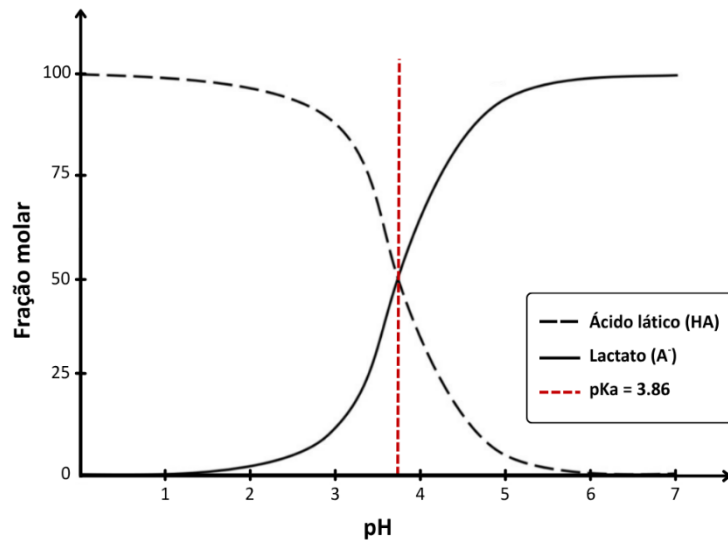


Figura 2- Representação da fração molar entre a forma protonada (ácido láctico) e a forma desprotonada (lactato) em função do pH. Imagem adaptada de (Payan et al., 2023).

O lactato é transportado por todo o corpo através do sangue e eliminado algum tempo após a prática de exercício. A eliminação do lactato ocorre principalmente por oxidação no músculo esquelético e no coração, pela gliconeogênese no fígado e, em certa parte, pela excreção no suor e na urina (T. Huang et al., 2025).

No desporto, a monitorização do lactato é crucial por inúmeras razões. O exercício intenso prolongado induz perturbações entre a produção e a eliminação do lactato, o que acaba por prolongar a recuperação física. O lactato é um bom marcador para medições de resposta fisiológica corporal porque dele podem derivar dados sobre o funcionamento aeróbio e anaeróbio de um atleta. Estes dados podem ser utilizados para formular estratégias individualizadas de treino e recuperação (T. Huang et al., 2025). A Figura 3 ilustra a relação entre o nível de esforço físico, a disponibilidade de oxigénio e a respetiva produção de lactato.

Para além do seu papel energético, o lactato também funciona como uma molécula sinalizadora. Acredita-se que estimule e se ligue a vários alvos citosólicos, influenciando o metabolismo celular e a imunidade. No tecido adiposo branco utiliza vias metabólicas para regular o metabolismo lipídico. Através dessas vias pode inibir ou estimular a lipólise conforme a concentração e duração do estímulo. No músculo esquelético reduz a degradação de gordura, promove a síntese de triglicéridos intramusculares e aumenta a biogénese mitocondrial, entrando na matriz mitocondrial através do transportador MCT1. Além disso, ativa vias moleculares essenciais para a neuroplasticidade e para as adaptações à hipóxia (S. Huang et al., 2025; Nalbandian & Takeda, 2016).

Desta forma, o lactato, enquanto produto intermédio central do metabolismo celular, é reconhecido como um importante indicador do estado fisiológico e da saúde humana. A sua monitorização pode desempenhar um papel crucial em diversas áreas médicas, bem como na medicina desportiva e treino personalizado.

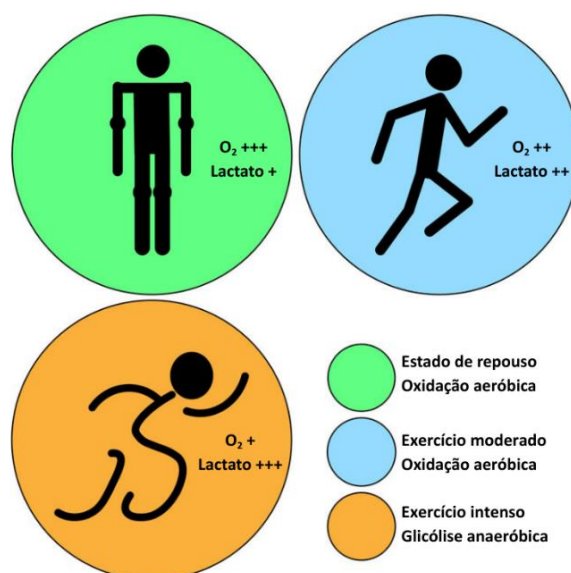


Figura 3- Relação entre intensidade do exercício, a disponibilidade de oxigénio e produção de lactato. Imagem adaptada de (T. Huang et al., 2025).

2.1.2 Fluidos na monitorização do lactato

As técnicas convencionais de medição do lactato envolvem a colheita invasiva de sangue, frequentemente dos lóbulos das orelhas, pontas dos dedos, veias ou artérias. O nível de lactato no sangue é um indicador comprovado e sensível à adaptação fisiológica e à intensidade do exercício. No entanto, a colheita de sangue é esporádica e requer alguma tolerância à dor. Apresenta também restrições de rapidez e portabilidade na deteção. A sua natureza intrusiva torna-o inadequado para a deteção em tempo real e contínuo, gerando discrepâncias entre as reações do teste e as condições reais de competição (T. Huang et al., 2025).

Um dos principais fluidos corporais estudados na monitorização não invasiva do lactato é o suor. Ao contrário de alguns métodos clássicos, que são inerentemente invasivos, a avaliação do suor oferece um processo prático, que pode ser contínuo e em tempo real. O suor é um fluido biológico presente na superfície da pele humana e tem vindo a ser cada vez mais valorizado como amostra para análise de biomarcadores, apresentando um pH ligeiramente ácido, entre 4,5 a 6,5 no ser humano saudável. O suor é composto por 99% de água e contém diversos componentes, como lactato, glicose, sódio, creatinina, cloreto, ureia e proteínas (Luo et al., 2021; Z. Xu et al., 2025).

Além do suor, o lactato pode ser detetado noutros fluidos, como lágrimas e saliva (Figura 4), embora estes sejam menos comuns e ainda pouco explorados.

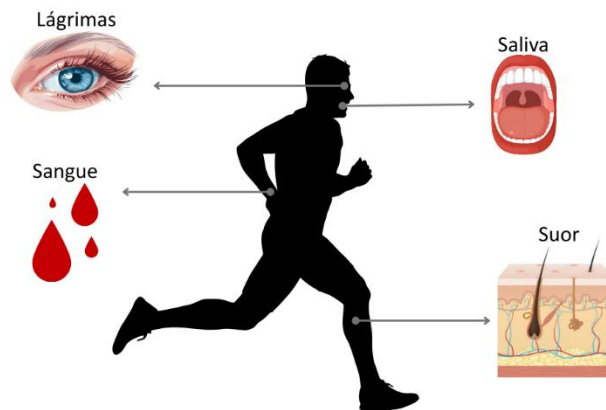


Figura 4- Fluidos biológicos utilizados para a monitorização de lactato: invasivo (sangue) e não invasivos (lágrimas, saliva, suor). Imagem adaptada de (G. Yang et al., 2024).

A concentração de lactato no suor é, em geral, superior à do sangue durante o exercício. No entanto, a correlação entre os níveis de lactato presentes no sangue e no suor nem sempre é clara. Alguns estudos não revelam qualquer associação e especulam que o lactato no suor pode ter origem nas próprias glândulas sudoríparas, independentemente dos níveis de lactato no sangue. Por outro lado, há investigações que apontam para uma possível correlação e demonstram que o aumento do lactato no sangue também se reflete num aumento do lactato no suor durante exercícios de potência aeróbia máxima (Luo et al., 2021).

A concentração média de lactato no sangue situa-se entre 0,5 mmol/L em repouso e 15 a 20 mmol/L durante exercício intenso (Ding et al., 2025). O limiar de lactato refere-se aos pontos críticos onde a acumulação de lactato aumenta abruptamente com o aumento progressivo da intensidade do exercício (T. Huang et al., 2025). O primeiro ponto, designado limiar aeróbio, corresponde ao início do aumento da concentração de lactato acima dos valores de repouso, onde começa a existir uma maior contribuição da glicólise anaeróbia. Já o segundo ponto, denominado limiar anaeróbio, é marcado pelo aumento exponencial dos níveis de lactato, onde passa a existir uma predominância do metabolismo anaeróbio. No sangue, o limiar aeróbio é geralmente identificado em torno de 2 mmol/L de concentração de lactato, enquanto o limiar anaeróbio é frequentemente definido próximo de 4 mmol/L (Mandadzhev, 2025).

No suor, a literatura afirma que os níveis de lactato estão, em média, entre 1 e 20–25 mmol/L aproximadamente (Messina & Giardi, 2024; Seki et al., 2021; Xuan et al., 2023). No entanto, estes valores podem ser influenciados por vários fatores, incluindo a taxa de sudorese, evaporação, temperatura, humidade relativa, intensidade do exercício, hipóxia tecidual local e variação interindividual. Além disso, os níveis de lactato no suor também podem diferir consoante a região do corpo humano (Luo et al., 2021).

Existe um atraso significativo na investigação sobre o lactato no suor em comparação com o lactato sanguíneo no desporto. Apesar de alguns autores já proporem o conceito de “limiar de

lactato no suor”, ainda não existe padronização ou um consenso científico sobre este biomarcador no suor (T. Huang et al., 2025).

2.1.3 Métodos de detecção

Atualmente, no campo biomédico, têm sido utilizados vários métodos analíticos para a determinação do lactato, tais como a avaliação colorimétrica, a espectrofotometria, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*), a cromatografia gasosa e os métodos enzimáticos (Ding et al., 2025).

A Tabela 1 sintetiza os principais métodos laboratoriais utilizados para a determinação do lactato, o respectivo princípio de funcionamento, bem como as suas principais vantagens e limitações. Contudo, a maioria destes métodos são complexos, dispendiosos, requerem conhecimentos especializados no manuseamento dos instrumentos, envolvem longos tempos de pré-tratamento das amostras e preparação de reagentes, não sendo, por isso, práticos em contexto de monitorização direta (Amin et al., 2019).

Tabela 1- Comparação entre os métodos laboratoriais tradicionais utilizados para detecção do lactato, com indicação das respetivas vantagens e limitações.

	Método	Princípio	Vantagens	Limitações
(Morbioli et al., 2017)	Colorimétrico	Mudança de cor direta ou reação enzimática que gera produto colorido.	Simples, baixo custo, fácil de interpretar.	Baixa sensibilidade; pouco quantitativo.
(Borshchevskaya et al., 2016)	Espectrofotometria enzimática	Conversão do lactato em piruvato pela LDH, gerando NADH, medido num comprimento de onda específico.	Específico, muito utilizado em prática clínica.	Requer enzimas estáveis; preparação de amostras.
(Ding et al., 2025; Valverde, 2024)	HPLC	Separação do analito por interações entre fase estacionária (coluna) e fase móvel (solvente).	Elevada precisão, seletividade e reprodutibilidade.	Muito dispendioso; equipamento volumoso; não portátil; exige técnicos.
(Nilam A.Nikam et al., 2025)	Cromatografia Gasosa	Separação em fase gasosa após derivatização.	Alta resolução e sensibilidade.	Pouco prático; exige pré-tratamento complexo.

Atualmente, a nova vaga de tecnologia favorece uma monitorização não invasiva e em tempo real do lactato no suor como biomarcador do estado fisiológico humano; além disso, a medição não invasiva de analitos no suor humano é utilizada como alternativa à medição de analitos no sangue. Desta forma, novas tecnologias vestíveis (*wearables*) para a deteção de lactato no suor podem permitir acompanhar este biomarcador de forma contínua e estável. Além disso, podem ser integrados a dispositivos digitais para fornecer, em tempo real, informações relevantes sobre a fisiologia do indivíduo, ao mesmo tempo que reduzem o risco de evaporação e contaminação da amostra.

Quanto aos dispositivos vestíveis para medição de lactato no suor, ainda não são tecnologias consolidadas no mercado. Muitos dos exemplos existentes são protótipos ou desenvolvimentos de laboratório. A área enfrenta vários desafios técnicos, como estabilidade de sensores, calibração, conforto para o utilizador e correlação entre os níveis de lactato no suor e no sangue (Ding et al., 2025; Luo et al., 2021; G. Yang et al., 2024). A Figura 5 representa a evolução atual dos métodos de deteção.

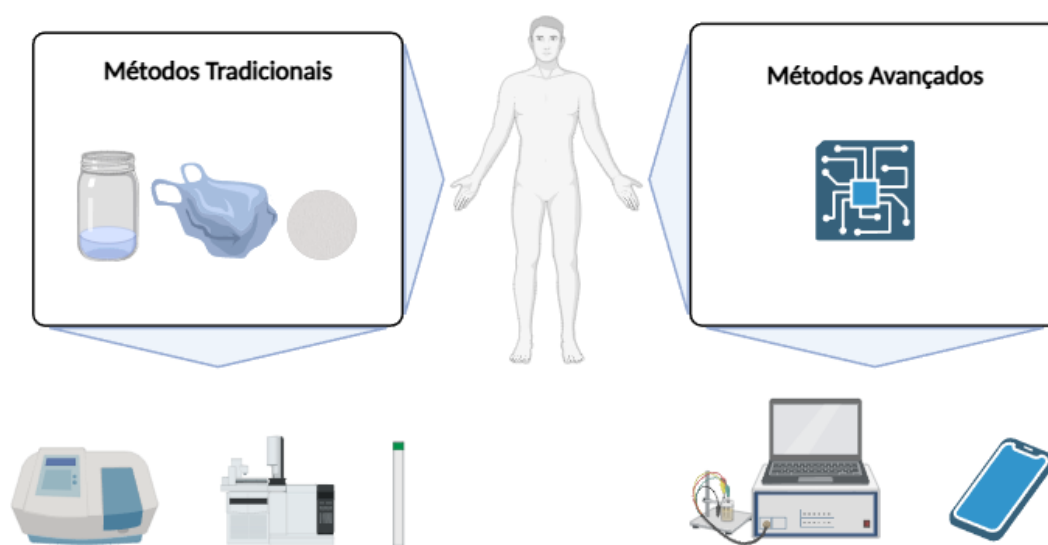


Figura 5- Comparação entre métodos tradicionais e métodos avançados de monitorização contínua. Imagem adaptada de (Luo et al., 2021).

2.2 Biossensores

Os biossensores são dispositivos constituídos por um elemento de biorreconhecimento e um transdutor físico-químico. Este dispositivo tem como objetivo principal identificar analitos específicos em diferentes tipos de amostras (Khan et al., 2020).

Entre as diversas aplicações destacam-se a monitorização de doenças, segurança alimentar e controlo ambiental/ industrial. Além disso, apresentam aplicabilidade numa grande variedade de amostras, tais como fluidos corporais (sangue, urina, saliva, entre outros), amostras alimentares e ambientais, bem como culturas celulares (Grieshaber et al., 2008; Tetyana et al., 2021).

Comparativamente a outros métodos de deteção, oferecem portabilidade, capacidade de miniaturização, facilidade de utilização, automatização, acessibilidade, maior estabilidade, tempos de deteção rápidos e a vantagem adicional de fornecerem respostas em tempo real (Kim & Park, 2021).

2.2.1 Estrutura de um biossensor

Um biossensor pode ser constituído por diversos componentes com funções distintas e essenciais para o seu funcionamento eficiente. Cada um destes componentes é seguidamente explicado em detalhe e apresentado na Figura 6 (Bhalla et al., 2016).

- **Analito:** substância-alvo que se pretende detetar. Pode ser, por exemplo, glicose, lactato, uma proteína, ácido nucleico ou outro composto específico presente numa amostra.
- **Biorreceptor:** elemento de reconhecimento biológico responsável pela interação seletiva com o analito. Pode ser uma enzima, anticorpo, ácido nucleico, célula ou tecido. O processo de reconhecimento específico entre o analito e o biorreceptor é designado por biorreconhecimento.
- **Transdutor:** converte o evento de biorreconhecimento num sinal físico mensurável. Este sinal é geralmente proporcional à quantidade de analito presente na amostra. A conversão da energia associada ao reconhecimento biológico num sinal quantificável é designada por sinalização.
- **Condicionamento do sinal:** um conjunto de dispositivos eletrónicos que amplificam, filtram ou convertem o sinal do transdutor. Estes condicionam o sinal para análise e exibição, traduzindo normalmente os sinais analógicos em sinais digitais.
- **Display:** o sinal é convertido num valor compreensível e apresentado ao utilizador por meio de um *display* digital, gráfico ou interface ligada a um *software*. Esta etapa final

traduz a informação bioquímica em dados úteis, como a concentração de lactato ou a presença de um biomarcador específico.

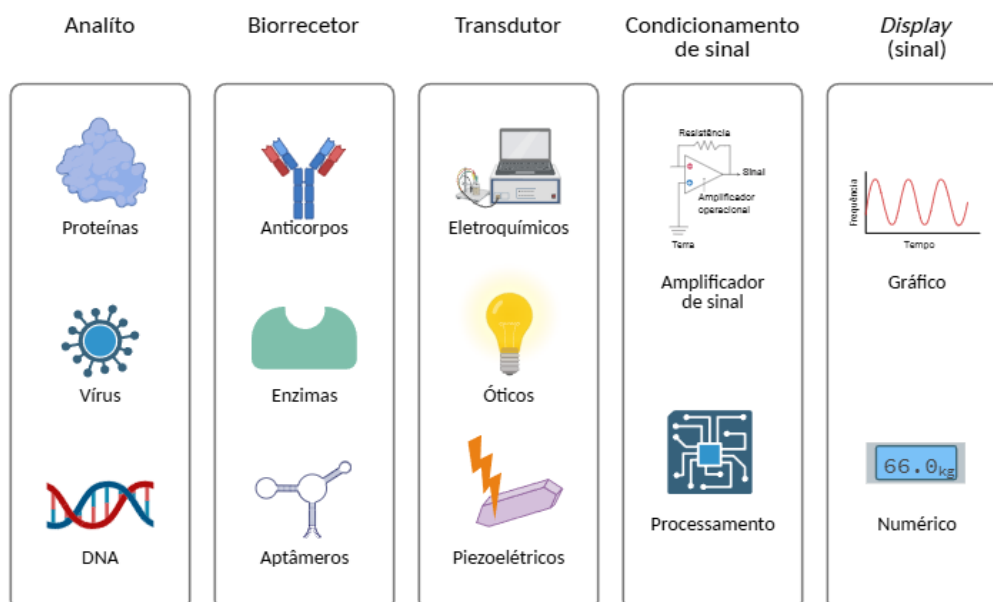


Figura 6- Componentes principais de um biossensor. Imagem realizada em *BioRender.com*

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de biorreceptor e o tipo de transdutor. Essa classificação, bem como as principais características desses dispositivos, será desenvolvida nos subcapítulos seguintes (Naresh & Lee, 2021).

2.2.2 Características de um biossensor

Devido à natureza das aplicações em que os biossensores são utilizados, vários parâmetros precisam de ser cumpridos quando se desenvolve um biossensor. Essas características definem o seu desempenho e utilidade. De seguida é apresentada a descrição de cada uma destas propriedades (Bhalla et al., 2016; Katey et al., 2023; Tetyana et al., 2021):

- **Sensibilidade:** é considerada a característica mais importante de um biossensor. A sensibilidade de um biossensor é definida como a relação entre a variação na concentração do analito e a intensidade do sinal gerado pelo transdutor.
- **Limite de deteção (LoD, do inglês, *Limit of Detection*):** é a menor quantidade de analito que se pode detetar de forma fiável, ou seja, que produza um sinal significativamente distinto do ruído de fundo.
- **Seletividade:** é a capacidade do biorreceptor responder apenas ao analito-alvo numa amostra que contenha outros compostos. Um falso positivo é definido quando o dispositivo sinaliza a presença do analito-alvo, mas a leitura é provocada por outro

composto da amostra. Este problema está normalmente associado a sensores de baixa seletividade.

- **Estabilidade:** determina a capacidade do biossensor de resistir a alterações no seu desempenho ao longo de um período de tempo em resposta a interrupções decorrentes de fatores externos. Estas alterações podem ser na forma de temperatura, humidade ou outras condições ambientais. Tais interrupções têm o potencial de induzir imprecisões no sinal de saída durante a medição, afetando assim a precisão e exatidão do dispositivo biossensor.
- **Reprodutibilidade:** refere-se à capacidade do dispositivo biossensor de produzir sinais de saída ou resultados equivalentes sob as mesmas condições experimentais em medições repetidas. A capacidade do biossensor de cumprir este critério depende fortemente do transdutor, que deve funcionar de forma precisa e exata.
- **Linearidade:** traduz a capacidade do biossensor de produzir sinais de saída diretamente proporcionais às diferentes concentrações do analito. Esta relação entre concentração e resposta é fundamental para a calibração do dispositivo e para garantir medições fiáveis ao longo de uma ampla gama de concentrações. Assim, o sensor consegue refletir de forma clara e consistente as alterações reais na quantidade do analito.
- **Tempo de resposta:** determina o tempo que o biossensor demora para produzir um sinal ou resposta após a interação do biorreceptor com o analito-alvo.

2.2.3 Classificação de biossensores de acordo com a tipologia do elemento de biorreconhecimento

Como referido anteriormente, um biossensor pode ser classificado de acordo com o elemento de biorreconhecimento utilizado. O material deve ser altamente específico, estável quando armazenado e imobilizado (Tetyana et al., 2021).

Existem diferentes tipos de elementos de biorreconhecimento, tais como anticorpos, tecidos, microrganismos, organelos e recetores celulares, enzimas ou ácidos nucleicos (Khaleque et al., 2024). Estão divididos em três categorias distintas: recetores de afinidade, metabólicos e catalíticos. Quando o elemento de biorreconhecimento se liga diretamente ao analito, o sensor é designado por sensor de afinidade. Se a interação com o analito provoca uma alteração química que pode ser utilizada para determinar a concentração do substrato, o sensor é classificado como sensor metabólico. Por último, o biossensor é considerado catalítico quando o elemento de biorreconhecimento se combina com o analito sem provocar alterações químicas diretas, mas transforma esse analito num substrato auxiliar (Mandal, 2023).

O grupo dos biossensores catalíticos é utilizado em dispositivos para monitorização de substâncias a níveis micromolares ou milimolares. Os elementos utilizados são enzimas, microrganismos e tecidos. O grupo de afinidade e metabólico é utilizado principalmente em

dispositivos biossensores que medem analitos como esteroides, fármacos e toxinas. Tais recetores incluem anticorpos, antigénios, ácidos nucleicos, entre outros (Tetyana et al., 2021).

Os biossensores são ainda classificados como naturais ou artificiais. Os de origem sintética são projetados para imitar as funcionalidades dos recetores biológicos naturais. Entre os biossensores de origem natural destacam-se aqueles baseados em anticorpos, enzimas e células, enquanto os artificiais incluem aptâmeros e polímeros de impressão molecular (Campuzano et al., 2023) (Figura 7).

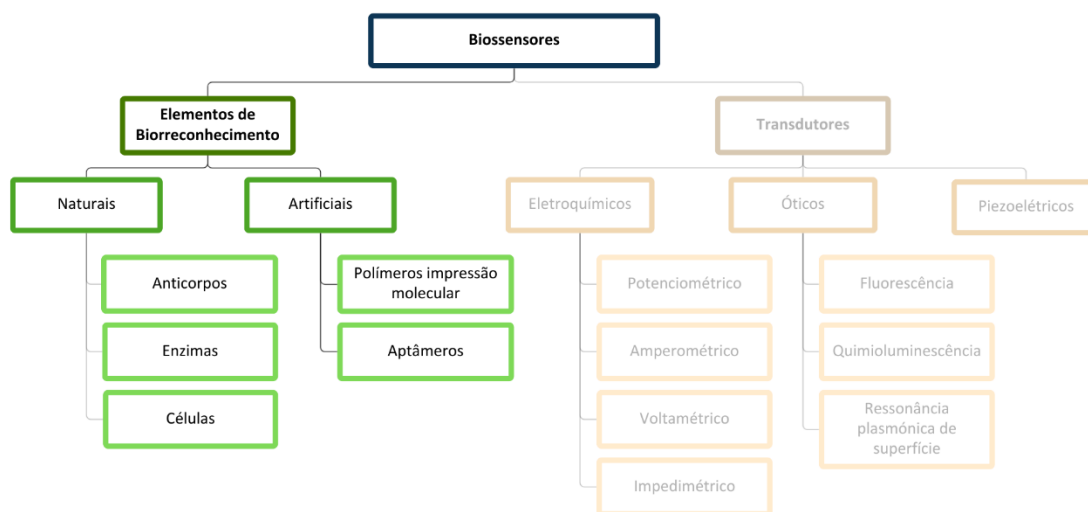


Figura 7- Classificação dos biossensores de acordo com os elementos de biorreconhecimento. Imagem adaptada de (Tetyana et al., 2021).

2.2.3.1 Anticorpos

Os anticorpos são proteínas em forma de "Y" sintetizadas pelo sistema imunitário, mais concretamente pelos glóbulos brancos, com capacidades de reconhecimento de antigénios. A sua estrutura é composta por duas cadeias pesadas (H, *heavy chains*) e duas leves (L, *light chains*) de polipeptídeos, ligadas entre si por pontes dissulfeto (Naresh & Lee, 2021)(Figura 8). As cadeias leve e pesada contêm regiões constantes (C, *constante region*) e variáveis (V, *variable region*). Estas últimas são denominadas parátomos e são responsáveis pela ligação aos antigénios. De forma análoga, o local de um antigénio no qual um anticorpo complementar pode ser ligado especificamente é denominado de epítipo (Mpofu et al., 2025).

Um imunoensaio é um teste bioanalítico que se baseia na interação específica entre antigénio-anticorpo para detetar ou quantificar a presença de um analito numa determinada amostra. O princípio básico é que o anticorpo reconhece e liga-se especificamente ao antigénio para formar um complexo imunitário (Darwish, 2006). A ligação é altamente específica e possibilita que os anticorpos reconheçam e se liguem a determinados patogénios, toxinas, células ou outras moléculas (Mpofu et al., 2025).

Os biossensores baseados na ligação antígeno-anticorpo são designados imunossensores. Os anticorpos são uma das moléculas mais procuradas nos biossensores porque apresentam uma elevada afinidade e especificidade. As limitações associadas à sua utilização incluem a dificuldade relacionada com modificações químicas, o elevado custo de produção e, por serem proteínas, a falta de resistência e estabilidade a flutuações de temperatura (Reaño & Escobar, 2024).

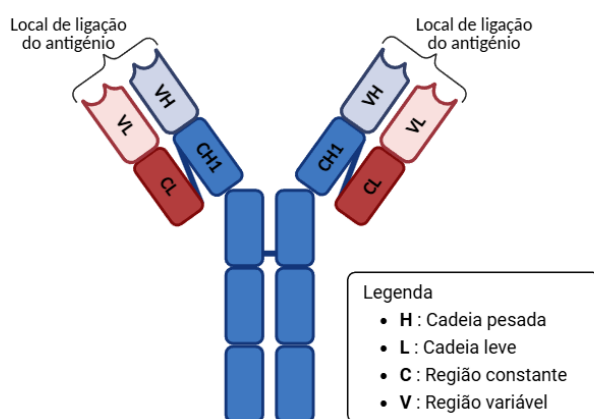


Figura 8- Estrutura de um anticorpo. Imagem realizada em *BioRender.com*

2.2.3.2 Enzimas

As enzimas são biomacromoléculas essenciais com diferentes funções catalíticas. São também consideradas importantes na regulação do metabolismo celular e na homeostasia nos seres vivos (Fan et al., 2023). As enzimas têm sido amplamente utilizadas como componentes integrais no desenvolvimento de biossensores funcionais, principalmente eletroquímicos (Naresh & Lee, 2021).

Os biossensores enzimáticos proporcionam uma análise e quantificação precisa, rápida e de baixo custo de diversos analitos. São valorizados pela sua elevada especificidade e pelo facto de as enzimas poderem ser reutilizadas durante vários ciclos de medição (Tetyana et al., 2021).

Embora superiores em vários aspetos, as enzimas naturais apresentam algumas limitações que impedem a sua utilização em diversas situações: funcionam apenas em condições fisiológicas limitadas, apresentam estabilidade reduzida em ambientes agressivos, são excessivamente caras de produzir e possuem processos de produção complexos (Das et al., 2021). As estruturas enzimáticas são também vulneráveis, pelo que melhorar a sensibilidade, a estabilidade ou a flexibilidade é um processo dispendioso e complexo. (Fan et al., 2023; Naresh & Lee, 2021).

2.2.3.3 Polímeros de Impressão Molecular

Os Polímeros de Impressão Molecular (MIPs, do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*) são polímeros sintéticos concebidos para atuar como recetores e substituir elementos de

reconhecimento biológico. Podem reconhecer e ligar-se a uma molécula-alvo específica utilizada durante o processo de impressão (molécula-molde) (Cegłowski et al., 2022).

A síntese de MIPs é geralmente realizada através da seleção de monómeros funcionais capazes de formar interações estáveis com uma molécula-molde. A formação de um complexo molde-monomero estável é crítica para a capacidade de reconhecimento do polímero. O arranjo espacial dos monómeros em torno da molécula-molde é fixado durante a polimerização, auxiliada por um agente reticulante, formando uma rede polimérica tridimensional. As interações entre a nova matriz polimérica e a molécula-alvo resultam na criação do reconhecimento molecular. A extração da molécula-molde resulta na formação de cavidades específicas e complementares à molécula utilizada, em forma, tamanho e propriedades químicas, possibilitando o reconhecimento seletivo a alvos e a compostos análogos funcionais. Os MIPs enquadram-se na categoria de biossensores de afinidade, simulando a interação entre anticorpo e antigénio para se ligar a alvos específicos (Y. Li et al., 2024; Mustafa et al., 2022).

Os MIPs podem oferecer elevada estabilidade, custo reduzido e reutilização, sendo também económicos, simples de utilizar e altamente sensíveis. Por outro lado apresentam limitações, como uma cinética de ligação lenta e reatividade cruzada (Agar et al., 2025).

A eficácia do MIP depende fortemente da escolha do monómero funcional, do reticulante e do método de polimerização. Uma seleção inadequada destes parâmetros pode resultar em cavidades mal formadas, reconhecimento insuficiente do alvo ou dificuldade na remoção completa da molécula-molde (Agar et al., 2025).

2.2.3.4 Aptâmeros

Os aptâmeros são oligonucleótidos sintéticos de ácido ribonucleico (RNA, do inglês, *Ribonucleic acid*) e de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) de cadeia simples que assumem uma estrutura bidimensional ou tridimensional complexa específica (Naresh & Lee, 2021). Devido às suas propriedades conseguem reconhecer e ligar-se de forma muito específica a diferentes alvos, tais como, iões metálicos, pequenas moléculas, proteínas e células inteiras (Napit et al., 2025). Os aptâmeros normalmente têm entre 25 e 80 nucleótidos de comprimento (Stangherlin et al., 2025).

Estes biorreceptores podem ser sintetizados através de um processo denominado Evolução Sistémica de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX, do inglês, *Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Este processo inicia-se a partir de uma grande biblioteca de sequências de DNA ou RNA com diferentes afinidades. Estas sequências são expostas à molécula-alvo e as que não se ligam são eliminadas (Farid et al., 2023). No entanto, as que mostram ligação são amplificadas e passam para a fase seguinte, como é possível observar na Figura 9. Após este processo, a biblioteca de oligonucleótidos é restaurada, dando início a um novo ciclo de seleção. Dependendo da natureza do alvo são necessárias entre 10 a 20 rondas de SELEX para isolar aptâmeros que se liguem especificamente ao alvo (Stangherlin et al., 2025).

Os aptâmeros, por serem compostos de ácidos nucleicos, apresentam maior estabilidade em diferentes temperaturas e condições de armazenamento. Têm também a capacidade de reconstituir a sua estrutura após desnaturação por calor e podem ser modificados quimicamente para otimizar a sua capacidade de ligação. Em contraste com os anticorpos, cuja produção depende de sistemas biológicos, os aptâmeros são facilmente sintetizados em laboratório. Os aptassensores são biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de biorreconhecimento (Naresh & Lee, 2021).

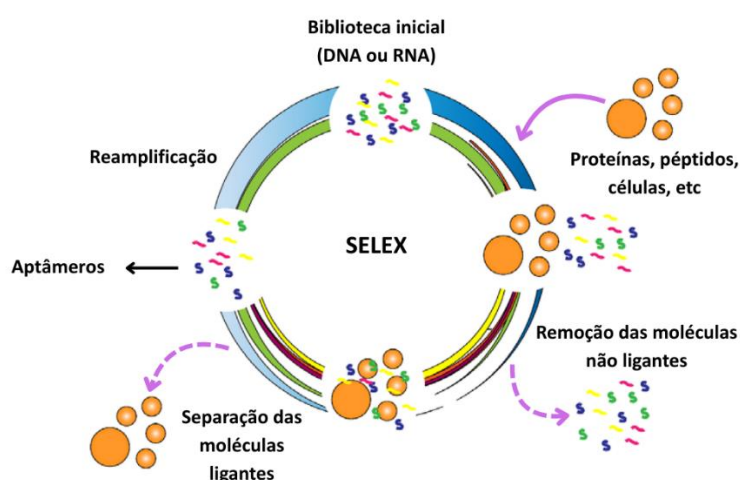


Figura 9- Esquema do processo SELEX. Imagem adaptada de (Stangherlin et al., 2025).

2.2.4 Nanoenzimas

Embora os sensores enzimáticos apresentem elevada especificidade, o seu funcionamento pode ser facilmente influenciado pelos fatores anteriormente descritos, o que afeta a estabilidade e a reprodutibilidade do processo de detecção. Por este motivo, nos últimos anos, têm sido feitos esforços para utilizar outros materiais com catalisadores como elementos centrais de biorreconhecimento. Isto conduziu à criação das chamadas "enzimas artificiais" ou "nanoenzimas", terminologia utilizada pela primeira vez em 2004 (Das et al., 2021; Ding et al., 2025).

Nanoenzimas são materiais sintéticos de estrutura nanométrica capazes de exibir atividade catalítica semelhante à das enzimas naturais, ou seja, capazes de mimetizar as funções catalíticas biológicas. Estas nanoestruturas apresentam dimensões típicas entre 1 e 100 nm. Diferentes nanomateriais têm sido utilizados para simular o comportamento cinético de enzimas naturais e catalisar a conversão de moléculas em formas oxidadas facilmente detetáveis. Estes incluem nanopartículas metálicas de ouro (Au), prata (Ag), platina (Pt) e paládio (Pd); óxidos metálicos (Fe_3O_4 , CeO_2 , ZnO, CuO), materiais de carbono (nanotubos de carbono, grafeno, pontos quânticos de carbono) e estruturas metal-orgânicas, como é possível observar na Figura 10 (W. Yang et al., 2021).

As nanoenzimas metálicas, constituídas por metais nobres, destacam-se pela elevada estabilidade química. Esta classe de nanoenzimas apresenta fortes propriedades plasmónicas superficiais e capacidades de conversão ótica e fototérmica. Além disso, a superfície metálica permite uma ligação eficiente a diversas biomoléculas (Ma et al., 2025).

Os óxidos metálicos são uma das principais classes de nanoenzimas devido à sua facilidade de produção, elevada mobilidade eletrónica e custo relativamente baixo. Estas nanoenzimas apresentam potencial significativo para uma ampla gama de aplicações, incluindo biossensores, diagnóstico de doenças, tratamentos terapêuticos, testes alimentares e até mesmo proteção ambiental (Das et al., 2021; Ma et al., 2025). Por sua vez, os nanomateriais de carbono destacam-se na construção de materiais flexíveis (Ma et al., 2025).

Por último, as estruturas metal-orgânicas são uma classe de materiais cristalinos microporosos híbridos que combinam componentes inorgânicos e orgânicos. Um exemplo é a estrutura metal-orgânica homogénea ZIF-67, formada pela reação entre iões Co^{2+} e 2-metilimidazol. As vantagens das estruturas metal-orgânicas incluem excelente estabilidade, porosidade ajustável à escala nanométrica e estruturas espaciais variadas com cavidades de tamanho uniforme. Nestas estruturas, tanto os nós metálicos como os componentes orgânicos conferem atividade enzimática (Ma et al., 2025).

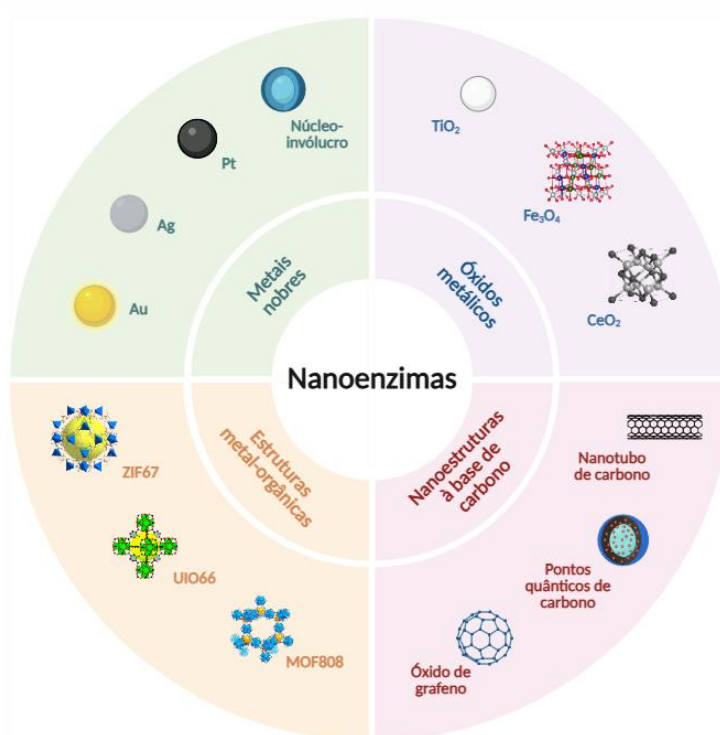


Figura 10- Principais classes de nanoenzimas. Imagem adaptada de (R. Yang et al., 2025).

As nanoenzimas apresentam diversas vantagens em relação às enzimas naturais. São capazes de desempenhar múltiplas funções catalíticas, têm baixos custos de fabricação, são estáveis e resistentes em ambientes agressivos (pH entre 1 e 12 e temperaturas até 80 °C) e permitem funcionalizar a sua superfície com diferentes abordagens. Além disso, são relativamente fáceis de sintetizar e, em certos casos, reutilizáveis, pelo que os custos globais são baixos. A limitação principal das nanoenzimas é a sua menor especificidade. Comparativamente com as enzimas naturais, as nanoenzimas têm dificuldade em catalisar apenas um substrato específico, o que pode resultar em biossensores menos seletivos. Posto isto, existem ainda algumas limitações na criação de dispositivos que sejam simultaneamente sensíveis, específicos, rápidos e de baixo custo (Das et al., 2021). A atividade enzimática das nanoenzimas pode ser otimizada através da construção de nanomateriais híbridos com outros elementos de reconhecimento. Esta combinação confere ao sistema uma melhor estabilidade, dispersibilidade, uma maior capacidade catalítica quando comparada com as nanoenzimas individuais e pode ainda aumentar a especificidade (Ma et al., 2025).

O desempenho das nanoenzimas depende sobretudo do tamanho, forma e composição das nanopartículas, que determinam a área ativa e a reatividade, bem como da presença de defeitos ou dopagens que podem potenciar a atividade catalítica. A funcionalização da superfície é igualmente importante para garantir seletividade, biocompatibilidade e estabilidade, especialmente em meios biológicos onde proteínas ou iões podem interferir. Também fatores externos, como o pH, a temperatura e o ambiente reacional, influenciam a sua eficiência, tornando essencial o controlo destas condições para otimizar a aplicação das nanoenzimas (Ma et al., 2025).

As nanoenzimas podem ser classificadas segundo diferentes critérios, incluindo a composição química, a atividade catalítica mimetizada, a estrutura e a origem. Quanto ao mecanismo catalítico, as nanoenzimas descobertas até ao momento podem atuar como mimetizadoras de peroxidase, oxidase, superóxido dismutase e catalase (Ma et al., 2025).

As enzimas com atividade de peroxidase são capazes de utilizar o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) como agente oxidante, promovendo a transformação de diversas moléculas. Esta ação é fundamental, por exemplo, na degradação de compostos tóxicos e na defesa contra agentes patogénicos. Este tipo de mecanismo ocorre sobretudo em meios ácidos. Nesta reação, o peróxido de hidrogénio atua como um dador de eletrões e sofre decomposição na superfície do nanomaterial. Esta decomposição conduz à produção de radicais reativos, como o radical hidroxilo ($\cdot OH$) e o anião superóxido (O_2^-). O radical hidroxilo, por sua vez, induz a oxidação dos substratos da peroxidase (Das et al., 2021; R. Zhang et al., 2022).

As oxidases são enzimas que catalisam a oxidação de substratos utilizando o oxigénio molecular (O_2). Este processo, além de permitir a conversão de substâncias específicas, produz frequentemente água ou peróxido de hidrogénio como subprodutos. (Das et al., 2021; R. Zhang et al., 2022).

As enzimas com atividade semelhante à catalase destacam-se pela sua capacidade de decompor rapidamente o peróxido de hidrogénio em oxigénio molecular e água. Esta função

constitui uma defesa adicional contra a toxicidade desta molécula, garantindo um maior equilíbrio no ambiente celular. Esta atividade é normalmente observada em condições de pH neutro (Das et al., 2021; R. Zhang et al., 2022). Por fim, a reação da superóxido dismutase desempenha um papel protetor nas células, uma vez que converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma molécula altamente reativa, em oxigénio e peróxido de hidrogénio. Desta forma, ajudam a reduzir o stress oxidativo, que está associado a diversas doenças e ao envelhecimento celular (Zhao et al., 2021).

2.2.4.1 Nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4)

Entre os exemplos mais estudados destacam-se as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, conhecidas como MNPs de Fe_3O_4 que, em 2007, foram as primeiras a demonstrar atividade semelhante à peroxidase (Q. Liu et al., 2021). Esta descoberta despertou um grande interesse científico e, atualmente, sabe-se que estas partículas podem apresentar atividades multi-catalíticas consoante as condições experimentais.

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro são catalisadores heterogéneos versáteis que exibem principalmente atividades do tipo peroxidase e catalase, mas também podem exibir atividade semelhante à oxidase. A sua função catalítica específica é frequentemente ditada por condições ambientais como o pH e propriedades estruturais do próprio nanomaterial (S. Singh, 2019). Por exemplo, nanoenzimas de óxido de ferro de menor dimensão tendem a apresentar maior atividade catalítica devido à maior área de superfície específica, que expõe um maior número de sítios ativos (Das et al., 2021).

Para além das características inerentes a todas as nanoenzimas, atributos físico-químicos favoráveis, alta estabilidade e o custo-eficácia, estas nanoenzimas apresentam propriedades magnéticas e uma boa compatibilidade biológica (Q. Liu et al., 2021). Entre todos os óxidos de metais de transição, o óxido de ferro (Fe_3O_4) destaca-se como um candidato promissor devido à sua condutividade eletrónica e comportamento *redox* eficiente (Fe^{2+}/Fe^{3+}) (S. Singh, 2019).

2.2.5 Classificação de biossensores de acordo com a tipologia de transdutor

O transdutor, que constitui o segundo componente principal de um biossensor, é o elemento responsável por transformar uma forma de energia noutra. Num biossensor, o transdutor converte o sinal bioquímico detetado pelo elemento de biorreconhecimento numa forma mensurável e quantificável, que pode ser piezoelétrica, ótica, eletroquímica, entre outros (Figura 11) (Tetyana et al., 2021).

Os transdutores de biossensores dependem da natureza do material utilizado, das especificações do dispositivo sensor e também do mecanismo de conversão do sinal em si. No que diz respeito às especificações do transdutor, estas são definidas principalmente pela natureza das capacidades do material sensor ativo e do *design* do próprio dispositivo (Polat et al., 2022).

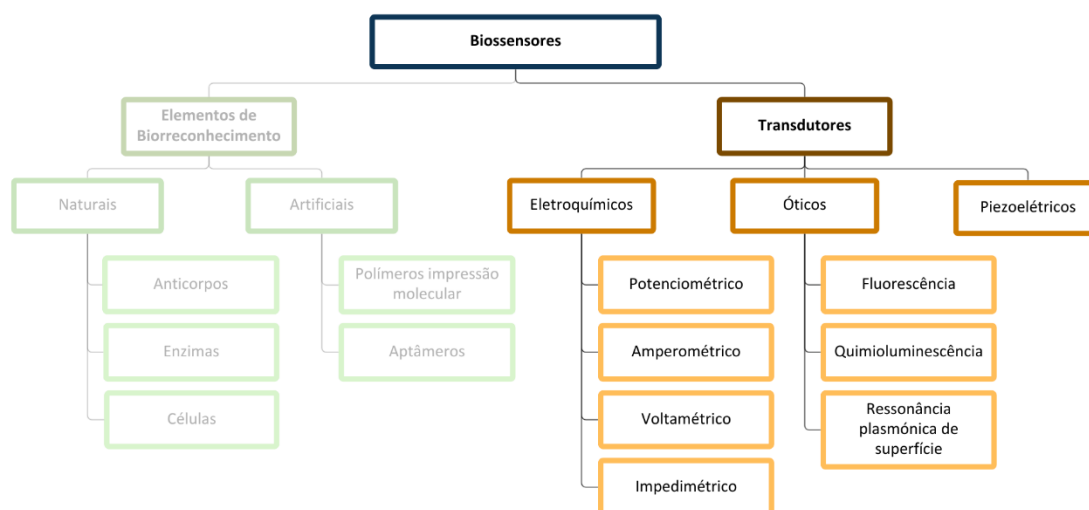


Figura 11- Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores. Imagem adaptada de (Tetyana et al., 2021).

2.2.5.1 Óticos

Nos biossensores com transdutores óticos, o processo de transdução induz uma alteração nas propriedades óticas da luz, tais como absorção, transmissão, reflexão, refração, fase, entre outros, em resposta a alterações físicas ou químicas criadas pelos elementos de biorreconhecimento (Naresh & Lee, 2021; A. K. Singh et al., 2023).

Estes sensores tornaram-se populares essencialmente devido à sua capacidade de fornecer respostas rápidas e têm sido utilizados em diversas áreas como diagnóstico clínico, descoberta de fármacos, controlo de processos alimentares e monitorização ambiental (Katey et al., 2023). Contudo, também apresentam algumas desvantagens, como um custo elevado de tecnologias, a necessidade de condições ambientais estáveis e uma sensibilidade relativamente reduzida (Sin et al., 2014; Vigneshvar et al., 2016).

Os biossensores podem ser classificados em duas grandes categorias, *label-free* e *label-based*. Na deteção *label-free* o sinal resulta diretamente da interação entre o analito e o elemento de biorreconhecimento, sem necessidade de marcadores auxiliares. Já na deteção *label-based* é necessário utilizar moléculas marcadoras (Uniyal et al., 2023). A ressonância plasmônica de superfície é o método mais utilizado nos biossensores óticos *label-free*, enquanto os corantes fluorescentes e as abordagens colorimétricas são as mais comuns na deteção ótica *label-based* (Naresh & Lee, 2021). Nestes últimos, o sinal ótico obtido será proporcional à intensidade da fluorescência, à alteração de cor ou à emissão de luz, no caso de uma reação de quimioluminescência (Uniyal et al., 2023). A Figura 12 representa os principais componentes de um biossensor ótico.

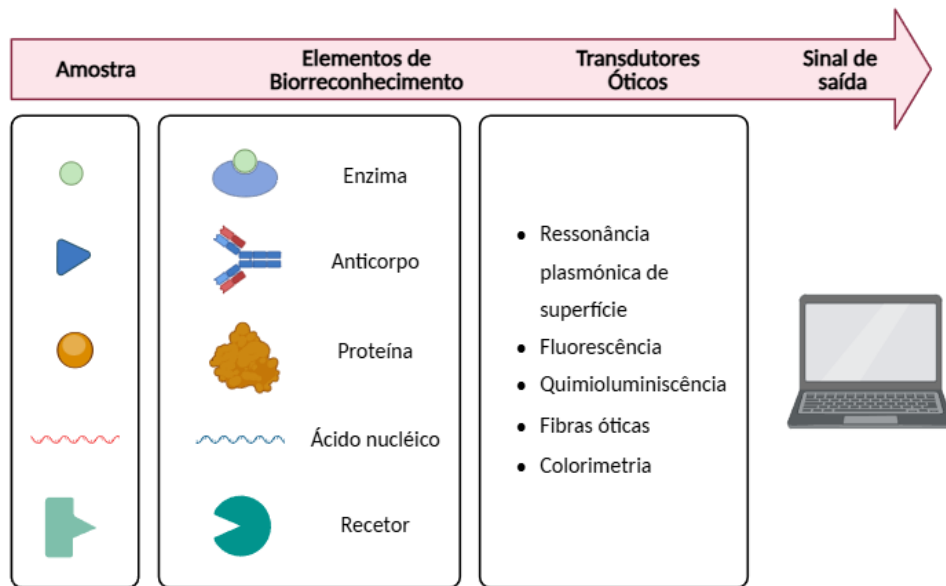


Figura 12- Esquema de funcionamento de um biossensor óptico. Imagem adaptada de (Damborský et al., 2016).

2.2.5.2 Piezoelétricos

O efeito piezoelétrico é um efeito físico que ocorre em certos corpos cristalinos sem simetria central, como a turmalina e o quartzo. Nestes materiais, a aplicação de força induz polarização de natureza elétrica no cristal piezoelétrico, ou seja, uma diferença de potencial nas extremidades. O efeito também pode ser inverso, uma tensão aplicada à superfície de um material piezoelétrico pode provocar alterações mecânicas ou oscilação quando a tensão é alternada (Pohanka, 2018).

No caso dos biossensores, quando o analito se liga ao elemento de biorreconhecimento, ocorre uma alteração de massa na superfície do cristal e, conseqüentemente, uma alteração da frequência de ressonância do mesmo. A mudança detetada é proporcional ao número de moléculas e é monitorizada eletricamente, dispensando a utilização de marcadores auxiliares (Malhotra et al., 2017).

Estes transdutores podem fornecer uma resposta em tempo real com uma gama de pH operacional mais ampla e alta seletividade. As desvantagens incluem sensibilidade limitada e restrições na medição e armazenamento, dado que são afetados pela humidade (Y. Li et al., 2024; Vinay Kumar et al., 2022).

2.2.5.3 Eletroquímicos

O princípio de funcionamento dos biossensores eletroquímicos baseia-se na interação do analito com o biorrecetor imobilizado na superfície do transdutor. Essa interação desencadeia reações *redox*, durante as quais ocorre a transferência de elétrões do analito para o elétrodo ou do elétrodo para o analito (Bollella & Katz, 2020). Esta transferência de elétrões traduz-se

em alterações nas propriedades elétricas do transdutor, tais como corrente elétrica, diferença de potencial ou impedância (A. Singh et al., 2021). O sinal elétrico resultante está relacionado com o processo de reconhecimento entre o elemento de biorreconhecimento e o analito, sendo proporcional à concentração do analito (Bhalla et al., 2016).

Posto isto, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em várias categorias. Os potenciométricos medem a diferença de potencial entre os eletrodos; os amperométricos que avaliam a corrente gerada por reações *redox*; os condutimétricos acompanham alterações na condutividade da solução; os impedimétricos analisam variações na impedância elétrica; e os voltamétricos relacionam a corrente com o potencial aplicado (Khan et al., 2020; Malhotra et al., 2017).

Os biossensores eletroquímicos apresentam vantagens como elevada sensibilidade e seletividade, simplicidade na instrumentação, um baixo custo, possibilidade de miniaturização, resposta rápida e sinais estáveis (Khan et al., 2020). São por isso adequados para a detecção de biomoléculas em ambientes complexos e, em muitos casos, considerados superiores a outros sensores, como os óticos. No entanto, também enfrentam desafios como dificuldade para produção em massa e a adsorção não específica de componentes biológicos na sua superfície, o que pode comprometer especificidade das medições (Y. Li et al., 2024; Naresh & Lee, 2021; Tetyana et al., 2021).

De uma forma geral, uma célula eletroquímica é constituída por três eletrodos (Katey et al., 2023). O eletrodo de trabalho (WE, do inglês, *Working Electrode*) é o componente central onde ocorre a reação *redox* de interesse. É neste eletrodo que os analitos interagem com a superfície, o que permite a transferência de elétrons. A eficiência deste processo depende não só do material do eletrodo como da sua superfície, geometria e de qualquer modificação química. O eletrodo de referência (RE, do inglês, *Reference Electrode*) tem um potencial conhecido e deve ser estável durante a medição. Como o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho é sempre medido em relação ao eletrodo de referência, é essencial um potencial estável para garantir resultados reprodutíveis e precisos. O contra eletrodo (CE, do inglês, *Counter Electrode*) completa o circuito elétrico, o que permite que a corrente flua pela solução eletrolítica e pelo eletrodo de trabalho sem alterar significativamente o seu potencial. O CE fornece ou recebe elétrons para manter o fluxo de corrente, mas não participa diretamente na reação (Grieshaber et al., 2008; Tetyana et al., 2021).

Os materiais dos eletrodos, como platina, ouro, carbono ou silício, tal como as suas dimensões influenciam diretamente a sensibilidade e eficiência do biossensor. De igual forma, as modificações superficiais aplicadas ao eletrodo também desempenham um papel relevante, sendo a incorporação de nanoestruturas um exemplo particularmente eficaz, pois aumentam a área de superfície disponível e melhoram a captura do analito (Grieshaber et al., 2008; Katey et al., 2023; Tetyana et al., 2021).

Os elétrodos serigrafados (SPEs, do inglês *Screen-Printed Electrodes*) são comumente utilizados como plataformas eletroquímicas (Figura 13). Estes elétrodos permitem personalizar a sua superfície e composição, o que facilita modificações com catalisadores ou outros materiais para otimizar o desempenho eletroquímico (Paimard et al., 2023).

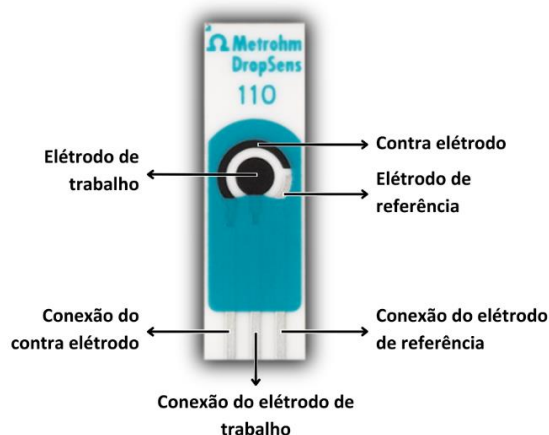


Figura 13- Esquema de uma célula eletroquímica de três elétrodos (C-SPE). Imagem adaptada de (Metrohm DropSens, 2025b).

Todos os diferentes tipos de biossensores eletroquímicos mencionados serão detalhadamente apresentados e discutidos nas seguintes secções.

a. Sensores potenciométricos

Os dispositivos potenciométricos medem a diferença de potencial em condições em que a corrente que flui através do eléttrodo é nula ou desprezável. Essa diferença de potencial é medida entre o WE e o RE da célula eletroquímica. Em comparação com os sensores amperométricos, estes dispositivos não consomem o analito durante a medição. São sensíveis, simples de fabricar e mantêm o desempenho estável mesmo quando miniaturizados para dimensões muito reduzidas. No entanto, vários estudos relatam que o limite de detecção relativamente alto é uma das principais desvantagens destes sensores (Grieshaber et al., 2008; Karimi-Maleh et al., 2021; Sumitha & Xavier, 2023).

b. Sensores amperométricos

Os sensores amperométricos são amplamente utilizados devido à sua elevada sensibilidade e capacidade de detecção de substâncias eletroativas em amostras biológicas (Vinay Kumar et al., 2022). Estes sensores medem a corrente gerada em reações de oxidação-redução quando é aplicado um potencial constante. A corrente medida resulta da interação do analito com o elemento de biorreconhecimento imobilizado no eléttrodo e é correlacionada com a variação da amostra em estudo (Tetyana et al., 2021; Ding et al., 2025). Para além disso, estes sensores podem ser afetados por interferências de outras espécies eletroativas presentes na amostra (Naresh & Lee, 2021).

c. Sensores voltamétricos

Os sensores voltamétricos são dispositivos eletroquímicos baseados em técnicas de voltametria. Na voltametria, uma gama de potencial é aplicada ao eletrodo imerso numa solução que contém o analito de interesse. Este potencial induz uma reação de oxidação-redução nas substâncias eletroativas presentes no eletrodo de trabalho. A corrente de resposta é registrada em função do potencial aplicado (Harun-Ur-Rashid et al., 2025; Sumitha & Xavier, 2023).

Existem diferentes técnicas de voltametria, tais como a voltametria de pulso diferencial, a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada, entre outras (Sumitha & Xavier, 2023). A voltametria cíclica (CV, do inglês, *Cyclic Voltammetry*) é a técnica eletroquímica mais utilizada. Na CV, o potencial aplicado (E) é varrido linearmente entre dois valores, E_1 e E_2 , a uma taxa de varrimento definida. Quando o potencial atinge E_2 , o varrimento é invertido e regressa a E_1 , como ilustrado na Figura 14 (Grieshaber et al., 2008).

Durante o varrimento ocorre a oxidação ou redução do analito. À medida que o potencial é aplicado no varrimento direto, a corrente aumenta progressivamente. Este aumento reflete o início da oxidação do analito na superfície do eletrodo. Quando o potencial se aproxima do valor de equilíbrio da reação *redox*, a corrente aumenta até atingir um valor máximo (pico anódico). Este pico corresponde ao momento em que se estabelece um equilíbrio entre o movimento dos eletrões e a difusão das moléculas envolvidas na reação. Quando o potencial é superior a este valor, a corrente diminui devido à redução da quantidade de analito disponível na superfície do eletrodo (J. Liu et al., 2022).

Se a reação for reversível, durante o varrimento inverso, pode ser observado um pico simétrico (pico catódico) com o sinal oposto (J. Liu et al., 2022). A tensão é medida entre o RE e o WE, enquanto a corrente é medida entre o WE e o CE. As medições obtidas são representadas em gráficos de corrente *versus* tensão, também conhecidos como voltamogramas (Grieshaber et al., 2008; Sandford et al., 2019).

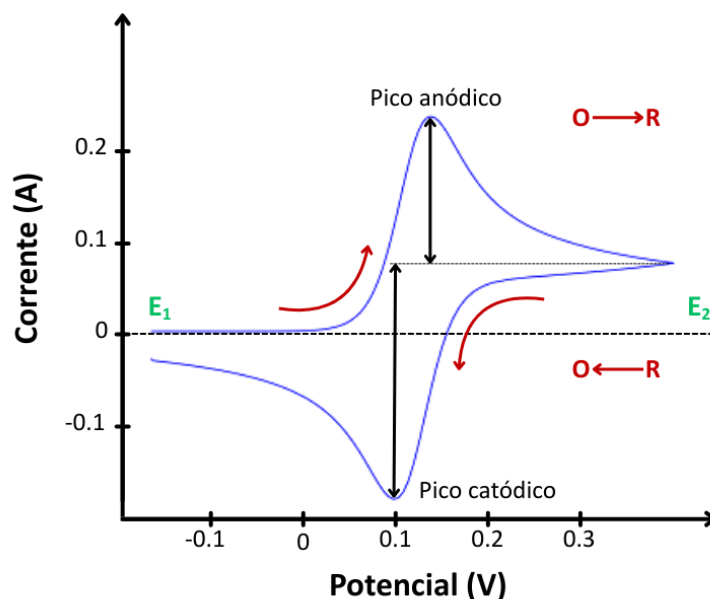


Figura 14- Exemplo de um voltamograma cíclico reversível. Imagem adaptada de (Dickinson, 2013).

A forma do voltamograma para um dado composto depende da velocidade de varrimento, da concentração do analito e das características da superfície do eletrodo, incluindo eventuais modificações. A velocidade de varrimento, definida como $v = \Delta E / \Delta t$, é um fator crítico, uma vez que define o tempo necessário para que ocorram as reações químicas (Ding et al., 2025; Grieshaber et al., 2008).

As características da corrente de resposta, como o valor de pico de corrente, a largura do pico e o potencial do pico da curva voltamétrica, representam as propriedades eletroquímicas de um analito. Um potencial do pico maior implica uma maior quantidade de energia aplicada ao processo *redox*. A CV é útil não apenas para fins de detecção, mas também como ferramenta de caracterização dos processos que ocorrem no eletrodo (Grieshaber et al., 2008; Harun-Ur-Rashid et al., 2025).

d. Sensores impedimétricos

Tal como mencionado anteriormente, os sensores impedimétricos são dispositivos que medem uma alteração na impedância elétrica na interface do eletrodo com o eletrólito. Esta variação é medida e associada à concentração do analito (Naresh & Lee, 2021).

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) é a técnica mais utilizada entre os sensores impedimétricos. Consiste na aplicação de um sinal de potencial de baixa amplitude ao eletrodo sensor e na medição da corrente de resposta em diferentes frequências (Naresh & Lee, 2021).

O sinal aplicado tem a forma de uma onda sinusoidal e, por isso, tanto a corrente como o ângulo de fase (φ) podem ser determinados em função da frequência angular (ω). O ângulo de fase

representa o desfasamento da resposta da corrente relativamente à tensão, expresso em graus ou radianos (Leva-Bueno et al., 2020).

A impedância complexa (Z) representa a oposição total do circuito eletroquímico ao movimento dos eletrões e é definida como a razão entre a tensão aplicada (E) e a corrente resultante (I) em função da frequência angular (ω) (Štukovnik & Bren, 2022):

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{I(\omega)} \quad (3)$$

Os dados de impedância complexa obtidos a partir de medições EIS são tipicamente visualizados utilizando o gráfico de *Nyquist*. No diagrama de *Nyquist*, a parte imaginária negativa da impedância ($-Z''$) é representada em função da sua parte real (Z'), para todo o intervalo de frequências analisado (Lazanas & Prodromidis, 2023).

Uma das porções do diagrama de *Nyquist* é um semicírculo na região de média ou alta frequência (Figura 15, (1)). Este semicírculo está diretamente ligado à resistência à transferência de carga (R_{ct}). Quanto maior for o diâmetro do semicírculo, maior será a resistência de transferência de carga na interface do eletrodo. A interceção do semicírculo com o eixo Z' a altas frequências corresponde à resistência da solução eletrolítica (R_s) e a impedância é representada como um vetor de comprimento $|Z|$. Finalmente, em frequências mais baixas, é possível observar uma região linear que representa o elemento de Warburg (Figura 15, (2)). Este elemento reflete as contribuições da difusão de espécies eletroativas na interface do eletrodo. Nos gráficos de *Nyquist*, os pontos de frequência mais alta tendem a estar mais à esquerda do gráfico, enquanto os pontos de frequência mais baixa tendem a estar mais à direita (Leva-Bueno et al., 2020; Magar et al., 2021).

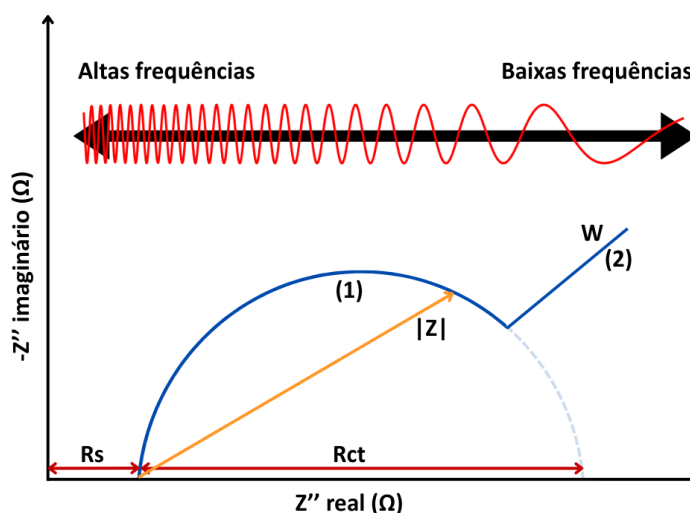


Figura 15- Gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de (Leva-Bueno et al., 2020).

2.3 Biossensores eletroquímicos para detecção de lactato no suor

Tal como referido anteriormente, os biossensores eletroquímicos apresentam diversas vantagens em comparação com outros métodos de detecção. Devido à evolução tecnológica, a utilidade destes dispositivos tem vindo aumentar, tendo aplicações em diversas áreas. Na Tabela 2 estão descritos alguns biossensores que existem na literatura (entre 2017 e 2025), capazes de detetar lactato no suor, com os respetivos limites de detecção e a gama linear. Do ponto de vista bibliográfico, observa-se que muitos dos estudos que recorrem a nanoenzimas desenvolveram sistemas de detecção híbridos, combinando-as com outros elementos funcionais mais específicos. Esta abordagem deve-se ao facto de as nanoenzimas, por si só, possuírem uma baixa especificidade catalítica.

Tabela 2- Exemplos de biossensores eletroquímicos para a detecção de lactato no suor.

Referência	Ano	Tipo de biossensor	Descrição	LoD	Gama linear
(Iula et al., 2025)	2025	Enzimático híbrido: Lactato oxidase (LOx) com Prussian Blue e Carbon black	Sensor vestível com fita de papel de recolha e elétrodos serigrafados modificados com Prussian Blue/Carbon black/LOx, integrado numa pulseira flexível.	60 $\mu\text{mol/L}$ (meio utilizado: KCl)	0,50-20 mmol/L
(Weng et al., 2024)	2024	Enzimático híbrido: Nanoenzima (CeO_2) + Enzima Lactato oxidase (LOx)	Sensor vestível composto por elétrodos flexíveis de grafeno, recobertos com nanoenzimas de CeO_2 e a enzima LOx, integrados num substrato de poliimida e tecido funcional.	0,052 mmol/L (meio utilizado: PBS)	0,1–50 mmol/L
(Sun et al., 2025)	2025	Enzimático: Lactato oxidase (LOx) e Bilirrubina oxidase (BOx).	Sensor vestível autoalimentado com elétrodos de carbono/grafeno modificados, recobertos com LOx (ânodo) e BOx (cátodo).	4,38 nmol/L (meio utilizado: PBS)	10 nmol/L– 50 mmol/L
(Zaryanov et al., 2017)	2017	MIPs com 3-Aminofenilborônico Ácido (3-APBA).	Sensor impedimétrico com elétrodos serigrafados de carbono modificados com 3-aminofenilborónico ácido.	1,5 mmol/L (meio utilizado: KCl e PBS)	3 – 100 mmol/L

(Dykstra et al., 2024)	2024	MIPs eletropolimerizados com 3-APBA e pirrol	Sensor baseado em elétrodos serigrafados de carbono modificados com Prussian Blue e recobertos por MIPs eletropolimerizados, sem reagentes <i>redox</i> externos.	0,20 mmol/L (meio utilizado: KCl)	1-35 mmol/L
(P. Li et al., 2024)	2024	Nanoenzima: Óxido de níquel (NiO) nanostruturado	Sensor flexível baseado em elétrodos de Au/PET modificados com NiO nanostruturado por <i>Glancing Angle Deposition</i> (GLAD)	3 μ mol/L (meio utilizado: KCl)	1-45 mmol/L
(Xia et al., 2023)	2023	Enzimático: bioânodo de lactato desidrogenase (LDH) e biocátodo de laccase (Lac).	Sensor vestível autoalimentado baseado em matriz têxtil de celulose flexível, modificado com nanotubos de carbono e óxido de grafeno reduzido, integrando a enzima LDH e laccase.	9,49 μ mol/L (meio utilizado: PBS)	9,5 μ mol/L – 10 mmol/L
(Q. Zhang et al., 2020)	2020	MIPs e Nanofios de prata (AgNWs)	Sensor vestível que utiliza elétrodos flexíveis com AgNWs revestidos e MIPs com 3-APBA.	0,22 μ mol/L (meio utilizado: PBS)	10^{-6} – 0,1 mol/L
(Khosravi et al., 2023)	2023	Enzimático híbrido: Lactato Oxidase (LOx) imobilizada em nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) revestidas com polidopamina (PDA).	Sensor sustentável baseado em elétrodos serigrafados de carbono modificados com Prussian Blue e nanomateriais Fe_3O_4 com PDA-LOx, obtidos a partir de resíduos industriais.	0,32 mmol/L (faixa baixa) e 6,31 mmol/L (faixa alta) (meio utilizado: PBS)	0,1 – 4,62 mmol/L e 4,62 – 149,21 mmol/L

3 Procedimento Experimental

Neste capítulo serão descritos de forma detalhada todos os equipamentos, materiais, reagentes, bem como os procedimentos experimentais utilizados na construção e otimização do biossensor eletroquímico para a detecção do lactato.

3.1 Material e equipamento

As medições eletroquímicas foram realizadas com um potenciômetro *Metrohm Autolab* (Figura 16), que utiliza o *software* Nova 1.11. Foram utilizados elétrodos serigrafados de carbono (C-SPEs) da marca *DropSens* (modelo DRP-110-U75), constituídos por um eletrodo de trabalho (WE) em carbono com 4 mm de diâmetro, um contra eletrodo (CE) igualmente em carbono e um eletrodo de referência (RE) em prata. As dimensões dos elétrodos são de $3,4 \times 1,0 \times 0,05$ cm. Para a realização das medições, os C-SPEs foram acoplados a um caixa de ligação *DropSens* (modelo DRP-DSC) que assegura a conexão entre os elétrodos de carbono e o potenciômetro (Figura 16).



Figura 16- Caixa de ligação DropSens (Metrohm DropSens, 2025a) e potenciômetro Metrohm Autolab (Metrohm, 2025), respectivamente.

Os volumes das diferentes soluções até 5 mL foram medidos com recurso a micropipetas *Biohit* de volume ajustável (2-20 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L; 500-5000 μ L). Para volumes superiores

a 5 mL, as soluções foram preparadas em balões volumétricos (50 mL, 100 mL e 200 mL). A pesagem dos reagentes foi realizada numa balança de precisão da marca *Mettler Toledo* (modelo MS105DU), com exatidão de $\pm 0,0001$ g.

Para a preparação das soluções foi utilizado um agitador magnético (IKA Big Squid White). Também foi necessário recorrer à utilização de um ultrassom da SELECTA de modo a homogeneizar as soluções com nanomateriais. Já para homogeneizar as diferentes soluções de lactato foi utilizado um agitador *vortex* para líquidos da marca *Fisherbrand*. Para o processo de secagem com temperatura, após deposição das camadas das partículas magnéticas e dos polímeros, foi necessário recorrer a uma Mufla da *Nabertherm*. Por fim, para medir o pH das soluções foi utilizado um medidor de pH da marca Crison (modelo GLP 21). Todos os reagentes utilizados estão descritos na Tabela 3, assim como a sua origem comercial.

Tabela 3- Lista de reagentes utilizados e a sua respetiva origem.

Reagente	Origem
Hexacianoferrato (II) de potássio ($K_2[Fe(CN)_6]$)	Riedel-de-Haën
Hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Riedel-de-Haën
Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	Scharlau
Sulfato de ferro (II) heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Panreac
Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)	Sigma Aldrich
Ácido Cítrico ($C_6H_8O_7$)	Riedel-de-Haën
Phosphate-buffered saline (PBS) pastilhas	VWR
Cloreto de Potássio (KCl)	Normapur
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Fisher Chemical
β -Ciclodextrina ($C_{42}H_{70}O_{35}$)	Sigma Aldrich
Alginato	Sigma Aldrich
Nafion NS-5-AQ	QUINTECH
Quitosano (100.000–300.000 $g \cdot mol^{-1}$)	Thermo Scientific
Creatinina ($C_4H_7NO_3$)	Fluka
Ureia (CH_4N_2O)	Fagron
Glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	Alfa Aesar
Ácido Láctico ($C_3H_6O_3$)	Fluka
Cloreto de Sódio (NaCl)	NormaPur
Ácido Acético (CH_3COOH)	Carlo Erba

3.2 Soluções

Todas as soluções que foram preparadas com recurso a água ultrapura utilizaram água proveniente de um sistema de purificação Milli-Q. Ao longo deste estudo utilizaram-se diferentes soluções preparadas sob distintas condições de pH. A primeira solução utilizada neste estudo foi a solução tampão salina com fosfato (PBS, do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*) com um pH de 7,4 e uma concentração de 0,01 mol/L. Para preparar esta solução dissolveu-se uma pastilha de PBS em 200 mL de água ultrapura. A segunda solução utilizada foi hidróxido de sódio (NaOH) com um pH de 13,6. Esta solução foi preparada com uma concentração de 0,1 mol/L. Por fim, a última solução utilizada foi cloreto de potássio (KCl), também com uma concentração de 0,1 mol/L, e um pH de 5,1.

A solução de ácido sulfúrico, com uma concentração de 0,5 mol/L, foi preparada em 100 mL de água ultrapura. Para o processo de medição eletroquímica recorreu-se a uma solução padrão *redox*, constituída por hexacianoferrato (II) de potássio e hexacianoferrato (III) de potássio, com uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L, cada um, em PBS. Quanto à solução utilizada para o estudo da área eletroativa do elétrodo, utilizou-se apenas o hexacianoferrato (II) de potássio. Esta solução foi preparada em KCl (0,1 mol/L) com uma concentração final de $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

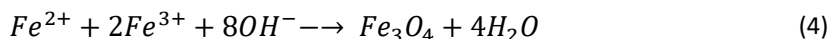
Para além das três soluções com diferentes valores de pH, utilizaram-se também três polímeros distintos com as partículas magnéticas. O quitosano, o alginato e o Nafion foram todos preparados com uma concentração final de 0,5% (m/v). O quitosano foi dissolvido em ácido acético (1%) enquanto o alginato e o Nafion foram preparados em água ultrapura.

O ácido láctico foi diluído nas três soluções tampão diferentes: o PBS, o NaOH e o KCl. A concentração de lactato (solução mãe) foi de 0,1 mol/L para cada um deles.

3.3 Síntese das partículas magnéticas

As MNPs foram preparadas pelo método de co-precipitação química. Numa primeira etapa foi preparada uma solução contendo cloreto de ferro (III) hexahidratado (0,55 mol/L) e sulfato de ferro (II) heptahidratado (0,275 mol/L) em 20 mL de água ultrapura num balão de Erlenmeyer de 100 mL. Após completar a dissolução dos reagentes, a solução foi mantida sob agitação magnética contínua, em ambiente de azoto, a 65 °C durante aproximadamente 30 minutos. A utilização de um meio inerte, ou seja, isento de oxigénio, foi crucial para a formação de partículas de magnetite pura.

Para induzir o processo de precipitação das partículas magnéticas preparou-se uma solução de NaOH com concentração de 2 mol/L. De seguida, 25 mL dessa solução foram adicionados gota a gota à reação. Observou-se que houve uma alteração da cor da mistura que passou de verde para preto no decorrer de 30 minutos. Posteriormente, para estabilizar a superfície das nanopartículas, foram adicionados 5 mL de ácido cítrico (2 mol/L). Manteve-se a reação a 65 °C durante 90 minutos em agitação constante. Este processo está representado na equação (4) abaixo apresentada e na Figura 17.



Por fim, a mistura foi deixada a arrefecer. As nanopartículas foram lavadas três vezes com água ultrapura, de modo a reduzir o pH até alcançar o valor neutro (pH =7). Em seguida, com auxílio de um íman, o sobrenadante foi removido e as nanopartículas foram recolhidas. A suspensão final foi armazenada no frigorífico.

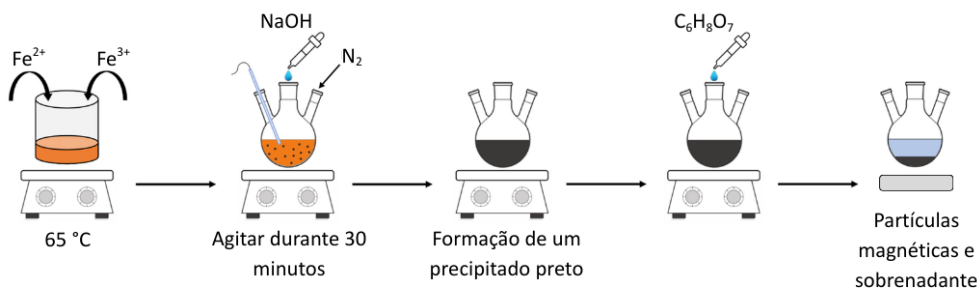


Figura 17-Síntese de nanopartículas magnéticas por co-precipitação química. Imagem adaptada de (Khosravi et al., 2023).

3.4 Medições eletroquímicas

Na presente dissertação, os resultados foram obtidos recorrendo a diversas técnicas eletroquímicas previamente descritas. Antes de se fazer qualquer tipo de modificação na superfície dos elétrodos C-SPEs, realizou-se sempre uma limpeza eletroquímica com ácido sulfúrico 0,5 mol/L. Para isso, colocou-se 80 μ L da solução de ácido nos 3 elétrodos e recorreu-se à técnica eletroquímica CV, aplicando um potencial de -0,5 V a +1,5 V, durante 10 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s.

Após a limpeza eletroquímica, o desempenho dos elétrodos foi sempre avaliado utilizando uma solução redox de hexacianoferrato(II) e hexacianoferrato(III) de potássio (80 μ L). Através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). A medição de CV ocorreu num intervalo de potencial de -0,5 V a +0,7 V, durante 3 ciclos, numa velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As medições de EIS foram realizadas com um número de 50 pontos de frequência, varrendo o intervalo de 0,12 a 1×10^5 Hz.

Após cada etapa de modificação, o desempenho do elétrodo foi avaliado novamente com a solução *redox*, através das mesmas técnicas eletroquímicas de CV e EIS.

As calibrações de lactato foram também avaliadas por CV, efetuando-se apenas um ciclo no intervalo de potencial de -0,2 V a +0,8 V. Antes de iniciar a medição das soluções padrão de lactato, foi necessário medir 3 a 4 vezes a solução correspondente ao respetivo pH (sem lactato), até que se obtivesse um sinal estável.

3.5 Preparação e modificação dos eletrodos

Inicialmente, os eletrodos de carbono foram modificados exclusivamente com as partículas magnéticas. As partículas magnéticas foram diluídas em água ultrapura num *ratio* de volume de 1:10. Esta suspensão foi homogeneizada num banho de ultrassons durante 5 minutos. Após a limpeza eletroquímica dos eletrodos, foram realizadas medições de CV e EIS utilizando solução *redox*. De seguida, depositaram-se 7 μL da suspensão de partículas magnéticas sobre a superfície do eletrodo de trabalho, o qual foi posteriormente colocado numa mufla a 60 °C durante 20 minutos. Neste estudo, o método de imobilização utilizado é denominado *drop-casting* (adsorção física). Esta técnica de imobilização apresenta várias vantagens, incluindo a simplicidade, o baixo custo, a capacidade de modificar superfícies irregulares e a possibilidade de aplicar múltiplas camadas (Kaliyaraj Selva Kumar et al., 2020; Moreira et al., 2024).

De seguida, foram avaliados diversos parâmetros experimentais com vista a otimizar as condições para o melhor desempenho dos eletrodos relativamente à deteção de lactato: (i) incorporação de diferentes polímeros, (ii) diferentes condições de pH, (iii) concentração de partículas magnéticas (iv) número de camadas aplicadas no eletrodo, (v) temperatura da mufla e (vi) velocidade de varrimento durante a medição eletroquímica.

i. Diferentes polímeros

Com o intuito de melhorar a adesão do nanomaterial à superfície do eletrodo, as partículas magnéticas foram misturadas com diferentes polímeros: quitosano, alginato e Nafion. Para cada polímero preparou-se uma mistura com partículas magnéticas, utilizando um *ratio* de 1:10 (volume), como é possível observar na Figura 18. Cada mistura foi levada aos ultrassons durante 10 minutos de modo a ficar homogénea. De seguida, os eletrodos (WE) foram revestidos com 7 μL da mistura correspondente e colocados na mufla a 60 °C durante 20 minutos para promover a adesão da camada. Foram preparados em triplicado tanto os eletrodos unicamente com partículas magnéticas como os modificados com polímeros.

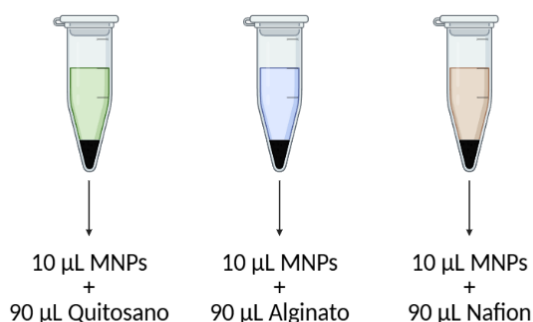


Figura 18- Diluição de partículas magnéticas em diferentes polímeros com uma razão de volume de 1:10. Imagem realizada em *BioRender.com*

ii. Diferentes pHs

Conforme referido anteriormente, este estudo avaliou o desempenho dos elétrodos modificados com as nanopartículas em diferentes condições de pH (ácido, neutro e básico). Para isso, utilizaram-se as soluções-mãe de lactato de 0,1 mol/L preparadas em PBS (meio neutro), NaOH (meio básico) e KCl (meio ácido). A partir da solução preparada em PBS, obtiveram-se 5 padrões de concentração (10 µmol/L, 100 µmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L e 50 mmol/L). De forma análoga, foram também preparados 5 padrões de concentração para as soluções de lactato em NaOH e KCl. As calibrações dos elétrodos modificados apenas com partículas magnéticas ou misturadas com os polímeros (quitosano, alginato ou Nafion) foram então realizadas em diferentes valores de pH. As diferentes concentrações utilizadas para cada solução encontram-se resumidas na Tabela 4.

Tabela 4- Concentrações das soluções padrão de lactato preparadas em PBS e NaOH/KCl.

Padrão	Concentração (PBS)	Concentração (NaOH/KCl)
1	10 µmol/L	500 µmol/L
2	100 µmol/L	1 mmol/L
3	1 mmol/L	5 mmol/L
4	10 mmol/L	10 mmol/L
5	50 mmol/L	50 mmol/L
6 (solução mãe)	0,1 mol/L	0,1 mol/L

iii. Concentração de Partículas Magnéticas

De forma a estudar o efeito da concentração de partículas magnéticas, avaliaram-se elétrodos com misturas de partículas magnéticas e alginato em diferentes concentrações de volume, 1:10 e 1:2, como apresentado na Figura 19. Os elétrodos foram novamente preparados em triplicado, com o mesmo procedimento experimental aplicado anteriormente. De seguida, a resposta eletroquímica foi avaliada utilizando uma solução de lactato a 10 mmol/L em KCl, por voltametria cíclica (1 ciclo a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s).

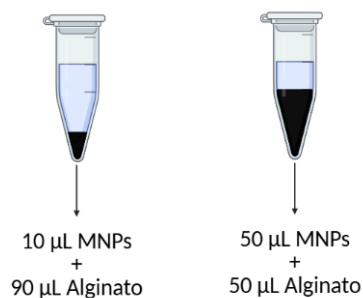


Figura 19- Diluição de partículas magnéticas em alginato com uma razão de volume de 1:10 e 1:2, respectivamente. Imagem realizada em *BioRender.com*

iv. Número de Camadas

O número de camadas de nanomaterial aplicadas no elétrodo foi considerado como um potencial fator de influência na resposta à detecção do lactato. Anteriormente, os estudos realizados incidiam sobre elétrodos com apenas uma única camada. Assim sendo, foram preparados em triplicado elétrodos com duas e três camadas da mistura partículas magnéticas e alginato (*ratio* 1:2). O tempo de aplicação na mufla foi de 20+20 minutos para duas camadas e de 20+20+20 minutos para três camadas.

Os elétrodos com diferentes números de camadas foram avaliados numa solução de lactato a 10 mmol/L em KCl, recorrendo a voltametria cíclica (1 ciclo e velocidade de varrimento de 0,05 V/s).

v. Temperatura de cura

Até esta fase os elétrodos modificados com nanomaterial tinham sido preparados à temperatura de 60 °C. Deste modo, prepararam-se elétrodos com três camadas de partículas magnéticas e alginato (*ratio* 1:2) que foram submetidos a 50 °C e 70 °C. Todas as restantes condições experimentais mantiveram-se inalteradas.

Os elétrodos modificados a diferentes temperaturas foram avaliados numa solução de lactato a 10 mmol/L em KCl, recorrendo a voltametria cíclica (1 ciclo e velocidade de varrimento de 0,05 V/s). Os resultados obtidos foram comparados com os elétrodos a 60 °C.

vi. Velocidade de varrimento

Por fim, avaliou-se a influência da velocidade de varrimento durante a medição eletroquímica (CV). Anteriormente tinha sido utilizada apenas a velocidade de 0,05 V/s. Posteriormente, testaram-se também 0,02 V/s e 0,1 V/s em elétrodos preparados com três camadas de partículas magnéticas e alginato (razão 1:2), submetidos a 70 °C.

Após a otimização destes parâmetros experimentais, voltou a proceder-se à avaliação dos eletrodos com 5 padrões de concentração de lactato diluído em KCl (100 $\mu\text{mol/L}$, 500 $\mu\text{mol/L}$, 1 mmol/L , 5 mmol/L e 10 mmol/L).

Para determinar a concentração da suspensão inicial obtida após a síntese das partículas magnéticas, utilizou-se um papel de filtro previamente pesado. Em seguida, depositou-se sobre ele um volume conhecido da suspensão de MNPs, o qual foi submetido à secagem em mufla a 70 °C por 24 horas. Após esse período, o papel de filtro foi novamente pesado e, a partir da diferença de massas, determinou-se a concentração de nanopartículas magnéticas na suspensão, que foi de aproximadamente 5 mg/mL .

3.6 Incorporação de β -ciclodextrina nas partículas magnéticas e calibração do biossensor

A β -ciclodextrina é um oligossacárido derivado do amido, constituído por sete moléculas de glucose na forma cíclica, unidas por ligações α -1,4. A sua estrutura característica é em forma de cone truncado, com uma cavidade interna hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, como é possível observar na Figura 20. Esta estrutura permite a formação de complexos de inclusão estáveis com diversas moléculas (ALBORJI et al., 2024).

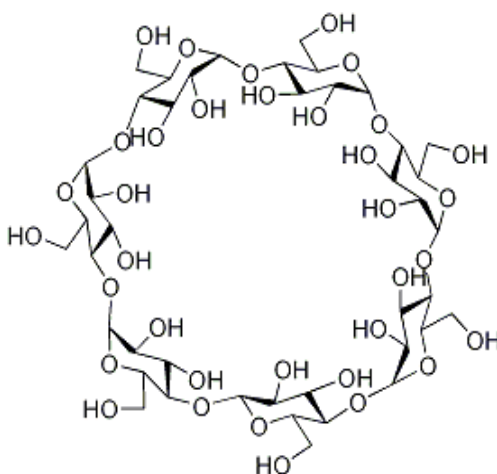


Figura 20- Estrutura química da β -ciclodextrina (ChemWhat, 2025).

Neste estudo, a β -ciclodextrina foi diluída numa solução de ácido acético (1%) numa concentração de 100 mg/mL . Após a preparação da solução de β -ciclodextrina adicionou-se 5 mL da suspensão de nanopartículas magnéticas. Esta mistura foi homogeneizada nos ultrassons durante 5 minutos e, de seguida, colocada em banho maria durante 1 hora a 50 °C com o objetivo de funcionalizar as partículas magnéticas. Por fim, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o depósito de nanomaterial com água ultrapura.

De forma a modificar a superfície dos eletrodos, utilizou-se uma solução de MNPs já funcionalizadas com β -ciclodextrina, à qual foi adicionado alginato numa *ratio* de 1:2 (volume).

Esta mistura foi novamente homogeneizada nos ultrassons. Após a limpeza eletroquímica dos elétrodos e a respetiva medição em solução *redox*, alterou-se a superfície do elétrodo com 3 camadas desta mistura, tendo cada camada 7 μL , como é possível observar na Figura 21. Entre cada camada os elétrodos foram levados à mufla a 70 °C por 20 minutos, exceto na última camada que foram 30 minutos.

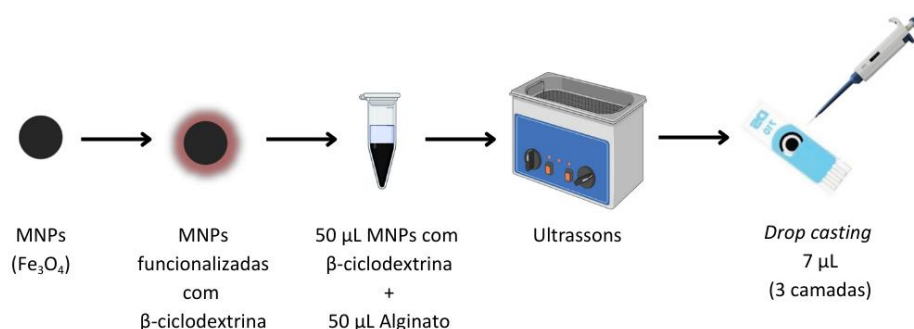


Figura 21- Esquema do processo de funcionalização das nanopartículas magnéticas com β -ciclodextrina e posterior deposição nos elétrodos de carbono. Imagem adaptada de (Khosravi et al., 2023).

Para avaliar a resposta dos elétrodos modificados, foram realizadas calibrações com diferentes soluções de lactato, preparadas em KCl, com diferentes concentrações: 50 $\mu\text{mol/L}$; 100 $\mu\text{mol/L}$; 200 $\mu\text{mol/L}$; 500 $\mu\text{mol/L}$; 1 mmol/L ; 2 mmol/L ; 5 mmol/L e 10 mmol/L . As medições eletroquímicas foram realizadas com CVs durante 1 ciclo, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s.

3.7 Cálculo da área eletroativa dos elétrodos

De forma a caracterizar as modificações introduzidas no elétrodo C-SPEs, calculou-se a área eletroativa dos elétrodos (modificados e não modificados). Para isso, foi preparada uma solução de hexacianoferrato (II) de potássio ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) em KCl (0,1 mol/L) e colocada na superfície do elétrodo. De seguida, aplicou-se a técnica eletroquímica CV num intervalo de potencial de -0,6 V a +0,8 V, durante 10 ciclos, a diferentes velocidades de varrimento. Sem trocar a solução no elétrodo, foram aplicadas as seguintes velocidades de varrimento: 0,250 V/s; 0,150 V/s; 0,100 V/s; 0,050 V/s e 0,025 V/s. Este procedimento foi realizado para elétrodos limpos sem qualquer modificação de superfície, para elétrodos com 3 camadas de partículas magnéticas e para elétrodos com 3 camadas de partículas magnéticas funcionalizadas com β -ciclodextrina e alginato (1:2 *ratio* de volume). Os elétrodos e as medições foram realizados em triplicado para cada condição.

3.8 Estudos dos interferentes e do suor sintético

Tal como mencionado anteriormente, para além de sensibilidade a diferentes concentrações, um biossensor deve apresentar uma grande seletividade a um composto específico, que neste

caso é o lactato. Posto isto, foi realizado um estudo com interferentes, bem como em amostras complexas como o suor sintético, contendo outros componentes presentes em elevadas concentrações no suor.

Para o estudo dos interferentes utilizaram-se 3 moléculas interferentes, nomeadamente a creatinina, a ureia e a glucose. Estas soluções foram preparadas com uma concentração de 1 mmol/L em KCl. Foram utilizados elétrodos com 3 camadas de MNPs com β -ciclodextrina e alginato (*ratio* 1:2). Procedeu-se à realização de medições por CV para cada solução de interferentes, em paralelo com o lactato (1 mmol/L) em KCl (controlo). De forma a mimetizar as condições de amostras mais complexas e reais, foi preparada uma solução de suor artificial, em conformidade com a Norma Europeia EN 1811:2011 (Midander et al., 2016), adotando-se uma formulação ligeiramente modificada conforme descrito neste artigo (Eldamak et al., 2020). A composição resultante incluiu 85 mmol/L de NaCl, 13 mmol/L de KCl e 15 mmol/L de ureia, com um pH final de 5,5. A partir desta solução fez-se uma solução mãe de lactato de 10 mmol/L e diferentes padrões diluídos a partir da solução mãe (50 μ mol/L; 100 μ mol/L; 200 μ mol/L; 500 μ mol/L; 1 mmol/L; 2 mmol/L; 5 mmol/L). As medições foram realizadas utilizando CVs com as mesmas características das medições anteriores.

3.9 Estudos de caracterização

3.9.1 SEM

A morfologia da superfície dos elétrodos de carbono modificados com os diferentes nanomateriais foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês, *Scanning Electron Microscopy*), utilizando um equipamento FEI Quanta 400FEG ESEM/EDAX PEGASUS X4M, com uma voltagem de aceleração de 25 kV. Cada amostra foi observada em cinco ampliações distintas: 5 kX, 25 kX, 50 kX, 100 kX e 200 kX, abrangendo várias regiões do eletrodo.

3.9.2 TEM

As dispersões aquosas de nanopartículas magnéticas (com e sem β -ciclodextrina) foram diluídas sete vezes para a análise por microscopia eletrónica de transmissão (TEM, do inglês, *Transmission Electron Microscopy*). O equipamento utilizado foi um microscópio Jeol JEM-1400.

3.9.3 FTIR

A Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foi realizada num espectrómetro *Thermo Scientific Nicolet iS10* iTR, acoplado a um acessório de reflexão total atenuada (ATR, do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) com cristal de contacto em germânio (Ge). Os espectros das diferentes amostras foram registados no intervalo de número de onda entre 4000 e 600 cm^{-1} , sob controlo da temperatura e da humidade ambiente, utilizando 64 varrimentos e uma resolução de 32 cm^{-1} .

4 Resultados e Discussão

A presente secção tem como objetivo analisar e discutir os resultados obtidos durante o processo de desenvolvimento e otimização de um biossensor eletroquímico para a deteção de lactato. A apresentação dos resultados segue uma ordem sequencial, começando pela síntese das nanopartículas magnéticas (MNPs), seguida da preparação dos elétrodos de carbono serigrafados (C-SPE) e da sua modificação com as MNPs e diversos polímeros. Em seguida, são descritas as etapas de otimização das condições experimentais e as modificações adicionais com β -ciclodextrina, de modo a obter o melhor desempenho electrocatalítico do nanomaterial. Finalmente, é avaliado o desempenho do biossensor em termos de sensibilidade e seletividade para a deteção do lactato.

4.1 Caracterização eletroquímica dos elétrodos

Conforme referido anteriormente, antes de qualquer modificação da superfície do eléctrodo de carbono, foi realizada uma etapa de limpeza eletroquímica num meio ácido, tal como está representada na Figura 22. O principal objetivo desta etapa é remover as impurezas presentes no eléctrodo e, simultaneamente, oxidar espécies existentes na sua superfície, tornando a superfície do eléctrodo mais reativa. Observa-se que, ao longo dos ciclos de varrimento, ocorre um aumento progressivo da corrente, como é possível observar no respetivo voltamograma.

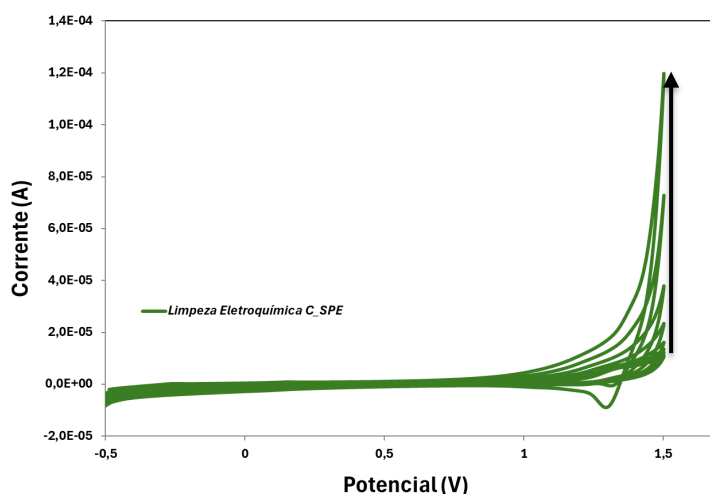


Figura 22- Voltamograma de limpeza eletroquímica do C-SPE.

Na Figura 23 está representada a comparação do comportamento eletroquímico do eletrodo de carbono antes e após a etapa de limpeza, avaliado por (a) voltametria cíclica (CV) e (b) espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

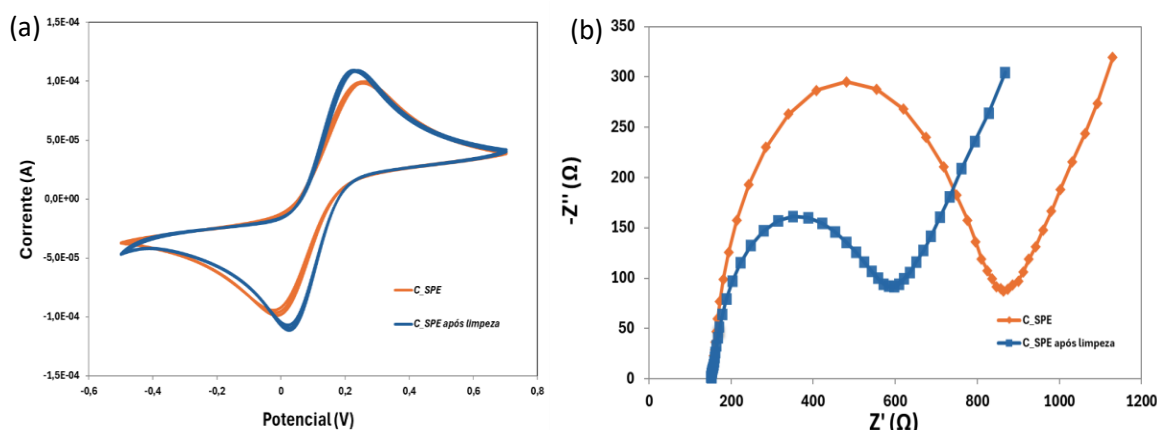


Figura 23- Comparação dos voltamogramas (a) e dos diagramas de Nyquist (b) dos eletrodos C-SPE antes (linha laranja) e após a limpeza eletroquímica (linha azul).

No voltamograma (a) observa-se que, após a etapa de limpeza (linha azul), a intensidade de corrente aumenta em comparação com o eletrodo antes da limpeza (linha laranja). Esse aumento reflete uma melhoria na eficiência das reações *redox* na superfície do material, indicando que houve uma melhoria no desempenho eletroquímico do eletrodo.

No diagrama de Nyquist (b), observa-se uma redução significativa do diâmetro do semicírculo após a limpeza. Essa diminuição está diretamente associada à redução da resistência à transferência de carga (R_{ct}), o que reflete uma melhoria na cinética de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. Isto também é um indicador que a superfície do eletrodo se encontra mais favorável à condução de processos eletroquímicos, contribuindo para um desempenho global superior.

Nesta fase do estudo foram preparados elétrodos modificados com uma camada de nanopartículas magnéticas diluídas em água (MNPs) e em diferentes polímeros, quitosano (MNPs-QUI), alginato (MNPs-ALG) e Nafion (MNPs-NAF), numa razão de volume de 1:10. O quitosano, o alginato e o Nafion utilizados apresentam todos uma concentração de 0,5% (m/v). A incorporação das MNPs com polímeros é essencial para promover uma adesão mais favorável das nanopartículas ao elétrodo, para além de conferir uma maior seletividade às nanopartículas magnéticas na deteção do lactato. A Figura 24 representa a estrutura química de cada um dos polímeros.

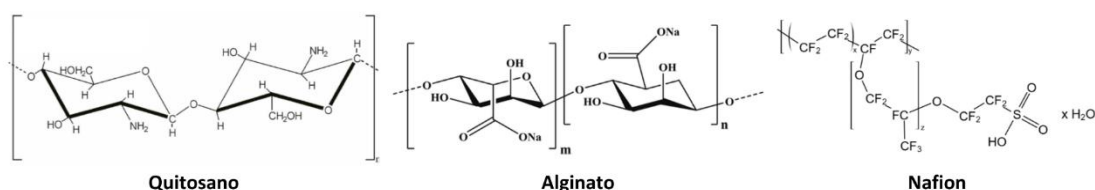


Figura 24- Estrutura química do quitosano (López-García et al., 2014), alginato (Foroughi et al., 2018) e Nafion (Sahu et al., 2009), respetivamente.

Após a etapa de limpeza dos elétrodos e da modificação com as nanopartículas magnéticas de ferro e os respetivos polímeros, procedeu-se novamente à caracterização eletroquímica por CV. A Figura 25 apresenta a comparação entre os voltamogramas obtidos para os elétrodos limpos (linha azul) e após modificação com diferentes materiais (linha vermelha): (a) MNPs, (b) MNPs-QUI, (c) MNPs-ALG e (d) MNPs-NAF.

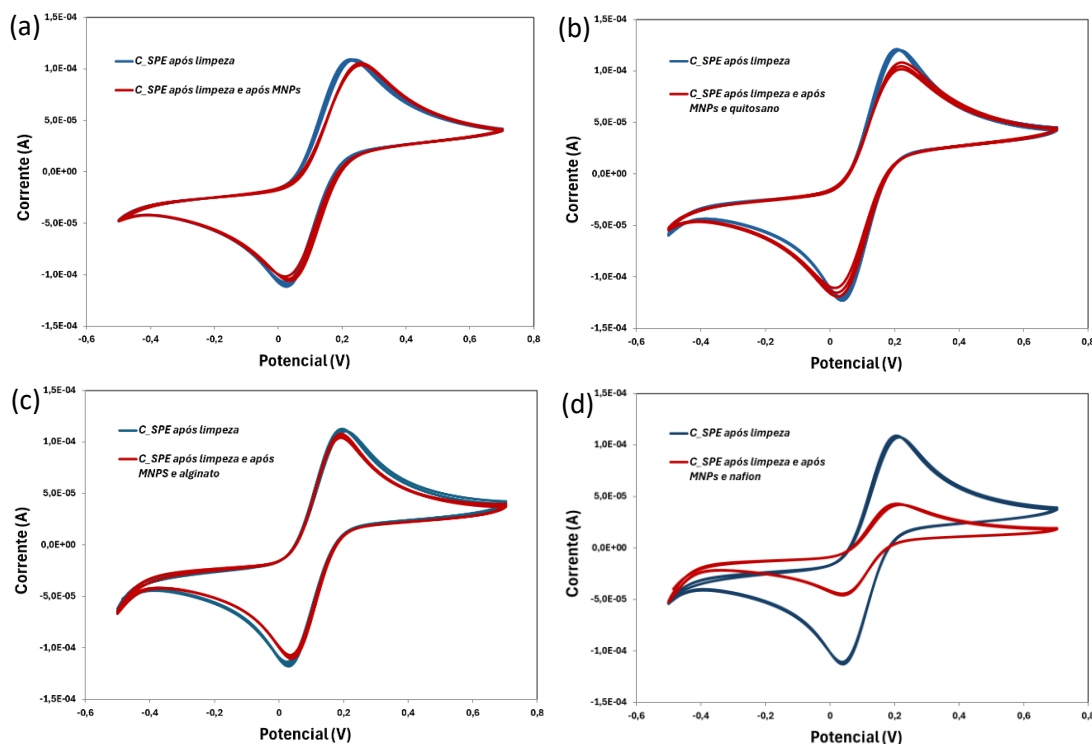


Figura 25- Voltamogramas obtidos através de medições em solução *redox* de ferro, comparando os elétrodos C-SPE após a limpeza eletroquímica (linha azul) e após a modificação com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion (linha vermelha).

Nos casos das nanopartículas magnéticas isoladas, com quitosano e com alginato (a,b e c), observa-se que a resposta eletroquímica às medições com a solução *redox* de ferro não se altera de forma significativa. Já no caso do Nafion (d) nota-se uma redução da corrente, o que sugere a existência de uma barreira maior à transferência de elétrons, o que se pode dever ao efeito isolante de polímero.

De forma análoga, a Figura 26 representa a comparação entre os diagramas de *Nyquist* obtidos nas mesmas condições: (a) MNPs, (b) MNPs-QUI, (c) MNPs-AIG e (d) MNPs-NAF.

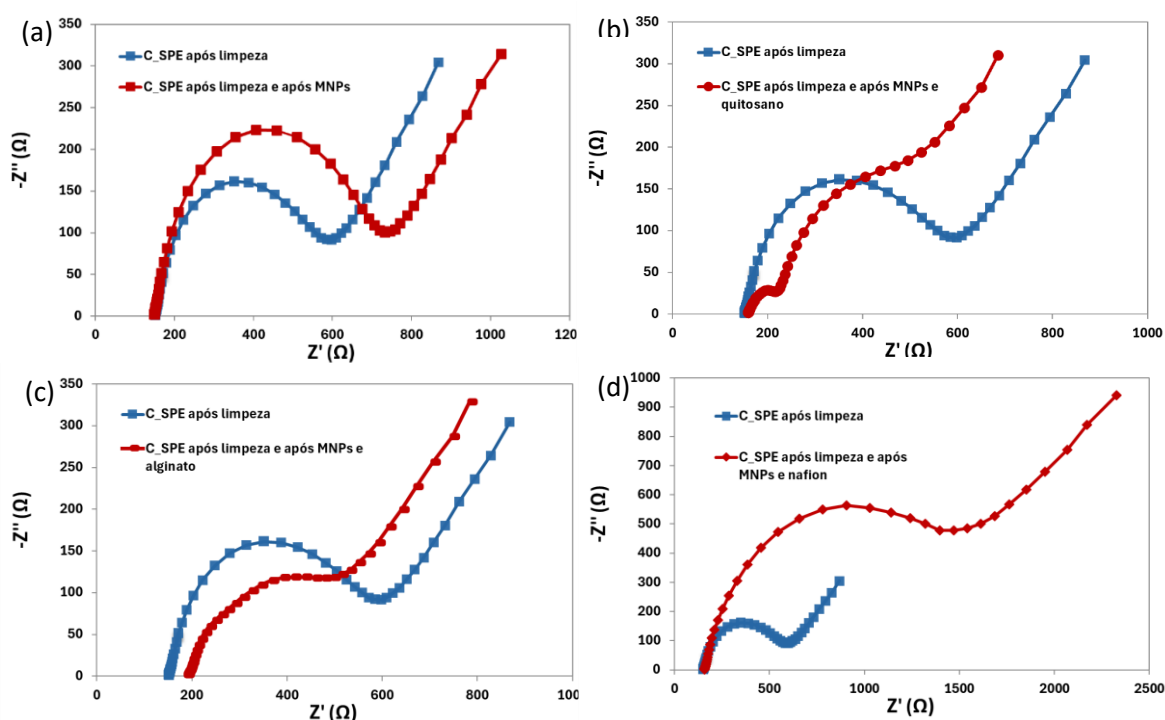


Figura 26- Diagramas de *Nyquist* através de medições em solução *redox* de ferro, comparando os elétrodos C-SPE após a limpeza eletroquímica (linha azul) e após a modificação com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion (linha vermelha).

A modificação do C-SPE apenas com nanopartículas (a) levou a um aumento do diâmetro do semicírculo. Já no caso do quitosano (b), observa-se a presença de dois semicírculos distintos, indicando a ocorrência de mais do que um processo eletroquímico ou barreiras adicionais associadas à heterogeneidade da camada formada no elétrodo; este comportamento traduziu-se também num aumento da impedância global. A modificação de MNPs com Nafion (d) foi a modificação menos favorável, apresentando o maior aumento da resistência de transferência de carga entre todas as condições testadas, o que está de acordo com a voltametria cíclica apresentada anteriormente.

Em contraste, a modificação com nanopartículas em alginato (c) destacou-se positivamente. É possível observar uma ligeira redução da impedância, o que indica uma melhor dispersão das nanopartículas e uma maior facilidade no transporte iónico.

4.2 Efeito de diferentes polímeros a diferentes pHs na detecção do lactato

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência do pH e de diversos polímeros utilizados na modificação dos elétrodos na detecção direta de lactato. O pH é um parâmetro que pode alterar o estado de protonação dos polímeros, a estabilidade das cadeias formadas, a interação com as nanopartículas e a superfície do elétrodo. O objetivo desta análise foi obter uma visão geral do desempenho dos elétrodos, de modo a identificar quais são as condições mais adequadas e selecionar o sistema mais adaptado ao contexto de aplicação pretendido. Assim, o presente estudo avaliou o desempenho de cada modificação do nanomaterial relativamente à detecção eletroquímica de lactato, recorrendo à voltametria cíclica como técnica de caracterização. A análise permitiu correlacionar a atividade catalítica do nanomaterial com a eficiência do processo de oxidação do analito.

4.2.1 pH neutro

A Figura 27 apresenta os voltamogramas obtidos para os elétrodos de carbono modificados. Tal como referido anteriormente, avaliaram-se elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs-QUI, (c) MNPs-ALGI e (d) MNPs-NAF. As medições foram realizadas em tampão PBS (pH de 7,4 e uma concentração de 0,01 mol/L) e na presença de diferentes concentrações de lactato (entre 10 $\mu\text{mol/L}$ e 50 mmol/L).

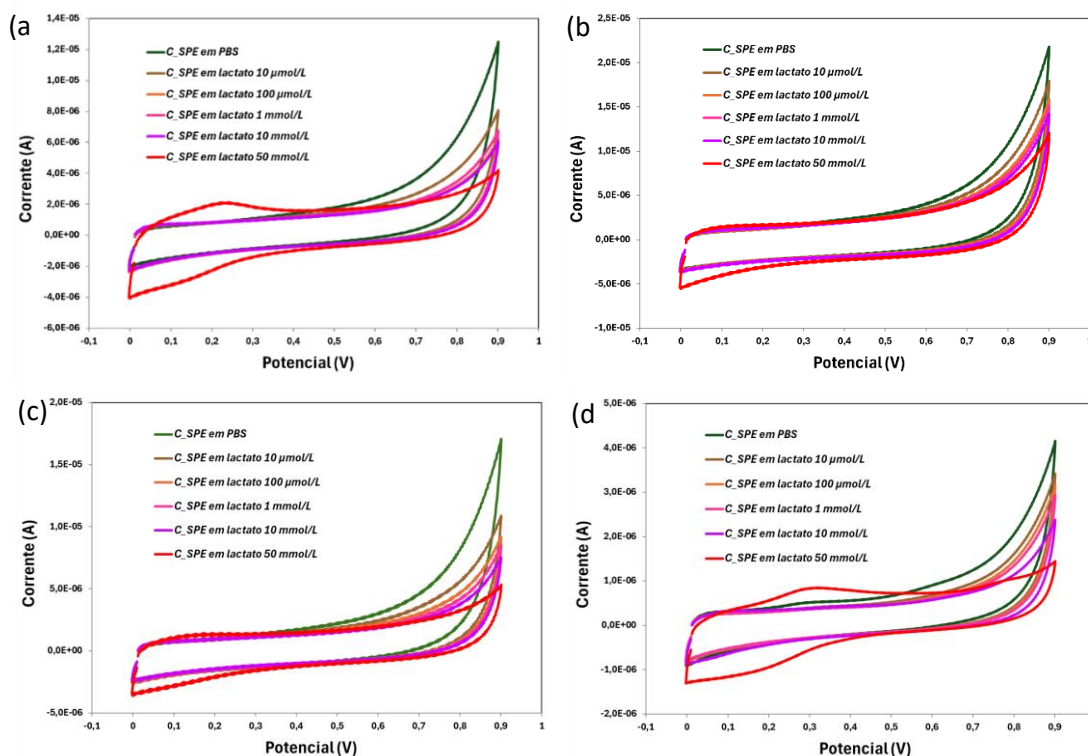


Figura 27- Voltamogramas obtidos em solução tampão PBS (pH 7,4) e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução tampão (10 $\mu\text{mol/L}$ – 50 mmol/L), para elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion.

Observa-se que tanto os elétrodos modificados apenas com nanopartículas magnéticas (a) como aqueles que combinam nanopartículas magnéticas com Nafion (d) apresentaram resposta apenas na concentração mais elevada de lactato (50 mmol/L). Por outro lado, os elétrodos modificados com quitosano (b) e com alginato (c) não apresentaram resposta às diferentes concentrações de lactato testadas, com curvas praticamente sobreponíveis às registadas no tampão.

Para padronizar a comparação entre os resultados, selecionou-se uma concentração de interesse para o lactato. A Tabela 5 apresenta a comparação entre as medições do branco (tampão PBS, pH 7,4) e as medições de lactato a uma concentração de 10 mmol/L para os diferentes elétrodos modificados. Verifica-se que, em todas as condições estudadas, não foi detetada a presença de picos nem diferenças de corrente significativas em relação ao branco. Estes resultados confirmam que, nesta concentração, nenhum dos sistemas desenvolvidos permite a deteção do lactato.

Tabela 5- Valores de potencial e corrente obtidos dos picos de oxidação para os diferentes sistemas modificados (MNPs, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion), em PBS (branco) e na presença de lactato (10 mmol/L). Os valores de Δ Corrente/Branco representam a diferença entre as correntes obtidas nas duas condições sobre o valor do branco.

Condições	Potencial (V)	Corrente (A)		$\frac{\Delta \text{ Corrente}}{\text{Branco}}$
		Branco (PBS)	Lactato 10 mmol/L	
MNPs	Não Existe	-	-	-
MNPs+Quitosano	Não Existe	-	-	-
MNPs+ Alginato	Não Existe	-	-	-
MNPs+Nafion	Não Existe	-	-	-

4.2.2 pH básico

A Figura 28 mostra os voltamogramas obtidos para os elétrodos de carbono modificados, conforme descrito anteriormente: (a) MNPs, (b) MNPs-QUI, (c) MNPs-ALG e (d) MNPs-NAF. Desta vez as medições foram realizadas em meio básico. Utilizaram-se soluções de lactato preparadas em NaOH 0,1 mol/L (pH 13,6), com concentrações no intervalo de 500 $\mu\text{mol/L}$ a 50 mmol/L.

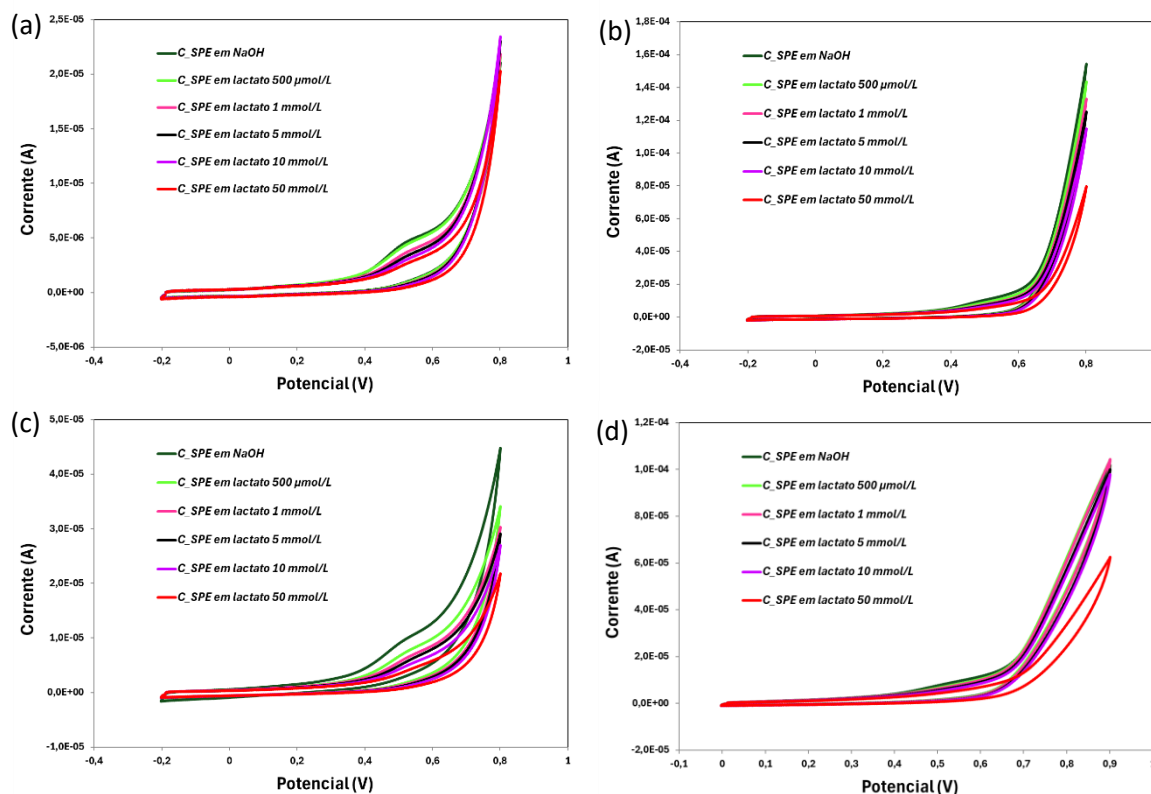


Figura 28- Voltamogramas obtidos em solução de NaOH e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução (500 $\mu\text{mol/L}$ – 50 mmol/L), para elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion.

Importa salientar que, ao contrário do observado em pH neutro, em meio alcalino verifica-se uma tendência inversa. Com o aumento da concentração de lactato, a corrente diminui e o pico desloca-se para uma posição mais baixa no voltamograma.

É possível observar que os elétrodos modificados apenas com MNPs (a) apresentam uma resposta, ainda que limitada, já que os voltamogramas obtidos para o lactato permanecem próximos dos registados para o branco (NaOH). Existe alguma diminuição de corrente com o aumento da concentração de lactato mas as variações são pouco significativas. No caso dos elétrodos modificados com MNPs e quitosano (b) observa-se uma ausência de resposta significativa, dado que os voltamogramas obtidos em todo o intervalo de concentrações permanecem praticamente sobrepostos ao do branco. De forma análoga, os elétrodos modificados com MNPs e Nafion (d) também não apresentaram uma resposta significativa. O

comportamento é semelhante ao observado com o quitosano, ou seja, os voltamogramas são praticamente sobrepostos ao branco.

Por outro lado, os elétrodos modificados com MNPs e alginato (c) apresentam a melhor resposta. Existe um deslocamento claro das curvas e um diminuição consistente da corrente à medida que a concentração de lactato aumenta, no intervalo de 500 $\mu\text{mol/L}$ e 50 mmol/L .

A Tabela 6 apresenta a relação entre as medições no branco (NaOH) e as medições de lactato com uma concentração de 10 mmol/L para os diferentes elétrodos modificados.

Tabela 6- Valores de potencial e corrente obtidos dos picos de oxidação para os diferentes sistemas modificados (MNPs, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion), em NaOH (branco) e na presença de lactato (10 mmol/L). Os valores de Δ Corrente/Branco representam a diferença entre as correntes obtidas nas duas condições sobre o valor do branco.

Condições	Potencial (V)	Corrente (A)		$\frac{\Delta \text{ Corrente}}{\text{Branco}}$
		Branco (NaOH)	Lactato 10 mmol/L	
MNPs	+0,54 V	$4,2 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-6}$	0,24
MNPs+Quitosano	Não existe	-	-	-
MNPs+ Alginato	+0,55V	$1,08 \times 10^{-5}$	$5,7 \times 10^{-6}$	0,47
MNPs+Nafion	Não existe	-	-	-

A análise da Tabela 6 demonstra que o alginato é o material que mais se destaca entre as condições testadas porque apresenta a maior diferença de corrente relativamente ao branco. Em contraste, as MNPs isoladas apresentam uma diferença de corrente bastante reduzida, enquanto as MNPs com quitosano e com Nafion não mostram variações significativas, o que se traduz numa menor sensibilidade à presença de lactato.

4.2.3 pH ácido

A Figura 29 apresenta os voltamogramas obtidos para os C-SPE nas quatro condições de modificação já descritas. As medições foram realizadas com soluções de lactato preparadas em KCl 0,1 mol/L (pH 5,1), nas concentrações de 500 $\mu\text{mol/L}$, 1 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L e 50 mmol/L.

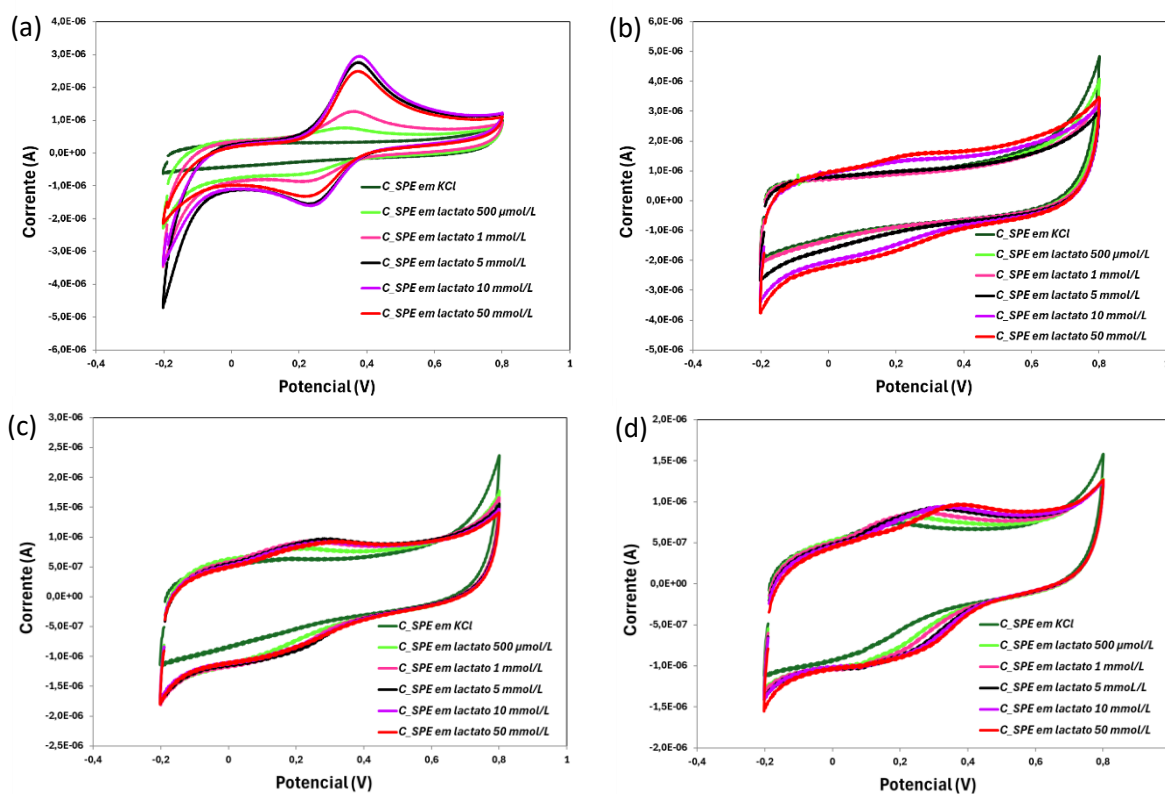


Figura 29- Voltamogramas obtidos em solução de KCl e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução (500 $\mu\text{mol/L}$ – 50 mmol/L), para elétrodos modificados com (a) MNPs, (b) MNPs com quitosano, (c) MNPs com alginato e (d) MNPs com Nafion.

Para os elétrodos modificados apenas com MNPs (a) observa-se uma variação crescente de resposta até à concentração de 10 mmol/L. Contudo, na concentração mais elevada (50 mmol/L), ocorre uma saturação do elétrodo. Essa saturação provoca uma redução no valor de corrente para essa concentração.

Nos elétrodos modificados com MNPs e quitosano (b) não se regista uma resposta nas concentrações mais baixas. A deteção do lactato só é visível a partir da concentração de 10 mmol/L, o que indica uma menor sensibilidade inicial.

Já os elétrodos com MNPs e alginato (c) apresentam resposta desde a menor concentração testada (500 $\mu\text{mol/L}$). Contudo, a partir de 5 mmol/L verifica-se a saturação do elétrodo, fazendo com que as curvas correspondentes às concentrações de 5, 10 e 50 mmol/L se sobreponham à de 1 mmol/L.

Por fim, nos elétrodos modificados com MNPs e Nafion (d), a resposta mostra saturação a partir de 10 mmol/L. As curvas das concentrações mais elevadas (10 e 50 mmol/L) coincidem praticamente com a de 5 mmol/L, sem existir um aumento de corrente.

A Tabela 7 apresenta a relação entre as medições no branco (KCl) e as medições de lactato com uma concentração de 10 mmol/L para os diferentes elétrodos modificados.

Tabela 7- Valores de potencial e corrente obtidos dos picos de oxidação para os diferentes sistemas modificados (MNPs, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion), em KCl (branco) e na presença de lactato (10 mmol/L). Os valores de Δ Corrente/Branco representam a diferença entre as correntes obtidas nas duas condições sobre o valor do branco .

Condições	Potencial (V)	Corrente (A)		$\frac{\Delta \text{ Corrente}}{\text{Branco}}$
		Branco (KCl)	Lactato 10 mmol/L	
MNPs	+0,38 V	$4,0 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^{-6}$	6,25
MNPs+Quitosano	+0,25 V	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$	0,40
MNPs+ Alginato	+0,3 V	$6,25 \times 10^{-7}$	$9,1 \times 10^{-7}$	0,46
MNPs+Nafion	+0,35 V	$6,75 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-6}$	1,22

Os elétrodos modificados apenas com MNPs registaram a maior diferença de corrente em relação ao branco (Δ Corrente = 6,25), o que demonstra uma elevada sensibilidade à presença de lactato. Os elétrodos com MNPs combinadas com Nafion também mostram uma resposta assinalável (Δ Corrente = 1,22), embora menos marcada do que no caso das MNPs isoladas.

Os elétrodos modificados com MNPs e quitosano ou com MNPs e alginato apresentam respostas mais reduzidas, mas ainda assim detetáveis, com variações de corrente de 0,40 e 0,46, respetivamente. Embora estes elétrodos tenham apresentado as respostas menos significativas em termos de variação de corrente, é importante destacar que o potencial aplicado para que o processo eletroquímico ocorresse foi também mais baixo nestes casos. Um potencial mais baixo indica que a reação pode ocorrer com uma menor quantidade de energia aplicada, enquanto valores mais elevados implicam a necessidade de um maior fornecimento de energia para o transporte de eletrões. Para além disso, operar a baixo potencial permite que a reação desejada, neste caso a oxidação do lactato, ocorra antes da oxidação ou redução de outras espécies presentes em amostras biológicas, aumentando assim a seletividade do sensor. Assim, apesar da amplitude de corrente mais limitada, os sistemas com quitosano ou alginato apresentam vantagens em termos de seletividade e eficiência energética, características desejáveis em biossensores eletroquímicos.

No caso dos ensaios realizados em PBS, a resposta eletroquímica ao lactato não foi muito evidente. As medições em meio básico apresentaram respostas mais evidentes, contudo, o pH elevado deste meio é bastante distante do valor fisiológico, o que o torna pouco adequado para o contexto pretendido. Diante dos resultados obtidos e da necessidade de desenvolver uma solução biocompatível para futura aplicação na pele, ou seja, próxima das condições fisiológicas do suor, optou-se por um meio mais ácido (KCl).

De modo similar, no meio ácido, foram avaliados quatro tipos de elétrodos modificados: MNPs isoladas, MNPs com quitosano, MNPs com alginato e MNPs com Nafion. O elétrodo modificado apenas com MNPs apresentou a melhor resposta à presença de lactato, no entanto, devido à capacidade não específica das nanopartículas interagirem com diferentes espécies químicas, a seletividade do sensor poderia estar comprometida. Assim, a introdução de um polímero tem como objetivo tornar o biossensor mais seletivo através dos seus grupos funcionais, além de promover uma melhor adesão da modificação à superfície do elétrodo. Embora as partículas modificadas com Nafion apresentem uma boa resposta, trata-se de um polímero de origem sintética amplamente explorado na literatura e sem qualquer vantagem de biocompatibilidade. Neste estudo, optou-se por priorizar a utilização de um polímero de origem natural, alinhando-se a critérios de sustentabilidade. O alginato demonstrou melhores resultados em termos de adesão à superfície do elétrodo e desempenho eletroquímico, além de apresentar elevada biocompatibilidade, característica essencial considerando o potencial uso do sensor para monitorização contínua na pele. Dessa forma, o alginato consolidou-se como a escolha mais adequada para os estudos subsequentes.

Paralelamente a este estudo, realizado com misturas de MNPs e diferentes polímeros, também se investigou o efeito do método camada por camada nessas condições. Inicialmente, uma camada das MNPs era depositada sobre o elétrodo e, posteriormente, era adicionada uma camada no elétrodo do polímero (quitosano, alginato ou Nafion).

Os resultados obtidos com este método de camada por camada foram semelhantes em comparação com os elétrodos preparados a partir da mistura, tanto nas medições *redox* de ferro como nas medições com diferentes concentrações de lactato. Por esse motivo, e também por uma questão de maior praticidade, optou-se por utilizar sempre a metodologia baseada na mistura direta das nanopartículas com o polímero.

4.3 Otimização de parâmetros experimentais

No decorrer do presente trabalho foi necessário proceder à otimização de diversos parâmetros experimentais, com o objetivo de melhorar a detecção eletroquímica do lactato e garantir o melhor desempenho possível do biossensor. Os parâmetros avaliados foram (i) concentração de nanopartículas, (ii) número de camadas aplicadas, (iii) temperatura da mufla e (iv) velocidade de varrimento. Este estudo foi efetuado em triplicado para cada parâmetro e consistiu em testar uma solução de lactato com concentração de 10 mmol/L, realizar uma medição por voltametria cíclica (CV) na gama de potencial de -0,2 a +0,8 V, e retirar o valor máximo de corrente obtido. Cada um destes fatores experimentais será abordado em detalhe.

4.3.1 Concentração de partículas magnéticas

Até este ponto, os elétrodos tinham sido preparados e utilizados sob condições específicas: foram submetidos à mufla a 60 °C após a deposição do nanomaterial, com uma única camada depositada e uma razão de diluição de 1:10 da suspensão de nanopartículas magnéticas. Estas condições serviram como referência para os ensaios iniciais de otimização.

A Figura 30 ilustra o efeito de duas concentrações diferentes de MNPs na resposta da nanoenzima à presença do lactato. Observa-se um aumento do valor de corrente quando a concentração de MNPs aumenta, indicando que a maior concentração de nanopartículas incorporadas no elétrodo contribui para uma maior atividade eletrocatalítica. Este comportamento pode ser devido ao aumento da área superficial efetiva, à melhoria da transferência eletrônica e à maior cobertura catalítica disponível para a interação com o analito (lactato). Com base nos resultados apresentados, o melhor desempenho foi obtido para a diluição mais baixa (1:2) de MNPs-ALG, a qual será utilizada nos estudos subseqüentes.

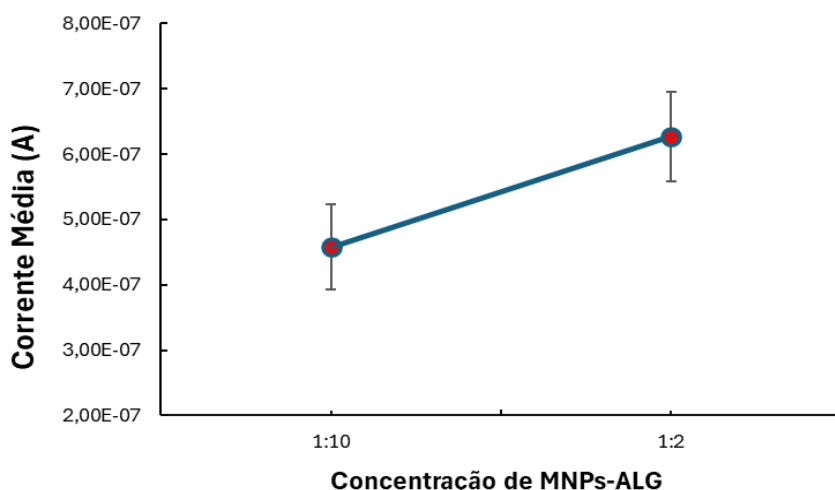


Figura 30- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG em diferentes razões de volume (1:10 e 1:2). Os elétrodos foram preparados em triplicado, com uma única camada de MNPs-ALG, submetidos a mufla a 60 °C, e analisados por CV a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.

4.3.2 Número de camadas

Tal como referido, todos os estudos anteriores foram realizados com a deposição de uma única camada de nanomaterial. Assim sendo, neste estudo, foram preparados elétrodos com duas e três camadas de partículas magnéticas e alginato (*ratio* 1:2).

Observa-se um aumento progressivo da corrente no pico de oxidação com o aumento do número de camadas no elétrodo, conforme ilustrado na Figura 31. Este resultado pode ser explicado pelo facto de que o acréscimo de camadas aumenta a área superficial ativa disponível e o número de sítios catalíticos, favorecendo a transferência de carga e a interação com o analito, resultando em picos de corrente mais elevados.

Contudo, em termos de reprodutibilidade, o espaço disponível no eletrodo é bastante limitado, pelo que a deposição de um número superior de camadas poderia comprometer a uniformidade e reduzir a consistência dos resultados. Assim, três camadas parecem representar a condição mais adequada no intervalo estudado. A partir deste ponto, as três camadas passaram a ser a condição selecionada para os ensaios subsequentes.

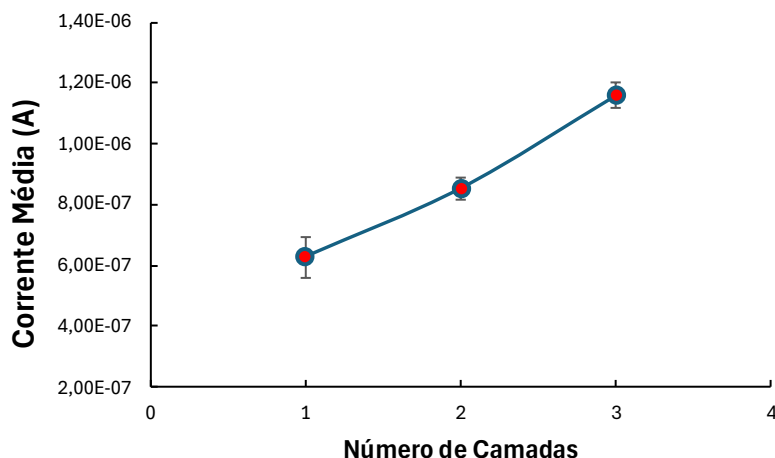


Figura 31- Corrente média obtida para eletrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG (razão de volume 1:2) com diferentes números de camadas (1, 2 e 3). Os eletrodos foram preparados em triplicado, submetidos a mufla a 60 °C e analisados por CV a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.

4.3.3 Temperatura da mufla

Até esta fase do estudo os eletrodos tinham sido preparados a 60 °C. Deste modo, prepararam-se eletrodos com três camadas de partículas magnéticas e alginato (*ratio* 1:2) que foram submetidos a 50 °C e 70 °C.

Observando a Figura 32, verifica-se que o valor de corrente no pico de oxidação aumenta gradualmente com o aumento da temperatura da mufla, sendo o efeito mais acentuado quando a temperatura atinge os 70 °C. Entre 50 °C e 60 °C a resposta mantém-se relativamente próxima, com variações pouco significativas dentro do desvio padrão. No entanto, a 70 °C observa-se um incremento claro na intensidade de corrente, indicando que esta condição melhora as propriedades eletrocatalíticas do eletrodo modificado em relação à detecção do lactato, o que resulta numa melhor resposta. Estas medições sugerem que o tratamento térmico desempenha um papel importante na otimização do desempenho do biossensor, provavelmente por promover uma melhor fixação dos componentes ou uma maior uniformidade da matriz de alginato com as nanopartículas magnéticas.

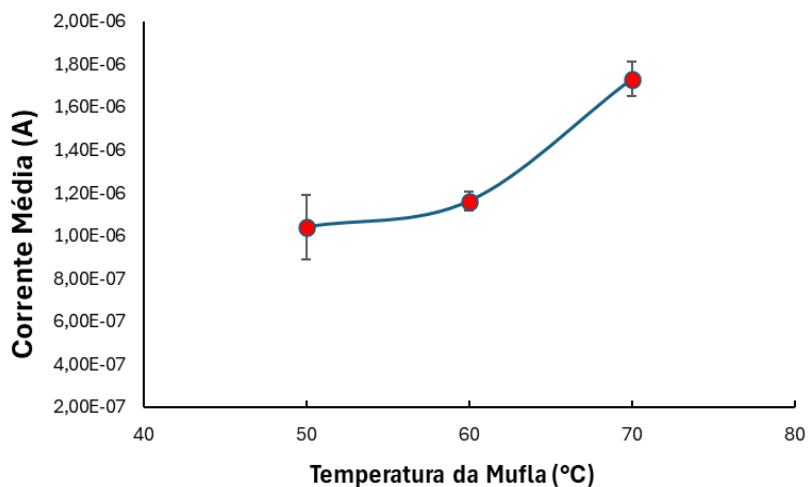


Figura 32- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG (razão 1:2) com três camadas, submetidos a diferentes temperaturas de mufla (50, 60 e 70 °C). Os elétrodos foram preparados em triplicado e analisados por voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.

4.3.4 Velocidade de varrimento

Tal como mencionado anteriormente, a partir daqui utilizaram-se elétrodos com três camadas de nanopartículas magnéticas e alginato (*ratio* 1:2), tratados a 70 °C na mufla. No estudo da velocidade de varrimento é utilizada a mesma gama de potencial, de -0,2 V a +0,8 V, o mesmo número de ciclos (1), sendo testadas diferentes velocidades de varrimento, nomeadamente 0,02 V/s, 0,05 V/s e 0,1 V/s.

É possível afirmar, pela interpretação dos dados obtidos da Figura 33, que existe uma tendência clara de aumento do valor médio de corrente do pico de oxidação à medida que a velocidade de varrimento aumenta de 0,02 para 0,1 V/s. O valor máximo obtido em 0,1 V/s sugere que essa condição é a mais adequada para a deteção do lactato, apesar de apresentar um desvio padrão ligeiramente superior às outras temperaturas utilizadas. No entanto, é importante salientar que a velocidade mais elevada testada resultou num voltamograma com um maior nível de ruído, indicando que velocidades superiores tenderão a comprometer ainda mais a clareza e a reprodutibilidade dos voltamogramas.

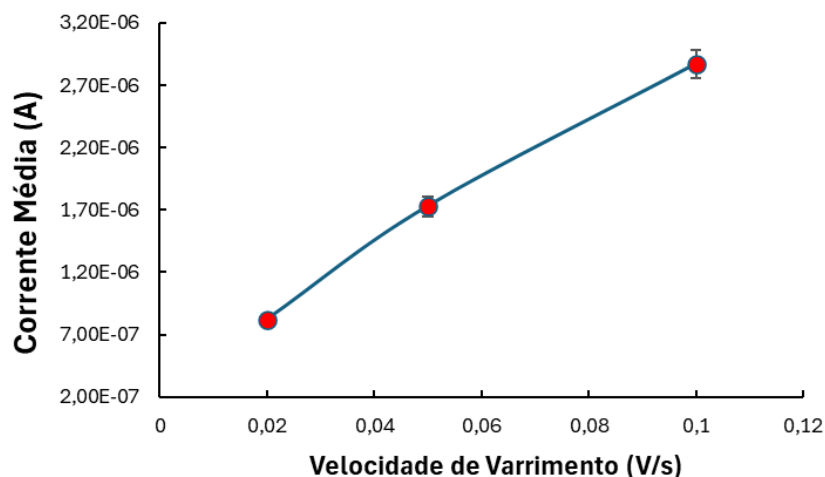


Figura 33- Corrente média obtida para elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG (razão de volume 1:2), três camadas, submetidos a mufla a 70 °C e analisados por CV em velocidades de varrimento de 0,02 V/s; 0,05 V/s e 0,1 V/s. Os elétrodos foram preparados em triplicado. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicados.

4.3.5 Calibrações

Antes da otimização, os elétrodos modificados com MNPs e alginato apresentavam aumentos de corrente nos picos de oxidação bastante diminutos, sem uma relação bem definida entre a concentração de lactato e a intensidade da corrente. Além disso, verificava-se uma rápida saturação do elétrodo, como é possível observar na Figura 29 (c). A sobreposição das curvas anteriormente obtidas sugere que existiam limitações na sensibilidade do sistema e dificuldades em detetar o lactato a partir de uma determinada concentração.

A Figura 34 representa os resultados após a otimização e a respetiva curva de calibração. Os voltamogramas mostram curvas mais bem definidas e com uma maior separação entre as diferentes concentrações testadas. Esta evolução é confirmada pelo gráfico de calibração, que demonstra uma relação linear entre a corrente máxima do pico de oxidação e a concentração do lactato, com um coeficiente de determinação elevado ($R^2 = 0,9799$). Estes resultados demonstram que, após a otimização, o sensor apresenta melhor linearidade e uma resposta eletroquímica mais consistente na deteção do lactato. Verifica-se uma saturação do elétrodo para a concentração mais alta (10 mmol/L).

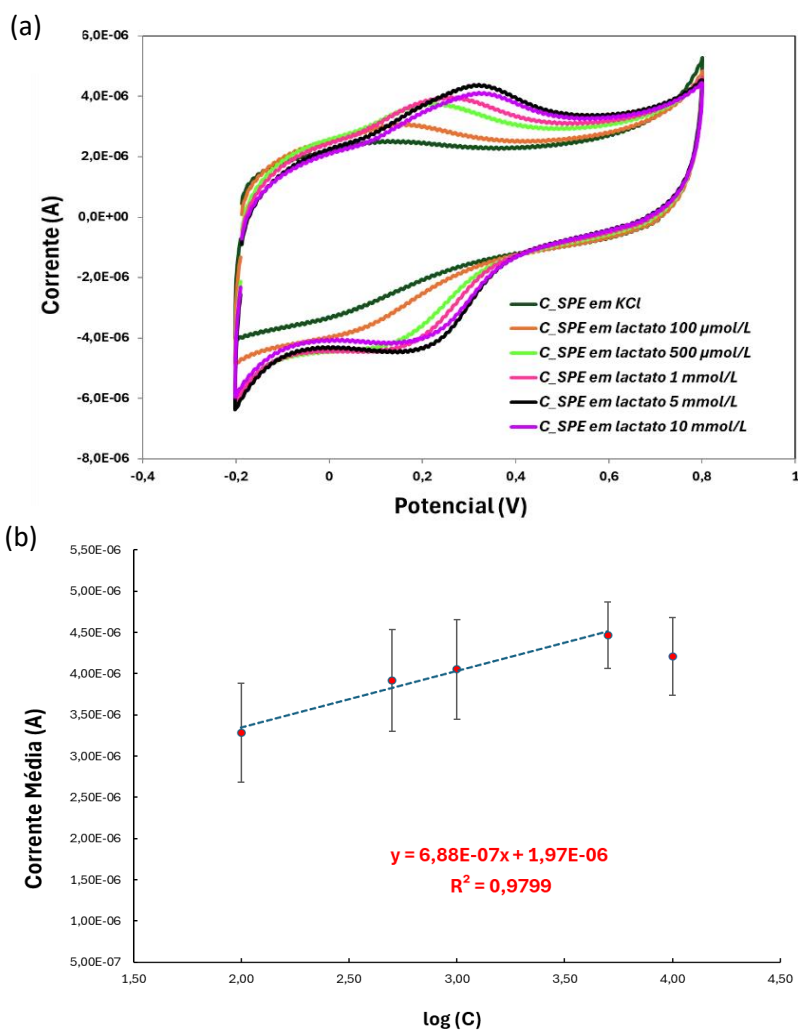


Figura 34-Voltamograma obtido após otimização dos parâmetros experimentais, medido em solução de KCl (branco) e em diferentes concentrações de lactato (100μmol/L a 10 mmol/L), utilizando elétrodos C-SPE modificados com MNPs-ALG com um ratio 1:2 (3 camadas), submetidos a mufla a 70 °C e analisados a uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s (a). Curva de calibração com a corrente média dos ensaios realizados em triplicado, com a equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2) e barras de desvio padrão dos triplicados (b) .

Tal como referido anteriormente, as nanopartículas magnéticas podem apresentar atividade catalítica semelhante à peroxidase, catalase ou oxidase. As duas primeiras estão associadas a reações que envolvem peróxido de hidrogénio, o que parece não se aplicar no presente estudo. Assim, especula-se que a atividade catalítica observada esteja relacionada com um mecanismo do tipo oxidase. Neste caso, observa-se claramente que a intensidade de corrente do pico anódico aumentou rapidamente com a adição de concentrações crescentes de lactato. Esse aumento pode ser atribuído ao processo de oxidação do lactato a piruvato por meio de uma transferência de dois eletrões, tal como já reportado para outros nanomateriais (Elakkiya & Maduraiveeran, 2019).

4.4 Funcionalização das partículas magnéticas

Neste estudo, a funcionalização das nanopartículas magnéticas com β -ciclodextrina na presença de alginato visa melhorar características essenciais do biossensor para o lactato, tais como estabilidade, seletividade e biocompatibilidade. Enquanto o alginato assegura a fixação estável das MNPs na superfície do eletrodo, a ciclodextrina pode atuar como sítio de reconhecimento molecular, aproximando o analito da superfície catalítica e favorecendo a transferência eletrônica (Wang et al., 2023).

A Figura 35 mostra o desempenho do biossensor após a adição de β -ciclodextrina às nanopartículas magnéticas. É possível observar que a incorporação de β -ciclodextrina aumentou a sensibilidade do sensor, dado que o declive da reta de calibração apresenta um valor ligeiramente superior. O eletrodo também detetou mais níveis de concentração de lactato antes de saturar, ou seja, apresentou uma gama linear mais alargada.

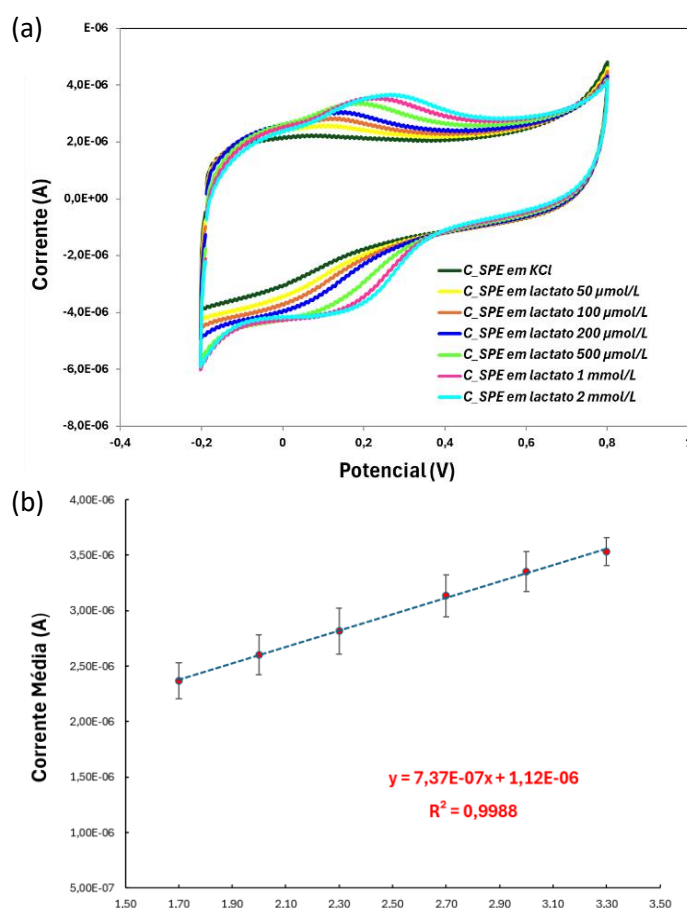


Figura 35-Voltamograma obtido através de medições em solução de KCl (branco) e em diferentes concentrações de lactato (50 $\mu\text{mol/L}$ a 2 mmol/L), utilizando C-SPEs modificados com MNPs funcionalizadas com β -ciclodextrina e alginato (ratio 1:2; 3 camadas), submetidos à mufla a 70 $^{\circ}\text{C}$ e analisados a uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s (a). Curva de calibração construída a partir da corrente média dos ensaios realizados em triplicado, com a equação de regressão linear, coeficiente de determinação (R^2) e barras de desvio padrão dos triplicados (b).

Quando utilizada em conjunto com nanopartículas magnéticas, a β -ciclodextrina pode atuar como um recetor seletivo e promover a acumulação de lactato junto à superfície do eléctrodo. Esta acumulação pode tornar o analito mais acessível à ação catalítica da nanoenzima, resultando numa maior sensibilidade (declive), reprodutibilidade (barras de erro) e linearidade (R^2). No gráfico de calibração, a linearidade da resposta é praticamente ideal, com um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9988$. Comparativamente aos eléctrodos sem β -ciclodextrina, a linearidade é superior. Isto demonstra que o sensor responde de forma proporcional ao aumento da concentração de lactato, desde valores muito baixos até concentrações mais elevadas.

Por fim, importa destacar a reprodutibilidade do sistema. Os eléctrodos foram preparados em triplicado e os desvios-padrão observados são mínimos, o que confirma que o desempenho da nanoenzima desenvolvida é consistente e apresenta estabilidade na resposta.

4.5 Cálculo da área eletroativa

Antes de se proceder ao cálculo da área eletroativa do eléctrodo, é importante apresentar as características geométricas do C-SPE comercial utilizado neste trabalho. A Tabela 8 resume o diâmetro do eléctrodo e a respetiva área geométrica. Este valor serve como referência para a comparação com a área eletroativa obtida experimentalmente.

Tabela 8- Valores de diâmetro e área geométrica do C-SPE comercial.

Eléctrodo	Diâmetro (cm)	Área Geométrica (cm ²)
C_SPE_Carbono	0,40	0,126

Tal como referido anteriormente, para determinar a área eletroativa dos eléctrodos utilizou-se uma solução hexacianoferrato (II) de potássio ($5,0 \times 10^{-3}$ mol/L) em KCl (0,1 mol/L). De seguida, aplicou-se a técnica eletroquímica CV (gama de potencial de -0,6 V a +0,8 V), durante 10 ciclos, com as seguintes velocidades de varrimento: 0,250 V/s; 0,150 V/s; 0,100 V/s; 0,050 V/s; 0,025 V/s, tal como é possível observar na Figura 36.

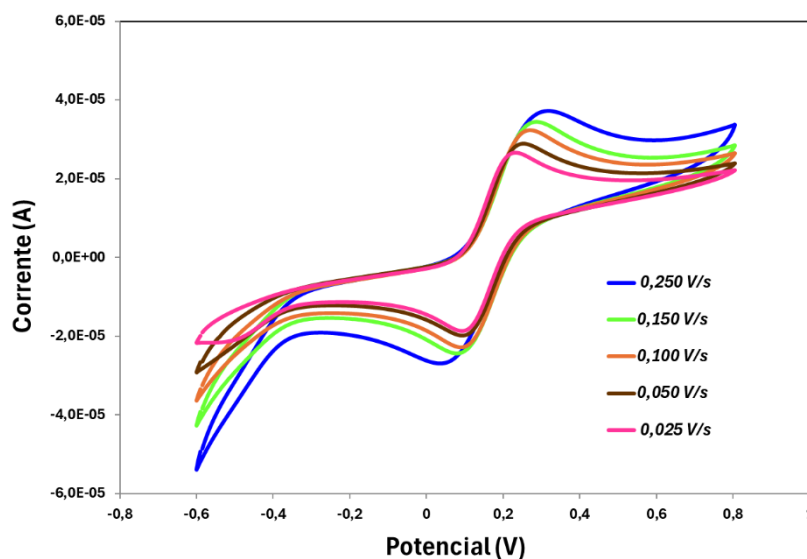


Figura 36-Voltamograma obtido através de medições de CV para os elétrodos modificados com 3 camadas de MNPs funcionalizadas com β - ciclodextrina e alginato, na gama de potencial de $-0,6$ V a $+0,8$ V, durante 10 ciclos, com diferentes velocidades de varrimento (0,250; 0,150; 0,100; 0,050 e 0,025 V/s).

Como os elétrodos foram realizados em triplicado, para cada velocidade determinou-se a média dos valores de corrente dos picos de oxidação dos três e construiu-se uma reta de calibração, a partir da qual foi retirado o declive.

Para o cálculo da área eletroativa (A) do eléctrodo, recorreu-se à equação de Randles–Ševčík (Kissinger & Heineman, 1983), que relaciona a corrente de pico voltamétrica com parâmetros físico-químicos do sistema:

$$I_p = 268600 \times \sqrt[2]{n^3} \times A \times \sqrt[3]{D} \times C \times \sqrt[2]{v} \quad (5)$$

Onde:

- I_p (**corrente do pico, A**): corresponde ao valor máximo da corrente observado no voltamograma, associado ao processo de oxidação da espécie eletroativa;
- **268600** representa uma constante numérica da equação;
- n (**número de eletrões**): corresponde ao número de eletrões transferidos no processo *redox*. A reação eletroquímica realizada neste estudo envolve a transferência de um eletrão;
- A (**área eletroativa, cm²**): é o parâmetro a determinar pela equação. Representa a área real do eléctrodo que participa ativamente nas reações de transferência de carga;

- **D (coeficiente de difusão, cm²/s):** representa uma constante físico-química que traduz a mobilidade da espécie *redox* em solução. Para a espécie eletroquímica utilizada foi considerado o valor de $7,6 \times 10^{-6}$ cm²/s (Grewal et al., 2013);
- **C (concentração da espécie *redox*, mol/cm³):** corresponde à concentração da espécie *redox* em solução, sendo de 5 mmol/L = 5×10^{-6} mol/cm³;
- **v (velocidade de varrimento, V/s):** corresponde à taxa de variação do potencial aplicado ao eletrodo em função do tempo durante a voltametria cíclica.

Trocando a velocidade de varrimento para outro lado da equação obtemos a seguinte equação:

$$\frac{I_p}{\sqrt[2]{v}} = 268600 \times \sqrt[2]{n^3} \times A \times \sqrt[2]{D} \times C \quad (6)$$

$$\Leftrightarrow d = 268600 \times \sqrt[2]{n^3} \times A \times \sqrt[2]{D} \times C \quad (7)$$

$$\Leftrightarrow A = \frac{d}{268600 \times \sqrt[2]{n^3} \times \sqrt[2]{D} \times C} \quad (8)$$

Onde d representa o declive da reta de calibração obtido através da média dos 5 voltamogramas. Este procedimento foi realizado para eletrodos sem qualquer modificação de superfície, para eletrodos com 3 camadas de partículas magnéticas e para eletrodos com 3 camadas de partículas magnéticas funcionalizadas com β -ciclodextrina e alginato (1:2 *ratio* de volume).

Na Tabela 9 encontram-se resumidos os valores atribuídos a cada parâmetro da equação, assim como os resultados obtidos para a área eletroativa em cada condição e a respetiva razão entre a área eletroativa e a área geométrica.

Tabela 9- Parâmetros eletroquímicos atribuídos para a determinação da área eletroativa (Aa) e resultado da mesma para os eletrodos C-SPE não modificados, C-SPE modificados com MNPs e C-SPE modificados com MNPs+ Alginato+ β -ciclodextrina. Aa/Ag corresponde à razão entre a área ativa e a área geométrica do eletrodo.

Eléctrodo	declive	D	C (mol/cm ³)	n	Área Ativa (cm ²)	Aa/Ag
C-SPE	0,004244	0,0000076	0,000005	1	1,146	9,13
C-SPE+MNPs	0,006656	0,0000076	0,000005	1	1,798	14,31
C-SPE+ MNPs+Alg+ β -Ciclo	0,000998	0,0000076	0,000005	1	0,270	2,15

O elétrodo de carbono limpo (C-SPE) apresentou uma área eletroativa de 1,146 cm², cerca de nove vezes superior à área geométrica (Aa/Ag = 9,13). Este valor deve-se ao facto de o carbono ser um material condutor e, muitas vezes, a superfície do carbono não é lisa, mas cheia de irregularidades, fendas e poros, o que aumenta a área de contato efetiva com o eletrólito, resultando em área eletroativas superiores à geométrica.

Com a modificação por nanopartículas magnéticas (C-SPE + MNPs) verificou-se um aumento ainda mais acentuado da área eletroativa, que atingiu 1,798 cm². Este valor é aproximadamente catorze vezes a área geométrica (Aa/Ag = 14,31). Estes resultados, embora elevados, são expectáveis dado que a introdução de nanopartículas contribui para um aumento considerável da área superficial do elétrodo.

Por outro lado, a presença de alginato e β-ciclodextrina no elétrodo modificado com MNPs levou a uma redução da área eletroativa. O valor da área eletroativa diminuiu para 0,270 cm², com uma razão Aa/Ag de apenas 2,15. Este comportamento pode ser explicado pelo caráter isolante dos polímeros, que tendem a dificultar o acesso da espécie *redox* à superfície condutora. Desta forma, reduzem a área disponível para as reações eletroquímicas.

4.6 Intervalo linear e limite de deteção

O intervalo linear corresponde ao intervalo de concentrações em que o biossensor apresenta uma resposta proporcional ao aumento da concentração do analito. No caso do biossensor desenvolvido com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com β-ciclodextrina e alginato, a gama linear situa-se entre 50 μmol/L e 2 mmol/L de lactato.

O limite de deteção é outro parâmetro fundamental na caracterização de um biossensor. O cálculo do LoD foi determinado de acordo com as recomendações da IUPAC, considerando três vezes o desvio padrão do sinal do branco dividido pela sensibilidade da curva de calibração (equação 9):

$$LoD = \frac{3 \times \sigma}{S} \quad (9)$$

Posto isto, o limite de deteção do biossensor desenvolvido é dado por:

$$LoD = \frac{3 \times (2,08 \times 10^{-7})}{7,37 \times 10^{-7}} \approx 0,85 \quad (10)$$

Como a curva de calibração foi ajustada em função do logaritmo da concentração, o valor obtido (0,85 μmol/L) corresponde a log C. Para obter o limite de deteção em termos de concentração, é necessário aplicar a função inversa do logaritmo:

$$C_{LoD} = 10^{0,85} \approx 7,1 \mu\text{mol/L} \quad (11)$$

Deste modo, o limite de deteção é de 7,1 $\mu\text{mol/L}$. Quando comparado com os valores reportados na bibliografia, este limite é, de uma forma geral, inferior.

No contexto da prática desportiva significa que o sensor é capaz de detetar concentrações iniciais de lactato mas ainda não consegue acompanhar os níveis mais elevados que podem estar associados a esforços extremos. Idealmente, para que o biossensor fosse utilizável em contexto de monitorização contínua, a sua gama linear deveria ser alargada até cerca de 20–25 mM (Messina & Giardi, 2024; Seki et al., 2021; Xuan et al., 2023). Ainda assim, o dispositivo mantém aplicabilidade prática, uma vez que é sensível e prático de utilizar. O suor recolhido pode ser posteriormente diluído, permitindo que mesmo concentrações elevadas de lactato fiquem dentro da gama de deteção do sensor e possam ser quantificadas de forma fiável.

4.7 Caracterização morfológica e físico-química

4.7.1 SEM

A técnica SEM foi aplicada tanto aos elétrodos de carbono não modificados como aos elétrodos modificados com nanopartículas magnéticas, nanopartículas magnéticas com alginato e nanopartículas magnéticas com β -ciclodextrina e alginato. Na Figura 37 é possível observar as ampliações de 25 000x e 200 000x para cada um dos diferentes materiais testados.

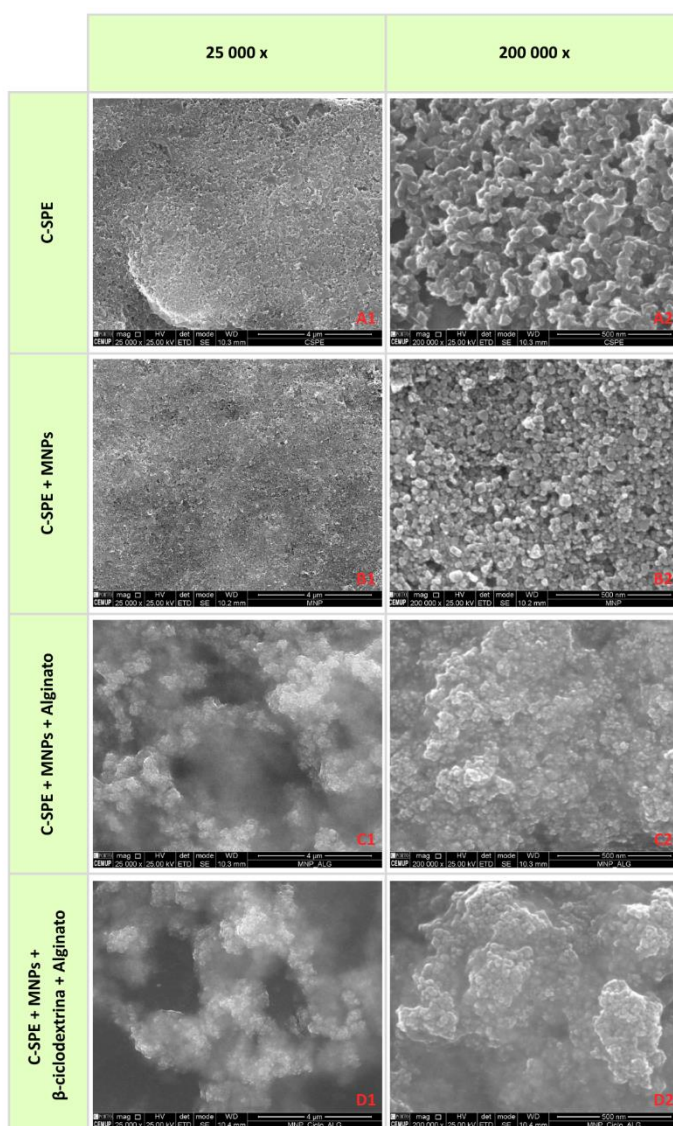


Figura 37- Análise SEM obtida para o C-SPE, C-SPE+ MNPs, C-SPE+ MNPs+ Alginato e C-SPE+ MNPs + Alginato + β -ciclodextrina, em diferentes ampliações.

Nas imagens com os elétrodos de carbono não modificados (A1 e A2) observa-se uma superfície relativamente homogênea e compacta, com alguma rugosidade e porosidade. Com a modificação por nanopartículas magnéticas (C-SPE + MNPs) a superfície torna-se visivelmente mais irregular. A ampliação de 200 000x (B2) permite distinguir uma distribuição mais granular e uma superfície mais heterogênea em comparação com o C-SPE simples.

Na presença de alginato (C1 e C2) observa-se a formação de aglomerados de maior dimensão e uma matriz com uma aparência mais densa e espessa. As nanopartículas magnéticas parecem visualmente menos definidas, o que sugere que o alginato atua como uma rede envolvente. A incorporação simultânea de β -ciclodextrina e alginato resulta numa superfície com aglomerados ainda maiores e mais densos. Na resolução de 25 000x (D1) é possível observar a formação de 'nuvens' mais compactas, o que sugere que a matriz polimérica envolve de forma mais acentuada as partículas.

4.7.2 TEM

A Figura 38 apresenta as imagens TEM obtidas para as nanopartículas magnéticas isoladas e para as MNPs modificadas com β -ciclodextrina, em ampliações de 50 000x e 120 000x.

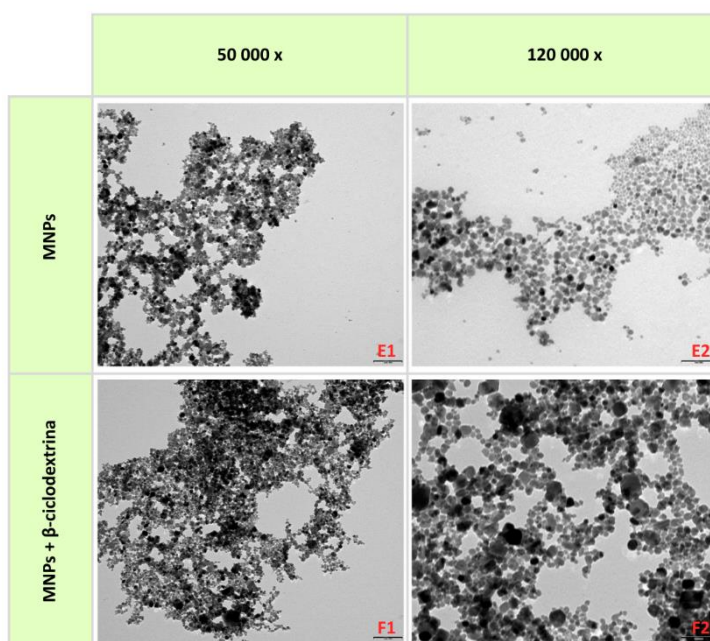


Figura 38- Análise TEM obtida para MNPs e MNPs funcionalizadas com β -ciclodextrina, em diferentes ampliações.

Nas imagens com MNPs sem modificação (E1 e E2) observa-se uma distribuição relativamente uniforme das nanopartículas, com tendência para a formação de aglomerados pouco compactos. É ainda possível distinguir claramente os contornos individuais de cada nanopartícula magnética, que apresentam um tamanho inferior a 50 nm. Na ampliação de 120 000x (E2) é possível notar a presença de partículas bem definidas, apesar de agrupadas em estruturas menos densas.

Já nas imagens correspondentes às MNPs funcionalizadas com β -ciclodextrina (F1 e F2), verifica-se uma alteração na morfologia das partículas. Estas apresentam-se em aglomerados mais compactos e próximos entre si, mas com contornos menos nítidos em comparação com as MNPs simples. Os resultados parecem sugerir que a β -ciclodextrina envolve parcialmente a superfície das nanopartículas e favorece interações que dificultam a visualização clara dos limites individuais.

4.7.3 FTIR

Na Figura 39 encontram-se representados os espectros ATR-FTIR correspondentes a (i) C-SPE, (ii) C-SPE+ MNPs, (iii) C-SPE+ MNPs+Alginato e (iv) C-SPE+ MNPs+Alginato+ β -ciclodextrina.

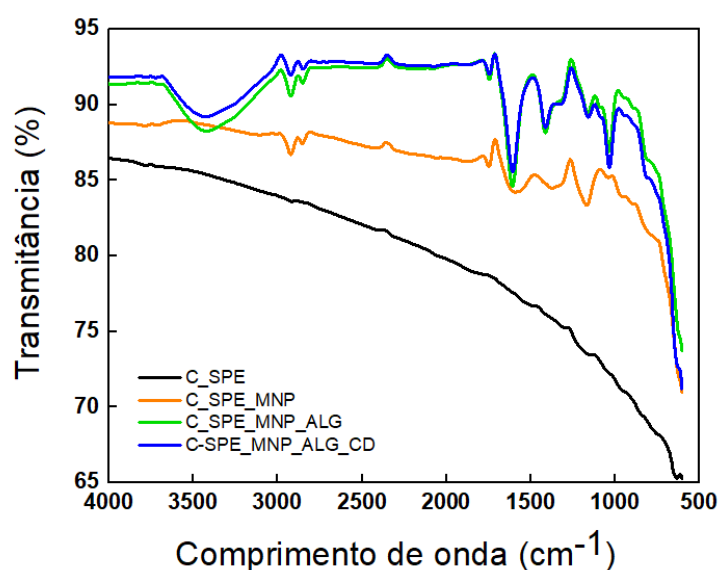


Figura 39-Espectros ATR-FTIR correspondentes a C-SPE (linha preta), C-SPE + MNPs (linha laranja), C-SPE + MNPs + Alginato (linha verde) e C-SPE + MNPs + Alginato + β -ciclodextrina (linha azul).

O espectro do FTIR do C_SPE (linha preta) mostra um perfil característico do carbono, sem bandas de grande relevância associadas a grupos funcionais adicionais. Com a incorporação de nanopartículas magnéticas (C_SPE_MNP, linha laranja) surgem bandas mais marcadas na região de 600–500 cm^{-1} , atribuídas às vibrações Fe–O (Wu et al., 2008).

Nos elétrodos com alginato (C_SPE_MNP_ALG, linha verde) observam-se novas bandas em torno de 3400–3200 cm^{-1} , associadas ao estiramento O–H. A alteração da banda centrada em aproximadamente 1600 cm^{-1} está relacionada com o estiramento assimétrico dos grupos carboxilato (COO^-). Estas alterações são típicas em espectros com alginato (Pasiczna-Patkowska et al., 2025).

Finalmente, no caso da junção de MNPs + Alginato + β -ciclodextrina (linha azul), verifica-se um perfil semelhante ao do alginato, mas com uma aparente intensificação na região de 1150–1030 cm^{-1} . Esta intensificação é comumente atribuída ao estiramento C–O–C característico da β -ciclodextrina. Também ocorreram ligeiras alterações na banda larga de O–H

(aproximadamente 3400 cm^{-1}). Estas evidências sugerem que a β -ciclodextrina foi efetivamente incorporada na matriz polimérica (R. Xu et al., 2020).

4.8 Estudo de interferentes

A seletividade do nanoenzima para a detecção do lactato face a potenciais moléculas interferentes presentes em amostras biológicas foi avaliada por meio de ensaios de seletividade. Neste estudo efetuaram-se ensaios comparativos entre o lactato e potenciais interferentes presentes no suor: creatinina, glucose e ureia, todos testados na concentração de 1 mmol/L . A Figura 40 apresenta os voltamogramas obtidos para os potenciais interferentes: creatinina (a), glucose (b) e ureia (c), bem como para o lactato-controlo (d), em comparação com a resposta do branco (KCl).

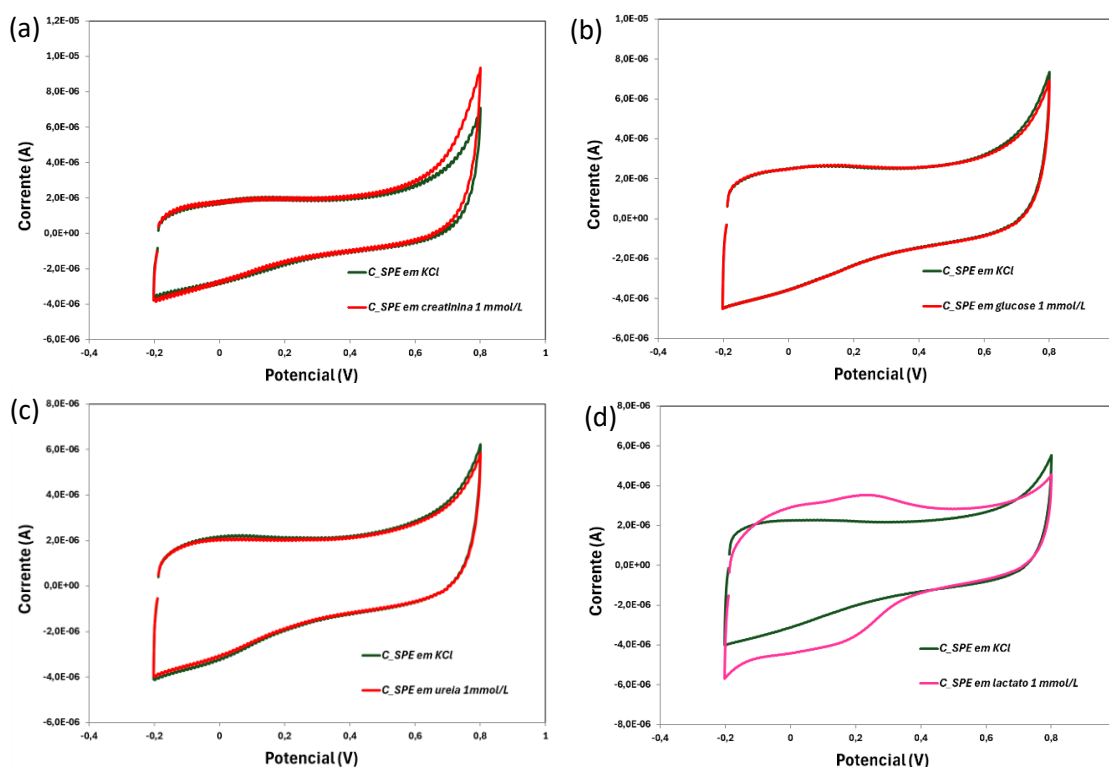


Figura 40-Voltamogramas obtidos em solução de KCl (linha verde) e na presença de potenciais interferentes a 1 mmol/L : (a) creatinina, (b) glucose e (c) ureia (linhas vermelhas). A imagem (d) mostra a comparação entre KCl (linha verde) e lactato a 1 mmol/L (linha rosa).

Nos gráficos relativos à creatinina, glucose e ureia, observa-se uma sobreposição quase completa das curvas em relação à curva do KCl. Isto indica que as presenças destes compostos não interferem na gama de potencial estudada ($-0,2\text{ V}$ a $+0,8\text{ V}$), evidenciando a ausência de interferência nas medições.

4.9 Suor sintético: estudo e calibrações

De forma a avaliar o desempenho do biossensor otimizado em condições próximas das reais, foi preparada uma solução sintética de suor com 85 mmol/L de NaCl, 13 mmol/L de KCl e 15 mmol/L de ureia (Eldamak et al., 2020). Esta solução tem um pH de 5,5. Na Figura 41 estão representados os voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de lactato diluído em suor sintético (50 $\mu\text{mol/L}$ a 1 mmol/L).

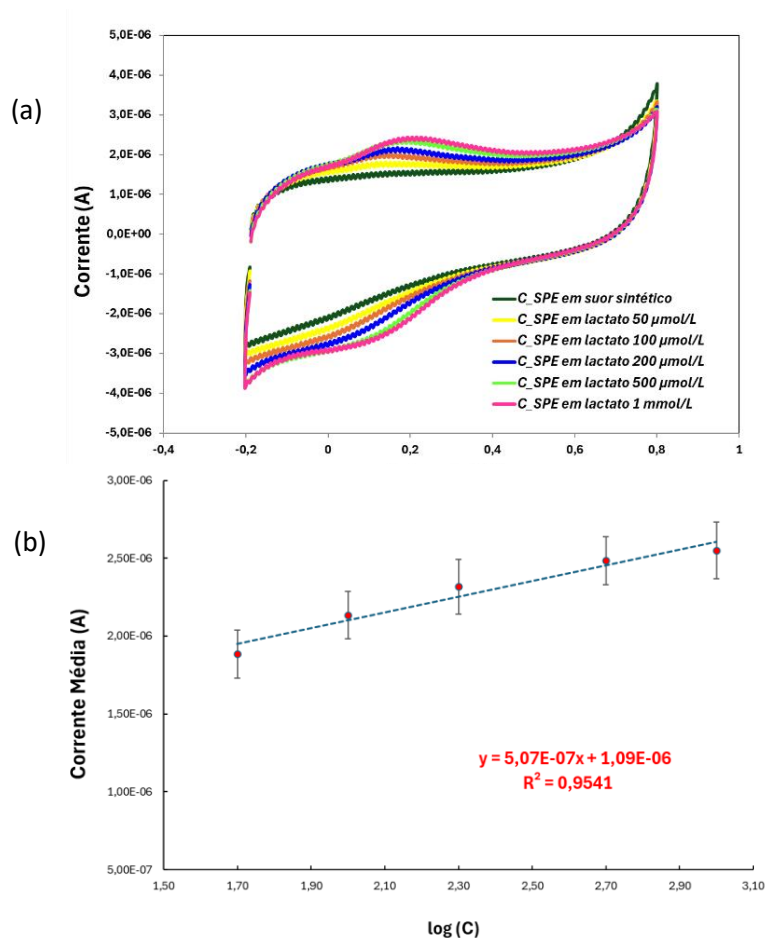


Figura 41-Voltamograma obtido em suor sintético e em diferentes concentrações de lactato diluídas nessa solução (50 $\mu\text{mol/L}$ a 1 mmol/L), utilizando C-SPEs modificados com MNPs-ALG numa razão 1:2 (3 camadas), submetidos à mufla a 70 °C e analisados a uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s (a). Curva de calibração com a corrente média dos ensaios realizados em triplicado, com a equação de regressão linear, o coeficiente de determinação (R^2) e barras de desvio padrão dos triplicados (b).

Observa-se que, à medida que a concentração de lactato aumenta, a intensidade de corrente no pico de oxidação também aumenta progressivamente. Em concentrações mais elevadas (500 $\mu\text{mol/L}$ e 1 mmol/L), os picos máximos de oxidação ficam cada vez mais próximos, sugerindo o início de um processo de saturação na resposta do eletrodo. Apesar disso, a resposta mantém-se regular e estável. A análise dos resultados revela uma boa linearidade entre 50 $\mu\text{mol/L}$ e 1

mmol/L, com um coeficiente de determinação elevado ($R^2 = 0,9541$). A partir da concentração 2 mmol/L o eléctrodo entra em saturação.

Para além disso, observa-se que o valor do potencial de pico de oxidação mantém-se inalterado em relação às correspondentes medições realizadas em KCl. Isto significa que os outros constituintes do suor sintético não estão a interferir com a resposta eletroquímica e que o sinal recebido pertence, na realidade, ao lactato. Esta resposta valida a seletividade do biossensor e a sua possível aplicação numa configuração fisiológica.

5 Conclusão

O lactato é formado a partir da conversão do piruvato pela ação da enzima lactato desidrogenase. Em situações de exercício físico intenso, em que a disponibilidade de oxigênio é limitada, os níveis de lactato aumentam. Este aumento está correlacionado com o limiar anaeróbio, frequentemente utilizado como um parâmetro de referência na avaliação da intensidade do exercício. A determinação do lactato é, portanto, fundamental para monitorizar o desempenho desportivo. Nos últimos anos, o suor tem ganho destaque como uma matriz alternativa ao sangue para a monitorização deste biomarcador. Contudo, as técnicas tradicionais utilizadas para a determinação do lactato não são adequadas para uma monitorização direta e contínua.

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e otimização de um biossensor eletroquímico para a deteção de lactato no suor, um biomarcador para a monitorização metabólica no contexto desportivo. Para tal, foram utilizados C-SPEs modificados com nanoenzimas, mais especificamente nanopartículas magnéticas de ferro.

Numa fase inicial, os elétrodos foram modificados com nanopartículas magnéticas misturadas com diferentes polímeros, quitosano, alginato e Nafion, e avaliados por curvas de calibração obtidas por voltametria cíclica em diferentes condições de pH. Posto isto, selecionou-se o meio ácido (KCl) com um pH de 5,1 aproximadamente. Dentro desta condição, o alginato destacou-se como a matriz polimérica natural mais favorável. Apesar do aumento da resistência à transferência de carga (R_{ct}) com a introdução dos polímeros, o seu papel foi determinante para assegurar a fixação das nanopartículas e para conferir seletividade ao sistema.

Após este estudo, foram avaliados diversos parâmetros experimentais, nomeadamente a concentração de nanopartículas, o número de camadas aplicadas, a temperatura de tratamento e a velocidade de varrimento, permitindo identificar as condições ótimas para maximizar a resposta eletroquímica do sensor ao lactato. Verificou-se que a utilização de uma concentração de MNPs e alginato num ratio de 1:2 de volume, aplicadas em três camadas no elétrodo e submetidas a tratamento térmico de 70 °C proporcionaram os resultados mais favoráveis. Relativamente às medições por voltametria cíclica, a velocidade de varrimento de 0,100 V/s demonstrou ser a que apresentou maiores picos de oxidação.

Posteriormente, a incorporação da β -ciclodextrina com as nanopartículas magnéticas mostrou-se particularmente eficaz, uma vez que proporcionou um aumento da sensibilidade, uma melhor linearidade da resposta e uma maior estabilidade do biossensor. Relativamente aos estudos de seletividade, foi possível verificar que outras moléculas presentes no suor, como a creatinina, a glucose e a ureia, não interferiram na resposta do biossensor. De forma análoga, os ensaios em suor sintético demonstraram linearidade e uma ausência de desvios nos potenciais dos picos de oxidação, reforçando a seletividade do dispositivo.

Em suma, o biossensor desenvolvido revelou-se um dispositivo sensível, seletivo e reprodutível, com um grande potencial para se tornar uma plataforma de monitorização contínua. Do ponto de vista analítico, o biossensor final apresentou um limite de deteção de 7,1 $\mu\text{mol/L}$ e um intervalo de linearidade entre 50 $\mu\text{mol/L}$ e 2 mmol/L .

Como perspetivas futuras, é necessário validar o desempenho do biossensor em amostras reais de suor humano, em diferentes condições fisiológicas e de esforço, de modo a comprovar a sua aplicabilidade no desporto. Adicionalmente, será fundamental expandir a gama linear de deteção, de modo a englobar todo o intervalo de concentrações do lactato presentes no suor.

6 Referências

- Agar, M., Laabei, M., Leese, H. S., & Estrela, P. (2025). Multi-Template Molecularly Imprinted Polymeric Electrochemical Biosensors. *Chemosensors*, *13*(1), 11. <https://doi.org/10.3390/chemosensors13010011>
- ALBORJI, A., ABNIKI, M., & MOGHIMI, A. (2024). Magnetic dispersive solid-phase extraction of ciprofloxacin drug as β -cyclodextrin functionalized magnetic nanotubes on Fe₃O₄ nanoparticles. *Revue Roumaine de Chimie*, *69*(7–8), 341–349. <https://doi.org/10.33224/rrch.2024.69.7-8.01>
- Amin, S., Tahira, A., Solangi, A., Mazzaro, R., Ibupoto, Z. H., & Vomiero, A. (2019). A sensitive enzyme-free lactic acid sensor based on NiO nanoparticles for practical applications. *Analytical Methods*, *11*(28), 3578–3583. <https://doi.org/10.1039/C9AY00516A>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bollella, P., & Katz, E. (2020). Enzyme-Based Biosensors: Tackling Electron Transfer Issues. *Sensors*, *20*(12), 3517. <https://doi.org/10.3390/s20123517>
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N., & Sineokii, S. P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, *71*(8), 755–758. <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>
- Campuzano, S., Pedrero, M., Torrente-Rodríguez, R. M., & Pingarrón, J. M. (2023). Affinity-Based Wearable Electrochemical Biosensors: Natural versus Biomimetic Receptors. *Analysis & Sensing*, *3*(5). <https://doi.org/10.1002/anse.202200087>
- Cegłowski, M., Marien, Y. W., Smeets, S., De Smet, L., D'hooge, D. R., Schroeder, G., & Hoogenboom, R. (2022). Molecularly Imprinted Polymers with Enhanced Selectivity Based on 4-(Aminomethyl)pyridine-Functionalized Poly(2-oxazoline)s for Detecting Hazardous Herbicide Contaminants. *Chemistry of Materials*, *34*(1), 84–96. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c02813>
- ChemWhat. (2025). *.beta.-Ciclodextrina, éteres sulfobutilílicos, sais de sódio CAS#: 182410-00-0; ChemWhat Código: 73541*. ChemWhat.
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>
- Darwish, I. A. (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International journal of biomedical science : IJBS*, *2*(3), 217–235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674985>
- Das, B., Franco, J. Lou, Logan, N., Balasubramanian, P., Kim, M. Il, & Cao, C. (2021). Nanozymes in Point-of-Care Diagnosis: An Emerging Futuristic Approach for Biosensing. *Nano-Micro Letters*, *13*(1), 193. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00717-0>
- Della Rocca, Y., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Trubiani, O., Caputi, S., Diomedede, F., Pizzicannella, J., & Marconi, G. D. (2022). Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *78*(4), 739–752. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00912-6>

- Dickinson, E. (2013, Maio 27). *Modeling Electroanalysis: Cyclic Voltammetry*. Comsol. <https://www.comsol.com/blogs/modeling-electroanalysis-cyclic-voltammetry>
- Ding, Y., Yang, L., Wen, J., Ma, Y., Dai, G., Mo, F., & Wang, J. (2025). A Comprehensive Review of Advanced Lactate Biosensor Materials, Methods, and Applications in Modern Healthcare. *Sensors*, 25(4), 1045. <https://doi.org/10.3390/s25041045>
- Dykstra, G., Chapa, I., & Liu, Y. (2024). Reagent-Free Lactate Detection Using Prussian Blue and Electropolymerized-Molecularly Imprinted Polymers-Based Electrochemical Biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(49), 66921–66931. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c19448>
- Elakkiya, R., & Maduraiveeran, G. (2019). A three-dimensional nickel–cobalt oxide nanomaterial as an enzyme-mimetic electrocatalyst for the glucose and lactic acid oxidation reaction. *New Journal of Chemistry*, 43(37), 14756–14762. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01291E>
- Eldamak, A. R., Thorson, S., & Fear, E. C. (2020). Study of the Dielectric Properties of Artificial Sweat Mixtures at Microwave Frequencies. *Biosensors*, 10(6), 62. <https://doi.org/10.3390/bios10060062>
- Fan, Y.-F., Guo, Z.-B., & Ge, G.-B. (2023). Enzyme-Based Biosensors and Their Applications. *Biosensors*, 13(4), 476. <https://doi.org/10.3390/bios13040476>
- Farid, S., Ghosh, S., Dutta, M., & Stroschio, M. A. (2023). Aptamer-Based Optical and Electrochemical Sensors: A Review. *Chemosensors*, 11(12), 569. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11120569>
- Foroughi, J., Mirabedini, A., & Warren, H. (2018). Hydrogels Fibers. Em S. Haider & A. Haider (Eds.), *Hydrogels*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74188>
- Gladden, L. B. (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of Physiology*, 558(1), 5–30. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058701>
- Goodwin, M. L., Harris, J. E., Hernández, A., & Gladden, L. B. (2007). Blood Lactate Measurements and Analysis during Exercise: A Guide for Clinicians. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1(4), 558–569. <https://doi.org/10.1177/193229680700100414>
- Grewal, Y. S., Shiddiky, M. J. A., Gray, S. A., Weigel, K. M., Cangelosi, G. A., & Trau, M. (2013). Label-free electrochemical detection of an *Entamoeba histolytica* antigen using cell-free yeast-scFv probes. *The Royal Society of Chemistry*.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>
- Harun-Ur-Rashid, M., Imran, A. Bin, & Foyez, T. (2025). Voltammetric sensors modified with nanomaterials: applications in rapid detection of bioactive compounds for health and safety monitoring. *Discover Electrochemistry*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s44373-025-00027-9>
- Huang, S., Shangguan, R., Chen, S., Lai, X., Han, H., & Sun, J. (2025). Mechanism of Fatty Acid Metabolism and Regulation by Lactate During Exercise in White Adipose and Skeletal Muscle Tissue: A Review. *Sports Medicine - Open*, 11(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s40798-025-00862-5>

- Huang, T., Liang, Z., Wang, K., Miao, X., & Zheng, L. (2025). Novel insights into athlete physical recovery concerning lactate metabolism, lactate clearance and fatigue monitoring: A comprehensive review. *Frontiers in Physiology*, *16*.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1459717>
- Iula, G., Miglione, A., Kalligosfyri, P. M., Spinelli, M., Amoresano, A., Di Natale, C., Darwish, I. A., & Cinti, S. (2025). On-body electrochemical measurement of sweat lactate with the use of paper-based fluidics and 3D-printed flexible wearable biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *417*(17), 3825–3834. <https://doi.org/10.1007/s00216-025-05905-0>
- Kaliyaraj Selva Kumar, A., Zhang, Y., Li, D., & Compton, R. G. (2020). A mini-review: How reliable is the drop casting technique? *Electrochemistry Communications*, *121*, 106867. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106867>
- Karimi-Maleh, H., Orooji, Y., Karimi, F., Alizadeh, M., Baghayeri, M., Rouhi, J., Tajik, S., Beitollahi, H., Agarwal, S., Gupta, V. K., Rajendran, S., Ayati, A., Fu, L., Sanati, A. L., Tanhaei, B., Sen, F., shabani-nooshabadi, M., Asrami, P. N., & Al-Othman, A. (2021). A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *184*, 113252. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113252>
- Katey, B., Voiculescu, I., Penkova, A. N., & Untaroiu, A. (2023). A Review of Biosensors and Their Applications. *ASME Open Journal of Engineering*, *2*.
<https://doi.org/10.1115/1.4063500>
- Khaleque, Md. A., Hossain, S. I., Ali, Md. R., Aly Saad Aly, M., Abuelmakarem, H. S., Al Mamun, M. S., & Hossain Khan, Md. Z. (2024). Bioreceptor modified electrochemical biosensors for the detection of life threatening pathogenic bacteria: a review. *RSC Advances*, *14*(39), 28487–28515. <https://doi.org/10.1039/D4RA04038D>
- Khan, M. Z. H., Hasan, M. R., Hossain, S. I., Ahommed, M. S., & Daizy, M. (2020). Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, *166*, 112431. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112431>
- Khosravi, H., Carreras-Gallo, O., & Casals-Terré, J. (2023). Mill Scale-Derived Magnetite Nanoparticles: A Novel Substrate for Lactate Oxidase-Based Biosensors. *Biosensors*, *13*(11), 957. <https://doi.org/10.3390/bios13110957>
- Kim, J., & Park, M. (2021). Recent Progress in Electrochemical Immunosensors. *Biosensors*, *11*(10), 360. <https://doi.org/10.3390/bios11100360>
- Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*.
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Lazanas, A. Ch., & Prodromidis, M. I. (2023). Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. *ACS Measurement Science Au*, *3*(3), 162–193.
<https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00070>
- Lee, T.-Y. (2021). Lactate: a multifunctional signaling molecule. *Yeungnam University Journal of Medicine*, *38*(3), 183–193. <https://doi.org/10.12701/yujm.2020.00892>
- Leva-Bueno, J., Peyman, S. A., & Millner, P. A. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Medical Microbiology and Immunology*, *209*(3), 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0>

- Li, P., Kalambate, P. K., Harris, K. D., Jemere, A. B., & Tang, X. (Shirley). (2024). Robust and flexible electrochemical lactate sensors for sweat analysis based on nanozyme-enhanced electrode. *Biosensors and Bioelectronics: X*, *17*, 100455. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2024.100455>
- Li, Y., Luo, L., Kong, Y., Li, Y., Wang, Q., Wang, M., Li, Y., Davenport, A., & Li, B. (2024). Recent advances in molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *249*, 116018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116018>
- Liu, J., Xu, Y., Liu, S., Yu, S., Yu, Z., & Low, S. S. (2022). Application and Progress of Chemometrics in Voltammetric Biosensing. *Biosensors*, *12*(7), 494. <https://doi.org/10.3390/bios12070494>
- Liu, Q., Zhang, A., Wang, R., Zhang, Q., & Cui, D. (2021). A Review on Metal- and Metal Oxide-Based Nanozymes: Properties, Mechanisms, and Applications. *Nano-Micro Letters*, *13*(1), 154. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00674-8>
- López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P., & Sába, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, *5*(2), 43–57. <https://doi.org/10.3390/jfb5020043>
- Luo, T.-T., Sun, Z.-H., Li, C.-X., Feng, J.-L., Xiao, Z.-X., & Li, W.-D. (2021). Monitor for lactate in perspiration. *The Journal of Physiological Sciences*, *71*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00811-3>
- Ma, X., Sun, G., Leng, A., Wei, X., Xu, J., Ding, W., Liu, H., & Fang, H. (2025). Nanozyme biosensors: Catalytic mechanism, activity regulation, signal amplification and application in food analysis. *Talanta*, *296*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128398>
- Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors*, *21*(19), 6578. <https://doi.org/10.3390/s21196578>
- Malhotra, S., Verma, A., Tyagi, N., & Kumar, V. (2017). *Biosensors: Principle, Types and Applications* (Vol. 3, Número 2). www.ijariie.com
- Mandadzhiev, N. (2025). The contemporary role of lactate in exercise physiology and exercise prescription – a review of the literature. *Folia Medica*, *67*(1). <https://doi.org/10.3897/foimed.67.e144693>
- Mandal, A. (2023). *Biosensor Principles*. <https://www.news-medical.net/health/Biosensor-Principles.aspx>
- Messina, L., & Giardi, M. T. (2024). Recent Status on Lactate Monitoring in Sweat Using Biosensors: Can This Approach Be an Alternative to Blood Detection? *Biosensors*, *15*(1), 3. <https://doi.org/10.3390/bios15010003>
- Metrohm. (2025). *Autolab PGSTAT302N*. Metrohm. https://www.metrohm.com/pt_pt/products/a/ut30/aut302n_s.html
- Metrohm DropSens. (2025a). *Boxed connector for screen-printed electrodes*. Metrohm DropSens. <https://metrohm-dropsens.com/products/connectors/boxed-connectors/boxed-connector-for-screen-printed-electrodes-2/>

- Metrohm DropSens. (2025b). *Screen-printed carbon electrode*. Metrohm DropSens.
<https://metrohm-dropsens.com/products/electrodes/screen-printed-electrodes/screen-printed-carbon-electrode-110/>
- Midander, K., Julander, A., Kettelarij, J., & Lidén, C. (2016). Testing in artificial sweat – Is less more? Comparison of metal release in two different artificial sweat solutions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *81*, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.09.021>
- Morbioli, G. G., Mazzu-Nascimento, T., Stockton, A. M., & Carrilho, E. (2017). Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (µPADs) - A review. *Analytica Chimica Acta*, *970*, 1–22.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.037>
- Moreira, J. K., Germann Souza, M., Victória de Mello Jantzch, G., Moraes, D. da S., Pastore, T. S., Fernandes, I. J., Scherer, J. N., Santos, J. F. L. dos, Hasenkamp Carreira, W., & Lora, P. S. (2024). Electrochemical evaluation of screen-printed sensor manufacturing and LOx enzyme immobilization for lactate biomarker detection: influence of reference electrode material. *RSC Advances*, *14*(51), 38022–38034. <https://doi.org/10.1039/D4RA06473A>
- Mpofu, K., Chauke, S., Thwala, L., & Mthunzi-Kufa, P. (2025). Aptamers and antibodies in optical biosensing. *Discover Chemistry*, *2*(1), 23. <https://doi.org/10.1007/s44371-025-00094-2>
- Mustafa, Y. L., Keirouz, A., & Leese, H. S. (2022). Molecularly imprinted polymers in diagnostics: accessing analytes in biofluids. *Journal of Materials Chemistry B*, *10*(37), 7418–7449. <https://doi.org/10.1039/D2TB00703G>
- Nalbandian, M., & Takeda, M. (2016). Lactate as a Signaling Molecule That Regulates Exercise-Induced Adaptations. *Biology*, *5*(4), 38. <https://doi.org/10.3390/biology5040038>
- Napit, R., Jaysawal, S. K., Chowdhury, R., Catague, J., Melke, H., Pham, C. V., Xu, H., Jia, L., Lin, J., Hou, Y., & Duan, W. (2025). Aptasensors and Advancement in Molecular Recognition Technology. *Advanced Materials Technologies*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1002/admt.202400504>
- Naresh, Varnakavi., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, *21*(4), 1109.
<https://doi.org/10.3390/s21041109>
- Nilam A.Nikam, N. A. N., Sandhya P.Kadam, S. P. K., & Dr. Vivek Kumar K.Redasani, Dr. V. K. K. R. (2025). A Comprehensive Review on Gas chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, *10*(3), 18–33.
<https://doi.org/10.35629/4494-10031833>
- Paimard, G., Ghasali, E., & Baeza, M. (2023). Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors*, *11*(2), 113.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>
- Pasieczna-Patkowska, S., Cichy, M., & Flieger, J. (2025). Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in Characterization of Green Synthesized Nanoparticles. *Molecules*, *30*(3), 684. <https://doi.org/10.3390/molecules30030684>
- Payan, C., Gancel, A.-L., Jourdes, M., Christmann, M., & Teissedre, P.-L. (2023). Wine acidification methods: a review. *OENO One*, *57*(3), 113–126.
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.3.7476>

- Phypers, B., & Pierce, J. T. (2006). Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 6(3), 128–132.
<https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkl018>
- Pohanka, M. (2018). Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials*, 11(3), 448. <https://doi.org/10.3390/ma11030448>
- Polat, E. O., Cetin, M. M., Tabak, A. F., Bilget Güven, E., Uysal, B. Ö., Arsan, T., Kabbani, A., Hamed, H., & Gül, S. B. (2022). Transducer Technologies for Biosensors and Their Wearable Applications. *Biosensors*, 12(6), 385. <https://doi.org/10.3390/bios12060385>
- Rabinowitz, J. D., & Enerbäck, S. (2020). Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nature Metabolism*, 2(7), 566–571. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4>
- Reaño, R. L., & Escobar, E. C. (2024). A review of antibody, aptamer, and nanomaterials synergistic systems for an amplified electrochemical signal. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1361469>
- Sahu, A. K., Pitchumani, S., Sridhar, P., & Shukla, A. K. (2009). Nafion and modified-Nafion membranes for polymer electrolyte fuel cells: An overview. *Bulletin of Materials Science*, 32(3), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s12034-009-0042-8>
- Sandford, C., Edwards, M. A., Klunder, K. J., Hickey, D. P., Li, M., Barman, K., Sigman, M. S., White, H. S., & Minter, S. D. (2019). A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. *Chemical Science*, 10(26), 6404–6422.
<https://doi.org/10.1039/C9SC01545K>
- Saputra, H. A., & Karim, M. M. (2025). Enzymatic and Enzyme-Free Electrochemical Lactate Sensors: A Review of the Recent Developments. *Electrochemical Science Advances*, 5(1). <https://doi.org/10.1002/elsa.202400021>
- Seki, Y., Nakashima, D., Shiraishi, Y., Ryuzaki, T., Ikura, H., Miura, K., Suzuki, M., Watanabe, T., Nagura, T., Matsumoto, M., Nakamura, M., Sato, K., Fukuda, K., & Katsumata, Y. (2021). A novel device for detecting anaerobic threshold using sweat lactate during exercise. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84381-9>
- Sin, M. L., Mach, K. E., Wong, P. K., & Liao, J. C. (2014). Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 14(2), 225–244. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.888313>
- Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A., & Tiwari, M. (2023). Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, 67, 673–691.
<https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>
- Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A. (2021). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*, 11(9), 336. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>
- Singh, S. (2019). Nanomaterials Exhibiting Enzyme-Like Properties (Nanozymes): Current Advances and Future Perspectives. *Frontiers in Chemistry*, 7(FEB).
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00046>
- Stangherlin, S., Lui, N., Lee, J. H., & Liu, J. (2025). Aptamer-based biosensors: from SELEX to biomedical diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 191, 118349.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118349>

- Štukovnik, Z., & Bren, U. (2022). Recent Developments in Electrochemical-Impedimetric Biosensors for Virus Detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15922. <https://doi.org/10.3390/ijms232415922>
- Sumitha, M. S., & Xavier, T. S. (2023). Recent advances in electrochemical biosensors – A brief review. *Hybrid Advances*, 2, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2023.100023>
- Sun, J., Dai, W., Guo, Q., Gao, Y., Chen, J., Chen, J. L., Mao, G., Sun, H., & Peng, Y.-K. (2025). Self-powered wearable electrochemical sensor based on composite conductive hydrogel medium for detection of lactate in human sweat. *Biosensors and Bioelectronics*, 277, 117303. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2025.117303>
- Tetyana, P., Morgan Shumbula, P., & Njengele-Tetyana, Z. (2021). Biosensors: Design, Development and Applications. Em *Nanopores*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97576>
- Uniyal, A., Srivastava, G., Pal, A., Taya, S., & Muduli, A. (2023). Recent Advances in Optical Biosensors for Sensing Applications: a Review. *Plasmonics*, 18(2), 735–750. <https://doi.org/10.1007/s11468-023-01803-2>
- Valverde, S. (2024). The Essentials of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Applications, and Advances. *J Chromatogr Sep Tech*, 15. <https://doi.org/10.35248/2157-7064.24.15.573>
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B., & Prakash, H. (2016). Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(FEB). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>
- Vinay Kumar, J., N, S., Srinivas, S., Khosla, A., R, H. K., & C, M. (2022). Review on Biosensors: Fundamentals, Classifications, Characteristics, Simulations, and Potential Applications. *ECS Transactions*, 107(1), 13005–13029. <https://doi.org/10.1149/10701.13005ecst>
- Wang, M., Wu, P., Yang, S., Wu, G., Li, N., Tan, X., & Yang, Q. (2023). β -cyclodextrin-modified AuBi metallic aerogels enable efficient peroxidase mimicking for colorimetric sensing of urease-positive pathogenic bacteria. *Nano Research*, 16(7), 9663–9671. <https://doi.org/10.1007/s12274-023-5519-z>
- Weng, X., Li, M., Chen, L., Peng, B., & Jiang, H. (2024). A wearable nanozyme–enzyme electrochemical biosensor for sweat lactate monitoring. *Talanta*, 279, 126675. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126675>
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>
- Xia, Z., Zuo, W., Li, H., Qiu, L., Mu, R., Wang, Q., Liu, H., Wang, H., & Hui, yuchen. (2023). *Wearable cellulose textile matrix self-powered biosensor sensing lactate in human sweat*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3229604/v1>
- Xu, R., Lin, X., Xu, J., & Lei, C. (2020). Controlling the water absorption and improving the high C-rate stability: a coated Li-ion battery separator using β -cyclodextrin as binder. *Ionics*, 26(7), 3359–3365. <https://doi.org/10.1007/s11581-020-03449-0>
- Xu, Z., Liu, R., Sun, B., Pan, X., Cao, Z., Gao, K., Cui, Y., Zhao, H., Sun, H., Lu, Q., Lyu, Y., & Ren, F. (2025). Polythioctic acid-driven biomemristor for efficient sweat pH monitoring. *Materials Today Advances*, 28, 100624. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2025.100624>

- Xuan, X., Chen, C., Molinero-Fernandez, A., Ekelund, E., Cardinale, D., Swarén, M., Wedholm, L., Cuartero, M., & Crespo, G. A. (2023). Fully Integrated Wearable Device for Continuous Sweat Lactate Monitoring in Sports. *ACS Sensors*, *8*(6), 2401–2409. <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c00708>
- Yang, G., Hong, J., & Park, S.-B. (2024). Wearable device for continuous sweat lactate monitoring in sports: a narrative review. *Frontiers in Physiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1376801>
- Yang, R., Liu, Z., Chen, H., Zhang, X., Sun, Q., El-Mesery, H. S., Lu, W., Dai, X., & Xu, R. (2025). Advances in Nanozyme Catalysis for Food Safety Detection: A Comprehensive Review on Progress and Challenges. *Foods*, *14*(15), 2580. <https://doi.org/10.3390/foods14152580>
- Yang, W., Yang, X., Zhu, L., Chu, H., Li, X., & Xu, W. (2021). Nanozymes: Activity origin, catalytic mechanism, and biological application. *Coordination Chemistry Reviews*, *448*, 214170. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214170>
- Zaryanov, N. V., Nikitina, V. N., Karpova, E. V., Karyakina, E. E., & Karyakin, A. A. (2017). Nonenzymatic Sensor for Lactate Detection in Human Sweat. *Analytical Chemistry*, *89*(21), 11198–11202. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03662>
- Zhang, Q., Jiang, D., Xu, C., Ge, Y., Liu, X., Wei, Q., Huang, L., Ren, X., Wang, C., & Wang, Y. (2020). Wearable electrochemical biosensor based on molecularly imprinted Ag nanowires for noninvasive monitoring lactate in human sweat. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *320*, 128325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128325>
- Zhang, R., Zhao, H., & Fan, K. (2022). Structure-Activity Mechanism of Iron Oxide Nanozymes. In *ACS Symposium Series* (Vol. 1422, pp. 1–35). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2022-1422.ch001>
- Zhao, H., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2021). Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *Journal of Materials Chemistry B*, *9*(35), 6939–6957. <https://doi.org/10.1039/D1TB00720C>