

**PROCESSO PARA FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVO BIOSSENSOR,
DISPOSITIVO BIOSSENSOR E SEUS USOS**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere nos campos da Biomedicina, Química Analítica e Físico-química, mais precisamente nas áreas de Diagnóstico e Eletroquímica, e refere-se ao desenvolvimento de um sistema diagnóstico com alta seletividade e de baixo custo para o diagnóstico da SARS-CoV-2, baseado no reconhecimento da proteína *Spike* do vírus a receptores específicos presentes em membranas celulares de células alvo, e com diferenciação contra outros vírus, utilizando as propriedades únicas das membranas celulares combinadas com as propriedades catalíticas e de *point-of-care* de plataformas eletroquímicas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Sistemas diagnósticos têm se mostrado elementos-chave para o controle dos casos positivos durante a pandemia de SARS-CoV-2, tornando possível criar estratégias de isolamento.

[003] Atualmente, 2 tipos de testes de diagnóstico são comumente usados para a detecção de infecções por SARS-CoV-2: *i. reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) e *ii. IgM e IgG ligadas ao ensaio de enzima imunoabsorvente (ELISA)* (Sethuraman *et al.*, 2020). Tais testes apresentam altíssima sensibilidade e eficiência, porém são de alto custo, pouco portáteis e dependem de pesquisadores e equipamentos especializados, sendo, dessa maneira, indisponíveis para a grande maioria da população. Apesar da existência desses dois testes, o mais comumente utilizado e confiável para o diagnóstico de COVID-19 ainda

é o teste RT-PCR, pois detecta ácidos nucleicos SARS-CoV-2 presentes em fluidos nasofaríngeos ou outros espécimes do trato respiratório superior (Kevadiya *et al.*, 2021).

[004] Como alternativa, os testes rápidos para detecção de anticorpos do SARS-CoV-2 têm sido amplamente desenvolvidos e comercializados. De natureza puramente qualitativa, isto é, indicam apenas presença ou ausência de anticorpos SARS-CoV-2, muitos fabricantes não revelam a natureza dos antígenos usados (Chaibun *et al.*, 2021). Além disso, a janela de detecção pouco eficiente em relação ao ciclo viral e o grande número de resultados falsos positivos e falsos negativos, tem relatado sua baixa efetividade, gerando preocupações em relação à miniaturização e portabilidade desses testes (Valera *et al.*, 2021).

[005] Uma variedade de genes de RNA alvos pode ser utilizada na camada de biorreconhecimento de um dispositivo diagnóstico, tanto nos testes padrões quanto nos testes rápidos. Porém, um receptor tem chamado a atenção em relação à alta especificidade no reconhecimento do vírus via proteína *Spike*, inclusive no desenvolvimento de vacinas.

[006] De acordo com a literatura científica, SARS-CoV-2 infecta células de mamíferos através de um mecanismo de reconhecimento de receptor. A entrada do vírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína transmembrana *Spike* localizada na superfície do envelope viral (Miller *et al.*, 2021). Esta glicoproteína possui um domínio de ligação ao receptor que se liga especificamente ao receptor ACE-2 (Letko *et al.*, 2020); a posterior fusão e entrada do vírus na célula hospedeira também dependem da clivagem dos sítios S1/S2 e S2' da proteína *Spike* pela protease transmembrana serina 2

(TMPRSS2) (Markus *et al.*, 2020).

[007] ACE-2 é expressa na superfície de diversas células epiteliais das mucosas nasais, brônquios e pulmões, mas também em outros tecidos como coração, rins e intestino (Lukassen *et al.*, 2020; Lamers *et al.*, 2020; Subramanian *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). O padrão de expressão de ACE-2 em diferentes órgãos, tecidos e tipos de células pode estar diretamente associado à infecção por SARS-CoV-2, uma vez que as células-alvo que expressam altos níveis de ACE-2 podem permitir maior entrada, multiplicação, disseminação e patogênese deste coronavírus (Zou *et al.*, 2020).

[008] Diversos modelos de estudo *in vitro*, com linhagens celulares de mamíferos, têm sido empregados com sucesso em pesquisas relacionadas ao SARS-CoV-2 e COVID-19. Uma característica importante que estes modelos apresentam em comum é a alta susceptibilidade ao vírus, o que está diretamente relacionado à expressão de ACE-2 e TMPRSS2. Entre as linhagens celulares humanas, Calu-3, Caco-2 e Huh7 apresentam altos níveis de expressão destas proteínas (Id *et al.*, 2021), em contrapartida, células A549 expressam baixos níveis de ACE-2, não sendo facilmente infectadas por SARS-CoV-2 (Id *et al.*, 2021). Ainda, células Vero, isoladas a partir de células epiteliais renais de um macaco verde africano, são muito utilizadas em pesquisas relacionadas ao SARS-CoV-2 pois são facilmente infectadas pelo vírus devido à presença de altos níveis de ACE-2 em sua superfície (Id *et al.*, 2021; Takayama, 2020).

[009] Diante desse cenário, a utilização do biorreconhecimento entre membranas celulares que expressam o receptor ACE-2 e proteína *Spike* do vírus pode ser uma nova

e eficiente maneira de realizar o diagnóstico de SARS-CoV-2. Principalmente levando em conta o custo de produção e isolamento, quando comparado aos demais alvos.

[010] Aliado a uma camada de biorreconhecimento altamente seletiva, os biossensores eletroquímicos podem oferecer maior acessibilidade à identificação do vírus *Spike* relacionado a SARS-CoV-2. Esses são de altíssimo interesse principalmente devido à sua versatilidade, simplicidade, alto potencial de miniaturização e baixo custo. As medidas podem ser realizadas em um mesmo eletrodo nas diferentes etapas - desde a montagem até as medidas de detecção.

[011] Duas categorias de técnicas eletroquímicas amplamente utilizadas são as voltamétricas e as impedimétricas. Nas medidas impedimétricas o método mais utilizado é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), que é capaz de medir a permissividade de elétrons em um sistema ao longo de uma ampla faixa de frequências, que vai tipicamente de 10^4 a 10^{-3} Hz. Uma das maneiras mais comuns de observar os resultados da técnica EIS é através do diagrama de Nyquist, um gráfico composto de eixos correspondentes às componentes imaginária ($-Z''$) e real (Z') da impedância, e no qual cada ponto representa uma frequência distinta. A partir dos dados obtidos é possível desenhar um circuito equivalente através de softwares especializados e coletar informações sobre o que diz respeito à caracterização do biossensor, transformando uma informação de biorreconhecimento em resposta física mensurável (Freitas et al., 2016).

ESTADO DA TÉCNICA

[012] Com o avanço da pandemia da COVID-19 e a

necessidade de métodos de diagnóstico rápido, diversos biossensores capazes de detectar biomarcadores da doença foram desenvolvidos e podem ser encontrados no estado da técnica, por exemplo:

[013] O documento US10815539B1, de autoria de Brambati *et al.*, descreve um dispositivo para a detecção do material genético do SARS-CoV-2 usando oligonucleotídeos marcados com fluoróforos complementares às sequências do vírus, de maneira que a fluorescência é alterada após a hibridização, indicando a presença do vírus na amostra. Assim como para a detecção de outras doenças, a interação específica antígeno-anticorpo também é bastante explorada para o diagnóstico da COVID-19.

[014] No documento CN111474365A, um biossensor elétrico é descrito para a detecção dos anticorpos IgM e IgG usando eletrodos modificados com a proteína *Spike* ou com a proteína do nucleocapsídeo.

[015] Essa mesma plataforma é usada para a detecção da proteína *Spike*, nesse caso, com eletrodos modificados com anticorpos. Testes imunocromatográficos usando nanopartículas de ouro também foram desenvolvidos baseados na interação antígeno-anticorpo, como no documento CN111537746A, em que a tira de teste modificada com anticorpos pode ser usada para a detecção das proteínas *Spike* ou nucleocapsídeo. Apesar de se mostrarem como ótimas alternativas aos métodos convencionais realizados em laboratórios, os dispositivos desenvolvidos para a detecção das proteínas *Spike*, fazem uso de anticorpos, o que pode encarecer os testes e torná-los menos acessíveis.

[016] Como alternativa ao uso de anticorpos, no

documento CN111273016B foi desenvolvido um teste imunocromatográfico baseado na interação receptor-ligante entre a *Spike* e o ACE-2 para a detecção de COVID-19. No entanto, nessa metodologia, os receptores ACE-2 foram coletados do sobrenadante de uma cultura de células e purificados para, então, serem utilizados nos dispositivos. Nesse contexto, o dispositivo da presente invenção propõe o uso de membranas celulares com superexpressão de ACE-2 como elemento de biorreconhecimento para a detecção das proteínas *Spike* e sua aplicação no diagnóstico de COVID-19.

[017] Dentre os artigos científicos, apenas dois com publicação de 2021, fazem uso do receptor transmembrana ACE-2. Torres et al., desenvolveram um biossensor do tipo *point-of-care* para detecção de SARS-CoV-2. O sensor denominado RAPIS 1.0 detecta 10µL de amostra em 4 minutos por meio da EIS, com sensibilidade e especificidade de c.a. 85% a 100% para amostras de espécimes de nasofaríngeo e orofaríngeo (Torres et al., 2021). Um biossensor com as mesmas características foi publicado por Lima et al. Nesse caso, o biossensor denominado LEAD tem sua detecção aferida via voltametria de onda quadrada, alcançando um limite de detecção de 229 fg.mL para a proteína *Spike* (Lima et al., 2021). Nos dois casos, apesar do uso do receptor transmembrana ACE-2, estes trabalhos utilizaram o anticorpo ACE-2 isolado produzido pela empresa SinoBiological, que foi, então, imobilizado na superfície de eletrodos de grafite revestidos por nanopartículas de ouro. O sistema difere do apresentado na presente invenção, que utiliza membranas inteiras de células específicas como camada de biorreconhecimento.

[018] O documento em nome de Kiew et al., intitulado *Development of flexible electrochemical impedance Spectroscopy-based biosensing platform for rapid Screening of sars-cov-2 inhibitors*, refere-se a uma plataforma biossensora baseada em uma detecção de impedância eletroquímica (EIS) para identificar moduladores positivos e negativos da ligação entre proteína S e a enzima conversora de angiotensina (ACE-2). Para isso, os autores fazem uso de recombinante ACE-2 depositado em eletrodos de PET recobertos com filme fino de paládio, denominado ACE2-Pd-NTE. O recombinante ACE-2 foi expresso através do sistema de *Escherichia coli* utilizando protocolo para expressão de peptídeo. Além disso, o objetivo da plataforma é detectar potenciais inibidores farmacológicos aprovados pela FDA contra a ligação da enzima ACE-2 e proteína S. Apesar do uso de eletrodos de ITO, da técnica de EIS e do uso de uma subunidade da enzima ACE-2, o sensor não faz a detecção direta da proteína *Spike* com biorreconhecimento do receptor ACE-2 superexpresso em membranas celulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3), tal como proposto pela presente invenção.

[019] O documento em nome de Aydin et al., intitulado *New impedimetric sandwich immunosensor for ultrasensitive and highly specific detection of Spike receptor binding domain protein of SARS-CoV-2*, consiste em uma plataforma biossensora com detecção por impedância eletroquímica (EIS) de um domínio de ligação específico de um receptor da proteína *Spike* específico (RBD), isso é, um antígeno. Para isso, anticorpos anti-RBD foram imobilizados na superfície de eletrodos de ITO revestidos com C-NC. Para a detecção

eletroquímica foi utilizado um sistema de reconhecimento do tipo sanduíche com o antígeno RBD, seguido da ligação com um anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra, com o objetivo de amplificar o sinal do eletroquímico do imunossensor denominado ITO/C-NC/anti-RBD/BSA/RBD/Ab2. Apesar do uso de eletrodos de ITO e da técnica de EIS, esse sensor utiliza camada receptora diferente da presente invenção, isto é, sistema antígeno e anticorpo isolados. O teste não faz uso de camada de biorreconhecimento baseada em membranas extracelulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2, tal como proposto pela presente invenção.

[020] O documento em nome de Zaccariotto *et al.*, intitulado *A novel method for the detection of SARS-CoV-2 based on graphene-impedimetric immunosensor*, refere-se à uma plataforma biossensora desenvolvida por meio da imobilização de anticorpo monoclonal da glicoproteína S1 (anti-SARS-CoV-2) em grafeno reduzido (rGO) na superfície de eletrodos de carbono vítreo. Para a detecção eletroquímica foi utilizado o biorreconhecimento com o antígeno recombinante humano da glicoproteína S1 (RBD). Antígeno e anticorpo foram adquiridos da Abcam PLC (Cambridge, Reino Unido). O biorreconhecimento do sistema antígeno-anticorpo foi mensurado pelas técnicas de eletroquímicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica, alcançando limites de detecção 150 ng/mL, isso é, a menor concentração de antígeno detectada. Apesar do uso de eletrodos de ITO e da técnica de EIS, esse sensor utiliza camada receptora diferente da presente invenção, isso é, sistema antígeno e anticorpo isolados. Além disso, tal sensor não faz uso de camada de

biorreconhecimento baseada em membranas celulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2, tal como proposto pela presente invenção.

[021] O documento em nome de Witt *et al.*, intitulado *Boron doped diamond thin films for the electrochemical detection of SARS-CoV-2 S1 protein*, descreve uma plataforma biossensora baseada em eletrodo de diamante policristalino dopado com boro, funcionalizados com um complexo ligante biotina-estreptavidina e anticorpo anti-SARS-CoV-2 S1 biotilado. Para o biorreconhecimento, os autores utilizaram a subunidade S1 da proteína de superfície *Spike* e medidas de impedância eletroquímica. O sensor apresenta diferenças em relação à presente invenção quanto ao uso de sistemas antígeno-anticorpo e uso de eletrodos de diamante. Além disso, o referido teste não faz uso de eletrodos de ITO e de camada de biorreconhecimento baseada em membranas celulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2, tal como proposto pela presente invenção.

[022] O documento em nome de Imran *et al.*, intitulado *Electrochemical biosensors for the detection of SARS-CoV-2 and other viruses*, refere-se a um artigo de revisão da literatura, em que são apresentados inúmeros sistemas sensores para a detecção de vírus incluindo SARS-CoV-2. Sendo um artigo de revisão não há um detalhamento dos estudos, assim como nenhum trabalho apresentado se caracteriza ou possui qualquer semelhança com o desenvolvido na presente invenção, isto é, sobre a utilização de eletrodos de ITO com camada de biorreconhecimento baseada em membranas celulares

de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2.

[023] O documento em nome de Ning *et al.*, intitulado *Liposome-mediated detection of SARS-CoV-2 RNA-positive extracellular vesicles in plasma*, descreve um sistema de detecção baseada em nanopartículas compostas por vesículas extracelulares fundidas com lipossomas sintéticos e carregados com reagente fluorescente para amplificar e detectar o gene do SARS-CoV-2. Nesse caso, as vesículas extracelulares (EVs) são capturadas diretamente do plasma por meio da interação de um anticorpo com a proteína de superfície CD81 e, em seguida, fundido com lipossomas contendo reagentes para transcriptase reversa (RT), amplificação da polimerase de recombinação (RPA) e agrupados regularmente repetição palindrômica curta intercalada (CRISPR) - reações Cas12a. As EVs utilizadas nesse sistema diferem da membrana extracelular utilizada na invenção proposta em termos biológicos, pois são estruturas excretadas pelas células e que não possuem a superexpressão do receptor ACE-2. Neste estudo, o biorreconhecimento é obtido pelo RNA guia, que direciona a ligação CRISPR-Cas12a a um amplicon RT-RPA, induzindo clivagem dependente da concentração de uma sonda de oligonucleotídeo para detecção de RNA de SARS-CoV-2. Esta abordagem difere da presente invenção pois emprega captura mediada por anticorpos dos EVs e lipossomas contendo sondas fluorescentes para detecção. Além disso, o teste não faz uso de eletrodos de ITO, da técnica de EIS e de camada de biorreconhecimento baseada em membranas celulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2,

tal como proposto pela presente invenção.

[024] O documento IN 202011031211 descreve um método, um kit e uma composição para detecção rápida de novo coronavírus (SARS-CoV-2) em uma amostra utilizando lipossoma sintético. Os autores utilizam a técnica espectroscópica de fluorescência, diferente do proposto pela presente invenção, que é baseada na impedância eletroquímica. Além disso, apesar do uso do receptor ACE-2, este é incorporado junto ao proteolipossoma sintético e um fluoróforo lipofílico, para ser possível realizar a medida de fluorescência. Tal método não faz uso de eletrodos de ITO, da técnica de EIS e de camada de biorreconhecimento baseada em membranas celulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2, tal como proposto pela presente invenção.

[025] O documento US11054429B1 descreve a detecção de SARS-CoV-2 a partir da detecção de anticorpos por meio da técnica de espectroscopia de absorção molecular. Os autores utilizaram uma detecção espectroscópica de um sistema de antígeno-anticorpo com reconhecimento tipo sanduíche com o antígeno primário (ACE-2), seguido da ligação com um anticorpo secundário (Ab) marcado com HRP e após a ligação com o seu substrato TMB há a ativação de um produto de reação com coloração observada entre 450 e 570 nm, via técnica de uv-vis. Apesar do uso de uma subunidade do receptor ACE-2, o teste em questão apresenta diferenças em relação à presente invenção quanto ao uso de sistemas antígeno-anticorpo e uso de método espectroscópico para análise. Além disso, o referido teste não faz uso de eletrodos de ITO, da técnica de EIS e de camada de biorreconhecimento baseada em membranas

celulares de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3) com superexpressão do receptor ACE-2, tal como proposto pela presente invenção.

[026] Neste contexto, de maneira distinta ao estado da técnica, a presente invenção propõe o desenvolvimento de um sistema de biossensores utilizando como camada de biorreconhecimento, membranas celulares íntegras ricas em receptores ACE-2. Para isso, membranas celulares com alta expressão do receptor ACE-2 foram extraídas das células VeroCCL81 e Calu-3, conjugadas com EDC/NHS para a construção de vesículas de membranas celulares, obtidas por meio de extrusão mecânica que em seguida foram imobilizadas em eletrodos de ITO, previamente limpos e modificados com APTES. As linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3 foram escolhidas para esta etapa por superexpressarem o receptor transmembrana ACE-2, o qual tem despertado muito interesse como peça-chave no desenvolvimento de vacinas contra COVID-19.

[027] Importante ressaltar também que apesar do uso da enzima conversora de angiotensina (ACE-2) estar presente na maior parte dos documentos citados, todos fazem uso de uma subunidade desta biomolécula como anticorpo ou peptídeo, mas não como um sistema completo, tal como o realizado pela presente invenção, isto é, com membranas celulares extraídas de células de mamíferos (linhagens celulares VeroCCL81 e Calu-3), as quais possuem uma superexpressão do receptor ACE-2.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[028] A presente invenção tem por objetivo propor um sistema diagnóstico com alta seletividade e de baixo custo para o diagnóstico da SARS-CoV-2, baseado no reconhecimento

da proteína *Spike* do vírus a receptores específicos presentes em membranas celulares de células alvo, e com diferenciação contra outros vírus, utilizando as propriedades únicas das membranas celulares combinadas com as propriedades catalíticas e de *point-of-care* de plataformas eletroquímicas.

[029] Assim, a presente invenção propõe primeiramente um processo para fabricação de um dispositivo biossensor para SARS-CoV-2, compreendendo as etapas de: a) Extração e isolamento das membranas celulares de células de epitélio renal saudáveis VeroCCL81 e de epitélio de carcinoma pulmonar Calu-3; b) Obtenção de vesículas a partir das membranas com receptores ACE-2, seguido de incubação com EDC/NHS; e c) Imobilização das vesículas obtidas em eletrodos de ITO modificados com APTES (ITO-APTES).

[030] Adicionalmente, a presente invenção propõe o dispositivo biossensor para SARS-CoV-2 fabricado conforme o processo previamente descrito, compreendendo vesículas de membrana de células que superexpressam os receptores ACE-2, imobilizadas em plataforma condutora de um eletrodo de óxido de índio estanho (ITO), para leitura baseada na técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) com 3 eletrodos independentes: referência, contraeletrodo e trabalho.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[031] A Figura 1 mostra uma representação esquemática das 3 (três) etapas principais para a construção do dispositivo biossensor.

[032] A Figura 2 mostra gráficos de Nyquist obtidos por EIS e VC dos dispositivos biossensores. Gráficos de Nyquist obtidos por EIS da especificidade da camada de

biorreconhecimento (membrana A549 e lipossomo sintético (DPPC)) pela proteína *Spike*.

[033] A Figura 3 mostra gráficos de curvas analíticas e suas respectivas regressões lineares obtidas por medidas de EIS dos dispositivos biossensores ITO-APTES-mVero e ITO-APTES-mCalu na faixa de 10 a 120 ng/mL e 10 a 80 ng/mL, respectivamente. Experimentos realizados em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,4 na presença de 2 mmol/L de ferrocianeto de potássio.

[034] A Figura 4 mostra gráficos da especificidade dos dispositivos biossensores ITO-APTES-mVero e ITO-APTES-mCalu frente a outros vírus (Dengue e Zika) em 25ng/mL de proteína NS1Dengue e NS1Zika. As medidas foram realizadas em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, na presença de 2 mmol/L de ferrocianeto de potássio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[035] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um sistema diagnóstico com alta seletividade e de baixo custo para o diagnóstico da SARS-CoV-2, baseado no reconhecimento da proteína *Spike* do vírus a receptores específicos presentes em membranas celulares de células alvo, e com diferenciação contra outros vírus, utilizando as propriedades únicas das membranas celulares combinadas com as propriedades catalíticas e de *point-of-care* de plataformas eletroquímicas.

[036] Assim, em uma primeira modalidade, a presente invenção refere-se a um processo para fabricação do dispositivo biossensor para SARS-CoV-2, compreendendo as seguintes etapas:

a) Extrair e isolar membranas celulares de células de

epitélio renal saudáveis VeroCCL81 e de epitélio de carcinoma pulmonar Calu-3 com superexpressão do receptor ACE-2;

b) Obter vesículas a partir das membranas com receptores ACE-2, seguido de incubação com EDC/NHS; e

c) Imobilizar as vesículas obtidas em eletrodos de ITO modificados com APTES (ITO-APTES).

[037] As etapas do processo realizado são apresentadas na Figura 1 e serão descritas em mais detalhes a seguir.

Extração e isolamento das membranas celulares de células Vero e Calu-3 com superexpressão do receptor ACE-2

[038] Primeiramente, as membranas celulares (CM) são isoladas e purificadas de acordo com o método proposto por Lund *et al.*, 2009. Para isso, células VeroCCL81 (células epiteliais saudáveis isoladas de rim (de um macaco verde africano) e Calu-3 (célula epitelial de adenocarcinoma do pulmão humano) são cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal, em garrafas de 150 cm², até atingirem cerca de 90% de confluência. As garrafas são então lavadas com PBS à 4°C, e em seguida, 5 mL de PBS gelado são adicionados às garrafas e as células são removidas com o auxílio de um espalhador de células. As células coletadas são lavadas 3 vezes por centrifugação (1000 x *g*, 5 min) com PBS à 4°C e lisadas em tampão hipotônico (10 mM Trisbase, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, pH 6.8) por 20 min, em gelo.

Obtenção de vesículas de membrana com receptor ACE-2 e incubação com EDC/NHS

[039] As células lisadas são, então, centrifugadas (300 x *g*, 5 min), ressuspensas em tampão gradiente (0.25

M Sucrose, 10 mM HEPES, 100 mM ácido succínico, 1 mM EDTA, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , pH 7.4), homogeneizadas através de 80 ciclos (1900 rev/min) em um homogeneizador e centrifugadas à 10000 x g, 10 min. O sobrenadante é, então, coletado e centrifugado à 100000 x g durante 2 h em ultracentrífuga. Ao final, o *pellet* contendo as vesículas de membrana celular é ressuspendido em PBS contendo inibidores de protease e armazenado em *freezer* -80°C.

[040] Posteriormente, as membranas celulares extraídas são mantidas em banho seco com EDC/NHS à 37°C por 8 h (entre 3 e 12 mmol L⁻¹ e 2 e 8 mmol L⁻¹, respectivamente, em tampão fosfato salino). Em seguida, o sistema é extrudado através de membrana utilizando um miniextrusor com poros de 100 nm. O sistema resultante é caracterizado em função do tamanho, carga e concentração por meio das técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial Zeta e analisador de espalhamento de partículas (NTA), respectivamente.

Imobilização das vesículas em eletrodos de ITO-APTES para obtenção dos dispositivos biossensores

[041] Primeiramente, os eletrodos de óxido de índio estanho (ITO) de tamanho 1 x 0,5 cm² passam por uma limpeza química, onde são imersos em acetona e submetidos ao ultrassom por 10 minutos, o que pode ser realizado com tempos entre 5 e 15 minutos. O processo é repetido para álcool isopropílico, etanol e água ultrapura. Posteriormente, os eletrodos são secos sob fluxo de N₂. Outros procedimentos (do tipo limpeza via plasma) podem ser utilizados para a limpeza do substrato, desde que removam resíduos orgânicos e inorgânicos de maneira eficiente sem danificar o eletrodo (como solução piranha 4H₂SO₄:1H₂O₂).

[042] Em seguida, os eletrodos de ITO devidamente limpos são modificados com a imobilização do APTES. Para isso, os eletrodos são imersos por 1 hora em uma solução contendo 2% v/v de (3-aminopropil)-triethoxisilano (APTES) em etanol. Após o tempo de incubação, o eletrodo é lavado cuidadosamente com água ultrapura e seco utilizando um jato de gás inerte $N_2(g)$. Finalmente, o dispositivo é imerso em uma dispersão de vesículas de membrana celulares/EDC/NHS (concentrações de 10^6 , 10^7 ou 10^8 partículas/mL), contendo o receptor ACE-2, por 1h30min (tampão fosfato, 0,1 mol/L, pH 7,4). A variação do tempo de incubação foi realizada com tempos de 30min, 1h, 1h30min e 2h. Um ponto importante é que esta dispersão deve ser preparada até 48h antes de ser colocada em contato com o ITO. Após cada etapa, os eletrodos são cuidadosamente lavados em água ultrapura e secos sob um fluxo de N_2 . Todos os experimentos são realizados em temperatura média de 17 a 19 °C. Resultados podem ser observados na Figura 2.

[043] Adicionalmente, em uma segunda modalidade, a presente invenção refere-se ao dispositivo biossensor para SARS-CoV-2 fabricado conforme o processo previamente descrito, compreendendo vesículas de membrana de células que superexpressam os receptores ACE-2, imobilizadas em plataforma condutora de um eletrodo de óxido de índio estanho (ITO), para a detecção do SARS-CoV-2 por biorreconhecimento via técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) com 3 eletrodos independentes: referência, contraeletrodo e trabalho (mostrado na Figura 1).

[044] O eletrodo de trabalho, responsável pelo biorreconhecimento da proteína *Spike* do SARS-CoV-2,

corresponde a uma plataforma de ITO contendo vesículas formadas de membrana celular íntegras e completas com alta expressão do receptor ACE-2 imobilizadas através da técnica de automontagem. Para que as vesículas se posicionem adequadamente para interagir com a amostra, foram utilizadas moléculas de hidrocloreto de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) incorporadas nas vesículas, além de (3-aminopropil)-triethoxisilano (APTES) junto ao eletrodo ITO.

Medidas eletroquímicas

[045] Medidas eletroquímicas são realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato, ou qualquer dispositivo de impedância eletroquímica miniaturizado, em uma cela de 3 eletrodos convencional. Os eletrodos de ITO modificados são usados como eletrodo de trabalho ($1 \times 0,5 \text{ cm}^2$), enquanto uma placa de platina ($0,5 \times 1 \text{ cm}^2$) e um eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl, com solução interna KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) são utilizados como contraeletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. É importante destacar que o contraeletrodo pode ser composto de qualquer material inerte que permita conexão elétrica de forma que possa ser aplicado um potencial ao eletrodo de trabalho - como metais nobres, carbono e grafite. O eletrodo de referência pode ser substituído por qualquer um que ofereça um potencial constante, tais como eletrodo de calomelano saturado ou de hidrogênio. As medidas são feitas em 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,4 contendo $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio à temperatura de 20°C . Antes de cada medida de impedância eletroquímica, uma medida de voltametria cíclica (VC) é feita a fim de ativar a interface

do dispositivo biossensor (potencial variando entre -300 mV a 800 mV, velocidade de varredura 100 mV s⁻¹, 2 ciclos). Os experimentos de EIS são realizados em potencial de circuito aberto com amplitude de 10 mV e variação de frequência entre 0,1 e 10000 Hz. Antes e após cada experimento, os biossensores armazenados em PBS são imersos cuidadosamente 2 (duas) vezes em água ultrapura para a retirada de quaisquer moléculas fracamente adsorvidas na superfície do eletrodo, como sais do tampão ou ferricianeto de potássio.

[046] Resultados da otimização dos processos analíticos de sinal versus a concentração de proteína *Spike* (curva de calibração) podem ser observados na Figura 3.

Seletividade de membrana e proteína viral

[047] Esse novo sistema foi testado em função da sua seletividade a outros vírus e à especificidade da camada de biorreconhecimento (conforme mostrado nas Figuras 4 e 2, respectivamente). Para a avaliação da seletividade, os biossensores foram incubados por 50 min com 25 ng/mL das proteínas NS1 do vírus da Dengue e Zika e comparados com a resposta da proteína *Spike* (os resultados são mostrados na Figura 4). A especificidade da camada de biorreconhecimento foi comprovada utilizando membranas com baixa expressão do receptor ACE-2 e através de um lipossomo sintético (composição baseada no lipídio *dipalmitoilfosfatidilcolina* - DPPC) sem qualquer receptor, imobilizadas na superfície do eletrodo de ITO através do mesmo procedimento descrito para a obtenção dos biossensores. Esses biossensores foram avaliados em função do seu biorreconhecimento com 50 ng/mL da proteína *Spike* (os resultados são mostrados na Figura 2). É importante ressaltar que na ausência do receptor ACE-2

nenhuma resposta de EIS foi observada.

Resultados

[048] O tempo de imersão do eletrodo em cada uma das etapas de modificação, assim como a concentração de cada um dos componentes do biossensor foram cuidadosamente testados e otimizados, visando o melhor funcionamento do dispositivo.

[049] A caracterização das etapas de construção do dispositivo foi realizada através das técnicas de VC e EIS. Para isso, após cada etapa de modificação na superfície do eletrodo eram realizadas medidas. Como esperado, ITO-APTES apresenta uma resistência de transferência de carga (R_{tc}) baixa quando comparada à outras etapas de modificação, sendo possível observar no gráfico de Nyquist, característico de medidas de EIS, um valor de $R_{tc} = 2,5 \text{ k}\Omega$, seguido do processo de difusão dos íons ferricianeto em solução. Após a imobilização da camada de biorreconhecimento (ITO-APTES-mVero ou ITO-APTES-mCalu), os valores de R_{tc} são calculados em termos de ΔR_{tc} pois deve-se levar em consideração a etapa anterior. Nesse caso, observa-se um elevado aumento na ΔR_{tc} de aproximadamente $4,5 \text{ k}\Omega$ para ITO-APTES-mVero e $\Delta R_{tc} 3,4 \text{ k}\Omega$ para ITO-APTES-mCalu - determinada pelo diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist indicado na Figura 2. Após a incubação do biossensor em solução contendo 25 ng/mL da proteína *Spike*, a ΔR_{tc} aumentou $3,5 \text{ k}\Omega$ para ITO-APTES-mVero e $\Delta R_{tc} 8,1 \text{ k}\Omega$ para ITO-APTES-mCalu, indicando o biorreconhecimento entre a camada da base de membrana celular rica em receptor ACE-2 e a proteína *Spike*. O acompanhamento das etapas de construção dos biossensores pela técnica de VC levou a resultados semelhantes. Neste caso, o aumento da ΔR_{tc} leva à diminuição do pico de oxidação da molécula redox

ferrocianeto de potássio, assim como seu deslocamento para potenciais mais positivos.

[050] Ao utilizar uma camada de biorreconhecimento que continha poucos receptores ACE-2 foi verificado que o valor de ΔR_{tc} permaneceu praticamente inalterado. Para uma camada de biorreconhecimento composto de membranas da célula mA549 com baixa expressão do receptor ACE-2 observa-se um valor baixo de ΔR_{tc} , de aproximadamente 0,26 k Ω , mostrado na Figura 2. Esse fato é esperado devido à quantidade de receptores ACE-2 expresso na camada de biorreconhecimento, isso é, a resposta da camada sem receptor ACE-2 é c.a. de 7,4% em relação a resposta do biossensor ITO-APTES-mVero de apenas 2,5% em relação ao ITO-APTES-mCalu. O mesmo comportamento é observado quando uma vesícula de lipídio sintético é imobilizada na superfície do eletrodo, note que a ΔR_{tc} é praticamente nula.

[051] A caracterização eletroquímica do sistema demonstrou que a camada de biorreconhecimento proveniente de membranas celulares são capazes de reconhecer a proteína *Spike* em concentrações na ordem de ng/mL, isso é, intervalo de 10 a 120 ng/mL com um limite de detecção de 10,3 pg/mL e 8,70 pg/mL e quantificação de 31,1 pg/mL e 26,6 pg/mL. Ainda, os estudos de seletividade revelaram que essa plataforma foi capaz de diferenciar as proteínas NS1 de Dengue e Zika. Na ausência da membrana celular que contenha o receptor ACE-2, nenhuma resposta de espectroscopia de impedância eletroquímica de biorreconhecimento foi observada.

[052] Dessa forma, a construção de uma curva de calibração utilizando a resposta da EIS mostra que, como esperado, o aumento na concentração da proteína *Spike* leva

a um aumento na ΔR_{tc} para os dois biossensores (ITO-APTES-mVero ou ITO-APTES-mCalu). Foi observada uma relação linear entre ΔR_{tc} e a concentração da proteína *Spike* no intervalo de 10 a 120 ng/mL para ITO-APTES-mVero e 10 a 80 ng/mL para ITO-APTES-mCalu. Os parâmetros analíticos do biossensor ITO-APTES-mVero são: coeficiente de linearidade R^2 de 0,8046, limite de detecção de 0,0103 ng/mL, calculado através do desvio padrão de dez brancos e quantificação de 0,0311 ng/mL. A regressão linear mostra que a curva de calibração segue a equação $R_{tc} = 3520 + 52,77 \times 10^3 [\text{Spike}]$. Já para o biossensor ITO-APTES-mCalu, os parâmetros analíticos são: coeficiente de linearidade R^2 de 0,9139, limite de detecção de 0,0087 ng/mL, calculado através do desvio padrão de dez brancos e quantificação de 0,0266 ng/mL. A regressão linear mostra que a curva de calibração segue a equação $R_{tc} = 754,5 + 47,91 \times 10^3 [\text{Spike}]$, conforme mostrado nos resultados da Figura 3.

[053] O dispositivo biossensor apresentou alta seletividade na detecção de outras proteínas associadas a outras infecções virais, como a proteína NS1 da Dengue ou Zika, com diferenças significativas nas respostas de EIS, como observado na Figura 4. A resposta relacionada a estes vírus foi semelhante à obtida somente em PBS e, como esperado, apresentou um ΔR_{tc} significativamente menor do que a proteína *Spike* na mesma concentração. Para o biossensor ITO-APTES-mVero, a resposta do NS1Dengue foi de 11,2% e de 3,65% para NS1Zika quando comparado ao valor da resposta da *Spike*. E para o biossensor ITO-APTES-mCalu, a resposta do NS1Dengue foi de apenas 4,75% e de 1,35% para NS1Zika quando comparado ao valor da resposta da *Spike*, diferença ainda mais significativa. Sendo assim, os biossensores construídos

apresentaram especificidade no teste realizado.

[054] Assim, o dispositivo biossensor proposto na presente invenção difere de outras plataformas diagnósticas de SARS-CoV-2 principalmente devido à camada de biorreconhecimento e sua fácil obtenção. Atualmente, a maioria ou totalidade dos sistemas diagnósticos disponíveis fazem uso do biorreconhecimento de sistemas antígenos/anticorpos ou sequências de DNA.

[055] Além disso, foi constatado que a utilização da membrana celular com alta expressão de receptores ACE-2 diminui os custos de produção de diagnósticos do tipo testes rápidos para SARS-CoV-2. Isso evita a utilização de moléculas de alto valor agregado como antígenos/anticorpos, possibilitando assim o maior número de testes/dia, e, conseqüentemente, maior rastreabilidade de casos positivos. Esta nova ferramenta de diagnóstico representa uma nova oportunidade para o desenvolvimento de métodos mais eficientes e seguros para o diagnóstico SARS-CoV-2, diminuindo também as chances de falso positivos quando o paciente estiver com sintomas similares aos do SARS-CoV-2, porém decorrentes de outros vírus, tais como a Dengue ou Zika.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[056] Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. & Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 323, 2249-2251 (2020).

[057] Kevadiya, B. D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. 20, (2021).

[058] Chaibun, T. et al. Rapid electrochemical detection of coronavirus SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* 12, 1-10 (2021).

[059] Valera, E. et al. Covid-19 Point-of-Care Diagnostics: Present and Future. *ACS Nano* 15, 7899–7906 (2021).

[060] Miller, A. et al. A super-potent tetramerized ACE2 protein displays enhanced neutralization of SARS-CoV-2 virus infection. *Sci. Rep.* 11, 1–13 (2021).

[061] Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569 (2020).

[062] Markus Hoffmann, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, Georg Herrler, Nai-Huei Wu, Andreas Nitsche, M. A. M. & Christian Drosten, S. P. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271–280 (2020).

[063] Lukassen, S. et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* e105114 (2020) doi:10.15252/embj.2020105114.

[064] Lamers, M. M. et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science (80-.)*. 369, 50–54 (2020).

[065] Subramanian, A. et al. RAAS blockade, kidney disease, and expression of ACE2 , the entry receptor for SARS-CoV-2, in kidney epithelial and endothelial cells. 1–28 (2020) doi:10.1101/2020.06.23.167098.

[066] Chen, L., Li, X., Chen, M., Feng, Y. & Xiong, C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential

mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc. Res.* 116, 1097-1100 (2020).

[067] Zou, X. *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med.* 14, 185-192 (2020).

[068] Id, N. M. *et al.* propagation: Considerations for drug discovery and development. 1-18 (2021).

[069] Takayama, K. Trends in Pharmacological Sciences In Vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 Trends in Pharmacological Sciences. *Trends Pharmacol. Sci.* xx, 1-4 (2020).

[070] Freitas, M. *et al.* Impedimetric immunosensors for the detection of Cry1Ab protein from genetically modified maize seeds. *Sensors Actuators, B Chem.* 237, (2016).

[071] Torres, M. D. T. ., Araujo, W. R. de;, Lima, L. F. de; Ferreira, A. L. . & Fuente-Nunez, C. de la. Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care. *Matter* 4, 2403-2416 (2021).

[072] Lima, L. F. De, Ferreira, A. L., Torres, M. D. T. & Araujo, W. R. De. Minute-scale detection of SARS-CoV-2 using a low-cost biosensor composed of pencil graphite electrodes. *PNAS* 118, 1-9 (2021).

[073] Lund, R., Leth-Larsen, R., Jensen, O. N. & Ditzel, H. J. Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. *J. Proteome Res.* 8, 3078-3090 (2009).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para fabricação de dispositivo biossensor **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a) Extrair e isolar membranas celulares de células de epitélio renal saudáveis e de epitélio de carcinoma pulmonar com superexpressão do receptor ACE-2;

b) Obter vesículas a partir das membranas da etapa (a), seguido de incubação com EDC/NHS; e

c) Imobilizar as vesículas obtidas em eletrodos modificados com APTES.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as membranas celulares utilizadas são preferencialmente de células de epitélio renal saudáveis da linhagem VeroCCL81 e de epitélio de carcinoma pulmonar da linhagem Calu-3 com superexpressão do receptor ACE-2.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** de que os eletrodos são selecionados do grupo consistindo principalmente em ITO, ouro, platina, carbono, único multiplex, preferencialmente eletrodos de ITO.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa (b), as células lisadas são centrifugadas (300 x g, 5 min), ressuspensas em tampão gradiente de 0,25 M Sucrose, 10 mM HEPES, 100 mM ácido succínico, 1 mM EDTA, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7,4, homogeneizadas através de 80 ciclos (1900 rev/min) em um homogeneizador e centrifugadas à 10000 x g, 10 min, em que o sobrenadante é coletado e centrifugado à 100000 x g durante 2 h em ultracentrífuga, e ao final o *pellet* contendo as vesículas de membrana celular é ressuspendido em PBS contendo

inibidores de protease e armazenado em *freezer* à -80°C .

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de as membranas celulares extraídas na etapa (a) serem mantidas em banho seco com EDC/NHS à 37°C por 8 h, entre 3 e 12 mmol L^{-1} e 2 e 8 mmol L^{-1} , respectivamente, em tampão fosfato salino, onde posteriormente, na etapa (b) são extrudadas através de membrana utilizando um miniextrusor com poros de 100 nm.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa (c), o eletrodo previamente limpo, é modificado com a imobilização do APTES, pela imersão por 1 hora em uma solução contendo 2% v/v de (3-aminopropil)-triethoxisilano (APTES) em etanol; após o tempo de incubação, o eletrodo é lavado cuidadosamente com água ultrapura e seco utilizando um jato de gás inerte $\text{N}_2(\text{g})$; e o eletrodo é imerso em uma dispersão de vesículas de membrana celulares/ hidrocloreto de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS) em concentrações de 10^6 , 10^7 ou 10^8 partículas/mL contendo o receptor ACE-2, por tempos de 30 min, 1 h, 1h30 min e 2 h, preferencialmente 1h30min em tampão fosfato, 0,1 mol/L, pH 7,4.

7. Dispositivo biossensor fabricado conforme o processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que compreende vesículas de membrana de célula que superexpressam os receptores ACE-2 imobilizadas em plataforma de eletrodos condutores.

8. Dispositivo biossensor, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a membrana celular é natural e extraída de qualquer célula que superexpresse o receptor ACE-2, preferencialmente de células

de epitélio renal saudáveis da linhagem VeroCCL81 e de epitélio de carcinoma pulmonar da linhagem Calu-3.

9. Dispositivo biossensor, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o eletrodo condutor é selecionado do grupo consistindo principalmente em óxido de índio estanho (ITO), ouro, vidro, e polímero metalizado com ouro ou com qualquer metal, preferencialmente ITO.

10. Dispositivo biossensor, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de os eletrodos condutores são constituídos por qualquer plataforma condutora, incluindo nanomateriais condutores, como nanopartículas metálicas, grafeno, carbono amorfo, grafite, nanotubos de carbono.

11. Dispositivo biossensor, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que utiliza uma plataforma de detecção por espectroscopia de impedância eletroquímica.

12. Uso do dispositivo biossensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 11, **caracterizado** pelo fato de ser para detecção *in vitro* de proteína *Spike* de SARS-CoV-2.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a detecção do SARS-CoV-2 é realizada por biorreconhecimento via espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que, opcionalmente, diferencia a proteína *Spike* das proteínas NS1 de Dengue e Zika.

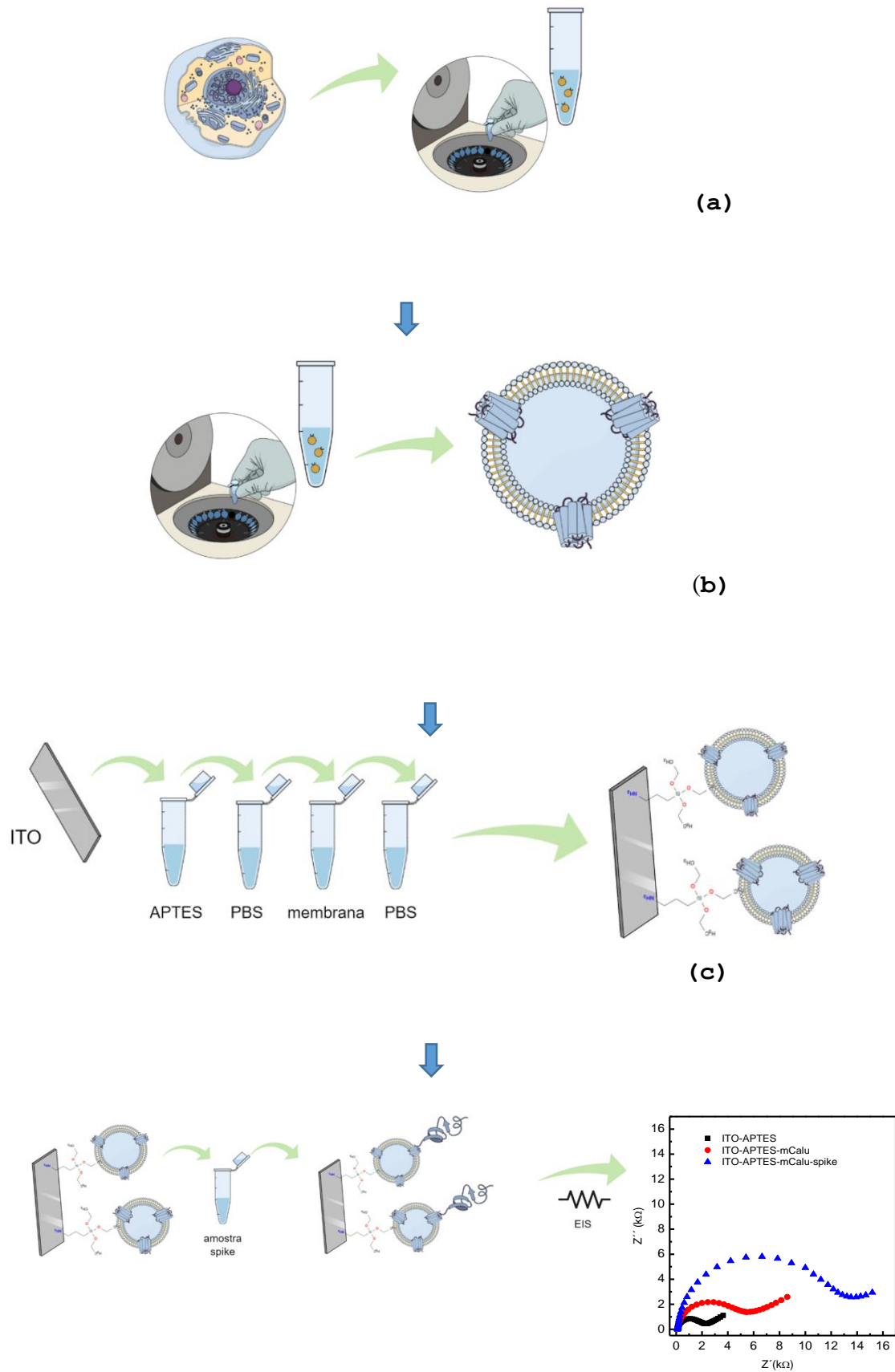


Figura 1

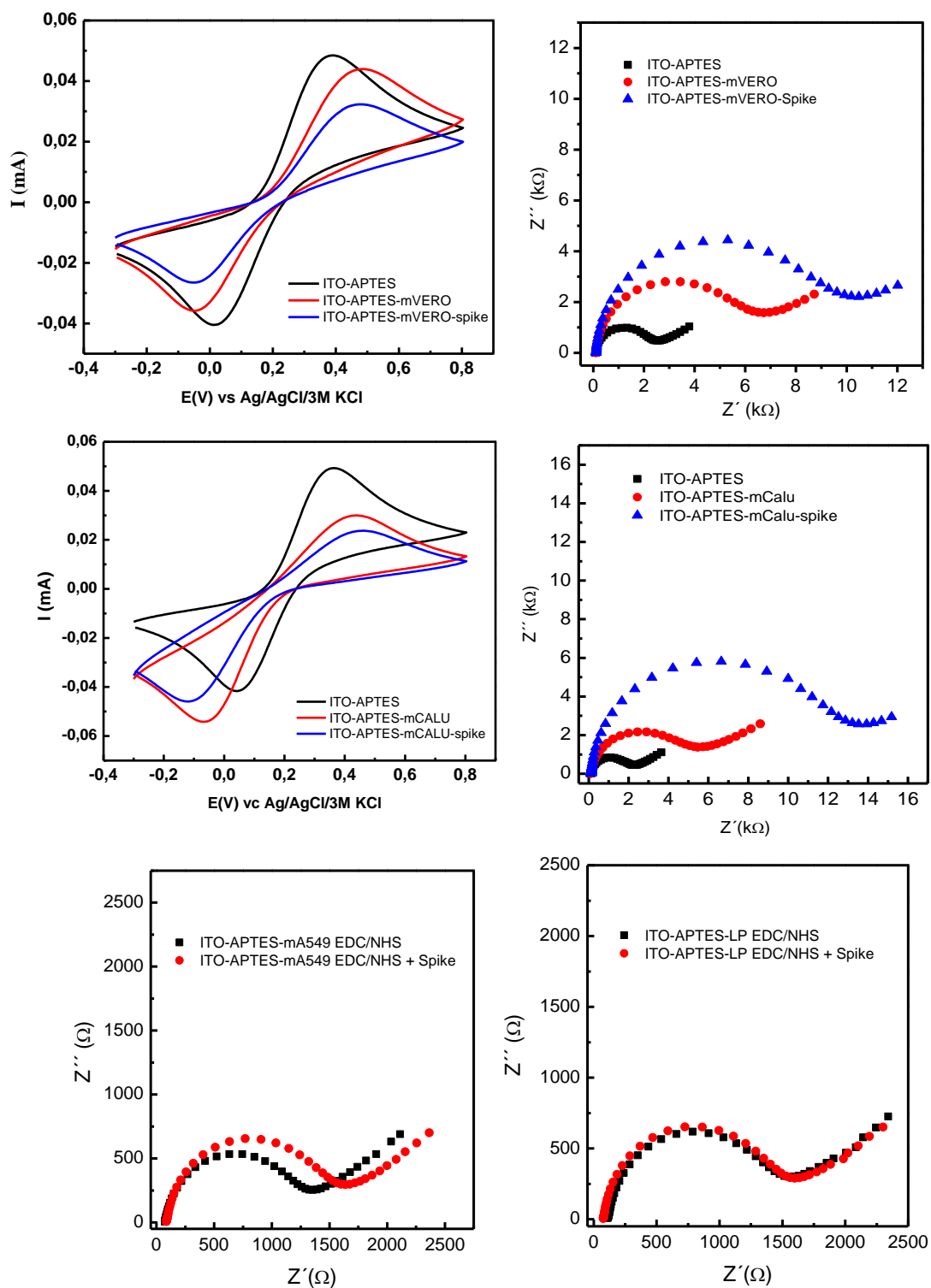


Figura 2

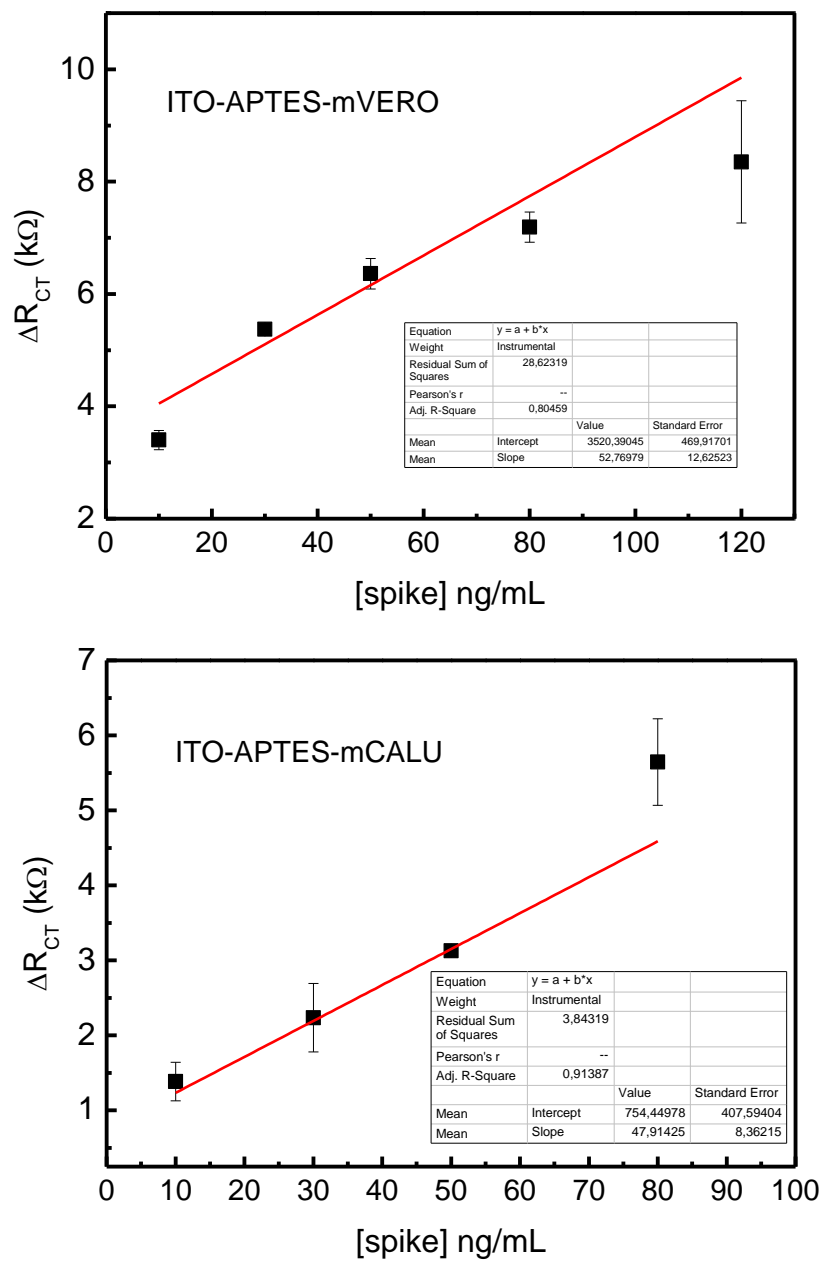


Figura 3

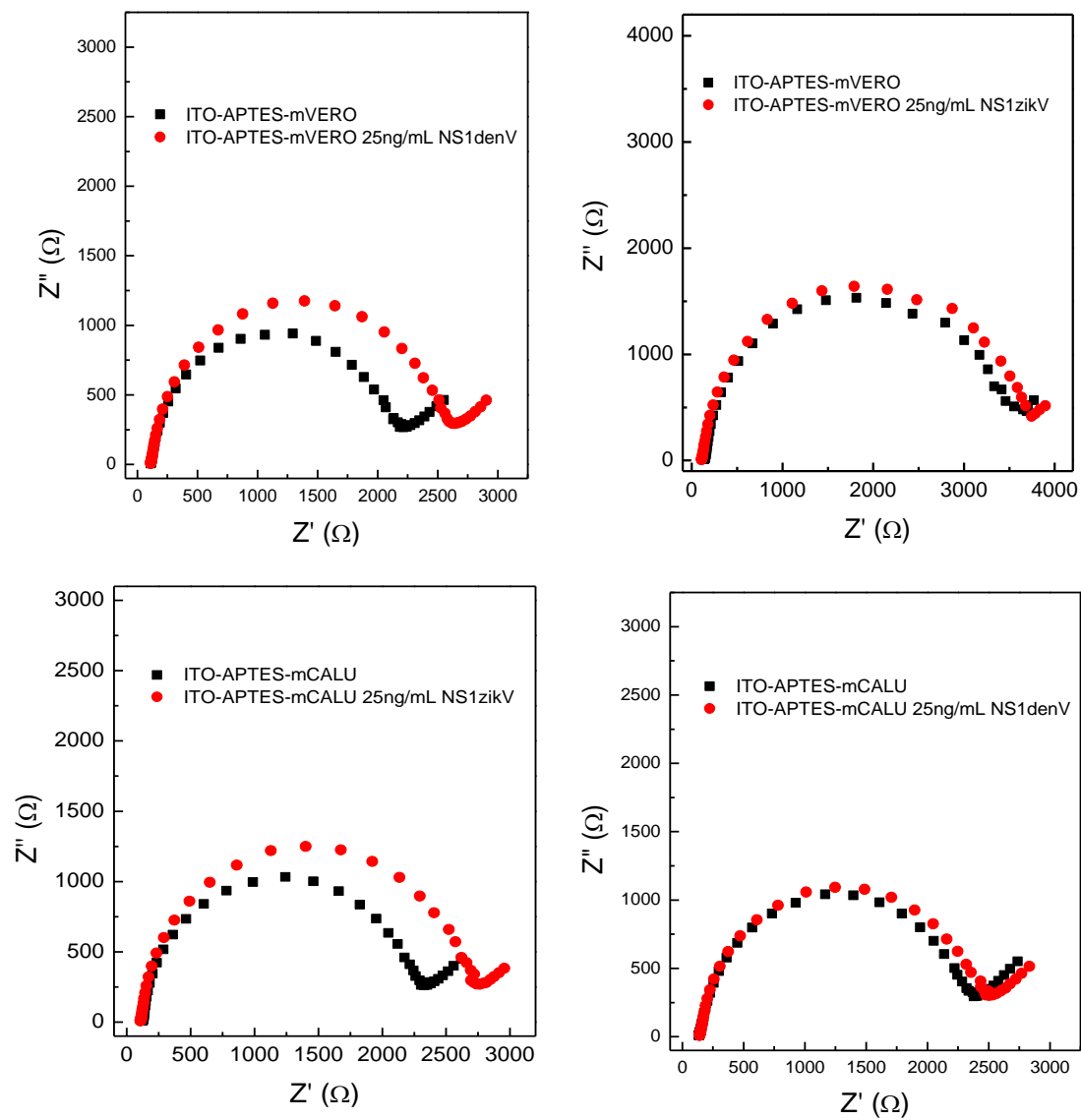


Figura 4

RESUMO

**PROCESSO PARA FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVO BIOCSENSOR,
DISPOSITIVO BIOCSENSOR E SEUS USOS**

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um sistema diagnóstico com alta seletividade e de baixo custo para o diagnóstico da SARS-CoV-2, baseado no reconhecimento da proteína *Spike* do vírus a receptores específicos presentes em membranas celulares de células alvo, e com diferenciação contra outros vírus, utilizando as propriedades únicas das membranas celulares combinadas com as propriedades catalíticas e de *point-of-care* de plataformas eletroquímicas. Assim, a presente invenção refere-se a um processo para fabricação de um dispositivo biossensor para SARS-CoV-2, bem como dispositivo biossensor para SARS-CoV-2 fabricado conforme o processo previamente descrito, compreendendo vesículas de membrana de células que superexpressam os receptores ACE-2, imobilizadas em plataforma condutora de um eletrodo de óxido de índio estanho (ITO), para leitura baseada na técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).