

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

SAMUEL GUERRA TORRES

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DETECÇÃO DE LACTATO**

**DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR
LACTATE DETECTION**

São Paulo – SP

2021

SAMUEL GUERRA TORRES

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DETECÇÃO DE LACTATO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Profa. Dra. Adriana Pavinatto da Costa
Orientadora

Prof. Dr. Mardoqueu Martins da Costa
Coorientador

São Paulo – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

T648d TORRES, Samuel Guerra.

Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico para detecção de Lactato / Samuel Guerra Torres -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

74 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Adriana Pavinatto da Costa.

Coorientação: Prof. Dr. Mardoqueu Martins da Costa.

1. Plataforma sensorial. 2. LBL. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Quitosana. 5. Lactato. I. Costa, Adriana Pavinatto da. II. Costa, Mardoqueu Martins da. III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

SAMUEL GUERRA TORRES

“DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LACTATO”.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Adriana Pavinatto da Costa

Prof(a). Dr(a) Adriana Pavinatto da Costa (presidente-orientadora)

Laurita dos Santos

Prof(a). Dr(a) Laurita dos Santos (UNIVERSIDADE BRASIL)

Bruno Vinicius Manzoli

Prof(a). Dr(a) Bruno Vinicius Manzoli Rodrigues (UNIVERSIDADE BRASIL)

Luiza Amim Mercante

Prof(a). Dr(a) Luiza Amim Mercante (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA)

Fernanda Lanzoni Migliorini

Prof(a). Dr(a) Fernanda Lanzoni Migliorini (EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO)

São Paulo, 22 de outubro de 2021.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa

Houve alteração do Título: sim () não (X):

**FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA
UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA
CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO**



UNIVERSIDADE
BRASIL

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE LACTATO”**

Autor(es):

Discente: **Samuel Guerra Torres**

Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa**

Assinatura: _____

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Data: 22/10/2021

DEDICATÓRIA

Com agradecimento, dedico este trabalho a Deus.

Dedico este trabalho aos meus pais Alfredo Rodrigues Torres e Maria Assunção Guerra Torres. Pelo apoio incondicional e constante.

Este trabalho de pesquisa que só foi possível através do apoio e suporte da minha amada esposa Thais Maria Guedes Basílio. Grato por tudo.

Aos meus filhos Beatriz Constance Basílio Torres e Samuel Guerra Torres Filho dedico este trabalho. Razão maior do meu viver.

Dedico esta tese de doutorado à minha orientadora Dra. Adriana Pavinatto da Costa cujo empenho e paciência serviram como base de sustentação para a concretização deste trabalho. Dedico esta pesquisa a ela.

RESUMO

O desenvolvimento de novas plataformas sensoriais é de grande interesse para a área de biossensores, principalmente as que apresentam características de baixo custo e grande reprodutibilidade. Para tanto o presente estudo visou a detecção de lactato em diferentes formas. Nesse contexto, o presente estudo visou a produção e caracterização de plataforma de biossensor composta por filmes produzidos pela técnica de automontagem por adsorção física (*Layer-by-Layer* - LbL) utilizando quitosana e AuNps@PTS (nanopartículas de ouro estabilizadas com o polímero PTS – um derivado sulfonado do politiofeno). Posteriormente, a plataforma formada foi utilizada para imobilização da enzima LOx e detecção de lactato. Os filmes foram formados em diferentes números de bicamadas e caracterizados por medidas espectroscópicas de absorção no ultravioleta (UV-Vis) e fluorescência, e medidas eletroquímicas. A enzima LOx foi imobilizada sobre duas bicamadas de filmes LbL através do gotejamento e *cross-linking* realizado com adição de glutaraldeído. A detecção do lactato foi realizada através de medidas de voltametria cíclica (VC) em amostras padrão. Os resultados mostraram que crescimento dos filmes foi relativamente homogêneo, sendo que até a quarta bicamada a intensidade de absorção cresceu linearmente com o número de bicamadas. Medidas de VC mostraram que o eletrodo modificado com duas bicamadas de filmes possibilitam maior transferência de carga, sendo a plataforma escolhida para imobilização da enzima LOx e detecção do lactato. Voltamogramas mostraram que a presença da enzima LOx dificulta a transferência de carga e que a imobilização da mesma foi efetiva. Medidas de detecção mostram que a plataforma desenvolvida é adequada para detecção do lactato, sendo que o sinal analítico apresentou regime linear entre o aumento na magnitude de corrente anódica e o aumento da concentração de lactato, na faixa de 0,5 a 30 mM de lactato. A plataforma utilizada foi capaz de detectar lactato de suor humano em diferentes tempos e intensidades de exercício físico, apresentando limites de detecção próximos aos encontrados na literatura.

Palavras-chave: plataforma sensorial, LbL, LOx, quitosana, nanopartículas de ouro, lactato.

ABSTRACT

The development of new sensory platforms is of great interest to the field of biosensors, especially those with low cost and high reproducibility characteristics. In this context, the present study aimed at the production and characterization of a biosensor platform composed of films produced by the physical adsorption self-assembly technique (Layer-by-Layer - LbL) using chitosan and AuNps@PTS (gold nanoparticles stabilized with PTS polymer – a sulphonated polythiophene derivative). Subsequently, the platform formed was used for immobilization of the enzyme lactate oxidase (LOx) and detection of lactate. The films were formed in different numbers of bilayers and characterized by spectroscopic measurements of ultraviolet absorption (UV-Vis) and fluorescence, and electrochemical measurements. The LOx enzyme was immobilized on two LbL film bilayers through dripping and subsequent cross-linking performed with the addition of glutaraldehyde. The detection of lactate was performed through cyclic voltammetry (VC) measurements on standard samples. The results show that film growth was relatively homogeneous, and until the fourth bilayer the absorption intensity increased linearly with the number of bilayers. CV measurements showed that the electrode modified with two film bilayers allows greater charge transfer, being the platform chosen for immobilization of the LOx enzyme and detection of lactic acid. Voltammograms showed that the presence of the LOx enzyme hinders charge transfer and that its immobilization was effective. Detection measurements show that the developed platform is suitable for detecting lactate, and the analytical signal presented a linear regime between the increase in the anodic current magnitude and the increase in the lactate concentration, in the range of 0.5 to 30 mM of lactate. The platform used was able to detect human sweat lactate at different times and intensities of physical exercise, with detection limits close to those found in the literature.

Keywords: sensory platform, LbL, LOx, chitosan, gold nanoparticles, lactate.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A cada dia que passa novas tecnologias são criadas para o acompanhamento e melhora do desempenho esportivo e saúde, porém muitos desses métodos podem se apresentar de forma inviável por conta da reprodutibilidade, elevado custo financeiro ou até mesmo por serem procedimentos invasivos. Diante disso, o presente estudo vem com uma proposta de viabilizar teste de limiar anaeróbio de baixo custo, fácil reprodutibilidade e não invasivo para determinar limiares de treinamento em atletas de alto rendimento por meio da detecção de lactato no suor dos avaliados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração dos principais componentes de um biossensor.	21
Figura 2 - Formação dos filmes finos a partir da imersão alternada nos substratos.	24
Figura 3 - Representação das estruturas químicas idealizadas de quitina e da quitosana.....	26
Figura 4 - Taça de Licurgo, relíquia Romana.	28
Figura 5 - Representação esquemática para formação de nanopartículas de ouro.	29
Figura 6 - Estrutura química do ácido láctico e lactato.....	30
Figura 7 - (a) Esquema do eletrodo de ouro / platina, (b) aplicação de laminado de enzima, (c) esquema e (d) layout final do sensor demonstrando flexibilidade.	33
Figura 8 - Limiar de lactato e comportamento da concentração de lactato no suor e sanguíneo durante exercício com carga incremental.	34
Figura 9 - Esquema utilizado para formação de filmes LbL	38
Figura 10 - Equipamentos utilizados para caracterização dos filmes. Espectrômetro de fluorescência (a) e espectrômetro de UV-Vis (b).....	38
Figura 11 – Potenciostato Autolab PGSTAT30 (Metrohm) (a) e célula eletroquímica (b) utilizados na caracterização e detecção eletroquímica	39
Figura 12 - Eletrodos descartáveis Dropsens-Metrohm referência 110 (a), eletrodo descartável acoplado em dispositivo ligado ao potenciostato para medição (b) processo de crescimento dos filmes LbL e imobilização da enzima LOx (c).....	40
Figura 13 – Tempo de total de exercício físico, velocidade de caminhada e tempos de coletas do suor e da frequência cardíaca.....	42
Figura 14 – Formação dos filmes em lâminas de vidro e FTO.....	44
Figura 15 – Espectros de absorvância (a) e Espectros de fluorescência (b) de filmes LbL com diferentes números de bicamadas formadas por Qui/AuNps@PTS. O inset dos gráficos mostra o aumento da absorvância e da fluorescência com o aumento do número de bicamadas.	46
Figura 16 – Voltamogramas cíclicos para o FTO e para os filmes LbL formados com diferentes números de bicamadas (a). Comparação dos voltamogramas obtidos para o FTO e para FTO modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS (b). Os VCs foram obtidos em solução de 0,05 mol L ⁻¹ de ferricianeto de potássio ([Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}) contendo 0,1 mol L ⁻¹ de KCl.	47

Figura 17 – Voltamogramas cíclicos realizados em (a) solução de ferrocianeto de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e (b) em tampão PBS (pH 7,4) para os diferentes tipos de arquiteturas da enzima LOx imobilizada. Velocidade de varredura $0,05 \text{ V s}^{-1}$	50
Figura 18 – Voltamogramas cíclicos ($0,05 \text{ V s}^{-1}$) na ausência e presença de diferentes concentrações de lactato (inset) na interface do FTO modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + LOx (a) e curva analítica obtida neste intervalo de concentração para o potencial $0,17\text{V}$ (b).....	52
Figura 19 – Voltamogramas cíclicos ($0,05 \text{ V s}^{-1}$) realizados na interface do eletrodo impresso modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS com e sem a imobilização da enzima LOx, utilizando 10 mM de lactato (amostra padrão) (a) e amostra de suor coletado após 30 minutos de exercício físico (b).....	54
Figura 20 – Voltamogramas cíclicos ($0,05 \text{ V s}^{-1}$) realizados na interface do eletrodo impresso modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS +LOx na detecção de lactato nas amostras de suor coletadas durante o esforço físico. O inset mostra o tempo de exercício realizado.....	55
Figura 21 – Tempo de exercício, concentração de lactato (a) e frequência cardíaca (b).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos de biossensores classificados pelo modo de transdução.	21
Tabela 2 - Propriedades químicas e biológicas da quitosana.	27
Tabela 3 – Locais do corpo e tempos de coleta de amostra suor e de frequência cardíaca.....	42
Tabela 4 – Resultados de tempo de exercício, concentração de lactato (determinada utilizado o biossensor desenvolvido) e frequência cardíaca durante o esforço físico.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AuNps – Nanopartículas de ouro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FTIR - Infravermelho por transformada de *Fourier*

\overline{GA} – Grau de acetilação médio

GOx – Enzima glicose oxidase

LbL – *Layer-by-Layer* (técnica de formação de filmes finos de automontagem por adsorção física)

LOD - Limite de detecção

LOx – Enzima lactato oxidase

PBS - Fosfato salino

Qui - Quitosana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos.....	19
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1	Biossensores.....	20
3.2	Filmes automontados por adsorção física (<i>Layer-by-Layer</i> – LbL)	23
3.3	Quitosana.....	25
3.4	Nanopartículas de ouro (AuNps).....	27
3.5	Ácido Lático e Lactato	30
3.6	Limiar de lactato no exercício físico	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Materiais.....	37
4.2	Deposição dos filmes pela técnica de <i>Layer-by-Layer</i> (LbL).....	37
4.3	Caracterizações físico-química e eletroquímica dos filmes formados	37
4.4	Formação da plataforma sensorial para detecção de lactato – imobilização da enzima LOx.....	39
4.5	Medidas de detecção eletroquímica.....	40
4.6	Protocolo de exercício, coleta de suor e frequência cardíaca	41
4.7	Detecção de lactato em amostras reais (suor).....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Formação e caracterização da plataforma sensorial.....	44
5.2	Caracterização de plataforma sensorial com a enzima LOx imobilizada	48
5.3	Detecção do Lactato em amostras padrão.....	51
5.4	Limite de detecção (LOD) e reprodutibilidade	53

5.5	Detecção do Lactato em amostras reais de suor	53
6	CONCLUSÕES	60
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
8	PRODUÇÃO CIENTÍFICA A PARTIR DOS RESULTADOS DA TESE	62
9	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros como a quitosana vem sendo amplamente empregados no processo de formação de filmes LbL. O polímero, que é oriundo principalmente do processo de desacetilação da quitina, um polímero muito abundante na natureza, pode ser utilizada na forma de géis, nanopartículas ou mesmo na formação de filmes sustentáveis (MUZZARELLI, 2009). Por desenvolver carga positiva quando solubilizada em soluções levemente ácidas, atua como polieletrólito catiônico na formação dos filmes LbL (PAVINATTO et al., 2015).

O teste de detecção de limiar de lactato é recomendado como um eficiente método para avaliar a intensidade e recuperação do treinamento e para melhorar o desempenho dos atletas de resistência (BALDARI et al., 2004). Durante exercício incremental (com cargas progressivas), o limiar de lactato é definido como a transição abrupta de aumentos lentos para exponenciais rápidas, aumentando os níveis de lactato no sangue (SVEDAHL; MACINTOSH, 2003). Contudo, a maioria dos estudos publicados sobre o limiar de lactato apresentam metodologias invasivas (coleta sanguínea), o que justificaria desenvolvimento de possíveis novas técnicas não invasivas para determinar limiares de treinamento em atletas (CARLSSON et al., 2012).

Novas tecnologias utilizadas no desenvolvimento de plataformas sensoriais com características de baixo custo e reprodutibilidade são de grande relevância e interesse para a área de biossensores. Biossensor é um tipo de dispositivo analítico que converte sinais biológicos combinados com moléculas de reconhecimento e analitos alvo em sinais detectáveis (FAN et al., 2020). Dentre as principais características de um biossensor podemos citar a sensibilidade, os limites de detecção, a reprodutibilidade e a seletividade. Tais características podem ser melhoradas através da utilização de nanomateriais que apresentam excelentes propriedades elétricas (SI et al., 2018).

Com o advento da nanotecnologia, novos nanomateriais e nanoestruturas vêm sendo desenvolvidas e empregadas na fabricação de biossensores a fim de fornecerem melhor condições de troca eficiente de elétrons e por consequência melhora nas características do dispositivo desenvolvido (ARAVAMUDHAN et al., 2014). Nesse sentido, o uso de nanomateriais condutores como plataforma sensorial e enzima podem fornecer condições favoráveis para troca eficiente de elétrons,

melhorando significativamente a sensibilidade dos dispositivos (HUANG et al., 2019).

Dentre as técnicas de nanoestruturação existentes e utilizadas na formação da plataforma sensorial, os sistemas de automontagem por adsorção física (em inglês, *Layer-by-Layer* - LbL) são bastante utilizados devido sua versatilidade e baixo custo (DECHER, 1997). A técnica LbL envolve adsorção simples e alternada de polieletrólitos carregados de carga oposta em substratos sólidos e, portanto, são consideradas ferramentas promissoras para construção de plataformas nanoestruturadas, que podem ser utilizadas na imobilização de biomoléculas e no desenvolvimento de biossensores (DELEZUK et al., 2017).

A técnica de formação de filmes LbL consiste na imersão alternada de um substrato sólido em diferentes soluções de cargas opostas, o que facilita o crescimento dos filmes através de atração eletrostática entre os componentes presentes na solução. Além disso, o crescimento dos filmes pode também ser devido a outras forças intermoleculares como forças de Van der Waals, ligações hidrogênio ou forças hidrofóbicas (DECHER, 1997).

Biossensores enzimáticos eletroquímicos vem sendo frequentemente desenvolvidos e utilizados para detecção de analitos de interesse da área da saúde (PAVINATTO et al., 2018). Em muitas dessas aplicações, o dispositivo desenvolvido visa substituir formas de análise invasivas e de mais alto custo, sendo que tais analitos podem ser detectados visando o diagnóstico de algumas doenças ou até mesmo a performance de atletas, como é o caso da avaliação do ácido láctico proveniente de esforço físico. A maioria dos testes físicos da avaliação do lactato sanguíneo, geralmente complementa a resistência dos esquemas periodizados de treinamento físico (HOLLMANN, 2001).

Na formação de plataformas de biossensores, por exemplo, a quitosana e nanopartículas metálicas têm se mostrado excelente como matrizes principalmente devido a sua biocompatibilidade e facilidade de bioconjugação (NOGUEIRA et al., 2010). A quitosana por ser uma boa formadora de filmes se mostra também adequada para imobilização de enzimas na construção de biossensores (MARINHO et al., 2016; PAVINATTO et al., 2015). Já as nanopartículas metálicas, como as de AuNps por exemplo, favorecem a transferência de carga elétrica e diminuição da resistência, atuando como amplificador de sinal (MERCANTE et al., 2015; MIGLIORINI et al., 2017; SANFELICE et al., 2017).

Diante do exposto, justifica-se a importância do presente estudo pelo baixo custo, simplicidade do método de nanoestruturação selecionado e facilidade de acesso aos substratos para produção de biossensores e suas diversas aplicabilidades. Para tanto, o presente estudo visou à produção e caracterização de plataforma de biossensor composta por filmes LbL de quitosana e AuNps utilizadas para imobilização da enzima LOx e a detecção da concentração de lactato em amostras padrão e amostras de suor provenientes de exercício físico contínuo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir plataforma de biossensor eletroquímico para detecção de lactato.

2.2 Específicos

- Produzir plataforma de biossensor através da técnica de automontagem por adsorção física (*Layer-by-Layer – LbL*) utilizando quitosana e AuNps@PTS;
- Caracterizar a plataforma desenvolvida através de medidas espectroscópicas e eletroquímicas;
- Imobilizar a enzima LOx na plataforma desenvolvida através de *cross-linking* e caracterizar através de medidas eletroquímicas;
- Realizar teste de detecção eletroquímica do lactato em amostras padrão utilizando a plataforma desenvolvida;
- Executar testes de detecção de lactato em amostras reais (suor proveniente de exercício físico).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biossensores

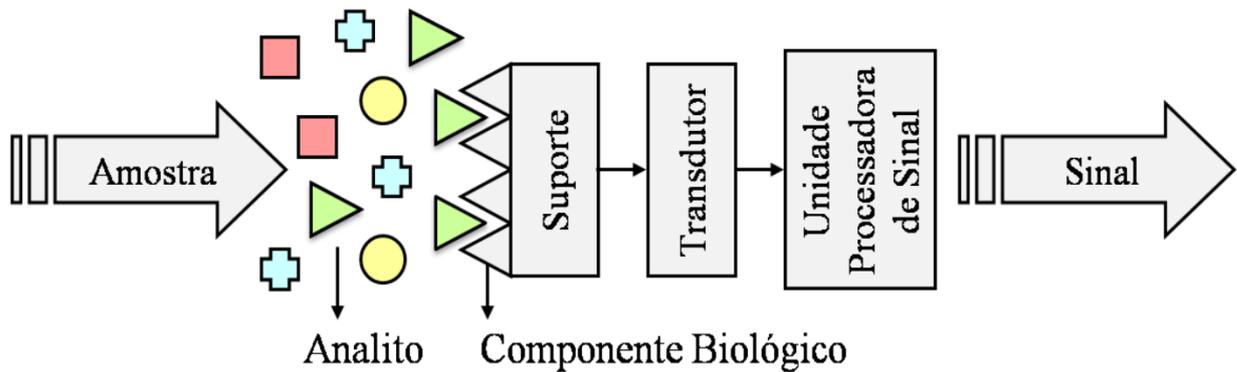
Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo (SILVA., 2019) onde a imobilização de biomoléculas ativas em superfícies sólidas consiste em uma das etapas de sua fabricação (PUTZBACH; RONKAINEN, 2013). Esses dispositivos são responsáveis por converterem sinais biológicos provindos da combinação de moléculas de reconhecimento e analitos em sinais detectáveis (FAN et al., 2020).

A análise quantitativa específica que um biossensor fornece é atribuída ao elemento de reconhecimento biológico imobilizado, que faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma interação química gerando um sinal mensurável. O funcionamento de um biossensor de uma forma geral envolve a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse (OLIVEIRA et al., 2015).

O trabalho pioneiro de Clark; Lyons (1962), desenvolveu um eletrodo enzimático modificado através da imobilização da glicose oxidase (GOx) para detecção de moléculas de glicose. Quarenta anos depois, houve a comercialização bem-sucedida do biossensor enzimático descartável para monitoramento da glicose. Embora bem consolidado, novos e otimizados biossensores de glicose continuam sendo observados na literatura, como por exemplo, os avanços relatados em eletrodos modificados por nanopartículas (LIU et al., 2020; POURASL et al., 2014; TAGUCHI et al., 2014).

Os biossensores são compostos por três componentes básicos: o elemento componente biológico, o transdutor e unidade processadora do sinal eletrônico, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Ilustração dos principais componentes de um biossensor.



Fonte: Figura adaptada disponível em <http://qnint.sbg.org.br/>. Acesso: 11/05/2021.

O formato de sistema desenvolvido determina a classificação do biossensor juntamente com a constituição do elemento de transdução que é empregado e utilizado de forma acoplada ao componente biológico. Os biossensores são normalmente classificados de acordo com o método de transdução que será utilizado para identificação do sinal. O transdutor é o componente que converte sinal provindo da interação do analito com as biomoléculas, reações bioquímicas, químicas, físicas ou biológicas em um sinal detectável. Mais especificamente sobre os biossensores eletroquímicos, estes podem ser do tipo impedimétricos, potenciométricos ou amperométricos, onde o sinal bioquímico é transduzido e passível de quantificação (POHANKA; SKLADAL, 2008). A Tabela 1 apresenta os principais tipos de biossensores nomeados por tipo de transdutores e suas características.

Tabela 1 – Principais tipos de biossensores classificados pelo modo de transdução.

BIOSENSOR	SISTEMA DE TRANSDUÇÃO	MEDIÇÃO	APLICAÇÕES
Eletroquímico	Amperométrico	Corrente	Substratos Enzimáticos
	Potenciométrico	Voltagem	Íons e espécies redox
	Conductimétrico	Conductância	Reações catalíticas
Acústicos	Piezoelétricos	Massa	Gases voláteis
Ópticos	Fibras ópticas	Luminisidade	pH, enzimas

Fonte: adaptado de Salomão (2018).

Dentre as principais vantagens no desenvolvimento dos biossensores como método de detecção analítica, podemos destacar - o baixo custo, a possibilidade de desenvolvimento de sistemas portáteis de aplicação on-line e no campo, o que desperta interesse de muitos pesquisadores apresentando-se como novas alternativas de análise. Somam-se às características vantajosas desses dispositivos analíticos, o menor tempo de processamento e análise da amostra (de minutos a horas), além da possibilidade de integração dos componentes em um único dispositivo e de análise em tempo real e no local de medição (SALOMÃO, 2018).

O que possivelmente determinará qual o melhor sensor que será utilizado são as exigências e condições impostas pelos diferentes tipos de processos e objetivos de interesse no que se diz respeito às medições do analito (ETEZADI et al., 2017). Sobre o desenvolvimento de biossensores para detecção de lactato, (SHI; LUO; CUI, 2018) realizaram o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para glicose e lactato. O sensor foi desenvolvido imprimindo carbono grafite em forma de tubo e tintas de prata/cloreto de prata (Ag / AgCl) na parede interna do tubo para construir eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodos. A GOx ou LOx foram em seguida, imobilizadas no eletrodo de trabalho do sensor. Um potencial foi aplicado entre o eletrodo de trabalho e eletrodo de referência, quando o sensor estava na presença de glicose / lactato, as moléculas foram catalisadas por GOx / LOx para gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que foi em seguida, oxidado pelo eletrodo de trabalho para gerar uma resposta de corrente.

Bollella *et al.*, (2019), relata o primeiro biossensor baseado em microagulhas (*microneedles*) para a detecção de lactato no fluido intersticial dérmico. Para tanto, a superfície de ouro do eletrodo de microagulhas foi modificada em 3 etapas subsequentes: i) eletrodeposição de nanotubos de carbono com paredes múltiplas (MWCNTs); ii) eletropolimerização do mediador, azul de metileno (MB); iii) imobilização da enzima LOx através do procedimento *drop casting* (evaporação do solvente).

De uma maneira geral, um biossensor eletroquímico é um dispositivo constituído por um sistema de reconhecimento e um tradutor eletroquímico que converte o sinal da reação química/bioquímica em um sinal mensurável, como exemplo a variação de frequência, potencial e corrente elétrica. Para configurar um biossensor, elementos biológicos devem ser utilizados como instrumento de

reconhecimento como, por exemplo um anticorpo, enzima ou até mesmo DNA (GOMES, 2019).

Estudos indicam que a principal etapa para o desenvolvimento dos biossensores é a imobilização das enzimas na superfície do sensor, sendo que a utilização de nanomateriais na construção da plataforma do dispositivo é recorrente, favorecendo a adsorção das biomoléculas e facilitando a identificação de substâncias com maior sensibilidade (ZHAO et al., 2013).

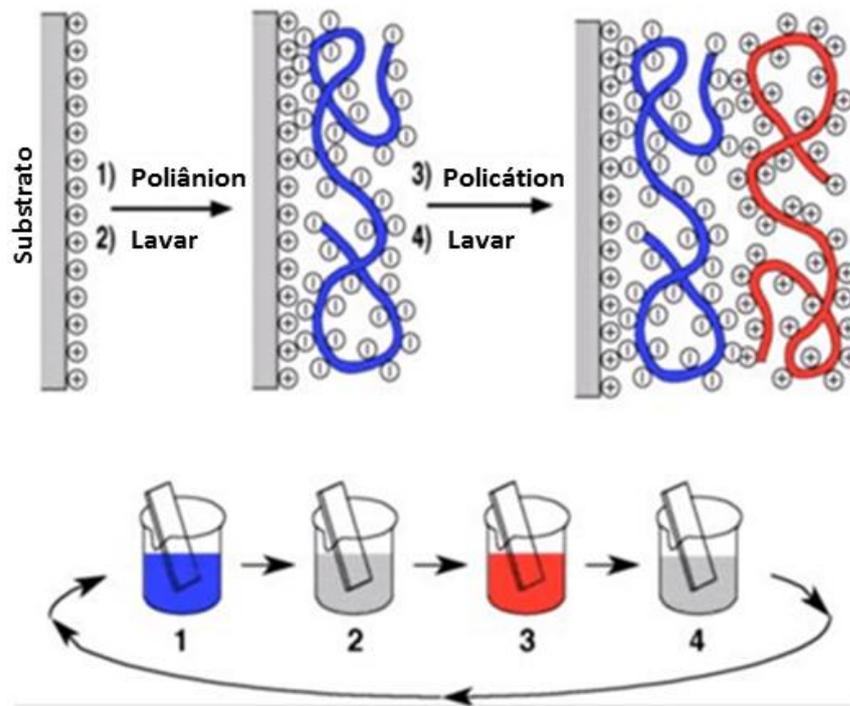
3.2 Filmes automontados por adsorção física (*Layer-by-Layer* – LbL)

A técnica de formação de filmes automontados por adsorção física (em inglês, *Layer-by-Layer*) foi introduzida pela primeira vez por J. J. Kirkland, (1965), descrevendo a formação de multicamadas por deposição alternativa de colóides com carga positiva e negativas por adsorção da solução (ZHANG; CHEN; ZHANG, 2007). Por volta de 1991, a técnica foi revitalizada pelo químico alemão Prof. Gero Decher que introduziu a técnica na deposição de filmes finos de ampla gama de polieletrólitos (LVOV; DECHER; MOEHWALD, 1993).

A técnica de LbL permite a construção de filmes multicamadas de polieletrólitos, entre outros materiais, em condições moderadas com base na adsorção externa (superfície) de elementos catiônicos e aniônicos. Basicamente, os filmes são formados por imersão vertical e emersão subsequente de substrato sólido (geralmente lâminas de vidro) em soluções de materiais catiônicos e aniônicos. Parâmetros como a espessura das camadas nanométricas, as propriedades viscoelásticas do revestimento e a carga química da superfície podem ser ajustadas controlando a natureza dos polieletrólitos, o pH, a força iônica, ou através de algumas modificações químicas (LEITE; SHER; MANO, 2014).

A montagem imersiva de LbL, muitas vezes chamada de "montagem por imersão", é um método utilizado, e o padrão no qual as tecnologias mais recentes são frequentemente comparadas em estudos científicos. A montagem imersiva é tipicamente realizada imergindo manualmente um substrato plano em uma solução do material desejado, seguido de três etapas de lavagem para remover o material não ligado (DELEZUK et al., 2017). Com a técnica, filmes finos de materiais são formados a partir da imersão alternada de um substrato sólido em diferentes soluções conforme ilustrado na Figura 2 (DESHMUKH et al., 2013).

Figura 2 - Formação dos filmes finos a partir da imersão alternada nos substratos.



Fonte: Figura adaptada disponível em www.nanostrata.com/ Acesso: 11/05/2021.

Uma das principais vantagens na utilização da técnica LbL é a simplicidade do seu aparato experimental. A montagem costuma ser um método simples, versátil e significativamente de baixo custo propiciando muitas aplicações potenciais como em sistemas de liberação controlada, no desenvolvimento de baterias de íon-lítio, produção de (bio)sensores, na eletro / fotocatalise, emissão de campo, na fabricação de dispositivos eletrocromicos e na produção de dispositivos de conversão e armazenamento de energia (XUE et al., 2014).

O uso da metodologia LbL apresenta uma base versátil, favorecendo uma redução nos custos de produção de multicamadas; devido ao potencial para modular as propriedades químicas da superfície em níveis nanométricos; além da possibilidade de introdução de uma estruturação de moléculas na multicamada em uma sequência programada, com várias funcionalidades (ANTUNES et al., 2011; CHUA et al., 2008).

A técnica LbL apresenta algumas vantagens se comparadas a outras técnicas de formação de filmes finos principalmente as que requerem instrumentação de

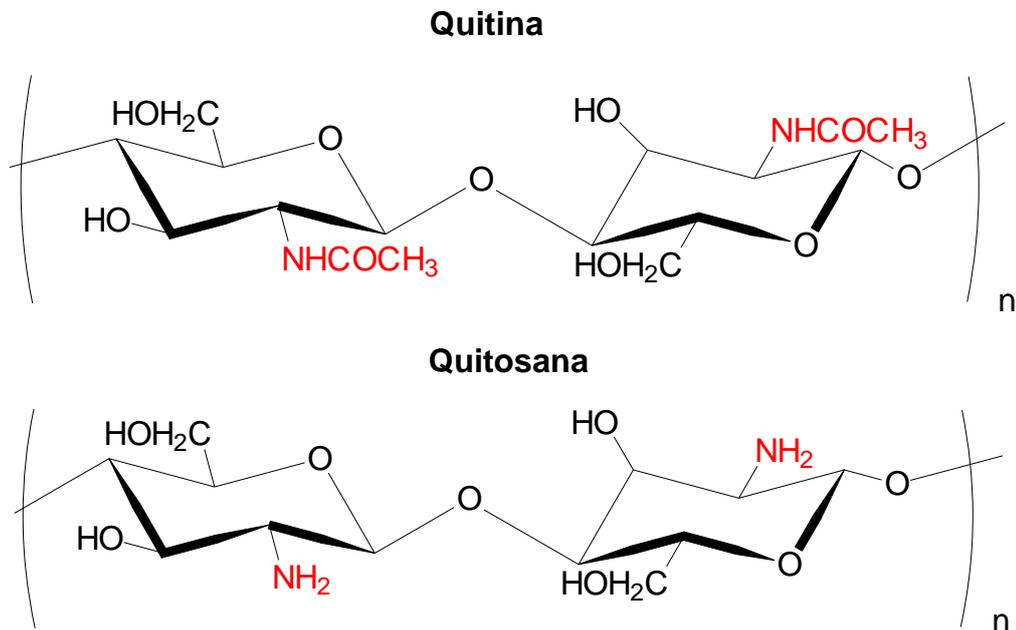
custo elevado, maior tempo para produção de filmes e que possuem limitação de materiais que possam ser utilizados na deposição. Nesse sentido, a técnica LbL possui ainda a vantagem de permitir a utilização de qualquer tipo de material hidrofílico, podendo ser utilizadas soluções ou mesmo suspensão de materiais, além de que a quantidade de camadas a ser produzida pode ser determinada de acordo com as necessidades (CAMPOS, 2014; TANG et al., 2006).

A construção de biosensores com a técnica LbL e com estrutura de nanomateriais podem proporcionar um aumento da condução elétrica e propriedades mecânicas de dispositivo eletrônico flexível, a utilização de ligantes de ouro é mais estável em estruturas orgânicas (KUMARASAMY et al., 2018).

3.3 Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtida principalmente através do processo de desacetilação da quitina. A quitina por sua vez é encontrada em abundância nos exoesqueletos de invertebrados (insetos, crustáceos e moluscos), sendo um polissacarídeo composto por unidades 2-acetamido 2-desoxi- D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), enquanto a quitosana é formada majoritariamente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. O grau de acetilação médio (\overline{GA}) confere à quitosana o número de unidades acetiladas ou de grupos acetamido e pode ser definido como o número de grupos amida em relação aos grupos amina da cadeia polimérica (ARAVAMUDHAN et al., 2014). Sendo assim, quando o polímero possui $\overline{GA} \geq 50\%$ o polissacarídeo é denominado quitina, enquanto quando $\overline{GA} \leq 50\%$ o polissacarídeo é denominado quitosana. A Figura 3 mostra a representação das estruturas rimárias idealizadas da quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.

Figura 3 - Representação das estruturas químicas idealizadas de quitina e da quitosana.



Fonte: Próprio Autor.

A quitosana apresenta propriedades muito interessantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, que propiciam a aplicação desse polissacarídeo nas mais diversas áreas, incluindo aplicações biomédicas. Além disso, é um polímero muito versátil podendo ser manipulado e utilizado na forma de pó, géis, filmes, fibras ou em solução aquosa ácida, onde desenvolve carga positiva através da protonação do seu grupamento amina (DELEZUK et al., 2017).

Mais especificamente no desenvolvimento de (bio)sensores, a quitosana é frequentemente utilizada como suporte na imobilização de enzimas, por possuir grande percentual de grupos amina e hidroxila (grupos químicos reativos) disponíveis em sua estrutura química (PAVINATTO et al., 2015).

Song et al., (2014) verificaram a formação de novo tecido ósseo em defeitos produzidos por calvária em ratos, produziram membranas de quitosana/fibroína-hidroxiapatita e membranas de colágeno. Nesse estudo foi observado que a membrana formada por colágeno, apresentou resultados similares aos obtidos com as membranas constituídas de quitosana/fibroína-hidroxiapatita, não houve diferenças significativas entre elas, ambas induziram a formação de novo tecido ósseo e nos defeitos ósseos que não foram empregadas nenhuma espécie de

membrana (grupo controle) ocorreu processo inflamatório e não formação de tecido ósseo.

Pesquisadores utilizaram a técnica LbL em substratos de PET para a criação de recobrimentos contendo quitosana, como resultado obtiveram superfícies estáveis e com maior biocompatibilidade. Observou-se em células endoteliais que a possibilidade de adesão celular foi aumentada e também a manutenção de suas funções. A interface criada também possibilitou a imobilização de fatores de crescimento (LIU; GAO, 2005).

Dutta *et al.*, (2003), citam as propriedades da quitosana tanto nos aspectos químicos como biológicos exemplificado na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades químicas e biológicas da quitosana.

PROPRIEDADES DA QUITOSANA	
Químicas	Biológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Poliamina linear • Grupos aminos reativos • Grupos hidroxila reativos disponíveis • Íons metálicos de transição • Agente hidratante 	<ul style="list-style-type: none"> • Bioconpatível • Propriedades de cicatrização óssea • Atividade antimicrobiana e antitumoral • Não-tóxica • Biodegradável

Fonte: adaptado (DUTTA et al., 2003).

3.4 Nanopartículas de ouro (AuNps)

Na medicina egípcia, é possível encontrar registros da utilização do ouro desde 5000 a.C, onde se mostrou útil em diversas situações como em implantes dentários e restaurações de dentaduras na odontologia, em pó misturado nas bebidas para tratar dores causadas por artrite e até em pomadas para tratamento de úlceras na pele (GUL et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

Apesar de parecer uma tecnologia recente, as nanopartículas de metais de transição são bem mais antigas do que se pode imaginar, a relíquia romana do século IV “Taça de Licurgo” com aproximadamente 1600 anos (Figura 4), provavelmente é o exemplo mais famoso do uso de nanopartículas. Sua cor é devido à presença de nanopartículas de ouro e de prata em sua estrutura, o que permite a mudança de cor conforme a incidência de luz (FREESTONE et al., 2007).

Figura 4 - Taça de Licurgo, relíquia Romana.



Fonte: Figura adaptada disponível em <https://incrivel.club>. Acesso: 07/06/2021.

No passado o ouro já foi utilizado pela medicina chinesa para o tratamento das mais variadas doenças como epilepsia e sífilis, já para tratamento de tuberculose o ouro coloidal já foi usado pela medicina mundial em 1920. Ouro coloidal também foi utilizado no tratamento de doenças reumáticas com grandes aplicações clínicas (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008).

No começo da década de 70, com o desenvolvimento de técnicas microscópicas mais sofisticadas, as nanopartículas de ouro vêm sendo estudadas em nanoescala para aplicações no campo da nanomedicina e da nanotecnologia (RAMIREZ-LEE et al., 2018).

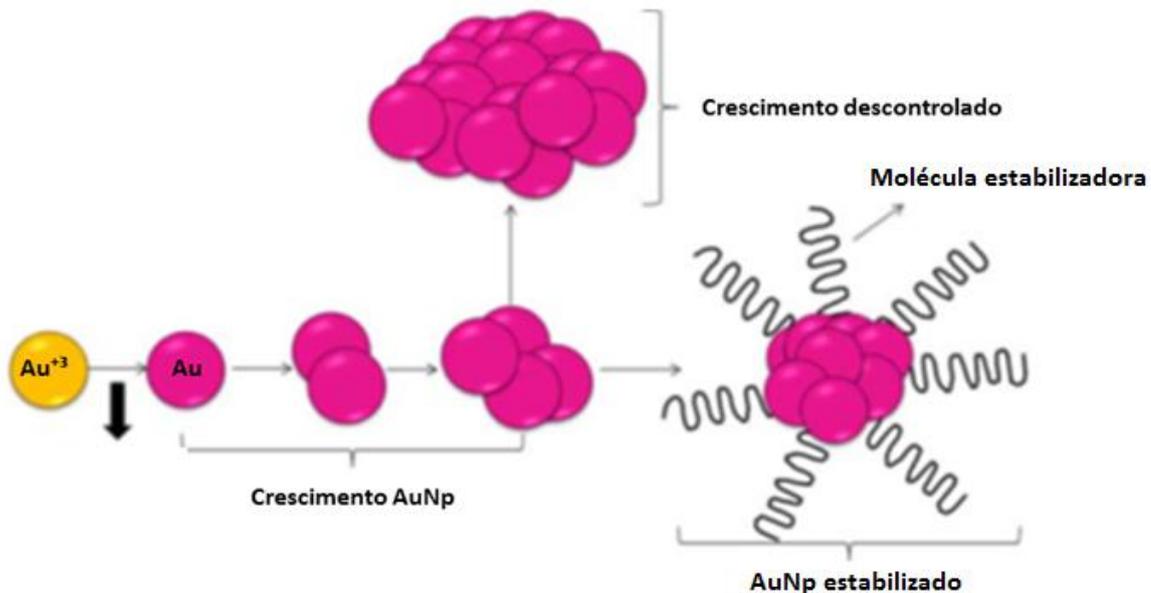
As AuNps provaram ser materiais versáteis e ajustáveis em comparação com outros materiais, incluindo nanopartículas esféricas, AuNps, o ouro alongado têm sido utilizadas para imobilizar moléculas biológicas a fim de fabricar diferentes biossensores devido às suas características únicas, como boa capacidade de mediação de elétrons, biocompatibilidade e facilidade de modificação de superfície (VIGDERMAN; KHANAL; ZUBAREV, 2012; WANG et al., 2006).

As AuNps podem fornecer características biocompatíveis de imobilização e uma plataforma de imunossensor, promissora para produtos eletroquímicos

altamente sensíveis nas análises de pequenas moléculas e detecção de segurança de vários componentes (HASANZADEH et al., 2014).

A Figura 5 representa a formação de AuNps e o impedimento do crescimento descontrolado das moléculas de citrato (molécula estabilizadora), primeiramente o ouro reduz a ouro metálico, depois cresce descontroladamente, e logo após ocorre a blindagem. Portanto, quanto mais as moléculas de citrato são alocadas em torno das nanopartículas, as partículas tornar-se mais "blindadas" e conseqüentemente, o crescimento é impedido e nanopartículas menores são obtidas (SANFELICE et al., 2016).

Figura 5 - Representação esquemática para formação de nanopartículas de ouro.



Fonte: Figura adaptada (SANFELICE et al., 2016).

Nanopartículas de ouro está entre os materiais nanoestruturados mais estudados, principalmente devido às propriedades químicas altamente estáveis do ouro. As AuNps são usadas comercialmente como matrizes de teste rápido para gravidez, detectores de biomoléculas, rotulagem de DNA, distribuição de drogas, imunocoloração, atividade catalítica, biossensores e no monitoramento ambiental (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2012; SIDDIQI; HUSEN, 2017).

Atualmente as AuNps ocupam espaço em pesquisas na área da medicina, mostrando-se eficazes na inibição de microrganismos causadores de diversas

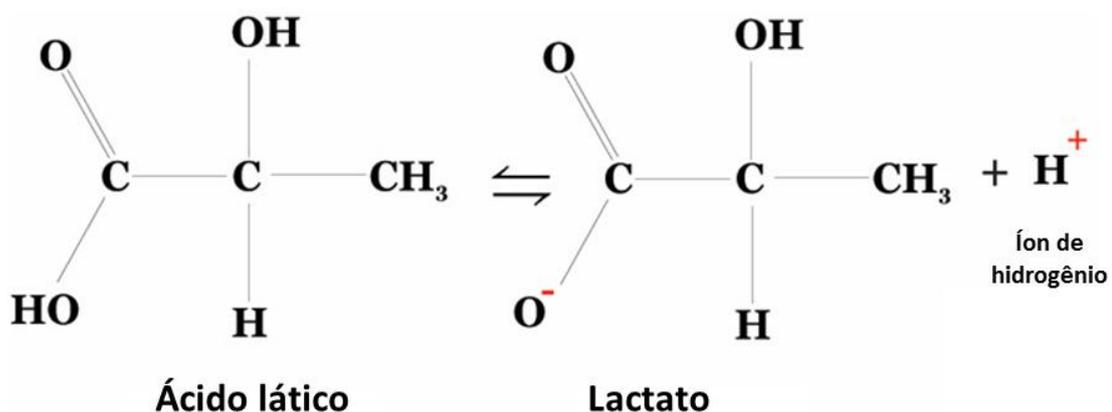
patologias, no tratamento de células cancerígenas e na identificação de micro-RNAs. Dessa forma, as AuNps são frequentemente adotadas em pesquisas de diagnóstico e terapias fotodinâmicas e de combate ao câncer (MELO et al., 2020).

3.5 Ácido Lático e Lactato

O lactato é uma substância produzida pelo organismo, com função energética sem necessidade de oxigênio. Tal composto foi descoberto por Carl Wilhelm, no ano de 1780, quando este químico analisava amostras de leite animal que haviam azedado. Em 1922, Otto Meyerhof e Archibald V. Hill receberam a premiação máxima na categoria Fisiologia e Medicina do Instituto Karolinska e Fundação Nobel, quando descobriram a produção deste elemento pelo organismo humano, durante contrações musculares (CAIRNS, 2006).

Por décadas, acreditava-se que lactato e ácido lático (Figura 6) eram a mesma molécula, entretanto, o ácido lático possui um átomo de hidrogênio a mais, o que impossibilita a sua ligação a fibras musculares, tendo em vista que fisiologicamente os tecidos e enzimas musculares humanas possuem um pH de 7,4, enquanto o ácido lático é formado em um pH ácido de 3,2. Em vista disso a musculatura não produz ácido lático, e sim lactato (IDE; LOPES; SARRAIPA, 2010).

Figura 6 - Estrutura química do ácido lático e lactato.



Fonte: Estrutura química adaptada disponível em <http://thescienceexplorer.com>. Acesso: 07/06/2021.

Segundo Mcardle; Katch; Katch, (2011) o lactato é um composto orgânico que atua como fonte energética para o organismo, durante a execução de exercícios físicos e atividades mais intensas. Ele se dá imediatamente após o esgotamento parcial da adenosina difosfato (ADP) que passa por uma glicólise anaeróbica, ou seja, a quebra da glicose sem atuação de oxigênio, formando o lactato. O aumento da concentração de lactato é diretamente proporcional a intensidade do exercício, onde quanto maior essa intensidade, maior será o acúmulo dessa substância no organismo. O acúmulo de lactato no organismo pode gerar um desconforto momentâneo que cessará após a pausa na execução do exercício.

O lactato sanguíneo é considerado por muitos pesquisadores um metabólito importantíssimo, que geralmente precisa ser avaliado e trabalhado, assim fornecendo possibilidades para uma melhor performance nos desportos ou em práticas do cotidiano clínico. Ao longo dos anos, essa substância vem sendo estudada de maneira mais aprofundada para que se possa haver resultados mais significativos no controle das oscilações de concentração desse composto no organismo. Uma das maneiras de mensurar a presença e o acúmulo do lactato no organismo é através de um teste invasivo utilizando amostras de sangue venoso antes e após a prática de exercícios (BRANDÃO et al., 2020).

Com o avanço das tecnologias, a ciência vem evoluindo e buscando maneiras cada vez menos invasivas e dolorosas para realizar testes nos pacientes ou participantes dos estudos. Um desses avanços é o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos que possam detectar analitos ou marcadores biológicos a partir de fluidos corporais. Assim, a detecção de moléculas de lactato provenientes do suor fornece resultados precisos e fidedignos sobre o acúmulo de lactato no organismo (GOMES, 2019).

Kemmler et al., (2009) verificaram em seus estudos, que é bastante importante manter um controle e uma manipulação dos níveis de lactato sanguíneo, para que atletas de diversas modalidades esportivas possam manter seus treinamentos sempre nos mais altos níveis, alcançando assim performances de excelência nos períodos de competições. O controle dos níveis de lactato é muito importante para prevenir fadigas musculares em excesso e também os danos nesses tecidos.

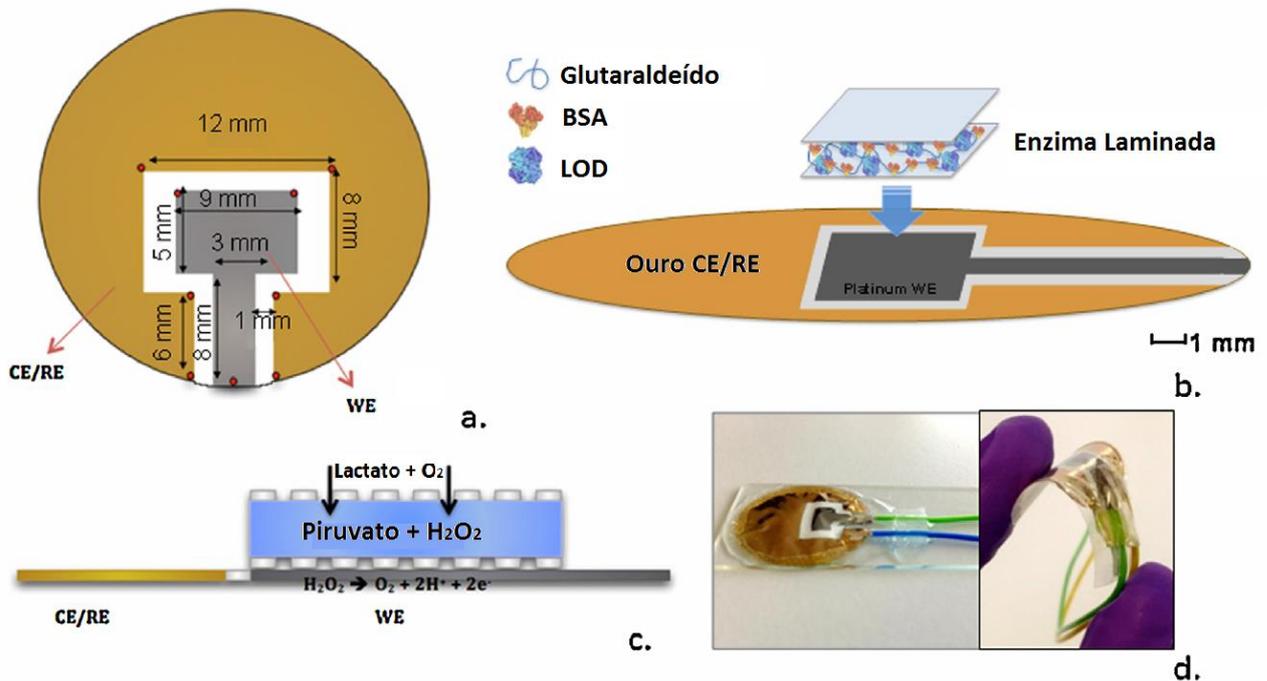
Venkatraman et al., (2016), desenvolveram, caracterizaram e otimizaram de um biossensor de lactato amperométrico de base eletroquímica estampado em

tecido de malha. O protótipo do biossensor de lactato em tecido serigrafado foi composto por três eletrodos que detectam a concentração de lactato do suor corporal coletado. Foi desenvolvido um sensor de lactato altamente sensível e estável baseado em uma fibra composta condutora de poli (3,4-etilenodioxitiofeno): poli (estireno sulfonato) (PEDOT: PSS) e álcool polivinílico (PVA). O dispositivo vestível também permitirá que os atletas monitorem sua concentração de lactato em tempo real e acompanhem suas atividades.

Tur-garcía et al., (2017), apresenta um novo biossensor amperométrico baseado em enzimas altamente flexível para monitoramento em tempo real e não invasivo do lactato no suor humano. O núcleo do sistema de reconhecimento é um laminado altamente flexível, composto por duas membranas de policarbonato altamente porosas, que fornecem suporte para a enzima LOx, imobilizada por reticulação covalente. A oxidação do lactato produz H_2O_2 , que é posteriormente identificado eletroquimicamente. O transdutor compreende um sistema de dois eletrodos em uma única membrana de policarbonato, revestida por pulverização catódica com ouro e platina para torná-la condutora (Figura 7). O sensor exibe seletividade de lactato com uma faixa de trabalho de 0-70 mM, cobrindo assim concentrações fisiologicamente relevantes para isquemia de pressão e mostrou-se adequado para determinação de lactato em suor sintético e suor humano diluído.

Baseado no exposto há um grande interesse no desenvolvimento de sensores de lactato altamente sensíveis para clínica geral, diagnóstico, terapia intensiva e medicina esportiva, vários métodos analíticos clássicos têm sido usados, como a amperometria (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2012).

Figura 7 - (a) Esquema do eletrodo de ouro / platina, (b) aplicação de laminado de enzima, (c) esquema e (d) layout final do sensor demonstrando flexibilidade.



Fonte: Figura adaptada (TUR-GARCÍA et al., 2017).

3.6 Limiar de lactato no exercício físico

Os estudos iniciais sobre a concentração do lactato no músculo de cervos exaustos verificou que o excesso dessa substância os deixavam quase que totalmente paralisados, posteriormente, este processo foi verificado em células do músculo estriado esquelético (BARNETT, 2003).

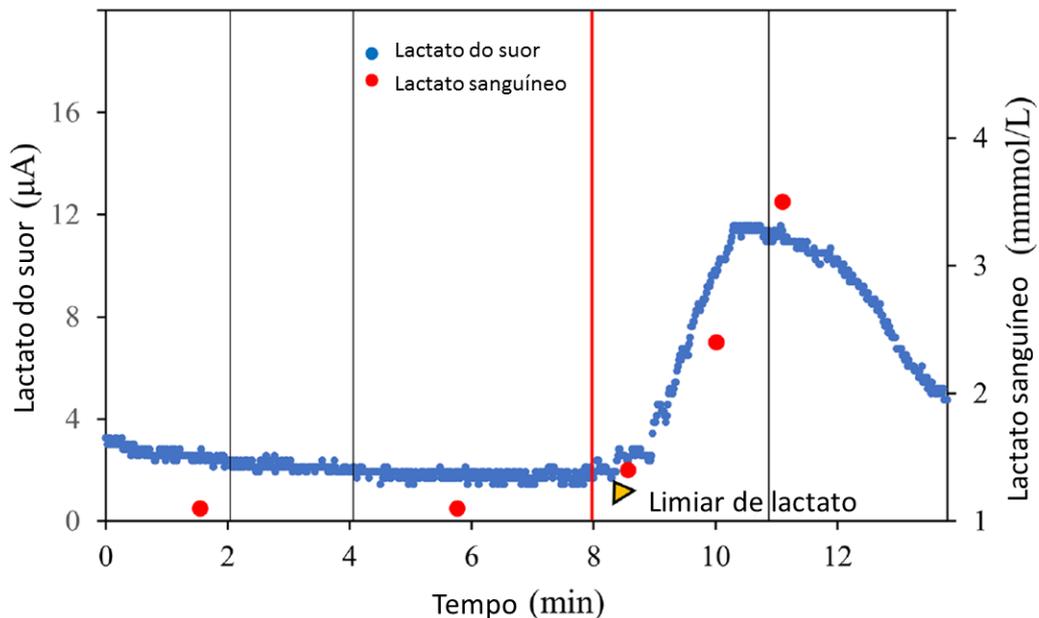
Para tanto, numerosos estudos têm apresentado o lactato como um importante coordenador no metabolismo de crescimento rápido, não sendo apenas um produto residual do metabolismo anaeróbio, mas sim um metabólito continuamente produzido e essencial a todas as células do corpo (BROOKS, 2009, 2016; POOLE et al., 2021).

Os níveis de lactato no organismo, além da prática de exercícios físicos, só podem ser elevados/alterados por outras condições como trauma cerebral, sepse, dengue, câncer, hepatite e pancreatite (MARIK; BELLOMO, 2016; SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017; WOLAHAN et al., 2018). A partir dessa informação, é importante salientar que apenas uma condição, o exercício físico, possui condições específicas

para alterar os valores de lactato nos fluidos corporais em indivíduos saudáveis, em curto intervalo de tempo (MARIK; BELLOMO, 2016). Além disso, fluidos corporais são potenciais como biomarcadores, sendo o suor uma fonte não invasiva e de fácil acesso, que pode ser obtida de maneira quase que contínua (NAGAMINE et al., 2019).

A determinação do limiar de lactato (intensidade do exercício em que o lactato começa a acumular no sangue) durante a prática do exercício se tornou um dos meios mais importantes no diagnóstico de desempenho de resistência na prática esportiva. Usualmente, os testes de exercícios graduais podem induzir um aumento exponencial na concentração do lactato sanguíneo, uma mudança na curva de lactato indica mudança na capacidade de resistência, que pode ser positiva ou negativa. A Figura 8 mostra a comparação entre a concentração de lactato encontrado no suor e no sangue, com detalhe da concentração determinada como limiar. Para tanto, existem incertezas quanto à magnitude dos ganhos de resistência, que não podem ser estimados com precisão (JONES, 2006).

Figura 8 - Limiar de lactato e comportamento da concentração de lactato no suor e sanguíneo durante exercício com carga incremental.



Fonte: figura adaptada (SEKI et al., 2021).

O limiar de lactato quando mensurado de maneira não invasiva pode servir de base para avaliação individual do desempenho de resistência, bem como para a

prescrição de intensidade no treinamento de resistência (FAUDE; KINDERMANN; MEYER, 2009).

Segundo Okano et al., (2006), no ciclismo o lactato é avaliado para determinação do seu limiar, que é o momento em que o organismo inicia uma leve fadiga que aumentará gradativamente com quantidade de tempo ou intensidade de trabalho em determinada musculatura, podendo paralisar a contração muscular por um curto período, até que haja outra carga de fonte energética para ser metabolizada. Diante disso, é comum que haja coletas de sangue ou suor para análise do limiar, a fim de estender o período pré lactacidemia, mantendo o atleta em atividade por mais tempo.

Em exercícios de musculação, o controle do limiar de lactato é acompanhado a fim de retardar a fadiga, fazendo com que o praticante consiga executar algumas repetições a mais ou trabalhe com cargas mais elevadas sem que haja falhas nas contrações rapidamente (LIMA et al., 2017).

O futebol é uma modalidade esportiva disseminada no mundo inteiro, que possui bilhões de praticantes amadores e profissionais. Inúmeros testes são feitos para manter grande parte desses atletas sempre nos mais altos nível, disputando os maiores campeonatos. Nesse esporte, o limiar de lactato é estudado e manipulado em diversas variáveis possíveis, a fim de manter os atletas em alta performance pelo maior tempo possível (COELHO et al., 2015).

O lactato é uma variável hemodinâmica adaptável, já que a concentração do mesmo é diretamente proporcional a intensidade dos treinamentos. Sendo assim, quanto mais se treina um organismo a fim de deixá-lo mais forte ou resistente, mais os níveis do limiar de lactato aumentarão proporcionalmente (MACHADO; SANZ; CAMERON, 2003). A modalidade mais utilizada para melhora dessa capacidade física é o treinamento resistido, que consiste numa combinação de diferentes exercícios físicos que aumentam a resistência, mesmo em atletas de variados esportes, auxiliando positivamente na ampliação da fase pré-limiar, assim proporcionando uma maior performance (GONÇALVES; DE ALMEIDA, 2020).

Pesquisadores na área, fisiologistas e clínicos esportivos ressaltam que é de fundamental importância entender qual a relação entre a concentração de lactato no suor e o desempenho esportivo, e, que se a relevância e aplicabilidade da detecção do lactato no suor pudessem ser demonstradas, significaria uma alta contribuição não apenas em termos de marcadores de desempenho (estado muscular), saúde

(nutricional e hidratação) e recuperação (inflamação, lesão e dano muscular), mas também no fornecimento de dados para construir modelos precisos que explicam com mais confiança a origem do lactato no suor. Desta forma, tanto os atletas de ponta quanto os praticantes de atividades físicas, serão capazes de treinar com mais eficiência, melhorar seu desempenho e prevenir sobrecargas ou lesões (VAN HOOVELS et al., 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como principal objetivo a produção e caracterização de biossensor eletroquímico para determinação da concentração de lactato em amostras de suor proveniente de exercício físico. A proposta pretende desenvolver um biossensor que faça o monitoramento da concentração do lactato expelido, de maneira não invasiva e em função do tempo (e carga) do exercício realizado, para futura correlação com o limiar de lactato, e consequentemente, limiar de fadiga muscular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os materiais utilizados na formação dos filmes LbL foram: o polissacarídeo quitosana (grau de acetilação de 22%, massa molecular de 113 KDa (Mn) e polidispersividade de 4.2), adquirido da Galena Química e Farmacêutica (Brasil) e AuNps sintetizadas e encapsuladas na presença de um derivado de politiofeno sulfonado (polímero semiconductor) solúvel em água (sal de sódio) denominado PTS. O processo de síntese e caracterização das AuNps@PTS pode ser encontrado no referido artigo (SANFELICE et al., 2016).

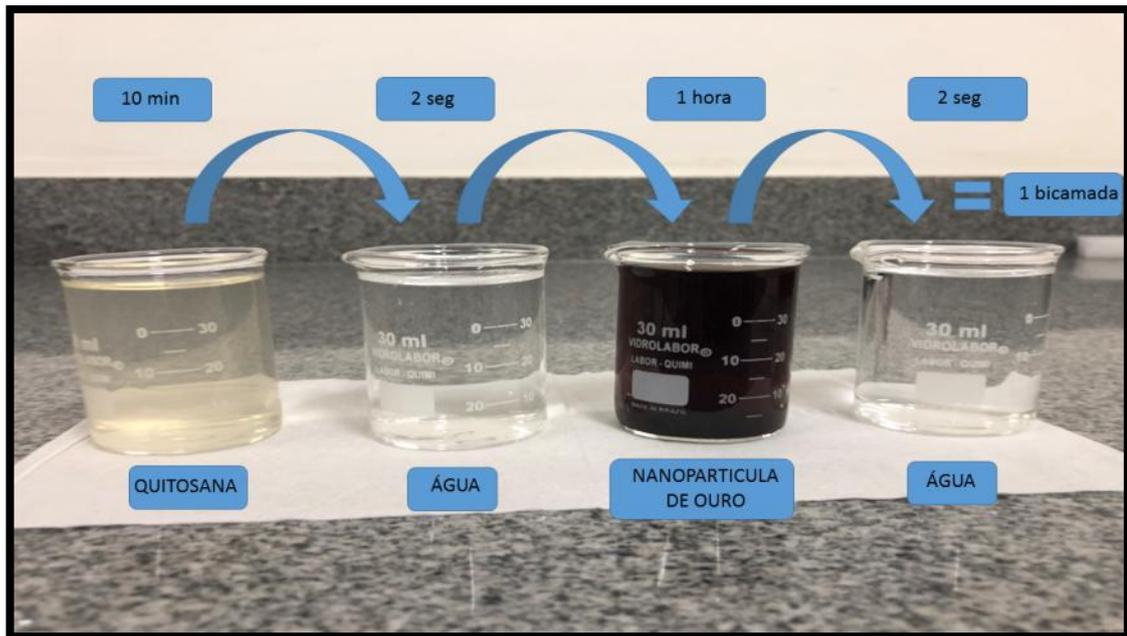
4.2 Deposição dos filmes pela técnica de *Layer-by-Layer* (LbL)

A representação detalhada do processo de fabricação dos filmes pela técnica de automontagem ou LbL é mostrada na Figura 9. A solução policatiônica utilizada foi quitosana dissolvida em solução aquosa ácida pH 3,0 na concentração de $0,5\text{mg mL}^{-1}$. Já como poliânion, utilizou-se a suspensão contendo as AuNps estabilizadas com o polímero PTS. O tempo de espera na imersão dos substratos na solução polianiônica foi de 10 minutos e na solução polianiónicas foi de 1 hora. A montagem imersiva é tipicamente realizada imergindo manualmente na vertical um substrato plano em uma solução do material desejado, seguido de duas etapas de lavagem para remover o material não aderido ao substrato.

4.3 Caracterizações físico-química e eletroquímica dos filmes formados

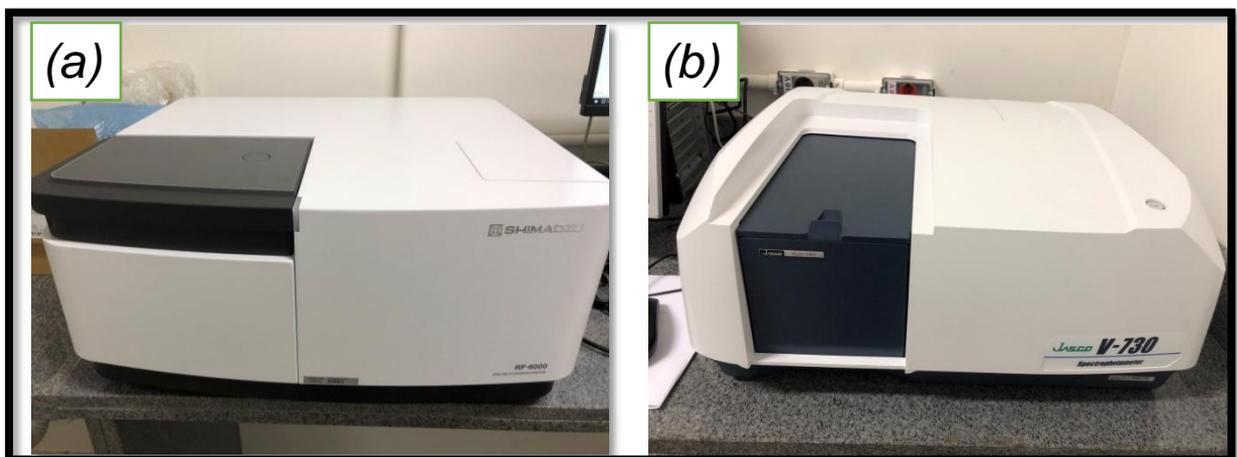
A formação dos filmes foi monitorada no substrato de vidro, utilizando-se a espectroscopia na região do UV-Vis, a qual também foi utilizada como análise estrutural, utilizando um espectrômetro de absorção UV-vis da marca Jasco e por medidas de fluorescência em equipamento da Shimadzu (Figura 10).

Figura 9 - Esquema utilizado para formação de filmes LbL



Fonte: Autoria própria.

Figura 10 - Equipamentos utilizados para caracterização dos filmes. Espectrômetro de fluorescência (a) e espectrômetro de UV-Vis (b)

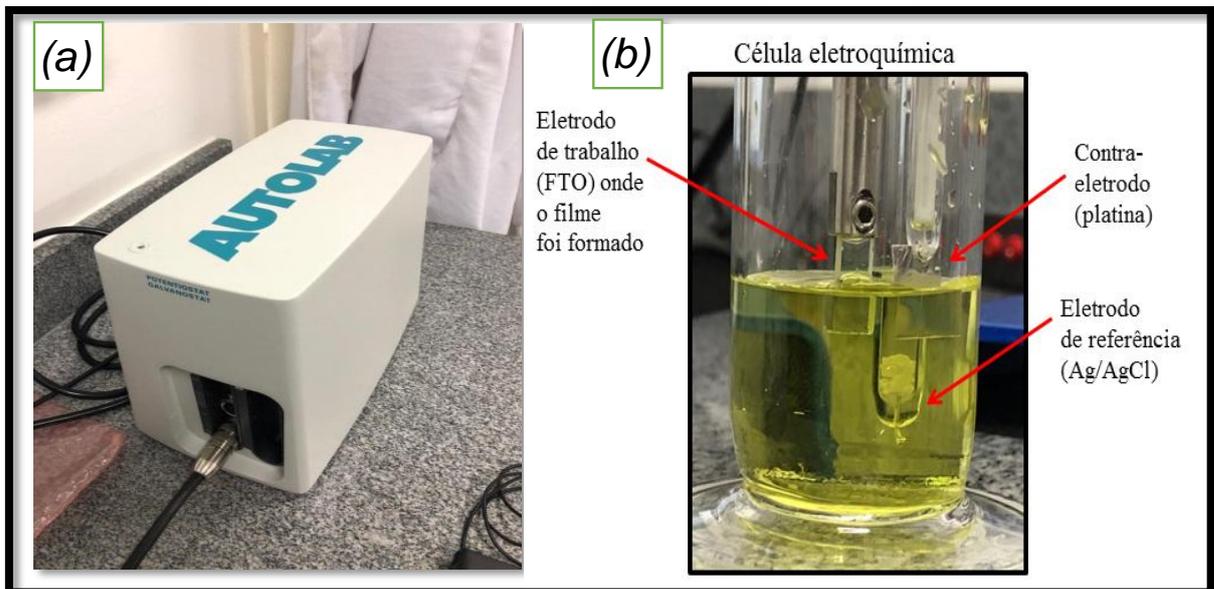


Fonte: Autoria própria.

Medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato da Autolab PGSTAT30 (Metrohm), controlado pelo programa NOVA 2.1.4. Os filmes LbL em substrato FTO foram utilizados como eletrodo de trabalho enquanto uma lâmina de platina e um eletrodo de prata/cloreto de prata ($\text{Ag}/\text{AgCl} - 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) foram utilizados como contra-eletrodo (CE) e eletrodo de referência (ER), respectivamente. A técnica de voltametria cíclica (VC) foi utilizada para

caracterização das plataformas sensoriais fabricadas, avaliando-se a transferência de carga dos filmes. As medidas foram feitas em solução de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como eletrólito suporte. A Figura 11 mostra a foto do potenciostato e da célula eletroquímica utilizada para as medições de caracterização, bem como de detecção abaixo descritas. A solução mostrada na Figura 11 (b) trata-se de solução de ferricianeto.

Figura 11 – Potenciostato Autolab PGSTAT30 (Metrohm) (a) e célula eletroquímica (b) utilizados na caracterização e detecção eletroquímica



Fonte: Autoria própria.

4.4 Formação da plataforma sensorial para detecção de lactato – imobilização da enzima LOx.

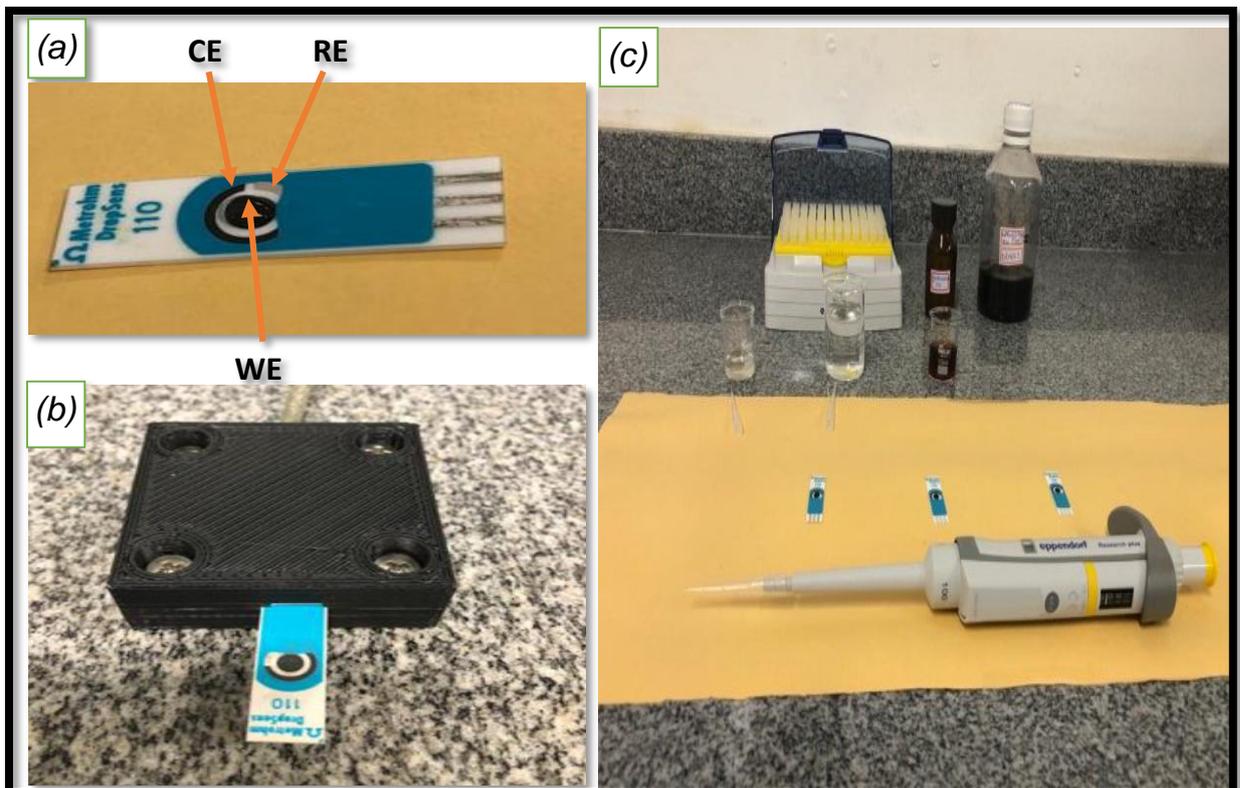
Após a preparação e caracterização dos filmes LbL, os mesmos foram reproduzidos em eletrodos descartáveis comerciais adquiridos da Dropsens-Metrohm referência 110, mostrado na Figura 12 (a). O eletrodo é composto por eletrodo de trabalho (WE) e contra-eletrodo (CE) formados de carbono e eletrodo de referência (RE) formado por Ag/AgCl, que podem ser vistos no detalhe na Figura.

A enzima LOx foi imobilizada sobre 2 bicamadas de filmes LbL formados por Qui/AuNps em diferentes arquiteturas através do gotejamento de $4 \mu\text{L}$ de solução da enzima na concentração de 40 mg mL^{-1} em Bovine Serum Albumin (BSA – 10 mg/mL). Em seguida, foram adicionados $2 \mu\text{L}$ de solução de glutaraldeído 3%, a fim

de promover ligação cruzada (*cross-linking*) entre os grupos funcionais amina (NH_2) da enzima e os grupamentos hidroxila (O-H) da quitosana, promovendo assim maior estabilidade na adsorção da enzima sobre os filmes, evitando dessorção. Após as deposições (gotejamento) os eletrodos foram armazenados na temperatura de 4°C .

A Figura 12 mostra fotos dos eletrodos impressos utilizados, do eletrodo acoplado ao dispositivo ligado ao potenciostato que foi utilizado para realizar as medidas de detecção nos eletrodos modificados e processo de deposição dos filmes, enzima e glutaraldeído em três eletrodos diferentes.

Figura 12 - Eletrodos descartáveis Dropsens-Metrohm referência 110 (a), eletrodo descartável acoplado em dispositivo ligado ao potenciostato para medição (b) processo de crescimento dos filmes LbL e imobilização da enzima LOx (c)



Fonte: Autoria própria.

4.5 Medidas de detecção eletroquímica

A detecção do lactato foi realizada através de medidas de voltametria cíclica (VC) utilizando o potenciostato Autolab PGSTAT30 (Metrohm), controlado pelo programa NOVA 2.1.4. O filme LbL formado por 2 bicamadas de Qui/AuNps com a enzima LOx imobilizada foi utilizado como eletrodo de trabalho. A técnica de

voltametria cíclica foi utilizada na detecção de lactato com janela de potencial variando de -1,0 a 0,4 V, utilizando velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . As medidas foram feitas em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,01 M (pH 7,4) em temperatura ambiente. A solução estoque de lactato foi preparada em também PBS (pH 7,4) na concentração de 100 mM.

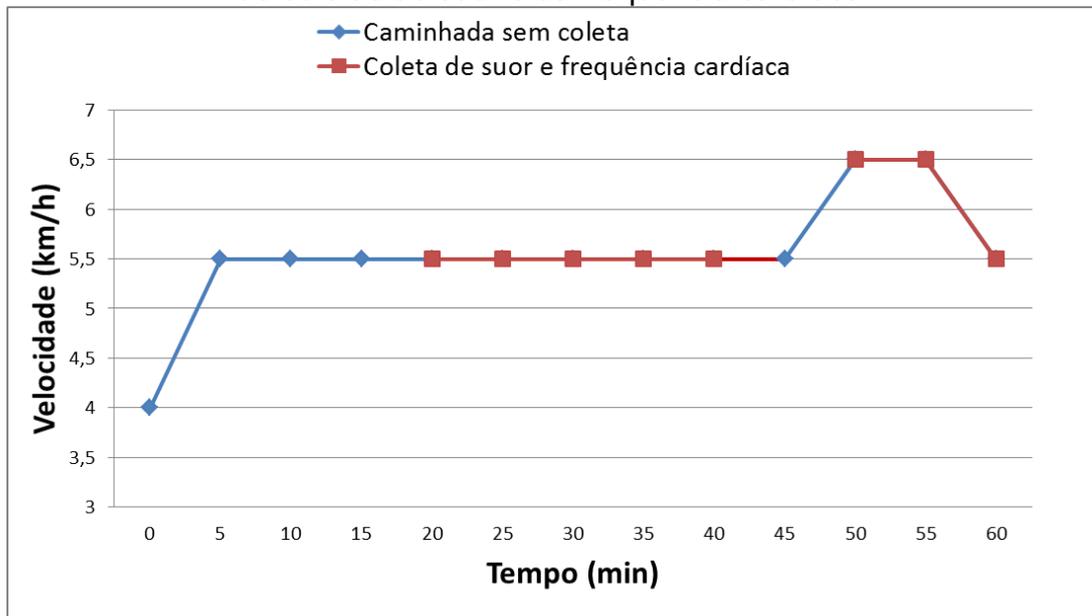
4.6 Protocolo de exercício, coleta de suor e frequência cardíaca

O voluntário que se submeteu ao exercício físico para coleta de amostras de suor e da frequência cardíaca, trata-se de um indivíduo sadio do sexo masculino com 40 anos de idade, peso 110 kg, 182 cm de estatura, fisicamente ativo há três meses utilizando a caminhada e corrida como forma de treinamento aeróbio. O mesmo não alega problemas articulares, nem problemas de saúde que possam vir a trazer riscos durante a execução do protocolo de esforço. É importante ressaltar que devido ao voluntário ser autor do presente trabalho, não foi necessária a obtenção de autorização prévia de comitê de ética em pesquisa (CEP) para realização dessa parte da sua pesquisa.

Para realização do teste de esforço foi utilizada esteira da marca Speedo modelo TR4. Já para obtenção dos dados da frequência cardíaca utilizou-se frequencímetro da marca Polar M430 com sensor de frequência cardíaca Polar H10.

O voluntário foi inicialmente familiarizado com a esteira, a familiarização visou minimizar o efeito de aprendizagem que poderia interferir nos resultados das coletas e durante a realização do teste o voluntário se manteve sem camisa para facilitar a coleta do suor. O teste de esforço realizado obteve o tempo total de 60 min, com coletas de suor e frequência cardíaca em tempos distintos, como podemos observar na figura 13. O teste foi composto por caminhada durante toda sua totalidade (sem trote ou corrida) com aquecimento na velocidade de 4 km/h pelo período de 5 minutos, logo após a velocidade foi aumentada para 5,5km/h até os 45 min de exercício e, logo após, houve mais um acréscimo de velocidade para 6,5 km/h até os 55 minutos, quando a velocidade retornou para 5,5 km até o final do teste. Após a execução do protocolo, o voluntário caminhou por mais 5 min com velocidade de 3 km/h a fim de diminuir a frequência cardíaca e realizar a volta a calma.

Figura 13 – Tempo de total de exercício físico, velocidade de caminhada e tempos de coletas do suor e da frequência cardíaca.



Fonte: Autoria própria.

As coletas de suor e frequência cardíaca foram realizadas nos tempos de 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55 e 60 minutos com o voluntário apoiando os dois pés na lateral da esteira por aproximadamente 30 segundos. A coleta do suor foi realizada em tubos de *ependorf* de 1,5 mL em contato com a pele do voluntário nos tempos determinados, em locais variados do corpo conforme descrito na Tabela 3. Logo após a coleta as amostras foram congeladas em freezer com a temperatura variando entre -14 e -17°C.

Tabela 3 – Locais do corpo e tempos de coleta de amostra suor e de frequência cardíaca.

Tempo de exercício (min)	Local de coleta de suor
20	Costas e pescoço
25	Costas e face
30	Costas
35	Costas, face e braço esquerdo
40	Costas e face
45	Não houve
50	Costas e face
55	Costas
60	Costas

Fonte: Autoria própria.

4.7 Detecção de lactato em amostras reais (suor)

A detecção do lactato em amostras reais foi também realizada através de medidas de voltametria cíclica (VC) utilizando o potenciostato Autolab PGSTAT30 (Metrohm), controlado pelo programa NOVA 2.1.4. A técnica VC foi utilizada com janela de potencial variando de -1,0 a 0,4 V, utilizando velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . As amostras de suor do participante do estudo foram descongeladas e utilizadas para detecção do lactato sem qualquer tipo de intervenção (purificação, filtragem ou outro). O filme LbL formado por 2 bicamadas de Qui/AuNps com a enzima LOx imobilizada (2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + 1 LOX) foi utilizado como eletrodo de trabalho.

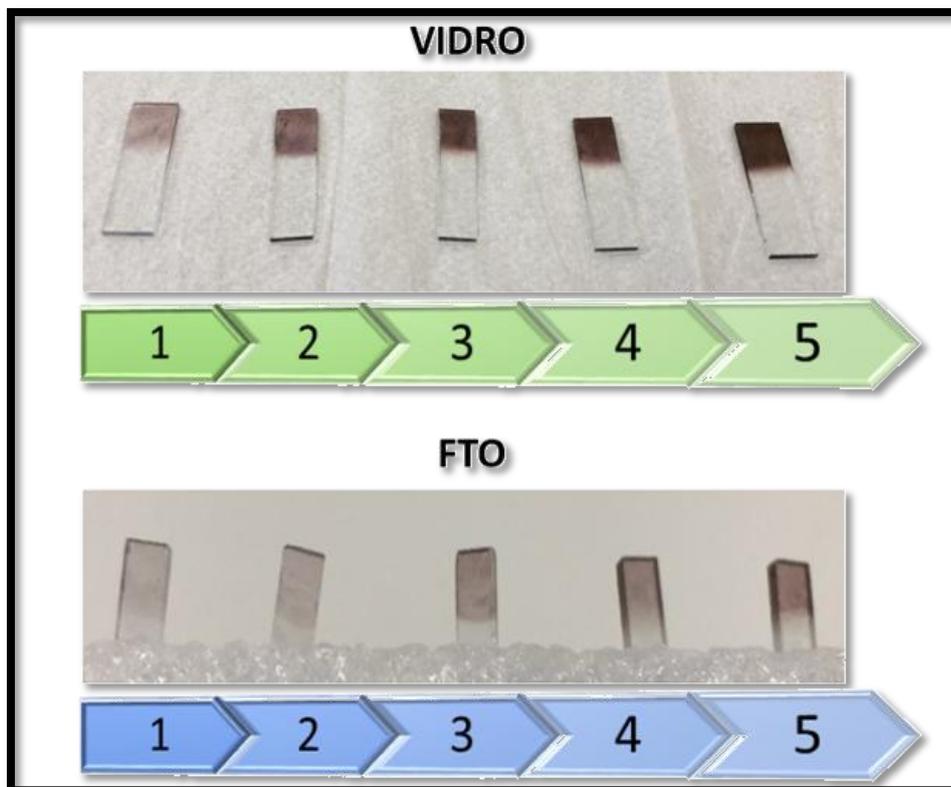
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Formação e caracterização da plataforma sensorial

As AuNps foram produzidas a partir de uma solução de sal de ouro na concentração de 0,04mol/L, sintetizadas e estabilizadas com o polímero politiofeno sulfonado poly[2-(3-tienil) etiloxi-4-butilsulfonado] sal de sódio (PTS) na proporção de 1:5:1 de Au:citrato:PTS, onde o citrato foi o agente redutor (SANFELICE et al., 2016).

Filmes LbL contendo de 1 a 5 bicamadas de Qui/AuNps foram formados em substratos de vidro e de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor (FTO), que foram utilizados, para posterior caracterização química e eletroquímica, respectivamente. A Figura 14 mostra os filmes formados nos diferentes números de bicamadas e substratos.

Figura 14 – Formação dos filmes em lâminas de vidro e FTO.



Fonte: Autoria própria.

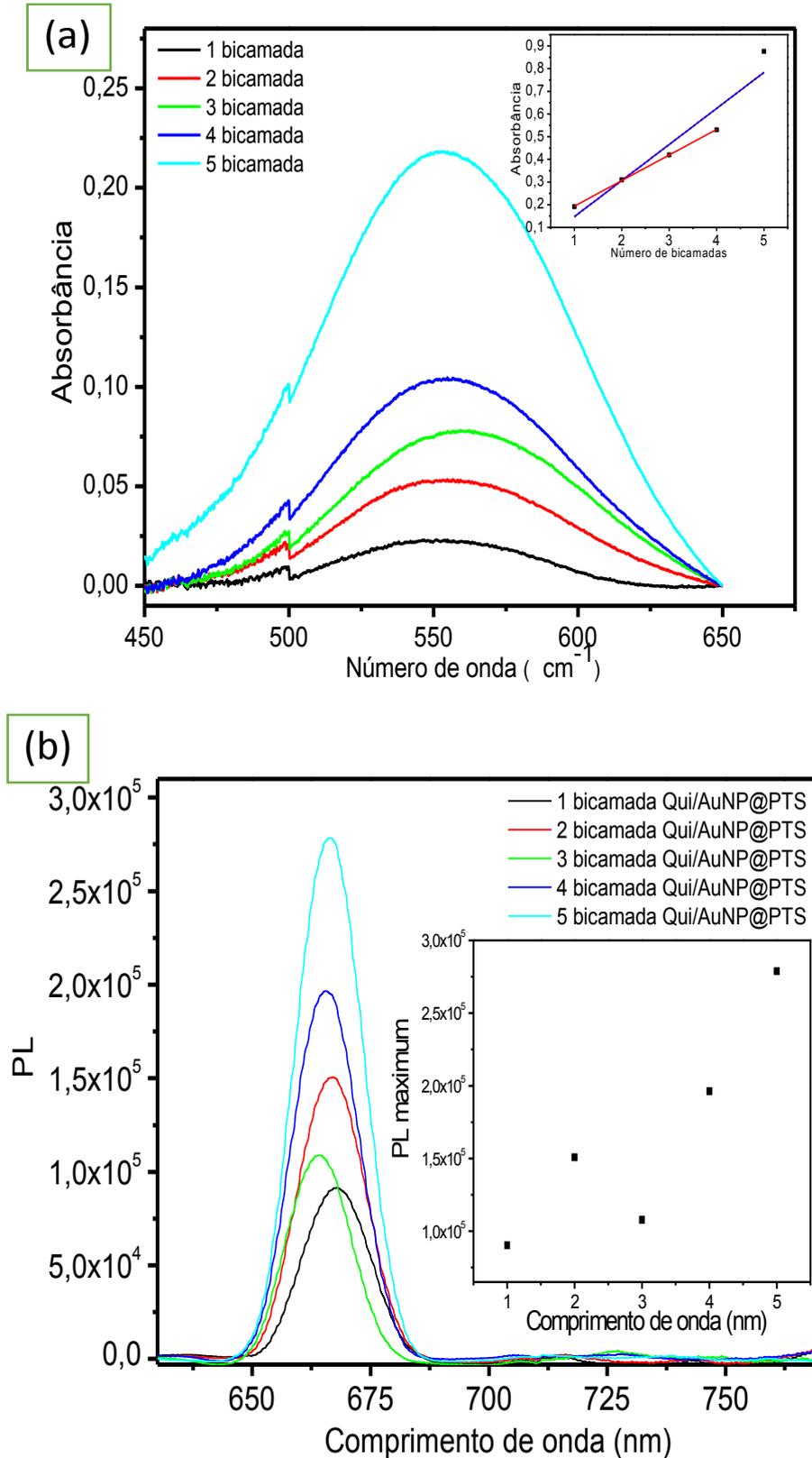
Através do monitoramento da banda em aproximadamente 550 nm no espectro de absorção de UV-Vis, referente às bandas plasmônicas de superfície das nanopartículas de ouro podemos ver que a formação dos filmes foi relativamente homogênea, sendo que até a quarta bicamada a intensidade de absorção cresceu linearmente, sugerindo que a mesma quantidade de material foi depositada por camada.

Porém, para o filme formado com cinco bicamadas a absorbância foi maior, o que significa que maior quantidade de material (AuNps) foi depositado, como podemos observar na Figura 15 (a). Já os resultados de fluorescência dos filmes, apresentados na Figura 15 (b), mostram banda centrada em aproximadamente 660 nm, referente à luminescência do polímero PTS. Os espectros de emissão aumentam em intensidade conforme aumenta o número de bicamada dos filmes, porém, uma diminuição brusca na intensidade é vista para o filme de três bicamadas. De qualquer forma, o crescimento do filme foi evidenciado pelas duas técnicas.

Informações importantes sobre a transferência de carga podem ser avaliadas com os voltamogramas apresentados na Figura 16. Os voltamogramas mostram ciclos de oxidação e redução quase reversíveis onde a razão entre a corrente catódica (I_{pc}) e a corrente anódica (I_{pa}) é aproximadamente 1, sugerindo a oxidação de 1 elétron (HUANG et al., 2014)

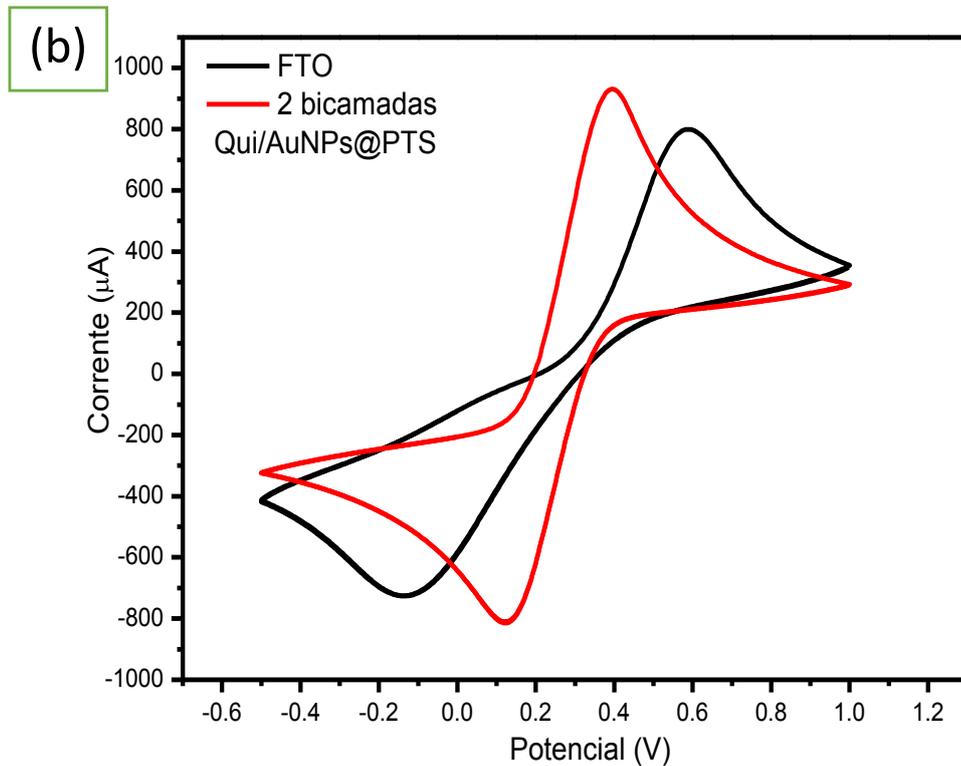
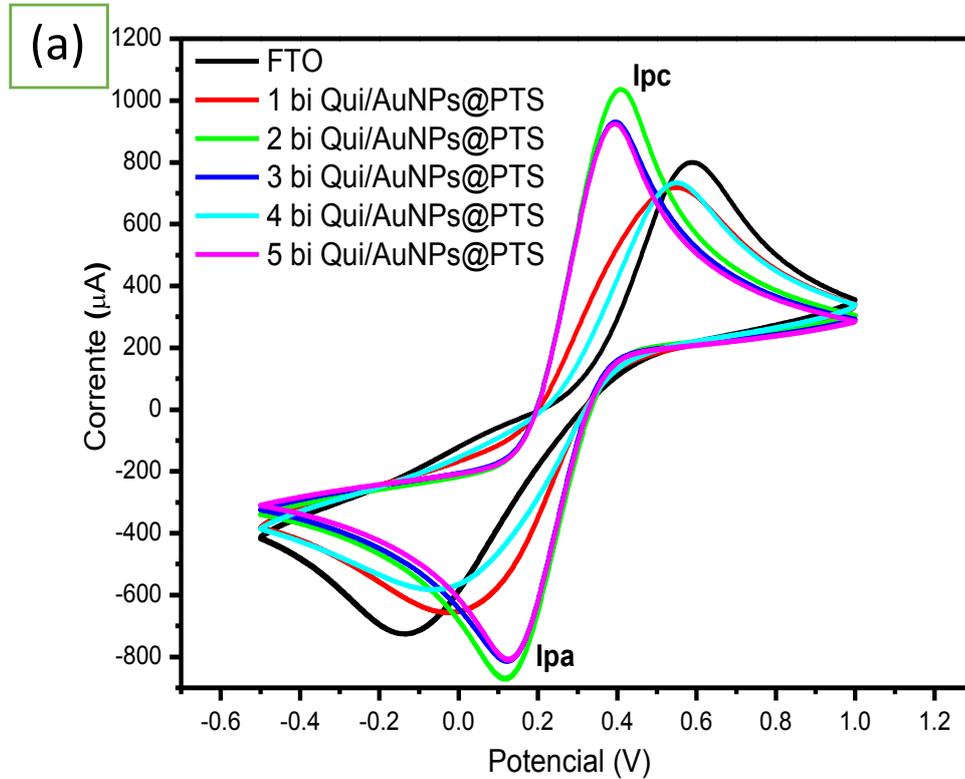
Como podemos ver, o eletrodo modificado com 2 bicamadas de filme possui maior corrente catódicas e anódica e a variação de potencial (ΔE) entre os picos é menor se comparado aos voltamogramas para os eletrodos de FTO sem modificação (Figura 15 (b)). Tal comportamento indica que o crescimento do filme diminuiu a resistência do eletrodo, resultando na mais rápida transferência de carga e conseqüente aumento dos picos de corrente de oxidação e redução. Com base nessa caracterização, a formação de filmes LbL formados com 2 bicamadas Qui/AuNps@PTS foi escolhida como plataforma sensorial para imobilização da enzima LOx e posterior detecção do lactato.

Figura 15 – Espectros de absorvância (a) e Espectros de fluorescência (b) de filmes LbL com diferentes números de bicamadas formadas por Qui/AuNps@PTS. O *inset* dos gráficos mostra o aumento da absorvância e da fluorescência com o aumento do número de bicamadas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos para o FTO e para os filmes LbL formados com diferentes números de bicamadas (a). Comparação dos voltamogramas obtidos para o FTO e para FTO modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS (b). Os VCs foram obtidos em solução de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.



Fonte: Autoria própria.

5.2 Caracterização de plataforma sensorial com a enzima LOx immobilizada

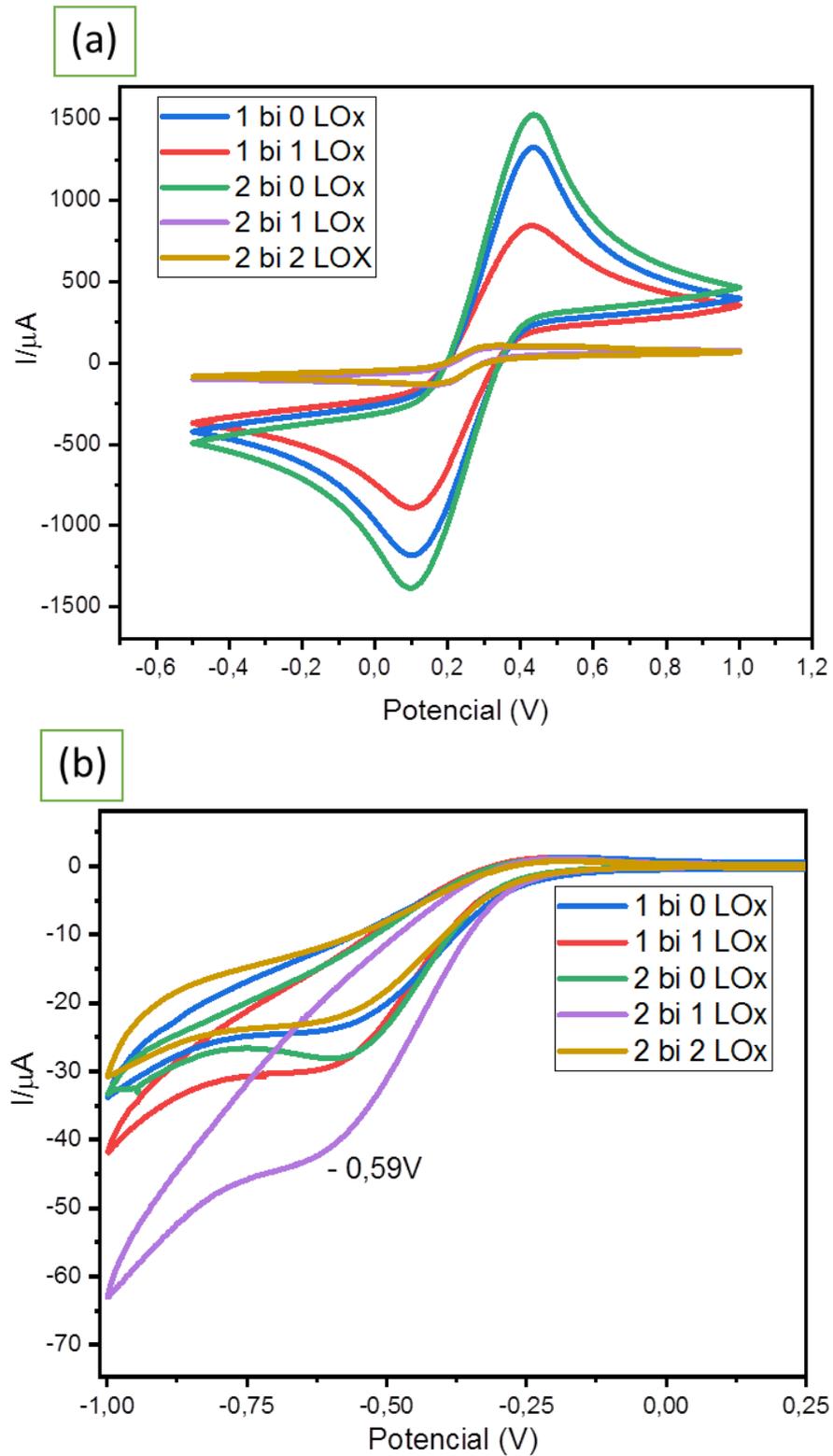
A etapa de imobilização enzimática e a estabilidade do sistema caracterizam-se como fundamentais na fabricação de biossensores. As biomoléculas imobilizadas devem manter sua estrutura, função e atividade biológica após imobilização e não serem desorvidas durante o uso, sendo que o processo de imobilização de uma enzima sobre um substrato pode influenciar ou até modificar as respostas do biossensor, influenciando fatores como a precisão das medidas e a reprodutibilidade (OLIVEIRA et al., 2013). Atualmente, os principais métodos utilizados na imobilização de enzimas são: adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada (*cross-linking*). Esse último, foi o procedimento utilizado para imobilização da enzima LOx nesse trabalho. O *cross-linking* foi realizado através de ligação covalente promovida pelo gluteraldeído entre os grupos amina (NH_2) da quitosana e a enzima LOx.

Após a formação e caracterização dos filmes LbL, a plataforma formada por Qui/AuNps@PTS foi utilizada na imobilização da enzima LOx e caracterizada através da realização de voltamogramas cíclicos. A Figura 17 (a) mostra os voltamogramas cíclicos (VCs) em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Conforme mostra a legenda do gráfico, filmes de uma e duas bicamadas de material foram formados, e 0, 1 ou 2 camadas de LOx foram depositadas. A ordem de deposição seguiu sempre a ordem de formação de 1 bicamada + gotejamento da LOx, assim, na arquitetura que contém duas camadas de LOx, uma delas está entre duas bicamadas de material (Qui/AuNps@PTS). Conforme podemos observar nos VCs, a presença da enzima na superfície do eletrodo diminui a corrente de pico (I_p) anódica e catódica, aumentando um pouco a variação do potencial (ΔE), indicando que a presença da enzima dificulta a transferência de carga e que a imobilização da mesma foi efetiva. Ainda como forma de caracterização, VCs foram realizados para as mesmas arquiteturas em solução tampão PBS (pH 7,4), conforme mostra a Figura 16 (b). No gráfico, pode-se observar um pico de corrente catódica (I_{pc}) bem pronunciado centrado em -0,59V, para o eletrodo com a arquitetura 2 bi 1 LOx (2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + 1 LOX).

Os voltamogramas da Figura 17 confirmam a presença da enzima imobilizada na plataforma, por meio das alterações citadas, sendo que o eletrodo

modificado com a arquitetura 2 bi 1 LOx (2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + 1 LOx) foi o escolhido para os experimentos de detecção de lactato por ser o que provocou mais significativas alterações. Tais resultados comprovam uma vez mais que a plataforma formada por 2 bicamadas é mais eficiente (adequada para detecção) do que as plataformas formadas por uma bicamada. Também, a plataforma mostrou-se mais adequada em comparação com o eletrodo modificado por Qui/AuNps@PTS, porém, sem enzima imobilizada (1 bi 0 LOx e 2 bi 0 LOx) e pelo eletrodo modificado com 2 camadas de LOx (2 bi 2 LOx).

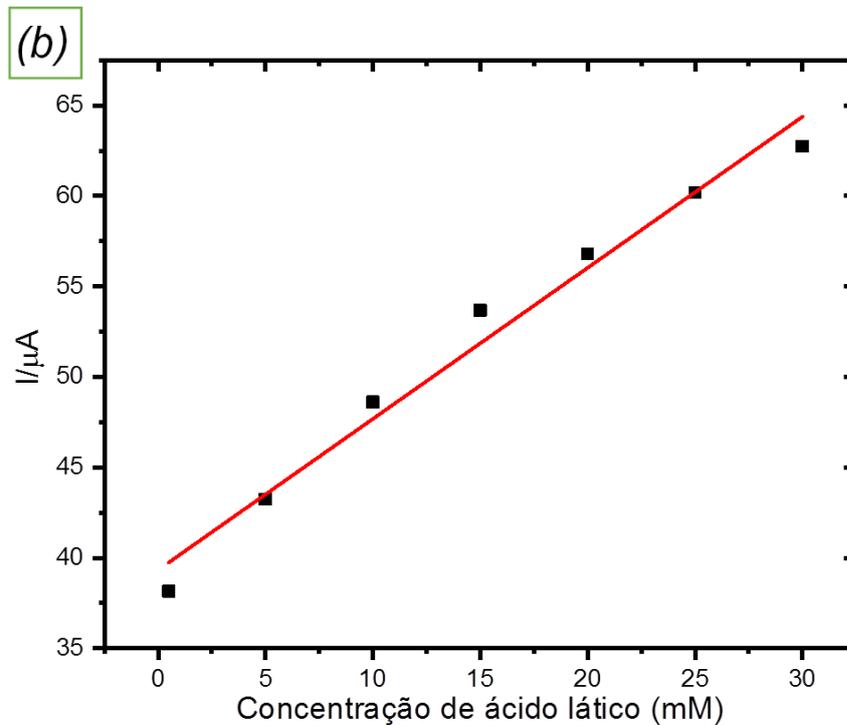
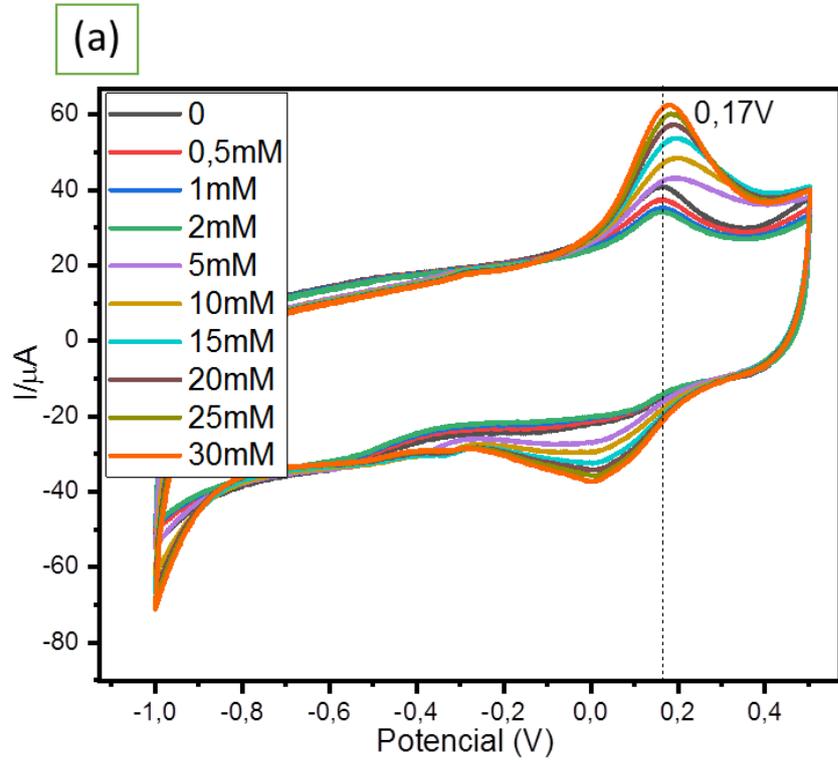
Figura 17 – Voltamogramas cíclicos realizados em (a) solução de ferrocianeto de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e (b) em tampão PBS (pH 7,4) para os diferentes tipos de arquiteturas da enzima LOx immobilizada. Velocidade de varredura $0,05 \text{ V s}^{-1}$.



5.3 Detecção do Lactato em amostras padrão

Ainda utilizando a técnica de VC, realizamos a detecção do lactato, utilizando-se a plataforma desenvolvida como eletrodo de trabalho. A Figura 18 (a) mostra os VCs realizados em solução tampão PBS pH 7,4. As curvas apresentam um aumento na magnitude de corrente anódica, centrada em 0,17V, com o aumento da concentração de lactato, indicando uma relação linear entre o sinal analítico e a concentração de lactato, indicadas no *inset* da Figura (a). Tal aumento na corrente em função da adição do analito indica a detecção do lactato pela plataforma sensorial desenvolvida. A Figura 18 (b) apresenta a curva analítica do biossensor desenvolvido. Conforme podemos observar, o sensor apresenta uma região linear entre 0,5 e 30 mM que é regida pela seguinte equação da reta: $I(\mu\text{A}) = 3,93 \times 10^{-5} + 8,35 \times 10^{-7} \times [\text{lactato}]$ ($R^2 = 0,975$). Tais parâmetros analíticos se mostraram adequados para a aplicação pretendida do biossensor produzido, pois no suor humano a concentração de lactato tem concentrações que variam entre 10 - 25 mM (FAHMIDA et al., 2018).

Figura 18 – Voltamogramas cíclicos ($0,05 \text{ V s}^{-1}$) na ausência e presença de diferentes concentrações de lactato (*inset*) na interface do FTO modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + LOx (a) e curva analítica obtida neste intervalo de concentração para o potencial 0,17V (b).



Fonte: Autoria própria.

5.4 Limite de detecção (LOD) e reprodutibilidade

O limite de detecção do biossensor foi calculado através de medidas realizadas com 1 mM de analito e da equação $LOD = 3 \sigma/S$, onde σ = desvio padrão (de 10 medidas) e S = slope da curva de calibração. O LOD obtido foi = 0,1 mM. O biossensor mostrou boa reprodutibilidade, calculada através de medidas realizadas com 5 mM de analito, obtendo os valores de desvio padrão relativo intra-eletrodo - RSD = 2,1% (10 medidas diferentes no mesmo eletrodo) e inter-eletrodo – RSD = 5,22% (para 2 eletrodos idênticos – 10 medidas cada).

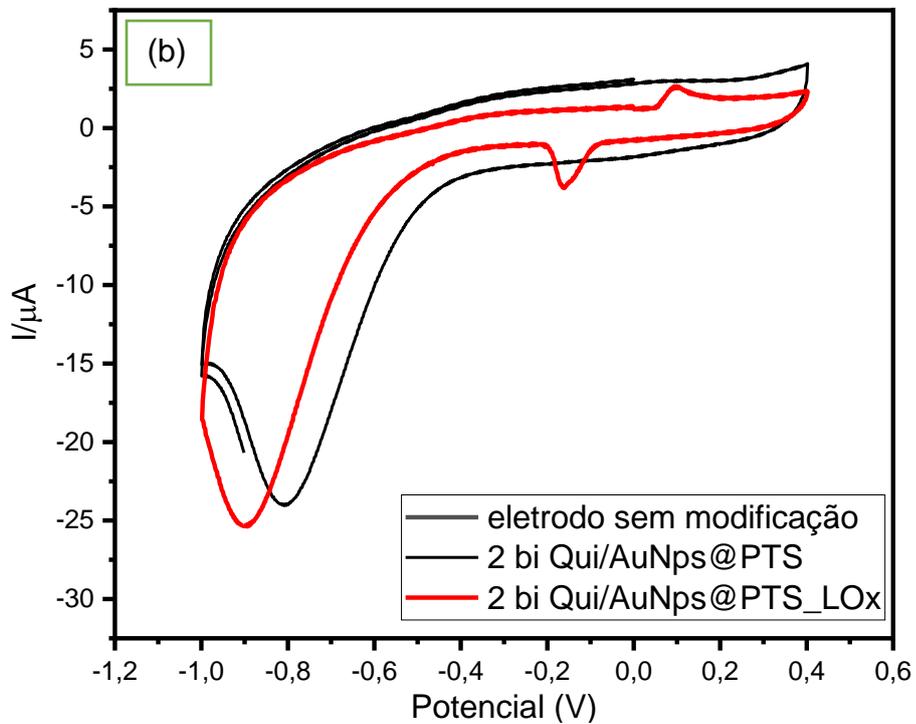
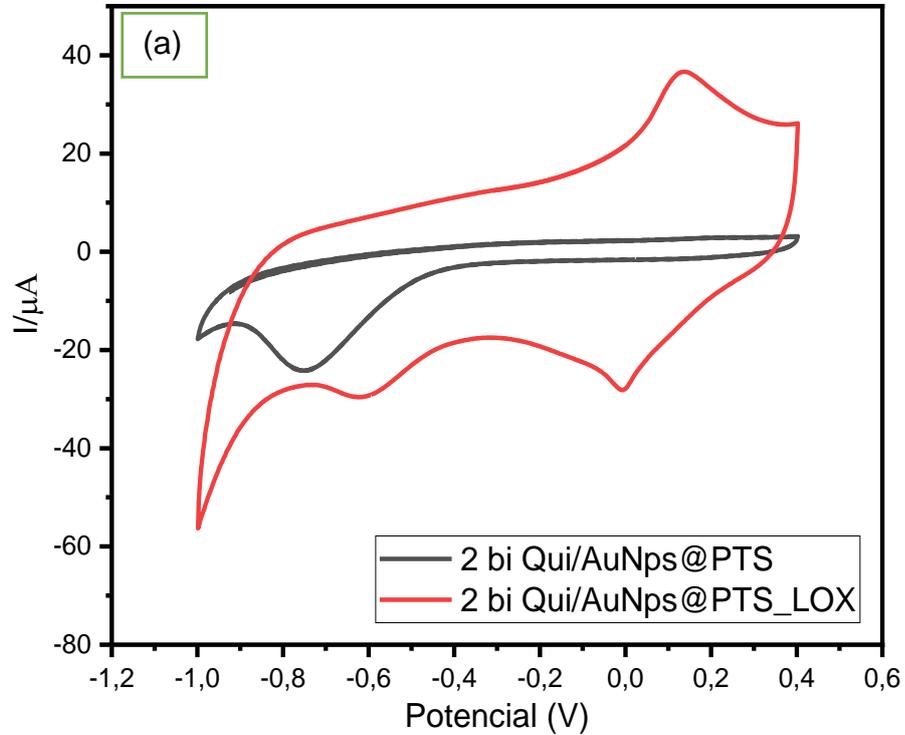
5.5 Detecção do Lactato em amostras reais de suor

Primeiramente, foram realizadas medidas de VC com a plataforma sensorial com e sem a enzima LOx imobilizada, em amostra padrão com 10 mM de lactato (Figura 19 a) e com amostra real proveniente do esforço físico com 30 minutos de exercício do protocolo adotado (Figura 19 b). Como podemos observar, ocorrem picos de detecção somente para as plataformas com a enzima imobilizada, o que não acontece quando temos a plataforma sem enzima.

Ao contrário dos outros componentes, as concentrações de lactato de suor no braço e nas costas apresentam-se semelhantes entre si, potencialmente devido à grande variação nas concentrações. Além disso, as concentrações gerais de lactato no suor excedem consideravelmente as concentrações de lactato no sangue, o que pode ser explicado possivelmente pela origem do lactato de suor como subproduto metabólico da glândula sudorípara (DERBYSHIRE et al., 2012).

Pesquisadores observaram que a concentração de lactato determinado no sangue e suor, simultaneamente, e em locais anatomicamente próximos da pele (veia antecubital e braço), comparados com concentrações de lactato na parte superior das costas, o suor mostrou um padrão decrescente, mas as alterações foram relativamente insignificantes (KLOUS et al., 2021).

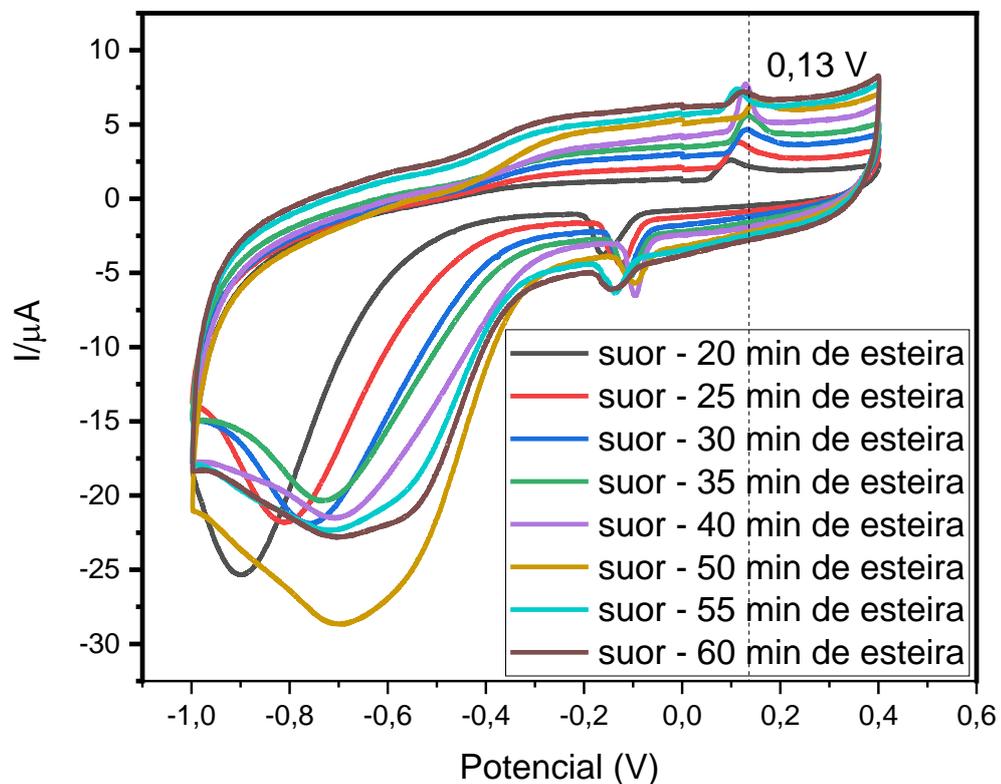
Figura 19 – Voltamogramas cíclicos ($0,05 \text{ V s}^{-1}$) realizados na interface do eletrodo impresso modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS com e sem a imobilização da enzima LOx, utilizando 10 mM de lactato (amostra padrão) (a) e amostra de suor coletado após 30 minutos de exercício físico (b).



Fonte: Autoria própria.

A Figura 20 apresenta os voltamogramas cíclicos para detecção do lactato em amostras de suor, coletadas durante todo o protocolo de exercício. As curvas apresentam um aumento na magnitude de corrente anódica, centrada em 0,13V com o aumento da concentração de lactato. As concentrações se apresentaram de maneira crescente com o decorrer do tempo e consequente aumento do volume de exercício. Ressaltamos que no minuto 45 de teste não foi possível à realização da coleta de suor por problemas no tubo de eppendorf.

Figura 20 – Voltamogramas cíclicos ($0,05 \text{ V s}^{-1}$) realizados na interface do eletrodo impresso modificado com 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS +LOx na detecção de lactato nas amostras de suor coletadas durante o esforço físico. O *inset* mostra o tempo de exercício realizado.



Fonte: Autoria própria.

Através dos VCs apresentados na Figura 20, foram calculadas as concentrações de lactato nas amostras de suor coletadas. Na Tabela 4 são apresentados os resultados de evolução do tempo de exercício, concentração de lactato no suor e frequência cardíaca durante a execução do protocolo realizado. A frequência cardíaca se correlaciona com percepção subjetiva de esforço obtida pela escala original de Borg (6-20 pontos, partido do esforço mais leve até o máximo),

lactato sanguíneo e ventilação em testes incrementais (ARSA et al., 2016) o que possivelmente também ocorra com o lactato obtido no suor durante o esforço físico.

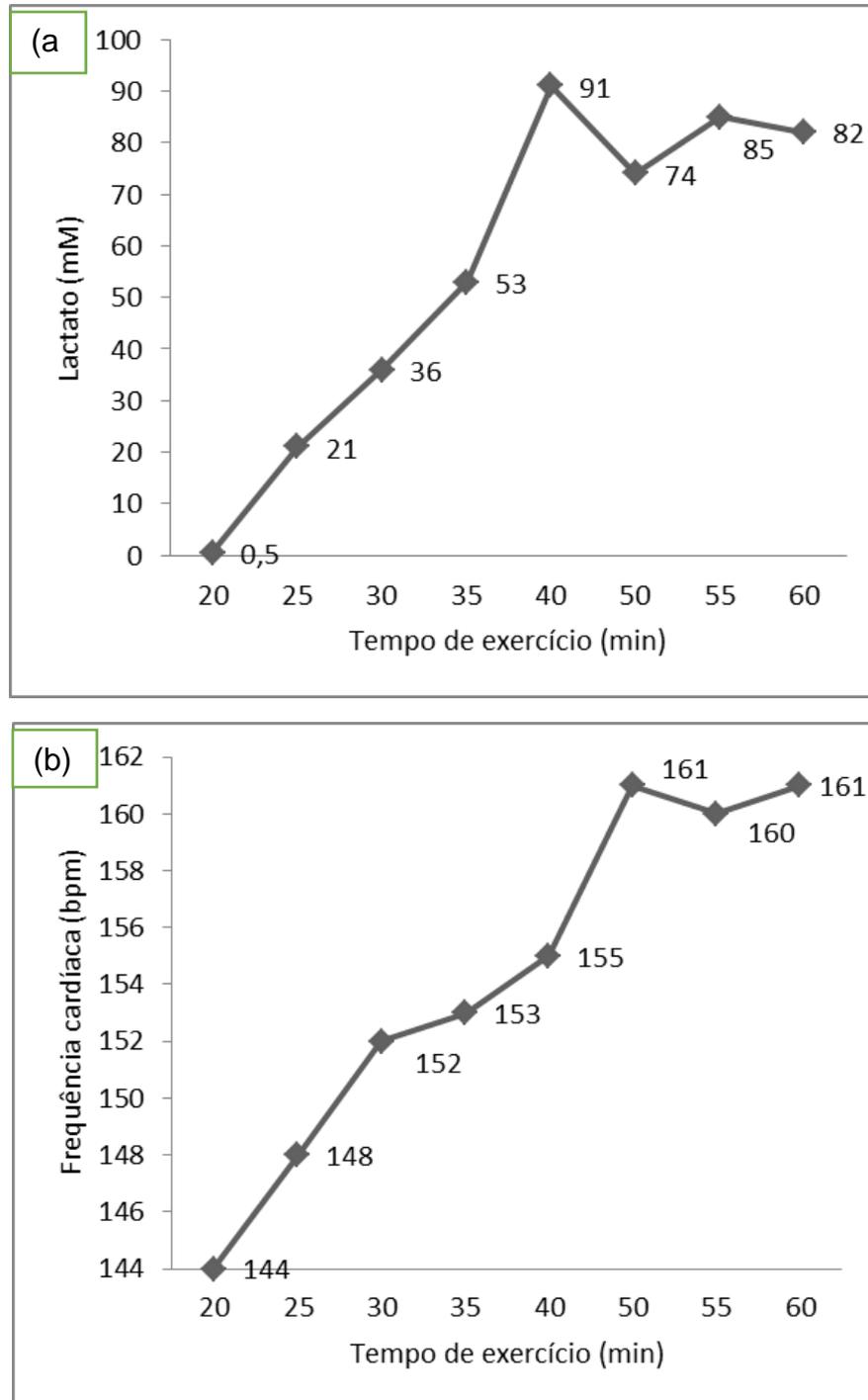
Tabela 4 – Resultados de tempo de exercício, concentração de lactato (determinada utilizando o biossensor desenvolvido) e frequência cardíaca durante o esforço físico.

Tempo (min)	Lactato (mM)	Frequência cardíaca (bpm)
20	0,5	144
25	21	148
30	36	152
35	53	153
40	91	155
50	74	161
55	85	160
60	82	161

Fonte: Autoria própria.

A Figura 21 (a) apresenta a crescente da concentração de lactato no suor no decorrer do teste de esforço, já a Figura 21 (b) demonstra o comportamento da frequência cardíaca com a evolução do tempo de exercício. O lactato do suor vem sendo considerado como possível medidor de intensidade de esforço durante atividades e exercícios físicos e, podemos observar uma relativa proximidade no decorrer do teste realizado no perfil do aumento da concentração de lactato no suor e da frequência cardíaca.

Figura 21 – Tempo de exercício, concentração de lactato (a) e frequência cardíaca (b).



Fonte: Autoria própria.

Trabalhos recentes na literatura apresentam a detecção de lactato em amostras reais, de maneira não invasiva e em tempo real. Zhang et. al., 2020, desenvolveram um biossensor eletroquímico flexível baseado em nanofios de prata por impressão molecular, para monitorar o lactato na transpiração durante a

realização de exercícios físicos. De maneira resumida, o biossensor é implantado em um substrato flexível por um processo de serigrafia e, assim, a corrente de retorno do lactato é captada com medição na epiderme, a medição ilustrou a detecção de lactato variou de 10-6 mM a 0,1 mM com o LOD de 0,22 μ M em PBS (ZHANG et al., 2020). Conforme podemos perceber, métodos de serigrafia também são viáveis no desenvolvimento de biossensores não invasivos.

Shitanda et. al., 2021, desenvolveram biossensor impresso baseado em carbono modelado com MgO polimerizado por enxerto no qual a enzima lactato oxidase (LOx) e a 1,2-naftoquinona foram imobilizadas. O biossensor apresentou limite de detecção de 0,3 mM de lactato, além de uma faixa de detecção de até aproximadamente 100 mM de lactato. O sistema desenvolvido mostrou-se adequado para a detecção do limiar de lactato, ou seja, a mudança do metabolismo aeróbio para anaeróbio, dado que a concentração de lactato no suor aumenta de 4 para 25 mM (metabolismo aeróbio – limiar 1) para 50-100 mM (metabolismo anaeróbio - limiar 2) (SHITANDA et al., 2021).

Nos estudos desenvolvidos por Zaryanov et al., foi possível realizar a detecção de lactato do suor na faixa de 3 mM a 100 mM, com o limite de detecção de 1,5 mM, e tempo de resposta de 2–3 min. A detecção bem-sucedida de lactato no suor humano foi realizada por meio do biossensor baseado na eletropolimerização do polímero poli ácido 3-aminofenilborônico (3-APBA) e impressão molecular do lactato, e foi confirmada usando método de referência altamente específico baseado na enzima LOx (coeficiente de correlação $r > 0,9$) (ZARYANOV et al., 2017).

O presente estudo apresentou faixa de detecção entre 0,5 e 91 mM de lactato determinado através da plataforma desenvolvida utilizando 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + LOx. Tais resultados corroboram com os citados acima, com limites próximos ao encontrado na literatura.

Outros estudos recentes discutem a correlação entre a concentração de lactato excretada no suor e no sangue, bem como o limiar de lactato sanguíneo e ventilatório. Estudos demonstraram um aumento significativo na concentração de lactato no suor da área muscular de trabalho, simultaneamente com o aumento do acúmulo de lactato sanguíneo durante exercício físico, apresentando correlação positiva ($r > 0,8$), mostrando a perspectiva de uma abordagem não invasiva para o monitoramento do treinamento do esportista (KARPOVA et al., 2020).

Corroborando com estes achados, Seki et al. realizaram monitoramento em tempo real dos valores de lactato no suor durante o exercício incremental em pacientes com doença cardiovascular, bem como em indivíduos saudáveis, e compararam com técnicas de limiar ventilatório e lactato sanguíneo. O limiar de lactato no suor foi bem correlacionado com o limiar de lactato no sangue e o limiar ventilatório ($r = 0,92$ e $0,71$, respectivamente). O monitoramento contínuo das concentrações de lactato durante o exercício pode fornecer informações adicionais para detectar o limiar ventilatório, que é considerado padrão-ouro (SEKI et al., 2021).

6 CONCLUSÕES

Filmes automontados com diferentes bicamadas de quitosana e AuNps@PTS foram produzidos através da metodologia de LbL. Os filmes foram caracterizados através de espectroscopia de absorção UV-Vis e de fluorescência. Através dos espectros, evidenciou-se que o crescimento do filme foi linear com o número de bicamadas.

Medidas eletroquímicas de voltametria cíclica mostraram que dentre as arquiteturas de filmes produzidas, aquela formada por 2 bicamadas de material (quitosana/AuNpS@PTS) é a que mais favoreceu a rápida transferência de carga (elétrons), sendo essa arquitetura a utilizada para imobilização da enzima LOx. Diferentes arquiteturas de imobilização da enzima foram testadas, sendo que a arquitetura 2 bi 1 LOx (2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + 1 LOx) foi a que provocou mais significativa alteração nos voltamogramas e, por esse motivo, foi a escolhida para os experimentos de detecção de lactato.

Medidas de detecção eletroquímica, utilizando a técnica de voltametria cíclica, mostraram que a plataforma desenvolvida é adequada para detecção do lactato. Os voltamogramas apresentam um aumento no valor de corrente anódica (centrada em 0,17V) com o incremento da concentração de lactato. A curva analítica do biossensor desenvolvido apresentou adequado regime linear entre 0,5 e 30 mM de lactato. Os parâmetros analíticos do biossensor desenvolvido são adequados para a detecção de lactato proveniente do suor humano.

O biossensor desenvolvido apresentou LOD = 0,1 mM e boa reprodutibilidade com desvios padrão relativos intra-eletrodo e inter-eletrodo calculados em RSD = 2,1% e RSD = 5,22%, respectivamente. A plataforma mostrou especificidade quando realizado o teste com e sem LOx imobilizada, detectando apenas na presença da enzima. A plataforma 2 bicamadas de Qui/AuNps@PTS + 1 LOx foi capaz de detectar lactato de suor humano em diferentes tempos e intensidades de exercício físico, apresentando um comportamento próximo da frequência cardíaca e faixa de detecção próxima as apresentadas pela literatura, indicando novas possibilidades para futuros estudos em populações maiores e protocolos de exercícios específicos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar e avaliar possíveis interações entre os materiais formadores dos filmes LbL (quitosana e AuNps) através de análise de espectros infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Realizar estudos de interferentes do biossensor desenvolvido.
- Testar a plataforma sem a imobilização da enzima LOx como sensor de pH.
- Desenvolver eletrônica compatível e protótipo para tornar o biossensor desenvolvido em dispositivo portátil.
- Realizar correlação entre a concentração do lactato medido no suor e o estresse muscular de atletas.

8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA A PARTIR DOS RESULTADOS DA TESE

Trabalhos Completos publicados em anais de Congresso

Torres, S. G., Santos, E. N.; Sanfelcie, R. C., Pavinatto, A. *Produção e Caracterização de filmes Layer-By-Layer (LbL) para utilização como plataforma de biossensor eletroquímico*. VII Encontro da Pós-Graduação da Universidade Brasil, 2019, São Paulo.

Resumos publicados em anais de conferências nacionais

Torres, S. G., Santos, E. N., Sanfelice, R. S., Pavinatto, A. *Desenvolvimento de Biossensor portátil para determinação de ácido láctico*. I CONTECBRASIL - I Congresso Acadêmico e Tecnológico da Universidade Brasil, 2020, São Paulo. I CONTECBRASIL - I Congresso Acadêmico e Tecnológico da Universidade Brasil. Dezembro de 2020.

Torres, S. G., Santos, E. N., Balogh, D. T., Sanfelice, R. C., Pavinatto, A. *Nanostructured materials as platforms for non-invasive electrochemical biosensors*. XVIII Brazilian MRS Meeting, 2019, Camboriú. Setembro de 2019.

9 REFERÊNCIAS

ANTUNES, Joana C.; PEREIRA, Catarina Leite; MOLINOS, Maria; FERREIRA-DA-SILVA, Frederico; DESSÌ, Mariagemiliana; GLORIA, Antonio; AMBROSIO, Luigi; GONÇALVES, Raquel M.; BARBOSA, Mário A. Layer-by-layer self-assembly of chitosan and poly(γ -glutamic acid) into polyelectrolyte complexes. **Biomacromolecules**, United States, v. 12, n. 12, p. 4183–4195, 2011. ISSN: 1526-4602 (Electronic). DOI: 10.1021/bm2008235.

ARAVAMUDHAN, Aja; RAMOS, Daisy M.; NADA, Ahmed A.; KUMBAR, Sangamesh G. Chapter 4 - Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications. *In*: KUMBAR, Sangamesh G.; LAURENCIN, Cato T.; DENG, Meng (org.). **Natural and Synthetic Biomedical Polymers**. Oxford: Elsevier, 2014. p. 67–89. ISBN: 978-0-12-396983-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123969835000041>.

ARSA, Gisela; CAMBRI, Lucieli Teresa; SILVA, Flávio Da; PARDONO, Emerson; SERRA, Andrey Jorge; LEITE, Gerson dos Santos; CAMPBELL, Carmen Silvia Grubert; SIMÕES, Herbert Gustavo. LIMIAR ANAERÓBIO A PARTIR DA PSE EM EXERCÍCIO RESISTIDO POR MODELOS MATEMÁTICOS. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 113–117, 2016. ISSN: 1517-8692. DOI: 10.1590/1517-869220162202149738. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922016000200113&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 27 set. 2021.

BALDARI, Carlo; VIDEIRA, Miguel; MADEIRA, Francisco; SERGIO, Joaquim; GUIDETTI, Laura. Lactate removal during active recovery related to the individual anaerobic and ventilatory thresholds in soccer players. **European journal of applied physiology**, Germany, v. 93, n. 1–2, p. 224–230, 2004. ISSN: 1439-6319 (Print). DOI: 10.1007/s00421-004-1203-5.

BARNETT, James A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. **Yeast**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 509–543, 2003. ISSN: 0749-503X.

BHATTACHARYA, Resham; MUKHERJEE, Priyabrata. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, Netherlands, v. 60, n. 11, p. 1289–1306, 2008. ISSN: 0169-409X (Print). DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.013.

BOLLELLA, Paolo; SHARMA, Sanjiv; CASS, Anthony Edward George; ANTIOCHIA, Riccarda. Microneedle-based biosensor for minimally-invasive lactate detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 123, p. 152–159, 2019. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566318305979>.

BRANDÃO, Weverton Guedes; LISBOA, Rafael Barbosa; DOS SANTOS BARROS,

Edilberto; OLIVEIRA-SILVA, Iransé; PEREIRA, Leonardo Costa. Efeitos da eletroestimulação neuromuscular sobreposta ao treinamento de força sobre os níveis de lactato sanguíneo. **International Journal of Movement Science and Rehabilitation**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 45–54, 2020. ISSN: 2674-9181.

BROOKS, George A. Cell–cell and intracellular lactate shuttles. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 587, n. 23, p. 5591–5600, 2009. ISSN: 0022-3751.

BROOKS, George A. Energy flux, lactate shuttling, mitochondrial dynamics, and hypoxia. **Hypoxia**, [S. l.], p. 439–455, 2016.

CAIRNS, Simeon P. Lactic acid and exercise performance : culprit or friend? **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, New Zealand, v. 36, n. 4, p. 279–291, 2006. ISSN: 0112-1642 (Print). DOI: 10.2165/00007256-200636040-00001.

CAMPOS, PAULA PEREIRA. **Desenvolvimento de um biossensor bioensimático amperométrico para detecção de β -lactose de filme nanoestruturado layer-by-layer**. Sorocaba: Universidade Federal de São Carlos, 2014.

CARLSSON, Magnus; CARLSSON, Tomas; HAMMARSTRÖM, Daniel; TIIVEL, Toomas; MALM, Christer; TONKONOGLI, Michail. Validation of Physiological Tests in Relation to Competitive Performances in Elite Male Distance Cross-Country Skiing. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, [S. l.], v. 26, n. 6, 2012. ISSN: 1064-8011. Disponível em: https://journals.lww.com/nsca-jscr/Fulltext/2012/06000/Validation_of_Physiological_Tests_in_Relation_to.7.aspx.

CHUA, P. H.; NEOH, K. G.; SHI, Z.; KANG, E. T. Structural stability and bioapplicability assessment of hyaluronic acid-chitosan polyelectrolyte multilayers on titanium substrates. **Journal of biomedical materials research. Part A**, United States, v. 87, n. 4, p. 1061–1074, 2008. ISSN: 1552-4965 (Electronic). DOI: 10.1002/jbm.a.31854.

CLARK, L. C. Jr; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v. 102, p. 29–45, 1962. ISSN: 0077-8923 (Print). DOI: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.

COELHO, Daniela Barbosa L.; MORANDI, Rodrigo Figueiredo; PAIXÃO, R.; MENDES, Thiago Teixeira; DE ALCANTARA BORBA, Diego; BARROS, Cristiano; PEREIRA, Emerson Ricardo Rodrigues; GARCIA, Emerson Silami; CABIDO, C. Limiar anaeróbico de 4,0mM é capaz de estimar a máxima fase estável de lactato de jogadores de futebol em testes de campo. *In*: 2015, **Anais [...]**. [s.l: s.n.]

DECHER, Gero. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science**, [S. l.], v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.277.5330.1232. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/277/5330/1232>.

DELEZUK, Jorge A. M.; PAVINATTO, Adriana; MORAES, Marli L.; SHIMIZU, Flávio

M.; RODRIGUES, Valquíria C.; CAMPANA-FILHO, Sérgio P.; RIBEIRO, Sidney J. L.; OLIVEIRA, Osvaldo N. Silk fibroin organization induced by chitosan in layer-by-layer films: Application as a matrix in a biosensor. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 155, p. 146–151, 2017. ISSN: 0144-8617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.060>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716310025>.

DERBYSHIRE, Philip J.; BARR, Hugh; DAVIS, Frank; HIGSON, Seamus P. J. Lactate in human sweat: a critical review of research to the present day. **The journal of physiological sciences**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 429–440, 2012. ISSN: 1880-6546.

DESHMUKH, Prashant K.; RAMANI, Ketan P.; SINGH, Saurabh S.; TEKADE, Avinash R.; CHATAP, Vivekanand K.; PATIL, Ganesh B.; BARI, Sanjay B. Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self-assembly systems: targeting and biosensory applications. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, Netherlands, v. 166, n. 3, p. 294–306, 2013. ISSN: 1873-4995 (Electronic). DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.12.033.

DUTTA, Pradip; DUTTA, Joydeep; TRIPATHI, V.; JOYDEEP. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **J Sci Indus Res**, [S. l.], v. 63, 2003.

DYKMAN, Lev; KHLEBTSOV, Nikolai. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. **Chem. Soc. Rev.**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 2256–2282, 2012. DOI: 10.1039/C1CS15166E. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C1CS15166E>.

ETEZADI, Dordaneh; WARNER IV, John B.; RUGGERI, Francesco S.; DIETLER, Giovanni; LASHUEL, Hilal A.; ALTUG, Hatice. Nanoplasmonic mid-infrared biosensor for in vitro protein secondary structure detection. **Light: Science & Applications**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. e17029–e17029, 2017. ISSN: 2047-7538. DOI: 10.1038/lsa.2017.29. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/lsa.2017.29>.

FAHMIDA, Alam; ROYCHOUDHURY, Sohini; JALAL, Ahmed Hasnain; UMASANKAR, Yogeswaran; FOROUZANFAR, Shahrzad; AKTER, Naznin; BHANSALI, Shekhar; PALA, Nezhil. Lactate biosensing: The emerging point-of-care and personal health monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 117, p. 818–829, 2018. ISSN: 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.06.054>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566318304858>.

FAN, Xuemei; WANG, Shumin; LI, Zhejian; WANG, Yimeng; FAN, Xinhui; YU, Lingmin. An Electrochemiluminescence Biosensor for the Determination of Mercury Ion via Dual-Amplification Strategy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 31, p. 2620–2627, 2020. ISSN: 01035053. DOI: 10.21577/0103-5053.20200144. Disponível em: https://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=10987&nomeArquivo=2020-0142AR.pdf. Acesso em: 8 jun. 2021.

FAUDE, Oliver; KINDERMANN, Wilfried; MEYER, Tim. Lactate Threshold Concepts How Valid are They? **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, [S. l.], v. 39, p. 469–490, 2009.

FREESTONE, Ian; MEEKS, Nigel; SAX, Margaret; HIGGITT, Catherine. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 270–277, 2007. ISSN: 2190-7579. DOI: 10.1007/BF03215599. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03215599>.

GOMES, N. O. **Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos baseados em papel para monitoramento não invasivo de lactato em suor**. 2019. Universidade de São Paulo, Instituto de química de São Carlos, [S. l.], 2019.

GONÇALVES, Gregue Fausto; DE ALMEIDA, Paulo Henrique Foppa. Comparação do limiar anaeróbico entre indivíduos praticantes de treinamento de força e sedentários. **Redes - Revista Interdisciplinar do IELUSC; v. 1 n. 3 (2020): Redes - Revista Interdisciplinar Acadêmica da Faculdade Ielusc**, [S. l.], 2020. Disponível em: <http://revistaredes.ielusc.br/index.php/revistaredes/article/view/85>.

GUL, Anum; KUNWAR, Bimal; MAZHAR, Maryam; FAIZI, Shaheen; AHMED, Dania; SHAH, Muhammad Raza; SIMJEE, Shabana U. Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF- κ B and iNOS activation. **International immunopharmacology**, Netherlands, v. 59, p. 310–317, 2018. ISSN: 1878-1705 (Electronic). DOI: 10.1016/j.intimp.2018.04.017.

HASANZADEH, Mohammad; SHADJOU, Nasrin; ESKANDANI, Morteza; SOLEYMANI, Jafar; JAFARI, Farshad; DE LA GUARDIA, Miguel. Dendrimer-encapsulated and cored metal nanoparticles for electrochemical nanobiosensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 53, p. 137–149, 2014. ISSN: 0165-9936. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599361300246X>.

HOLLMANN, W. 42 years ago--development of the concepts of ventilatory and lactate threshold. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, New Zealand, v. 31, n. 5, p. 315–320, 2001. ISSN: 0112-1642 (Print). DOI: 10.2165/00007256-200131050-00002.

HUANG; MIAO, Yue-E.; JI, Shanshan; TJIU, Weng Weei; LIU, Tianxi. Electrospun Carbon Nanofibers Decorated with Ag–Pt Bimetallic Nanoparticles for Selective Detection of Dopamine. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [S. l.], v. 6, n. 15, p. 12449–12456, 2014. DOI: 10.1021/am502344p. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/am502344p>.

HUANG, Zhen; HU, Song; XIONG, Yonghua; WEI, Hua; XU, Hengyi; DUAN, Hongwei; LAI, Weihua. **Application and development of superparamagnetic nanoparticles in sample pretreatment and immunochromatographic assay**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., 2019. ISSN: 18793142. DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.004.

IDE, Bernardo Neme; LOPES, Charles Ricardo; SARRAIPA, Mário Ferreira. Fisiologia do treinamento esportivo. **Phorte editora**, [S. l.], 2010.

JONES, Andrew M. The physiology of the world record holder for the women's marathon. **International Journal of Sports Science & Coaching**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 101–116, 2006. ISSN: 1747-9541.

KARPOVA, Elena; LAPTEV, Aleksey; ANDREEV, Egor; KARYAKINA, Elena; KARYAKIN, Arkady. Relationship Between Sweat and Blood Lactate Levels During Exhaustive Physical Exercise. **ChemElectroChem**, [S. l.], v. 7, p. 191–194, 2020. DOI: 10.1002/celec.201901703.

KEMMLER, Wolfgang; STENGEL, Simon; KÖCKRITZ, Christina; MAYHEW, Jerry; WASSERMANN, Alfred; ZAPF, Jürgen. Effect of Compression Stockings on Running Performance in Men Runners. **Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association**, [S. l.], v. 23, p. 101–105, 2009. DOI: 10.1519/JSC.0b013e31818eaef3.

KIRKLAND, J. J. Porous Thin-Layer Modified Glass Bead Supports for Gas Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 1458–1461, 1965. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac60231a004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60231a004>.

KLOUS, L.; DE RUITER, C. J.; SCHERRER, S.; GERRETT, N.; DAANEN, H. A. M. The (in)dependency of blood and sweat sodium, chloride, potassium, ammonia, lactate and glucose concentrations during submaximal exercise. **European Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 121, n. 3, p. 803–816, 2021. ISSN: 1439-6327. DOI: 10.1007/s00421-020-04562-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04562-8>.

KUMARASAMY, Jayakumar; CAMARADA, María Belén; VENKATRAMAN, Dharuman; JU, Huangxian; DEY, Ramendra Sundar; WEN, Yangping. One-step coelectrodeposition-assisted layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and reduced graphene oxide and its self-healing three-dimensional nanohybrid for an ultrasensitive DNA sensor. **Nanoscale**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1196–1206, 2018. DOI: 10.1039/C7NR06952A. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C7NR06952A>.

LEITE, Álvaro J.; SHER, Praveen; MANO, João F. Chitosan/chondroitin sulfate multilayers as supports for calcium phosphate biomineralization. **Materials Letters**, [S. l.], v. 121, p. 62–65, 2014. ISSN: 0167-577X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.01.099>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X14001153>.

LIMA, Fernando Vitor; COSTA, Cinara Gonçalves; LACERDA, Lucas Túlio; SILVA, Lorena Viggiano Rocha; DINIZ, Rodrigo César Ribeiro; COSTA, Hugo César Martins; TOURINO, Frank Douglas; CHAGAS, Mauro Heleno. O efeito de diferentes durações das ações musculares na concentração de lactato sanguíneo em protocolos de treinamento de força na musculação. **Journal of Physical Education**, [S. l.], v.

28, n. 1 SE-Physiology and Biochemistry, 2017. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevEducFis/article/view/32769>.

LIU; GAO, Changyou. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, Netherlands, v. 46, n. 2, p. 117–126, 2005. ISSN: 0927-7765 (Print). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2005.09.005.

LIU, Zhixin et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. **Journal of medical virology**, [S. l.], v. 92, n. 6, p. 595–601, 2020. ISSN: 1096-9071 (Electronic). DOI: 10.1002/jmv.25726.

LVOV, Yuri; DECHER, Gero; MOEHWALD, Helmuth. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly (vinyl sulfate) and poly (allylamine). **Langmuir**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 481–486, 1993. ISSN: 0743-7463.

MACHADO, Marco; SANZ, Alexandre; CAMERON, L. C. A adição do treinamento contínuo no limiar de lactato aumenta a performance de jogadores de futebol. **Fitness & Performance Journal**, [S. l.], v. 2, p. 357–363, 2003. DOI: 10.3900/fpj.2.6.357.p.

MARIK, P.; BELLOMO, Rinaldo. A rational approach to fluid therapy in sepsis. **BJA: British Journal of Anaesthesia**, [S. l.], v. 116, n. 3, p. 339–349, 2016. ISSN: 1471-6771.

MARINHO, Thaís Maria Alves; CARDOSO, Márcio José Batista; EULALIO, Hugo Yves Cardoso; LEITE, Michele Dayana Rodrigues; LIMA, Rodrigo Jose Silva; SWARNAKAR, Ramdayal; FOOK, Marcus Vinicius Lia. Imobilização de urease com a quitosana pelo método de gotejamento sobre um eletrodo transdutor amperométrico. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [S. l.], v. 1, p. 25–29, 2016.

MELO, Rafael Leandro Fernandes; SOUZA, Isabel Cristina da Cósta; CARVALHO, Alessandro Jacinto Rodrigues; BEZERRA, Eveline Matias; COSTA, Roner Ferreira Da. Nanoparticles as biological tools: an exploratory review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 7 SE-, p. e363974155, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i7.4155. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/4155>.

MERCANTE, Luiza A.; SCAGION, Vanessa P.; PAVINATTO, Adriana; SANFELICE, Rafaela C.; MATTOSO, Luiz H. C.; CORREA, Daniel S. Electronic Tongue Based on Nanostructured Hybrid Films of Gold Nanoparticles and Phthalocyanines for Milk Analysis. **Journal of Nanomaterials**, [S. l.], v. 2015, p. 890637, 2015. ISSN: 1687-4110. DOI: 10.1155/2015/890637. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/890637>.

MIGLIORINI, Fernanda L.; SANFELICE, Rafaela C.; PAVINATTO, Adriana; STEFFENS, Juliana; STEFFENS, Clarice; CORREA, Daniel S. Voltammetric cadmium(II) sensor based on a fluorine doped tin oxide electrode modified with polyamide 6/chitosan electrospun nanofibers and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, [S. l.], v. 184, n. 4, p. 1077–1084, 2017. ISSN: 1436-5073. DOI: 10.1007/s00604-017-2082-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2082-x>.

MUZZARELLI, Riccardo A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 167–182, 2009. ISSN: 0144-8617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861708005183>.

NAGAMINE, Kuniaki; MANO, Taisei; NOMURA, Ayako; ICHIMURA, Yusuke; IZAWA, Ryota; FURUSAWA, Hiroyuki; MATSUI, Hiroyuki; KUMAKI, Daisuke; TOKITO, Shizuo. Noninvasive sweat-lactate biosensor employing a hydrogel-based touch pad. **Scientific reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019. ISSN: 2045-2322.

NOGUEIRA, Grinia M.; SWISTON, Albert J.; BEPPU, Marisa M.; RUBNER, Michael F. Layer-by-Layer Deposited Chitosan/Silk Fibroin Thin Films with Anisotropic Nanofiber Alignment. **Langmuir**, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 8953–8958, 2010. ISSN: 0743-7463. DOI: 10.1021/la904741h. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la904741h>.

OKANO, Alexandre Hideki; ALTIMARI, Leandro Ricardo; SIMÕES, Herbert Gustavo; MORAES, Antonio Carlos De; NAKAMURA, Fábio Yuzo; CYRINO, Edilson Serpeloni; BURINI, Roberto Carlos. Comparação entre limiar anaeróbio determinado por variáveis ventilatórias e pela resposta do lactato sanguíneo em ciclistas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [S. l.], v. 12, p. 39–44, 2006. ISSN: 1517-8692. DOI: 10.1590/S1517-86922006000100008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/rYgzgXZGzbDLKbrX5MXhbPq/?lang=pt#>. Acesso em: 22 set. 2021.

OLIVEIRA; CONSOLIN-FILHO, L. G.; PATERNO, L. H. C.; MATTOSO, E. S.; MEDEIROS. **Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores**. 2013. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), [S. l.], 2013.

OLIVEIRA, Dejjane P. C. De; RIBEIRO, Francisco W. P.; BECKER, Helena; LIMA-NETO, Pedro; CORREIA, Adriana N. AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON THE TYROSINASE ENZYME FOR THE DETERMINATION OF PHENOL IN WASTEWATER. **Química Nova**, [S. l.], v. 38, p. 924–931, 2015. ISSN: 0100-4042. DOI: 10.5935/0100-4042.20150086. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150086>. Acesso em: 8 jun. 2021.

PAVINATTO, Adriana; MERCANTE, Luiza A.; FACURE, Murilo H. M.; PENA,

Rafaella B.; SANFELICE, Rafaela C.; MATTOSO, Luiz H. C.; CORREA, Daniel S. Ultrasensitive biosensor based on polyvinylpyrrolidone/chitosan/reduced graphene oxide electrospun nanofibers for 17α – Ethinylestradiol electrochemical detection. **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 458, p. 431–437, 2018. ISSN: 0169-4332. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.07.035>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433218319081>.

PAVINATTO, Adriana; MERCANTE, Luiza A.; LEANDRO, Cleiton S.; MATTOSO, Luiz H. C.; CORREA, Daniel S. Layer-by-Layer assembled films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of 17α -ethinylestradiol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 755, p. 215–220, 2015. ISSN: 1572-6657. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.08.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665715300606>.

POHANKA, Miroslav; SKLADAL, Petr. Electrochemical biosensors - principles and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 57–64, 2008. ISSN: 1214021X. Disponível em: <https://jab.zsf.jcu.cz/artkey/jab-200802-0002.php>.

POOLE, David C.; ROSSITER, Harry B.; BROOKS, George A.; GLADDEN, L. Bruce. The anaerobic threshold: 50+ years of controversy. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 599, n. 3, p. 737–767, 2021. ISSN: 0022-3751.

POURASL, Ali H.; AHMADI, Mohammad Taghi; RAHMANI, Meisam; CHIN, Huei Chaeng; LIM, Cheng Siong; ISMAIL, Razali; TAN, Michael Loong Peng. Analytical modeling of glucose biosensors based on carbon nanotubes. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 33, 2014. ISSN: 1556-276X. DOI: 10.1186/1556-276X-9-33. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-33>.

PUTZBACH, William; RONKAINEN, Niina J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 4811–4840, 2013. ISSN: 1424-8220 (Electronic). DOI: 10.3390/s130404811.

RAMIREZ-LEE, Manuel Alejandro; AGUIRRE-BAÑUELOS, Patricia; MARTINEZ-CUEVAS, Pedro Pablo; ESPINOSA-TANGUMA, Ricardo; CHI-AHUMADA, Erika; MARTINEZ-CASTAÑÓN, Gabriel Alejandro; GONZALEZ, Carmen. Evaluation of cardiovascular responses to silver nanoparticles (AgNPs) in spontaneously hypertensive rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 385–395, 2018. ISSN: 1549-9634.

SALOMÃO, P. E. A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. **Society and Development**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1–11, 2018.

SAN-MILLÁN, Iñigo; BROOKS, George A. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 119–133, 2017. ISSN: 0143-3334.

SANFELICE; MERCANTE, Luiza A; PAVINATTO, Adriana; TOMAZIO, Nathália B; MENDONÇA, Cleber R; RIBEIRO, Sidney J. L; MATTOSO, Luiz H. C.; CORREA, Daniel S. Hybrid composite material based on polythiophene derivative nanofibers modified with gold nanoparticles for optoelectronics applications. **Journal of Materials Science**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 1919–1929, 2017. ISSN: 1573-4803. DOI: 10.1007/s10853-016-0481-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10853-016-0481-8>.

SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; GONÇALVES, V. C.; CORREA, D. S.; MATTOSO, L. H. C.; BALOGH, D. T. Synthesis of a nanocomposite containing a water-soluble polythiophene derivative and gold nanoparticles. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, [S. l.], v. 54, n. 13, 2016. ISSN: 10990488. DOI: 10.1002/polb.24032.

SEKI, Yuta et al. A novel device for detecting anaerobic threshold using sweat lactate during exercise. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 4929, 2021. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-021-84381-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84381-9>.

SHI, Weihua; LUO, Xiaojin; CUI, Yue. **A Tube-Integrated Painted Biosensor for Glucose and Lactate**. **Sensors** 2018. ISBN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s18051620.

SHITANDA, Isao; MITSUMOTO, Masaya; LOEW, Noya; YOSHIHARA, Yuko; WATANABE, Hikari; MIKAWA, Tsutomu; TSUJIMURA, Seiya; ITAGAKI, Masayuki; MOTOSUKE, Masahiro. Continuous sweat lactate monitoring system with integrated screen-printed MgO-templated carbon-lactate oxidase biosensor and microfluidic sweat collector. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 368, p. 137620, 2021. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137620>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468620320132>.

SI, Yunpei; PARK, Jeong Won; JUNG, Sunhee; HWANG, Geum-Sook; GOH, Eunseo; LEE, Hye Jin. Layer-by-layer electrochemical biosensors configuring xanthine oxidase and carbon nanotubes/graphene complexes for hypoxanthine and uric acid in human serum solutions. **Biosensors & bioelectronics**, England, v. 121, p. 265–271, 2018. ISSN: 1873-4235 (Electronic). DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.074.

SIDDIQI, Khwaja Salahuddin; HUSEN, Azamal. Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 40, p. 10–23, 2017. ISSN: 0946-672X. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.11.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X16303819>.

SILVA., CALILI; **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. Universidade Católica De Goiás, Universidade De Brasília**, [S. l.], 2019.

SONG, Jae Min; SHIN, Sang Hun; KIM, Yong Deok; LEE, Jae Yeol; BAEK, Young Jae; YOON, Sang Yong; KIM, Hong Sung. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat

calvarial defects: micro-computed tomography analysis. **International journal of oral science**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 87–93, 2014. ISSN: 1674-2818 (Print). DOI: 10.1038/ijos.2014.16.

SVEDAHL, Krista; MACINTOSH, Brian R. Anaerobic Threshold: The Concept and Methods of Measurement. **Canadian Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 299–323, 2003. ISSN: 1066-7814. DOI: 10.1139/h03-023. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/h03-023>.

TAGUCHI, Masashige; PTITSYN, Andre; MCLAMORE, Eric S.; CLAUSSEN, Jonathan C. Nanomaterial-mediated Biosensors for Monitoring Glucose. **Journal of diabetes science and technology**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 403–411, 2014. ISSN: 1932-2968. DOI: 10.1177/1932296814522799. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24876594>.

TANG, Z.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 18, n. 24, p. 3203–3224, 2006. ISSN: 0935-9648. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.200600113>. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.200600113>.

TUR-GARCÍA, Eva L.; DAVIS, Frank; COLLYER, Stuart D.; HOLMES, Joanne L.; BARR, Hugh; HIGSON, Séamus P. J. Novel flexible enzyme laminate-based sensor for analysis of lactate in sweat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 242, p. 502–510, 2017. ISSN: 0925-4005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400516318317>.

V. L., F. I. MCARDLE W. KATCH; KATCH. **Fisiologia do exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. 6. ed., Rio de Janeiro.

VAN HOOVELS, Kevin; XUAN, Xing; CUARTERO, Maria; GIJSSEL, Maarten; SWARÉN, Mikael; CRESPO, Gaston A. Can Wearable Sweat Lactate Sensors Contribute to Sports Physiology? **ACS Sensors**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1021/acssensors.1c01403. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssensors.1c01403>.

VENKATRAMAN, P.; VELUSAMY; KHAREL, R.; COLLINS, S. Smart wearable biosensor for non-invasive real time detection of sweat lactate using compression garments. *In*: 2016, **Anais [...]**. [s.l: s.n.]

VIGDERMAN, Leonid; KHANAL, Bishnu P.; ZUBAREV, Eugene R. Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 24, n. 36, p. 4811–4841, 2012. ISSN: 0935-9648. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201201690>. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.201201690>.

VOKHMYANINA, Darya V; ANDREEVA, Ksenia D.; KOMKOVA, Maria A.;

KARYAKINA, Elena E.; KARYAKIN, Arkady A. 'Artificial peroxidase' nanozyme – enzyme based lactate biosensor. **Talanta**, [S. l.], v. 208, p. 120393, 2020. ISSN: 0039-9140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120393>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019310264>.

VON MURALT, Alexander. The development of muscle-chemistry, a lesson in neurophysiology. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 4, p. 126–129, 1950. ISSN: 0006-3002.

WANG, C.; MA, Z.; WANG, T.; SU, Z. Synthesis, Assembly, and Biofunctionalization of Silica-Coated Gold Nanorods for Colorimetric Biosensing. **Advanced Functional Materials**, [S. l.], v. 16, n. 13, p. 1673–1678, 2006. ISSN: 1616-301X. DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.200500898>. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adfm.200500898>.

WOLAHAN, Stephanie M.; MAO, Howard C.; REAL, Courtney; VESPA, Paul M.; GLENN, Thomas C. Lactate supplementation in severe traumatic brain injured adults by primed constant infusion of sodium L-lactate. **Journal of neuroscience research**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 688–695, 2018. ISSN: 0360-4012.

XUE, Chenming; GAO, Min; XUE, Yuhua; ZHU, Lin; DAI, Liming; URBAS, Augustine; LI, Quan. Building 3D Layer-by-Layer Graphene–Gold Nanoparticle Hybrid Architecture with Tunable Interlayer Distance. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S. l.], v. 118, n. 28, p. 15332–15338, 2014. ISSN: 1932-7447. DOI: [10.1021/jp504553w](https://doi.org/10.1021/jp504553w). Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp504553w>.

ZARYANOV, Nikolay V; NIKITINA, Vita N.; KARPOVA, Elena V; KARYAKINA, Elena E.; KARYAKIN, Arkady A. Nonenzymatic Sensor for Lactate Detection in Human Sweat. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 89, n. 21, p. 11198–11202, 2017. ISSN: 0003-2700. DOI: [10.1021/acs.analchem.7b03662](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03662). Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03662>.

ZHANG, Qingwen et al. Wearable electrochemical biosensor based on molecularly imprinted Ag nanowires for noninvasive monitoring lactate in human sweat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 320, p. 128325, 2020. ISSN: 0925-4005. DOI: [10.1016/J.SNB.2020.128325](https://doi.org/10.1016/J.SNB.2020.128325).

ZHANG, Xi; CHEN, Huan; ZHANG, Hongyu. Layer-by-layer assembly: from conventional to unconventional methods. **Chemical Communications**, [S. l.], n. 14, p. 1395–1405, 2007. ISSN: 1359-7345. DOI: [10.1039/B615590A](https://doi.org/10.1039/B615590A). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B615590A>.

ZHAO; LIU, Yuanyuan; LI, Xiaojian; WANG, Huan; ZHANG, Yong; MA, Hongmin; WEI, Qin. Label-free ECL immunosensor for the early diagnosis of rheumatoid arthritis based on asymmetric heterogeneous polyaniline-gold nanomaterial. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 257, p. 354–361, 2018. ISSN: 0925-4005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.184>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400517321007>.

ZHAO, Wenbo; FANG, Yi; ZHU, Qinshu; WANG, Kuai; LIU, Min; HUANG, Xiaohua; SHEN, Jian. A novel glucose biosensor based on phosphonic acid-functionalized silica nanoparticles for sensitive detection of glucose in real samples. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 89, p. 278–283, 2013. ISSN: 0013-4686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.11.031>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468612018257>.