



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CAMPUS COLEMAR NATAL E SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

EDSON SILVIO BATISTA RODRIGUES

**Imunossensor impedimétrico para determinação de rituximabe
aplicado ao controle qualidade e monitoramento clínico**

**Goiânia
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

EDSON SILVIO BATISTA RODRIGUES

3. Título do trabalho

Imunossensor impedimétrico para determinação de rituximabe aplicado ao controle qualidade e monitoramento clínico

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 06/06/2023, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edson Silvio Batista Rodrigues, Discente**, em 09/06/2023, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3805213** e o código CRC **3E4B26F9**.

EDSON SILVIO BATISTA RODRIGUES

**Imunossensor impedimétrico para determinação de rituximabe
aplicado ao controle qualidade e monitoramento clínico**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de desenvolvimento farmacotécnico, analítico e avaliação biofarmacêutica de fármacos e medicamentos da Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Campus Colemar Natal e Silva para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Eric de Souza Gil
Co-orientador(a): Bruno Júnior Neves

**Goiânia
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rodrigues, Edson Silvio Batista

Imunossensor impedimétrico para determinação de rituximabe aplicado ao controle de qualidade e monitoramento clínico [manuscrito] / Edson Silvio Batista Rodrigues. - 2023.

LVIII, 58 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil; co-orientador Dr. Bruno Júnior Neves.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. imunoensaio. 2. proteína CD20. 3. espectroscopia de impedância eletroquímica. 4. monitoramento terapêutico de fármacos. 5. testes on-site. I. Gil, Eric de Souza, orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **124** da sessão de Defesa de Tese de **Edson Silvio Batista Rodrigues** que confere o título de Doutor em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **dez dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e três**, a partir das **08:00 horas**, na **sala de defesa da Faculdade de Farmácia/4º andar**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Imunossensor impedimétrico para determinação de rituximabe aplicado ao controle qualidade e monitoramento clínico”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Eric de Souza Gil (FF/UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professora Doutora Lívia Flório Sgobbi (IQ/UFG)**, membro titular externo; **Professora Doutora Valéria Christina de Rezende Feres (FF/UFG)**, membro titular externo; **Professor Doutor Álvaro Ferreira Júnior (EZV/UFG)**, membro titular externo; **Doutor Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto (FF/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Eric de Souza Gil (FF/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dez dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e três**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Eric De Souza Gil, Professor do Magistério Superior**, em 15/02/2023, às 09:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jerônimo Raimundo De Oliveira Neto, Técnico de Laboratório**, em 15/02/2023, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valéria Christina De Rezende Féres, Professora do Magistério Superior**, em 15/02/2023, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Álvaro Ferreira Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 16/02/2023, às 07:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lívia Flório Sgobbi, Professor do Magistério Superior**, em 16/02/2023, às 18:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3529998** e o código CRC **CF4EF9D2**.

Referência: Processo nº 23070.008210/2023-12

SEI nº 3529998



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CAMPUS COLEMAR NATAL E SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Eric de Souza Gil

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Stephania Fleury Taveira

**Goiânia-GO
2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CAMPUS COLEMAR NATAL E SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Edson Silvio Batista Rodrigues
Orientador(a): Eric de Souza Gil
Co-Orientador(a): Bruno Júnior Neves

Eric de Souza Gil / Presidente

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Lívia Flório Sgobbi / Membro Titular

Professora Adjunta do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

Valeria Christina De Rezende Feres/ Membro Titular

Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto / Membro Titular

Doutor em Inovação Farmacêutica pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal
de Goiás, FF/UFG.

Álvaro Ferreira Júnior / Membro Titular

Professor Titular da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás,
EZV/UFG.

Isabela Jubé Wastowski / Membro Suplente

Professora Titular da Faculdade Estadual de Goiás, UEG.

Guilherme Rocha Lino de Souza / Membro Suplente

Professor Associado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Goiás, FF/UFG.

Data: 10/02/2023

Dedico este trabalho a todo LAFAM em especial ao meu orientador e amigo Eric de Souza Gil, que teve a paciência e acreditou no meu trabalho, permitindo colher o resultado esperado e a minha esposa Giovanna pelo companheirismo em todos os momentos e etapas do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, responsável por tudo isso.

Aos meus pais, Edson e Sirlene, a minha irmã, Thaisa.

A minha esposa Giovanna, minha família e companheira, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis.

Ao professor Eric de Souza Gil, pela orientação e a amizade construída durante esse período.

A todo LAFAM.

Ítem	Assunto	Página
1	Introdução	17
2	Revisão bibliográfica	20
2.1	Rituximabe	20
2.2	Monitoramento terapêutico de fármacos	21
2.3	Controle de qualidade de medicamentos	21
2.4	Métodos eletroquímicos	22
2.4.1	Voltametria	23
2.4.1	Voltametria cíclica	24
2.4.2	Cronoamperometria	26
2.4.3	Espectroscopia de impedância eletroquímica	26
2.5	Imunoglobulina Y (IgY)	29
2.5.1	Purificação e caracterização de anticorpos IgY	30
2.6	Biossensores eletroquímicos	31
2.7	Imunossensores eletroquímicos	35
3	Objetivos	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	Materiais e métodos	38
4.1	Materiais e reagentes	38
4.2	Preparação do imunossensor	38
4.3	Ensaio eletroquímicos	39
4.4	Determinação do Rituximabe	39
4.5	Análises estatísticas	40
5	Publicações	41
6	Conclusão	50
7	Referências	51

TABELAS, FIGURAS, QUADROS E ANEXOS

Título	Página
Figura 1. Diagrama dos diferentes métodos eletroanalíticos e suas classificações.	23
Figura 2. Esquema ilustrativo de um sistema eletroquímico, composto de três eletrodos, eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA), acoplado a um galvanostato/potencioasto e um computador.	24
Figura 3. Variação do potencial em função do tempo (A) e voltamograma de uma voltametria cíclica (B).	25
Figura 4. Representação esquemática da interface eletrodo/solução, contendo a dupla camada elétrica dividida em dois planos, plano interno e plano externo de Helmholtz.	27
Figura 5. Representação gráfica de uma plotagem de Nyquist.	28
Figura 6. Circuito equivalente de Randles.	29
Figura 7. Sistema de ligação de um biorreceptor e transdutor eletroquímico.	31
Quadro 1: Revisão de literatura de aplicações de biossensores abordando diferentes alvos e técnicas eletroquímicas.	33

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
CQ	Controle de qualidade
CV	Voltametria cíclica
E	Potencial
EA	Eletrodo auxiliar
EIS	Espectroscopia de impedância
E_{pa}	Potencial do pico anódico
E_{pc}	Potencial do pico catódico
ER	Eletrodo de referência
ESM	Monitoramento de estabilidade estendida
ET	Eletrodo de trabalho
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
^A GCE	Eletrodo de carbono vítreo ativado
^A GCE/Ab	Eletrodo de carbono vítreo ativado com anticorpo
^A GCE/Ab ^{CAS}	Eletrodo de carbono vítreo ativado com anticorpo e caseína
DPR	Desvio padrão relativo
I	Corrente
INT	Interfaciais
I_p	Intensidade do Pico
I_{pa}	Intensidade do pico anódico
I_{pc}	Intensidade do pico catódico
LOD	Limite de de detecção
LOQ	Limite de quantificação
mAbs	Anticorpos monoclonais
N-INT	Não interfaciais
OMS	Organização mundial de saúde
pAb	Anticorpo policlonal
POC	<i>Point-of-care</i>
r	Coefficiente de correlação linear
Rct	Resistência ao transporte de cargas
RTX	Rituximabe
TDM	Monitoramento terapêutico de fármacos

Imunossensor impedimétrico para determinação de rituximabe aplicado ao controle de qualidade e monitoramento clínico

RESUMO

Introdução: Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. O Rituximabe (RTX) é um anticorpo monoclonal (mAb) químero formado pela combinação camundongo/humano, que se liga especificamente ao marcador da célula CD20 que é expresso em linfócitos B normais e malignos, exercendo atividade antitumoral significativa. Nesse contexto o RTX surgiu como alternativa terapêutica no tratamento de várias patologias, incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias e diversos tipos de câncer no qual é necessário métodos sensíveis e de baixo custo para o monitoramento terapêutico de fármacos (TDM) e controle de qualidade (CQ) desse medicamento. **Objetivo:** Desenvolver um imunossensor eletroquímico seletivo para a detecção e quantificação de RTX na urina e sangue. **Metodologia:** O anticorpo policlonal (pAb) foi purificado a partir de ovo de galinha, usado como elemento de bioreconhecimento para criar um imunossensor para a detecção e quantificação de RTX. O imunossensor foi construído a partir da imobilização do anticorpo IgY de RTX nas superfícies do eletrodo de carbono vítreo. A caracterização do imunossensor foi obtida através do monitoramento em cada etapa via voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, onde a seletividade é obtida pela ligação específica em o pAb e o RTX e a caseína é utilizada para bloquear possíveis interações inespecíficas de outras proteínas. Após o desenvolvimento do imunossensor foi realizada a validação do método, avaliando a seletividade, exatidão, precisão, linearidade e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Por fim foi determinado o RTX em amostras de urina e sangue. **Resultados e discussões:** Foi demonstrado a linearidade entre a resistência de transferência de carga e RTX de 2 a 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (r^2 de 0,99), com LOD e LOQ de 130 e 400 ng mL^{-1} respectivamente. O método apresentou precisão adequada com DPR de 0,96% para o pesquisador 1 e 1,27% para o pesquisador 2, e exatidão com DPR de 1,30%, com um intervalo de confiança entre 99,0% a 101,0%. A seletividade foi alcançada demonstrando a especificidade da ligação entre o anticorpo e o RTX, onde a caseína bloqueia ligações inespecíficas quando o imunossensor é aplicado em amostras de sangue e urina. **Conclusões:** O imunossensor desenvolvido apresentou precisão e exatidão para a detecção de RTX com resultados em aproximadamente 20 minutos. Dessa forma imunossensores eletroquímicos de baixo custo, com marcadores e sensíveis podem auxiliar no TDM, CQ e monitoramento de estabilidade estendida de diferentes medicamentos, de maneira simples e com ensaios versáteis.

Palavras-Chave: imunoensaio, proteína CD20, espectroscopia de impedância eletroquímica, monitoramento terapêutico de fármacos, testes *on-site*

Agradecimentos: LAFAM, IMTEK, CNPq e FAPEG.

Impedimetric immunosensor for rituximab experience applied to quality control and clinical monitoring**ABSTRACT**

Introduction: Cancer is an umbrella term for a large group of diseases that can affect any part of the body. Rituximab (RTX) is a chimeric monoclonal antibody (mAb) formed by the mouse/human combination, which specifically binds to the CD20 cell marker that is expressed in normal and malignant B lymphocytes, exerting significant antitumor activity. In this context, RTX emerged as a therapeutic alternative in the treatment of various pathologies, including autoimmune diseases, inflammatory diseases and various types of cancer in which sensitive and low-cost methods are required for therapeutic drug monitoring (TDM) and quality control (QC) of this drug. **Objectives:** To develop a selective electrochemical immunosensor for the detection and quantification of RTX in urine and blood. **Methodology:** The polyclonal antibody (pAb) was purified from chicken egg, used as a biorecognition element to create an immunosensor for the detection and quantification of RTX. The immunosensor was constructed from the immobilization of the RTX IgY antibody on the glassy carbon electrode surfaces. The characterization of the immunosensor was obtained through monitoring at each stage via cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, where selectivity is obtained by specifically binding pAb and RTX and casein is used to block possible nonspecific interactions of other proteins. After the development of the immunosensor, the validation of the method was carried out, evaluating the selectivity, accuracy, precision, linearity and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Finally, the RTX was determined in urine and blood samples. **Results and discussion:** Linearity was demonstrated between charge transfer resistance and RTX from 2 to 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (r^2 of 0.99), with LOD and LOQ of 130 and 400 ng mL^{-1} respectively. The method showed adequate precision with a RPD of 0.96% for researcher 1 and 1.27% for researcher 2, and accuracy with a RPD of 1.30%, with a confidence interval between 99.0% and 101.0 %. Selectivity was achieved by demonstrating the binding specificity between the antibody and RTX, where casein blocks non-specific binding when the immunosensor is applied to blood and urine samples. **Conclusion:** The developed immunosensor presented precision and accuracy for the detection of RTX with results in approximately 20 minutes. In this way, low-cost, marker-sensitive electrochemical immunosensors can help in TDM, QC and extended stability monitoring of different drugs, in a simple way and with versatile assays.

Keywords: immunoassay, CD20 protein, electrochemical impedance spectroscopy, therapeutic drug monitoring, *on-site* testing

Acknowledgements: LAFAM, IMTEK, CNPq e FAPEG.

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica que define o câncer é a rápida criação de células anormais que crescem além de seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, processo referido como metástase. A metástase é a principal causa de morte por câncer. (ALMEIDA et al., 2005).

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento na ocorrência de diagnósticos de câncer pelo mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve que o câncer é a segunda principal causa de morte na escala global, sendo responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2018, onde estima-se que uma a cada seis mortes são devidas ao câncer (OMS, 2021). O crescimento da incidência global do câncer está relacionado ao envelhecimento da população, obesidade, qualidade alimentar inadequada, sedentarismo, tabagismo e etilismo (OMS, 2021).

Atualmente o tratamento contra o câncer pode ser abordado de diferentes formas, sendo elas os procedimentos cirúrgicos, radioterapias e terapias sistemáticas. A abordagem invasiva em procedimentos cirúrgicos é considerada em estágios iniciais da doença, avaliando o risco ao paciente, mas em grande parte dos casos é realizado o tratamento com fármacos ou combinação entre as abordagens no tratamento. Em relação as terapias sistemáticas elas são definidas em quatro grupos sendo eles a terapia hormonal, terapia direcionada, imunoterapia e quimioterapia (DICKENS, E.; AHMED, S, 2018; FERNANDO; JONES, 2015).

Séculos atrás, o grande Paul Ehrlich, previa que os anticorpos monoclonais (mAbs) seriam o grande avanço da terapêutica moderna (STREBHARDT E ULLRICH, 2008). Nas últimas duas décadas, a teoria de Ehrlich tornou-se realidade e apesar do alto custo, os mAbs têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças alérgicas (CHEN ET AL., 2021) autoimunes e inflamatórias (ANDREAKOS, 2002). Além disso, os medicamentos mAbs trouxeram uma nova esperança para o combate ao câncer (SI, 2021). Portanto a imunoterapia consolidou-se como um dos pilares terapêuticos antineoplásicos na última década (WAINSTEIN, 2017; WEINER, 2010).

Nesse contexto, o rituximabe (RTX) é classificado com um anticorpo monoclonal (mAb) quimérico (combinação da região variável do anticorpo de camundongo com a

região constante do anticorpo humano), surgindo como alternativa terapêutica no tratamento de várias doenças, incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias e diversos tipos de câncer (ELTAHIRA, 2021; ATES et al., 2020; ROSMALEN et al., 2018; JACOBS et al., 2017; HONG et al., 2012). No entanto, a farmacocinética e a resposta clínica resultante dos mAbs são altamente variáveis e são afetadas por fatores multifatoriais como comorbidade, idade, sexo, dieta e genética familiar. Portanto, a utilização de dosagem personalizada para cada paciente com monitoramento terapêutico do RTX pode melhorar os resultados do paciente e reduzir os custos em saúde (CHEN et al., 2021; TRABIK, 2020; NAVAS et al., 2013). A posologia padrão para RTX é de 375 mg m⁻², que é administrada por meio de infusões intravenosas. O ciclo pode ser repetido de acordo com o regime de tratamento, enquanto que, devido à finalidade terapêutica e depuração, a concentração plasmática pode variar amplamente de 10 a 400 mg mL⁻¹. (ELTAHIRA, 2021).

O monitoramento terapêutico de fármacos (TDM), especificamente para o RTX, requer técnicas com alta seletividade e sensibilidade, como cromatografia e imunoensaios, uma vez que os mAb que são moléculas grandes com alto peso molecular e com baixa dosagem clínica. Estes requerem um laboratório bem equipado, possuem alto custo em relação a equipamentos e reagentes utilizados e pessoas bem qualificadas na execução dos ensaios (NAVAS et al., 2013).

Uma alternativa bastante atrativa para abordagens do TDM e controle de qualidade (CQ) é a eletroanálise, uma vez que é de fácil aplicação analítica e miniaturização do sistema para aplicações em análises tipo *point-of-care* (POC). Além disso, a eletroanálise oferece a possibilidade de combinar simplicidade, tempo de análise com precisão e sensibilidade adequadas (HAMPSON ET al., 2010; FELIX E ANGNES, 2018; GU et al., 2019; AFKHAMI et al., 2017; PAULY et al., 2011; ATES et al., 2021). Ademais, em relação aos mAbs, os imunossensores se destacam como sistemas de detecção altamente específicos, podendo ser facilmente acoplados a transdutores eletroquímicos (FELIX E ANGNES, 2018; GU et al., 2019; AFKHAMI et al., 2017; PAULY et al., 2011). Nesse contexto a espectroscopia de impedância (EIS) é uma das abordagens mais convenientes para monitorar imunocomplexos após eventos de bioreconhecimento, oferecendo um método não destrutivo juntamente com detecção sem marcadores (GU et al., 2019; AFKHAMI et al., 2017; PAULY et al., 2011).

No presente trabalho, foi desenvolvido e testado um imunossensor impedimétrico para a quantificação *in loco* e de baixo custo de RTX em amostras biológicas humanas não invasivas (urina) e invasivas (soro sanguíneo) para aplicações de TDM, controle de

qualidade (CQ), monitoramento de estabilidade estendida (ESM). Dessa forma, o reconhecimento de RTX foi alcançado por um anticorpo policlonal (pAb) contra RTX imobilizado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) oxidado, utilizando ferrocianeto de potássio como sonda redox.

2.1 RITUXIMABE

O RTX é um mAb quimérico IgG1, formado pela combinação camundongo/humano, que se liga especificamente ao marcador da célula CD20 que é expresso em linfócitos B normais e malignos. O CD20 é uma fosfoproteína transmembrana que é expressa na superfície de quase todas as células B, assim como em 40-50% dos blastos na leucemia linfoblástica aguda de células B precursora e na maioria dos blastos na leucemia linfoblástica aguda B matura (80-90%) (ELTAHIRA, 2021; PUI, JEHA, 2007; GOKBUGET, HOELZER 2004). O fármaco foi aprovado para uso e comercialização em 1997 pela *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos da América, com indicação descrita em bula para o tratamento de linfoma não Hodgkin, leucemia linfóide crônica, artrite reumatoide, granulomatose de Wegener e poliangite microscópica (RODRIGUES, LIMA, DE DOMENICO, 2022; ELTAHIRA, 2021; PUI, JEHA, 2007). Nesse contexto o RTX surgiu como alternativa terapêutica no tratamento de várias patologias, incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias e diversos tipos de câncer (ELTAHIRA, 2021; ATES et al., 2020; ROSMALEN et al., 2018; JACOBS et al., 2017; HONG et al., 2012).

A farmacocinética dos mAbs possuem grande variação devido as características específicas de cada paciente. Portanto fatores multifatoriais como comorbidade, idade, sexo, dieta e genética de cada paciente influenciam na resposta clínica dos mAbs durante o tratamento. Nesse contexto é aplicado o uso de dosagem personalizada em cada paciente, isso por meio do monitoramento terapêutico de fármacos (TDM), dessa forma é possível melhorar os resultados obtidos pelo paciente durante a terapia com o RTX, de forma assertiva e reduzindo custos (CHEN et al., 2021; TRABIK, 2020; NAVAS et al., 2013). A posologia padrão para RTX é de 375 mg m⁻², sua administração é realizada por meio de infusões intravenosas. O ciclo pode ser repetido de acordo com o regime de tratamento e de acordo com o quadro de cada indivíduo, onde a concentração plasmática do RTX pode variar de 10 a 400 mg mL⁻¹ (ELTAHIRA, 2021).

O TDM, especificamente do RTX, requer técnicas com alta seletividade e sensibilidade, como cromatografia líquida por exclusão e imunoenaios para o acompanhamento e assertividade durante a terapia, uma vez que por se tratar de um mAb, que são moléculas grandes e com baixa dosagem clínica, essa podendo ser de forma personalizada ao paciente.

2.2 MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS

O TDM descreve uma abordagem importante para a medicina personalizada, que permite durante a abordagem clínica a individualização medicamentosa durante um tratamento específico, controlando a dosagem do fármaco, de modo a atingir a concentração ideal do medicamento, garantindo o resultado terapêutico desejado. Não obstante o TDM reduz o risco de efeitos adversos com relação a dosagem administrada nos pacientes, onde esses riscos são avaliados de forma individual e personalizada (ZHANG, ZHANG, 2017; FREUDENBERGER, GAUGLITZ, 2016).

Novas tecnologias abordam o TDM em vários estudos que visam medir de forma sistêmica as concentrações de medicamentos e sua relação com a eficácia terapêutica e suas reações adversas. Esses estudos apresentam dados que corroboram na terapia individual dos pacientes, onde é realizado a avaliação do fármaco dentro de um intervalo terapêutico de baixo range ou crítico em sua ação farmacológica. Dessa forma, esse tipo de abordagem tem como objetivo reduzir os intervalos entre a coleta de dados de estudos iniciais de respostas a fármacos em condições experimentais e em administrações em casos clínicos (CREMERS, GUHA, SHINE, 2016; ZHANG, ZHANG, 2017).

Para a aplicação do TDM os fármacos devem seguir alguns critérios durante sua aplicação, onde obrigatoriamente deve existir uma relação entre a dose do fármaco e concentração sanguínea e entre a concentração sanguínea e o efeito terapêutico do fármaco, um índice terapêutico estreito, variabilidade farmacocinética interindividual ou uma relação ruim entre a dose e a resposta ao medicamento, a resposta farmacológica deve ter difícil avaliação e se diferenciar dos efeitos adversos (ZHANG, ZHANG, 2017; FREUDENBERGER, GAUGLITZ, 2016).

Por fim, o objetivo do TDM é individualizar a terapia de medicamentos de difícil administração, assumindo conhecimento sobre farmacocinética e farmacodinâmica, otimizando o resultado clínico (CREMERS, GUHA, SHINE, 2016).

2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

O controle de qualidade de medicamentos é imprescindível para a liberação dos insumos farmacêuticos ativos e produtos acabados na indústria farmacêutica e também durante o TDM. Portanto é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação de fármacos, para garantir a eficácia e segurança dos mesmos. Não obstante

alguns parâmetros devem ser seguidos durante o desenvolvimento e a etapa de validação do método seguindo as diretrizes guias e legislações vigentes (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

A RDC nº 166 de 2017 dispõe sobre a validação de métodos analíticos, onde o objetivo é demonstrar parâmetros que garantam resultados confiáveis, sendo adequado à finalidade proposta, de forma documentada e mediante critérios objetivos. O processo de validação consiste em analisar e verificar alguns parâmetros, sendo eles seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2017).

No presente trabalho, foi desenvolvido e testado um imunossensor impedimétrico para a quantificação no local e de baixo custo de RTX em amostras biológicas humanas não invasivas (urina) e invasivas (soro sanguíneo) para aplicações de TDM, CQ e ESM, seguindo as diretrizes aplicadas no desenvolvimento e validação de métodos analíticos (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

2.4 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

Os métodos eletroquímicos são capazes de determinar propriedades cinéticas e termodinâmicas, as quais são avaliadas por fenômenos interfaciais redutivos e oxidativos (redox). Portanto é possível quantificar e caracterizar o comportamento físico-químico de diferentes compostos. Nesse contexto, processos redox podem ser usados para a elucidação e quantificação fármacos, auxiliando no controle de qualidade de medicamentos. (RODRIGUES et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021).

A aplicação de ferramentas eletroquímicas é possível em diferentes sistemas, os quais podem ser classificados em interfaciais (INT) ou não interfaciais (N-INT). Aqueles cujo sistema envolve a presença de um contato entre eletrodo/solução, *i.e.* INT, podem ser divididos de acordo com a mobilidade do ambiente analítico *e.g.* estático ou dinâmico. Nos sistemas onde não há interface entre eletrodo/solução, *i.e.* N-INT, é empregada a condutometria (BRETT e BRETT, 1996; SERRANO, MACHADO & GIL, 2010). Na figura 1 estão descritos os métodos eletroanalíticos com suas respectivas classificações.

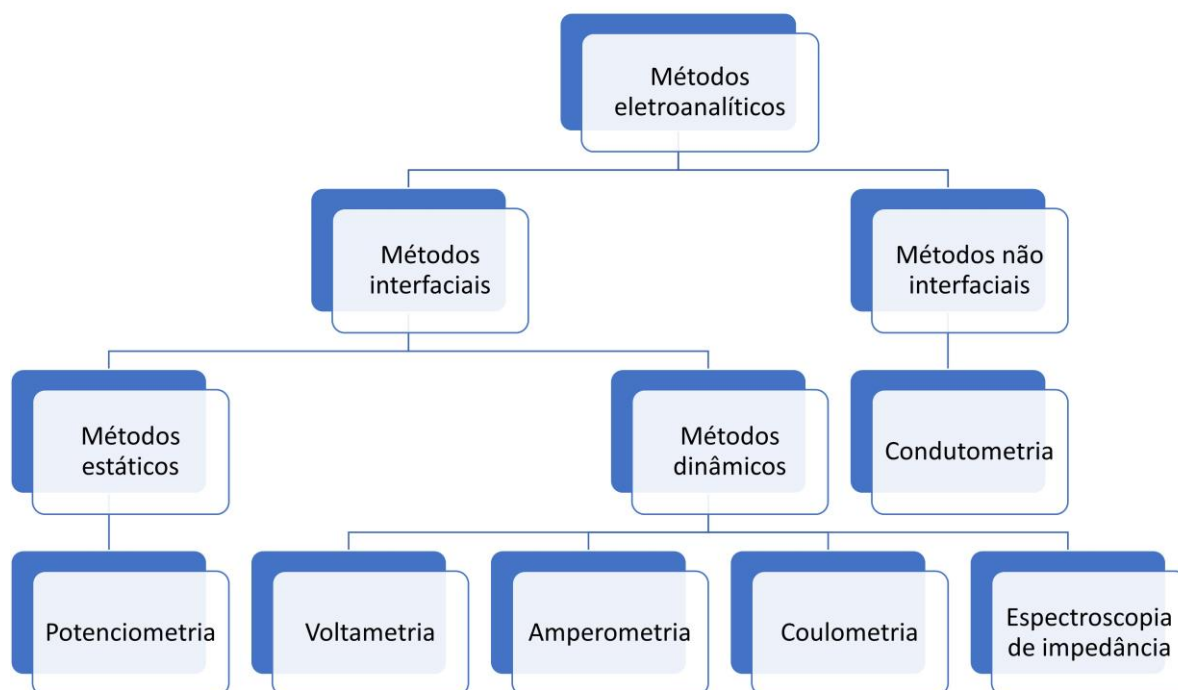


Figura 1. Diagrama dos diferentes métodos eletroanalíticos e suas classificações.

Fonte: Adaptado de Skoog, Holler e Crouch (2009).

Considerando as ferramentas INT, e suas respectivas divisões quanto à mobilidade do sistema, sabe-se que aqueles estáticos envolvem a potenciometria, enquanto que os dinâmicos envolvem voltametria, coulometria e amperometria. No tocante à aplicabilidade desses métodos, os sistemas estáticos não dependem da aplicação de um distúrbio no ambiente experimental, enquanto os sistemas dinâmicos dependem da aplicação desse distúrbio (SKOOG, HOLLER & CROUCH, 2009).

Apesar dos métodos eletroquímicos disponíveis para a caracterização dos processos redox e determinação de fármacos, a voltametria é uma das principais técnicas para esse estudo. Essa ferramenta permite a aquisição de informações sobre a termodinâmica e a cinética reacional de moléculas eletroativas, o que a torna ideal para estudos de TDM e CQ de medicamentos (PACHECO et al., 2013).

2.4.1 VOLTAMETRIAS

As técnicas voltamétricas baseiam-se na perturbação do sistema, aplicando-se um potencial, no qual são obtidas informações sobre o composto em estudo pela amplitude da corrente elétrica, que representa o parâmetro cinético e o valor do potencial aplicado, que representa a termodinâmica do sistema. Essa metodologia é facilmente aplicável por meio de um potenciostato/galvanostato, cujo principal sistema consiste em uma célula

eletroquímica acoplada à um sistema tri-eletródico (BRETT e BRETT, 1996; PACHECO et al., 2013). A figura 2 apresenta um sistema eletroquímico para a operação de voltametrias.

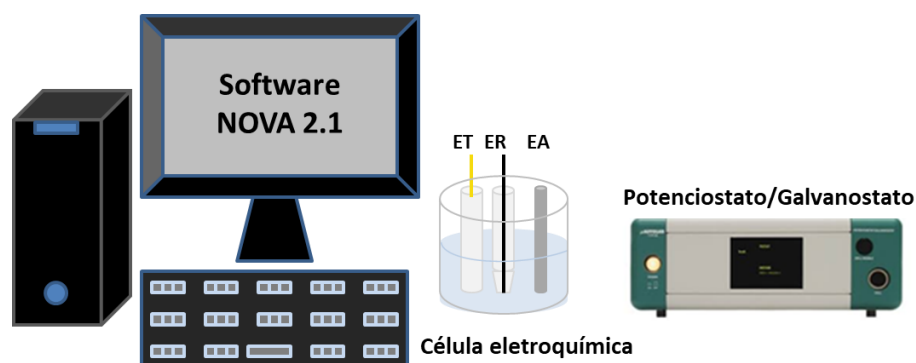


Figura 2. Esquema ilustrativo de um sistema eletroquímico, composto de três eletrodos, eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA), acoplado a um galvanostato/potenciostato e um computador.

Fonte: Autor

O eletrodo de referência (ER) é utilizado para dar uma medida de potencial absoluto ao qual os demais eletrodos possam ser comparados. Um bom ER precisa ter potencial estável na presença de mudanças físico-químicas do sistema. ER comumente utilizados nas técnicas voltamétricas são: eletrodos de hidrogênio, calomelano saturado e Ag/AgCl (BRETT e BRETT, 1996). O eletrodo auxiliar (EA) composto por fio de platina tem como objetivo diminuir o ruído durante a análise, retirando o excesso de carga gerada pela passagem de corrente decorrida dos processos de oxirredução. E por último, o eletrodo de trabalho (ET), é responsável por medir a corrente devido às trocas eletrônicas com o analito em sua superfície (SERRANO, MACHADO & GIL, 2010).

2.4.1.1 VOLTAMETRIA CICLICA

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas mais utilizadas na caracterização eletroquímica. Essa técnica permite uma primeira avaliação no comportamento termodinâmico e cinético de processos redox. A CV é uma técnica onde é determinada a corrente em um sistema eletroquímico, de acordo com a varredura linear de potencial, em ciclos e velocidade pré-determinados (PACHECO *et al.*, 2013). É realizada uma varredura de potencial completa nos dois sentidos, sendo eles crescente, decrescente ou vice-

versa. Os pontos de corrente são uma função do potencial, sendo descritos tal como na equação abaixo (equação 1):

$$I = f(E) \quad (1)$$

Na qual: I é a corrente em amperes e E é o potencial em volts.

Devido o surgimento de dupla camada elétrica na superfície do eletrodo por polarização, independente da presença do analito, há aumento da corrente-base. Essa corrente é denominada corrente capacitiva, em função da formação de um pseudo-capacitor na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1996).

Em uma análise de CV o pico gerado quando a varredura é realizada de forma positiva é denominado de pico anódico I_{pa} , relacionado a oxidação do composto, em um voltamograma é simbolizado pelo número ordinal do pico e a letra a. O pico gerado em uma CV com sentido negativo é denominado de pico catódico I_{pc} , relacionado a redução do composto, em um voltamograma é simbolizado pelo número ordinal e a letra c (Figura 3B) (PACHECO et al., 2013). Abaixo, segue um exemplo da representação gráfica da função dada pela equação 1, assim como de uma CV de um sistema reversível (Figura 3).

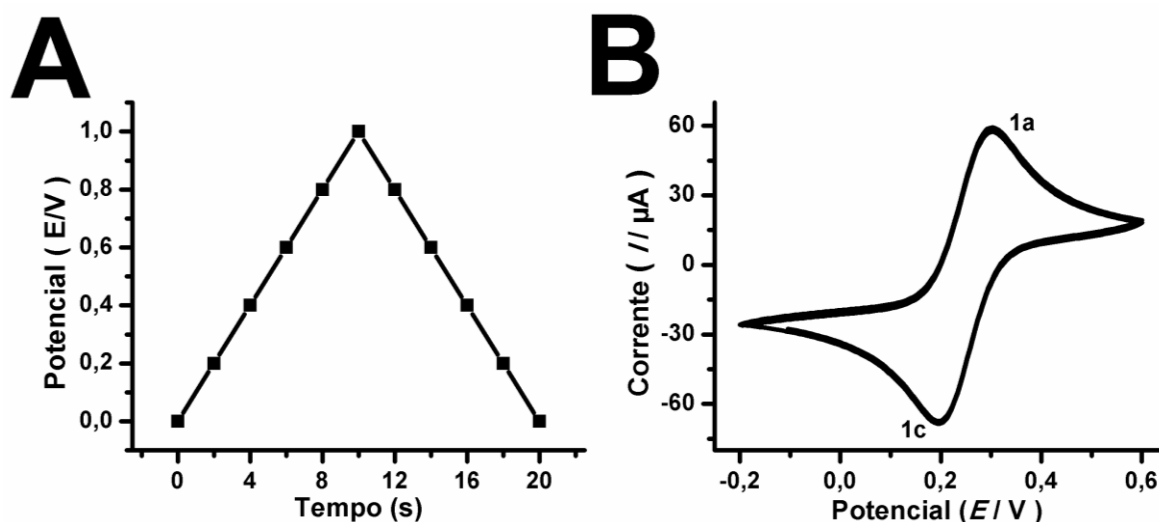


Figura 3. Variação do potencial em função do tempo (A) e voltamograma de uma voltametria cíclica (B).

Fonte: Autor.

Nesta técnica se avalia a reversibilidade dos processos redox, pela comparação da intensidade dos picos anódicos e catódico, uma vez que para reações envolvendo 1 próton e 1 elétron as diferenças de potenciais são de aproximadamente 59 mV (reações reversíveis). Quando temos um aumento da corrente anódica com perda de corrente

catódica, e vice-versa considerando o sentido, a reação é classificada em quasi-reversível, já quando a diferença de correntes é muito elevada, o processo é então denominado irreversível (BRETT e BRETT, 1996).

Por meio da CV é possível observar se o processo eletroquímico é controlado por adsorção ou difusão. Portanto o ensaio é realizado em diferentes velocidades de varredura, enquanto os outros parâmetros são constantes, assim correlaciona-se a intensidade do pico (I_p) anódico ou catódico com a velocidade de varredura (v). A relação entre I_p vs. v é expressa por meio de regressão linear, onde o coeficiente de correlação linear (r) quando *c.a.* 0,99 é aceito como satisfatório. Quando o valor de correlação linear é próximo de 1 para I_p vs. v , o processo da reação é controlado por adsorção. Entretanto, se a linearidade for observada apenas na correlação I_p vs. $v^{1/2}$ o processo reativo é controlado por difusão (PACHECO *et al.*, 2013; LUÍS, RODRIGUES *et al.*, 2019).

2.4.2 CRONOAMPEROMETRIA

A amperometria é uma técnica na qual um potencial específico é escolhido, normalmente o potencial onde o pico do analito é evidenciado, e este potencial é mantido constante durante o ensaio, diferentemente da voltametria em que o potencial é variado. Esta técnica pode ser empregada após ensaio voltamétrico, pois, a varredura de potencial evidencia o valor de E em que o processo faradaico ocorre para o analito de interesse, e assim, este valor de potencial específico pode ser fixado em um ensaio amperométrico subsequente (BRETT e BRETT, 1996).

No ensaio amperométrico, uma corrente basal é observada em determinado potencial fixo no qual apenas o solvente e o eletrólito inerte estão presentes na célula eletroquímica (BRETT e BRETT, 1996). A partir de então, alíquotas diferentes de uma mesma solução estoque são adicionadas periodicamente. Dessa forma a cronoamperometria pode ser aplicada na quantificação de fármacos e em auxílio a caracterização e preparação de eletrodos modificados.

2.4.3 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELETROQUIMICA

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) é baseada nas propriedades elétricas e eletródicas do sistema estudado. Portanto, a EIS pode ser aplicada em matrizes com diversas funções para o estudo de seus comportamentos, por meio da aplicação de distúrbios em um sistema eletroquímico fechado (TSAI e SUN, 2013; ZHAO

et al., 2017). De maneira geral, a EIS é realizada a partir da perturbação de um sistema eletroquímico por meio de um distúrbio contínuo e não variável em sua termodinâmica. O sistema de EIS é constituído por três eletrodos, assim como eletrólito suporte, sendo esse último utilizado para promover a formação de uma interface eletrodo-solução, a qual compreende a dupla camada elétrica (figura 4).

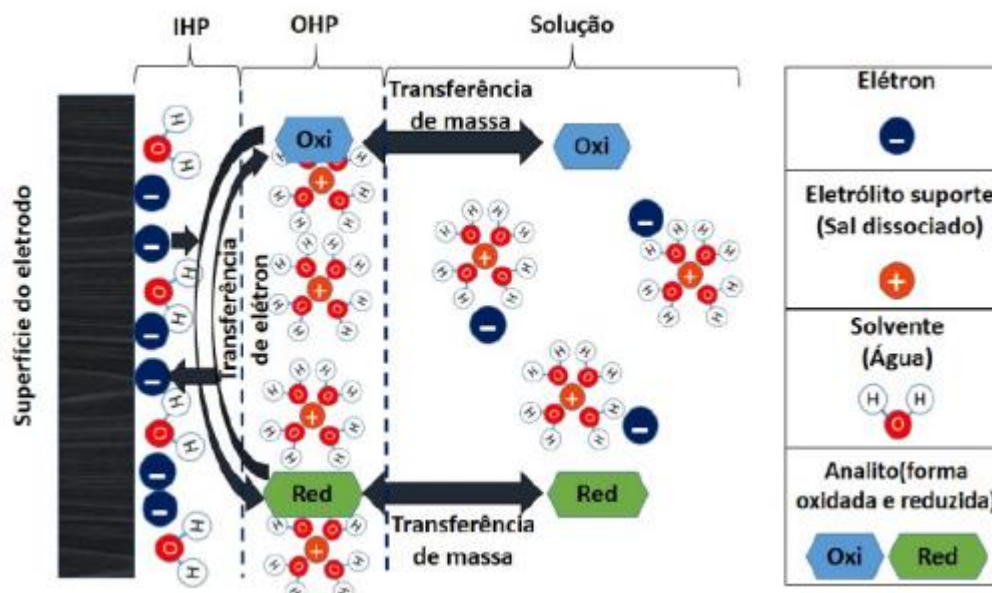


Figura 4. Representação esquemática da interface eletrodo/solução, contendo a dupla camada elétrica dividida em dois planos, plano interno e plano externo de Helmholtz.

Fonte: MACÊDO, 2017.

A interface eletrodo-solução de um sistema eletroquímico permite através da EIS o estudo de propriedades elétricas geradas do sistema, mesmo que essas não sejam espécies eletroativas. Dessa forma a EIS utiliza a aplicação de sinais com pequenas variações periódicas de corrente alternada em diferentes faixas de frequências possibilitando a caracterização de processos eletroquímicos e de interfaces complexas em todo sistema eletroquímico (LASIA, 2002; CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006; HAN et al., 2016).

Os cálculos para a obtenção de dados por EIS assumem valores irracionais, a plotagem dos dados é realizada em um plano complexo. Utiliza-se, portanto, a abordagem de Nyquist e a plotagem de Bode que são a correlação entre a parte real e a parte imaginária da impedância, descrevendo a variação da impedância total e o ângulo de fase dos vetores descritores e a frequência de oscilação (FRANCESCO, 2019; GAMRY, 2019). A representação gráfica da impedância por Nyquist é apresentada na Figura 5.

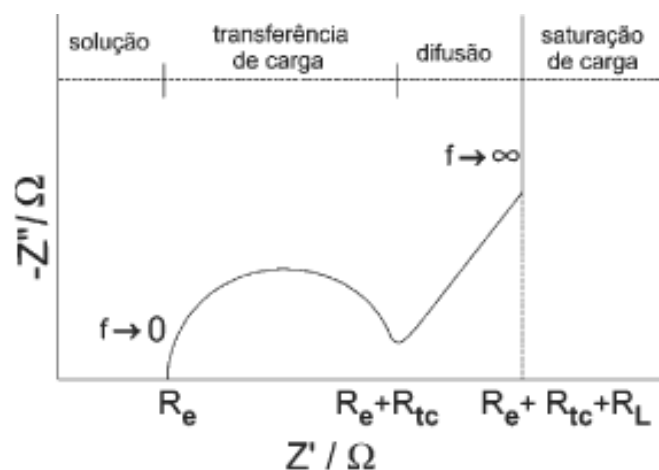


Figura 5. Representação gráfica de uma plotagem de Nyquist, evidenciando os pontos da plotagem condicionados por controle cinético e fenômenos de transporte de massas.

Fonte: Adaptado de DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006.

A avaliação da plotagem de Nyquist permite analisar o diâmetro do semicírculo da impedância, que está localizado em regiões de alta frequência, no eixo das abscissas (impedância real; Z'). Esse parâmetro se correlaciona com as resistências associadas ao circuito (ZHAO et al., 2017; GAMRY, 2019). Assim, o início do semicírculo no eixo das abscissas se correlaciona com a resistência da solução (R_s), enquanto o final do semicírculo se correlaciona à resistência a transferência de cargas na superfície do eletrodo (R_{ct}). Visto que o eletrodo é analisado em solução, e sua impedância é calculada na interface, a dupla camada comporta-se nesse caso como um capacitor enquanto que o transporte de massa por difusão na solução é representado pelo elemento de Warburg (W) (FRANCESCO, 2019; EASTON et al., 2020). Esse circuito simplificado é denominado circuito equivalente de Randles (Figura 6).

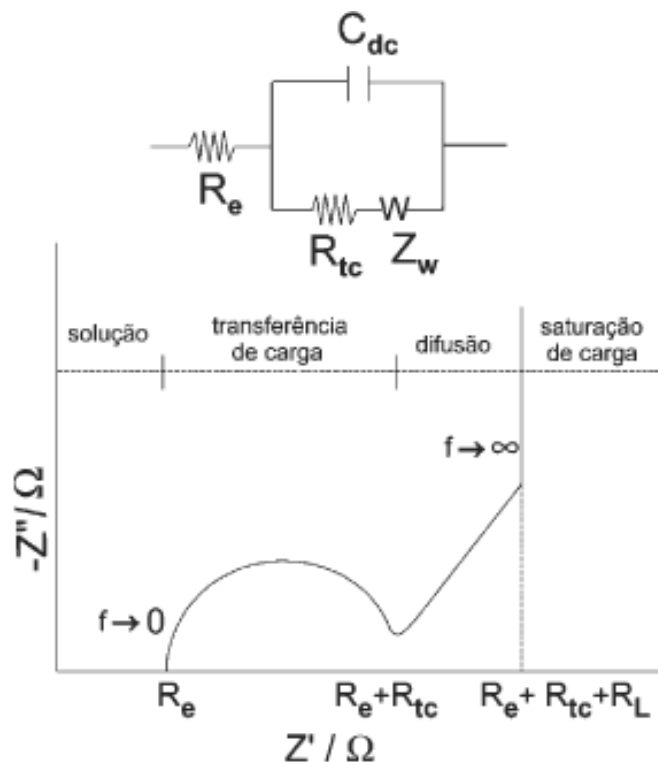


Figura 6. Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa.

Fonte: DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006.

Atualmente a EIS vem sendo muito utilizada como forma de caracterização da interação entre eletrodos quimicamente modificados com a solução, avaliando a transferência de carga nesta interface como forma de compreender a contribuição dos modificadores aplicados à resposta geral do sensor. A resposta é medida e definida com alguns parâmetros dos elementos do circuito, por exemplo, resistência ao transporte de cargas (R_{ct}), onde é possível a quantificação de analitos biológicos através da interação entre o analito e a superfície do eletrodo, em que existem grupos imobilizados que se ligam seletivamente.

2.5 IMUNOGLOBULINA Y (IgY)

Os anticorpos são proteínas capazes de reconhecerem marcadores de moléculas com alta seletividade e especificidade, essa função é considerada uma ferramenta indispensável em laboratórios de diagnósticos, onde são utilizados na pesquisa de novos métodos para diagnósticos, terapias e vacinas. A imunoglobulina Y (IgY) é uma molécula que apresenta elevada especificidade para a ligação e intivação de algumas substâncias,

como moléculas tóxicas ou antigênos, estes capazes de invadir o corpo (CHALGHOUMI et al., 2009).

Klemperer, há mais de um século, fez o primeiro estudo com a presença de anticorpos na gema do ovo de galinha. Durante a folículogênese esses anticorpos são transferidos do sangue da galinha para a gema do ovo, com o objetivo de imunizar o descendente. Não obstante a denominação IgY é descrita pela imunoglobulina da gema do ovo (Y = yolk).

Os anticorpos aviários são divididos em três isotipos sendo eles, IgY, IgM e IgA, onde a IgY é a imunoglobulina mais abundante no soro de aves, contudo as imunoglobulinas podem ser isoladas também de anfíbios e répteis, apresentando o isotipo equivalente a função IgG nos mamíferos, apesar da IgA e IgM serem homólogas as de mamíferos (DIAS DA SILVA, TAMBOURGI, 2010).

A estrutura geral do IgY é semelhante a IgG de mamíferos, com duas cadeias pesadas e leves, no entanto são divergentes em suas características bioquímicas e funções imunológicas que se devem a sequência de aminoácidos e diferenças estruturais (ZHANG, 2003 ; KARLSSON et al., 2004). A IgY apresenta massa molecular por volta de 180 kDa, sendo mais pesada que a IgG de mamíferos (Aproximadamente 150 kDa) (SIMIZU et al., 1993).

2.5.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS IgY

Os métodos para purificação dos anticorpos IgY da gema do ovo, removem contaminantes, devem conservar as funções dos anticorpos extraídos, ser um protocolo de baixo custo e não exige equipamentos sofisticados para sua condução (FERREIRA JUNIOR et al., 2012). A escolha de um método é influenciada pela escala de purificação, impacto sobre o meio ambiente e minimizar as quantidades de resíduos (SCHADE et al., 2005). Em geral, os métodos podem ser divididos em três grupos principais: (i) precipitação por meio de ajuste do ponto isoelétrico, por exemplo, pela adição de ácido clorídrico (HCl); (ii) precipitação por meio remoção da camada de solvatação (*salting out*), por exemplo, pela adição de sulfato de sódio (Na₂SO₄) e (iii) cromatografia por exclusão de peso molecular, troca iônica ou afinidade (SCHADE, 2005). Após a purificação, os anticorpos IgY são caracterizados quanto sua especificidade, sensibilidade, avidéz e titulação. Diferentes testes podem ser empregados para a caracterização de um anticorpo específico, entre eles o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Western Blot*, *Dot-blot* e imuno-histoquímica (HALDER et al., 2002).

2.6 BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS

O desenvolvimento de novas tecnologias para a detecção de importantes compostos biológicos com foco ambiental e industrial tem despertado interesse de pesquisadores de diversas áreas, buscando sensibilidade, seletividade, versatilidade em um dispositivo economicamente viável e com aplicação *in loco* (GOODE, RUSHWORTH, MILLNER, 2015 ; ROMANHOLO, et al., 2021). Nesse âmbito técnicas eletroquímicas são bastante exploradas, devido o baixo custo, rapidez, portabilidade, sensibilidade e especificidade no reconhecimento no marcador alvo (GARCIA, et al., 2020 ;ROMANHOLO, et al., 2021 ; BRAZACA, et al., 2022).

Um biossensor comum é constituído por dois sistemas, um biorreceptor (biomoléculas como enzimas, anticorpos, aptâmeros e ácidos nucleicos), responsável pelo reconhecimento seletivo do objeto de estudo e um transdutor (eletroquímico, óptico ou piezoelétrico) que permite a avaliação da resposta entre o biorreceptor e seu alvo. Os transdutores utilizados para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos são eletrodos compostos por materiais condutores, de modo que as biomoléculas receptoras estejam imobilizadas em sua superfície (figura 7) (FELIX, AGNES, 2018 ; KIM, et al., 2019).

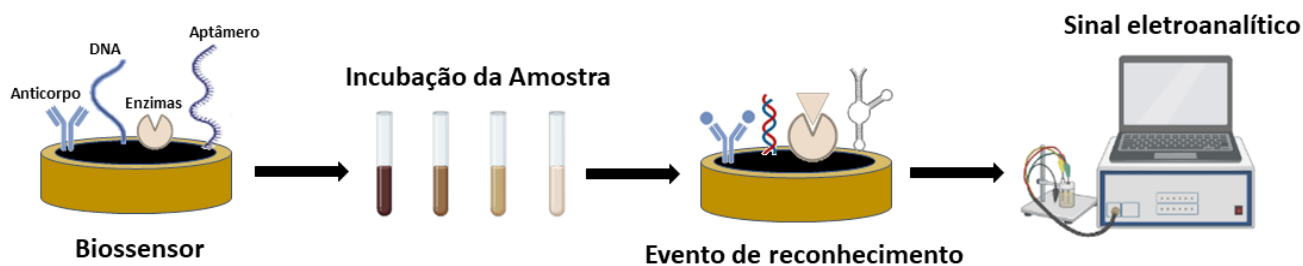


Figura 7. Sistema de ligação de um biorreceptor e transdutor eletroquímico.

Fonte: Autor.

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o tipo de sinal medido durante o evento de biorreconhecimento, como por exemplo amperométricos quando avaliamos a resposta do evento pelo sinal de corrente (EMIR, et al., 2021), potenciométricos quando é medido a diferença do potencial entre o biossensor e o eletrodo de referência (ÖZBEK, ISILDAK, ISILDAK, 2021) condutométricos quando é mensurada a variação na condutância (SOLDATKIN, et al., 2021) e impedimétricos, estes avaliando a impedância de todo o sistema eletroquímico através da resistência do sistema (GARCIA, et al., 2020; RODRIGUES, et al., 2022).

A aplicação de biossensores para o monitoramento de biomarcadores biológicos de interesse clínico tem crescido bastante nas últimas décadas, sendo essa abordagem bastante adotada como estratégia promissora no diagnóstico de doenças e monitoramento terapêutico em tratamentos clínicos (WONG, et al., 2015 ; MENEGHELLO, et al., 2018; ATES, et al., 2022). Dessa forma, é possível observar de modo seletivo e quantitativo, biomarcadores como proteínas , peptídeos e metabólicos orgânicos, permitindo o monitoramento terapêutico (PELÁEZ, et al., 2018; ATES, et al., 2022).

Durante as etapas de um tratamento clínico, a administração de medicamentos é modulada de acordo com a resposta do paciente, seja ela de forma positiva ou não, dessa forma a concentração da dose e até mesmo dos biomarcadores pode ser alterada no organismo, sendo necessário realizar o monitoramento durante todo o processo, em que ferramentas como os biossensores são de grande valor para realização de diagnósticos e prognósticos clínicos para diversos processos biológicos (DEVI, DOBLE, VERMA, 2015 ; PELÁEZ, et al., 2018; ATES, et al., 2022).

Atualmente pesquisadores buscam nas etapas de desenvolvimento de um biossensor alta especificidade e sensibilidade, com materiais de baixo custo (DEVI, DOBLE, VERMA, 2015).

As técnicas de detecção de biomarcadores baseadas em imunoenaios consistem em testes bioquímicos que permitem o reconhecimento molecular altamente específico entre anticorpos e antígenos. As técnicas mais utilizadas são o ensaio de imunoabsorção enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA), os fluoroimunoenaios, os imunoenaios por quimioluminescência, radioimunoenaios e cromatografia por exclusão (DEVI, DOBLE, VERMA, 2015; NAVAS, et al., 2013).

Apesar de sua confiabilidade, os imunoenaios requerem laboratórios bem equipados, reagentes caros, além de pessoal treinado e mais tempo de análise (NAVAS, et al., 2013). Enquanto isso, a cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (SE-HPLC) e a cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) compartilham as mesmas desvantagens, agravadas pelos altos custos e condições como o tamanho da molécula e os solventes utilizados na fase móvel, dessa forma a coluna cromatográfica fica com baixa durabilidade. (BERKOWITZ, et al., 2012 ; JACOBS, et al., 2017 ; TRUFFOT, et a., 2021). Portanto, em comparação com drogas de baixo peso molecular, a análise química de mAbs, que apresentam maior peso molecular apresenta desafios, independentemente da complexidade da matriz das amostras. Assim, além das aplicações de TDM, o desenvolvimento de métodos eficazes é de extrema importância para controle de qualidade (CQ) e fins regulatórios (VIGNERON, et al., 2013).

Como alternativa, a eletroanálise surge como uma abordagem atrativa para aplicações de TDM, CQ ou ESM, e em paralelo permite a miniaturização necessária para a análise POC. Além disso, a eletroanálise oferece a possibilidade de combinar simplicidade, rapidez com precisão, seletividade e sensibilidade (HAMPSON, et al., 2010 ; AFKHAMI, et al., 2017 ; FELIX, AGNES, 2018 ; GU, et al., 2019 ; ATES, et al., 2021).

Pesquisadores realizam diversas aplicações com biossensores abordando diferentes alvos e técnicas (Quadro 1) :

Quadro 1 : Exemplos recentes de aplicações de diferentes tipos de biossensores com técnicas eletroquímicas.

Título do artigo / Citação	Tipo de Biossensor	Marcador Alvo	Técnica utilizada
“A microfluidic electrochemical aptasensor for highly sensitive and selective detection of A549 cells as integrin $\alpha 6\beta 4$ -containing cell model via IDA aptamers”. (KHAKSARI, et al., 2022).	Aptasensor	Células A549 como modelo de célula contendo integrina $\alpha 6\beta 4$ via aptâmeros IDA.	Microfluídica com voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica.
“SARS-CoV-2-Impedimetric Biosensor: Virus-Imprinted Chips for Early and Rapid Diagnosis”. (HUSSEIN, et al., 2021).	Biossensor	SARS-CoV-2	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
“DNA-Based Electrodes and Computational Approaches on the Intercalation Study of Antitumoral Drugs”. (RODRIGUES, et al., 2021).	Biossensor	Farmacos antitumorais	Voltametria de pulso diferencial
“Impedimetric Immunosensor for On-Site Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples”. (RODRIGUES, et al., 2022).	Imunossensor	Rituximabe	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
“Impedimetric biosensor for bovine herpesvirus Type 1-antigen detection”. (GARCIA, et al., 2020).	Imunossensor	Herpes bovino tipo 1	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica

<p>“A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of <i>Salmonella</i> spp”. (MALVANO, PILLOTON, ALBANESE, 2020).</p>	Biossensor	<i>Salmonella</i> spp	Espectroscopia de impedância
<p>“A wearable microfluidics-integrated impedimetric immunosensor based on Ti3C2Tx MXene incorporated laser-burned graphene for noninvasive sweat cortisol detection”. (NAH et al., 2021).</p>	Imunossensor	Cortisol	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
<p>“Rapid detection and quantification of microcystins in surface water by an impedimetric immunosensor”. (OGUNGBILE et al., 2021).</p>	Imunossensor	Microcistinas	Espectroscopia de impedância
<p>“Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis”. (CORDEIRO et al., 2020).</p>	Imunossensor	Chagas e leishmania visceral	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
<p>“Label-free electrochemical impedimetric immunosensor for sensitive detection of IgM rheumatoid factor in human serum”. (CHINNADAYYALA et al., 2019).</p>	Imunossensor	Fator reumatoide IgM	Espectroscopia de impedância
<p>“Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of <i>Escherichia coli</i> in Drinking Water”. (CIMA FONTE et al., 2020).</p>	Imunossensor	<i>Escherichia coli</i>	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica
<p>“An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for <i>Listeria monocytogenes</i> detection”. (LI et al., 2021).</p>	Biossensor	<i>Listeria monocytogenes</i>	Espectroscopia de impedância e voltametria de onda quadrada.
<p>“Electrical pulse-induced electrochemical biosensor for hepatitis E virus detection”. (CHOWDHURY et al., 2019).</p>	Biossensor	Hepatite E	Espectroscopia de impedância e voltametria cíclica

2.7 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Os anticorpos são aplicados em grande escala no desenvolvimento de biossensores, possibilitando alta especificidade de ligação (ZHAO et al., 2021) e reconhecimento com o antígeno alvo (GARCIA et al., 2020 ; RODRIGUES et al., 2022). Portanto, podem ser aplicados na detecção e diagnóstico de patógenos (ZHAO et al., 2021), proteínas (KAUSHIK et al., 2018), hormônios (CHEN, LIU, WU, 2021), toxinas (LOYPRASERT et al., 2010), anticorpos monoclonais (RODRIGUES et al., 2022). Sua aplicação é definida pelo evento de reconhecimento e formação do complexo de ligação entre o anticorpo e o antígeno, este na superfície do transdutor, monitorado pelo sinal da técnica utilizada em sua avaliação (GARCIA et al., 2020 ; RODRIGUES et al., 2022).

Os imunossensores eletroquímicos combinam a elevada especificidade da reação imunológica, possibilitando alta sensibilidade, rapidez quanto a execução da técnica e baixo custo (GARCIA et al., 2020). Esses sistemas permitem a aplicação de métodos *label-free*, onde a detecção do alvo é realizada sem a utilização de anticorpos conjugados a enzimas ou a marcadores fluorescentes, o que pode diminuir o número de etapas, o tempo total e o custo das análises (AFKHAMI et al., 2017; GARCIA et al., 2020).

Outro avanço em relação ao desenvolvimento de imunossensores é a possibilidade de aplicações portáteis, com respostas rápidas, e baixa quantidade de amostras, sendo possível a miniaturização e detecção *in loco* e em tempo real, permitindo aplicações *point-of-care* (HSU et al., 2020). Esse tipo de sistema permite aplicações em campo, longe do laboratório de análises clínicas, podendo ser aplicado na residência do paciente e até mesmo no próprio consultório médico, permitindo o diagnóstico e monitoramento de fármacos durante o tratamento clínico (ATES et al., 2020 ; ATES et al., 2022 ; RODRIGUES et al., 2022).

Os anticorpos são responsáveis por gerar a ligação de um imunossensor, estes são constituídos por proteínas solúveis, as imunoglobulinas (Ig), estas relacionadas a resposta imune corporal. Sua função é definida pelo reconhecimento e ligação de antígenos, de bactérias, vírus, fungos e compostos estranhos ao organismo. Os anticorpos são produzidos por glóbulos brancos ativados, os linfócitos B (ou células B), e constituem cerca de 20% do total de proteínas sanguíneas (NELSON, COX, 2014).

Estima-se que os humanos tenham a capacidade de produzir mais de 100 milhões de anticorpos distintos com diferentes especificidades de ligação, as quais são caracterizadas pela natureza dos resíduos de aminoácidos nos domínios variáveis de suas cadeias pesadas e leves. O complexo antígeno-anticorpo formado após o evento de

reconhecimento é altamente estável, como uma consequência da elevada força de interação entre a imunoglobulina e seu respectivo antígeno, essa derivada das várias interações de van der Waals, iônicas e de ligação de hidrogênio que se estabelecem quando um antígeno interage com uma molécula de anticorpo (NELSON, COX, 2014).

A interação entre antígeno-anticorpo em técnicas eletroquímicas pode ser estudada de duas formas, direta, onde é avaliado o sinal eletroanalítico através dos picos de oxidação de resíduos de aminoácidos, ou indireta, monitorada por um indicador redox.

A detecção direta é definida pela transferência de elétrons da biomolécula para os eletrodos por meio de um processo de oxiredução. O sinal eletroquímico dos resíduos de aminoácidos depende da orientação favorável das proteínas, sendo necessário ter resíduos eletroativos para a aplicação da técnica (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013).

A detecção indireta baseia-se nas modificações geradas entre antígenos e anticorpos na superfície do eletrodo, isso por meio de compostos que podem reagir na presença desses materiais biológicos. Esse sistema é definido pela construção de um imunocomplexo entre o antígeno e o anticorpo, este marcado por uma sonda redox, gerando a resposta analítica através da sonda imobilizada no eletrodo de trabalho ou até mesmo em solução (GARCIA et al., 2020).

As sondas redox são constituídas de compostos eletroativos, com a capacidade de sofrer reações de oxiredução e na maioria de forma reversível (GARCIA et al., 2020 ; RODRIGUES et al., 2022). As sondas redox mais utilizadas são o ferrocianeto de potássio (GARCIA et al., 2020 ; RODRIGUES et al., 2022), ferroceno (TRINDADE, SILVA, DUTRA, 2019), azul de metileno (DUTTA et al., 2017) e vermelho de alizarina (ZHANG; DING, 2016).

Os anticorpos podem ter diferentes aplicações no diagnóstico e/ou no prognóstico de várias doenças de interesse epidemiológicas, doenças autoimunes, alergias, dentre outras. O desenvolvimento de imunossensores pode ter grande impacto econômico para a saúde humana, uma vez que os testes são mais rápidos e de baixo custo em diagnósticos e durante o tratamento (AFKHAMI et al., 2017; GU et al., 2019; GARCIA et al., 2020).

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um imunossensor eletroquímico seletivo para a detecção e quantificação de RTX em amostras de urina e sangue.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e validar o método analítico para a quantificação de RTX em amostras biológicas para uso no CQ e TDM;

Obter um método alternativo de baixo custo, rápido e seletivo para a quantificação de RTX em amostras biológicas aplicado no CQ e TDM.

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

A caseína de leite bovino grau técnico para a produção do imunossensor foi adquirida da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, EUA), ferrocianeto de potássio e cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltd. (Rio de Janeiro, Brasil). Rituximab, 10 mg ml⁻¹ (MabThera, Roche, Suíça) foi gentilmente doado pela AVFarma, Assistência e Serviços Farmacêuticos, Rio de Janeiro, Brasil.

A solução de caseína foi preparada na concentração de 0,5% (v/v), esta diluída em tampão borato de sódio (100mM, pH 9,0). A solução de ferrocianeto de potássio utilizada como sonda redox foi preparada na concentração de 0,5 M, esta diluída em água ultrapurificada (condutividade: 0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$) obtida de um sistema de purificação Milli-Q Millipore S/A (Molsheim, França). Em seguida, adicionou-se cloreto de potássio (KCl) a esta solução até uma concentração de 100 mM de ferrocianeto de potássio.

A imunoglobulina Y (IgY) pAb contra RTX foi produzida a partir de gemas dos ovos de galinhas poedeiras Leghorn brancas, onde foram imunizadas por via intramuscular com quatro doses de 200 μg de Rituximab misturado com adjuvante de Freund em intervalos de duas semanas. O título de anticorpo específico foi monitorado por ELISA. A IgY foi obtida a partir de gemas de ovos pelo método de precipitação com polietilenoglicol (PAULY, 2011) e quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A integridade e pureza dos anticorpos foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Todas as soluções do ensaio RTX foram preparadas com solução tampão fosfato (PBS) na concentração de 100 mM com pH 7,0, urina e soro sanguíneo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional para Seres Humanos (Protocolo 2.855.528).

4.2. PREPARAÇÃO DO IMUNOSSENSOR

O desenvolvimento do imunossensor eletroquímico foi dividida em quatro etapas. A primeira etapa consiste na ativação do GCE usando cronoamperometria a um potencial constante de 1,2 V em PBS 100 mM (pH 7,0). Na segunda etapa é realizada a imobilização do Ab sobre a superfície do GCE ativado (^AGCE) com suspensão de Ab a 1

mg mL⁻¹ (^AGCE/Ab) pelo método de drop casting. Na terceira etapa o eletrodo de ^AGCE/Ab foi então seco à temperatura ambiente e imerso na solução de caseína 0,5% por 5 minutos para bloquear as os sítios não ligados do eletrodo. Por fim na última etapa o eletrodo preparado com o anticorpo e caseína (^AGCE/Ab^{CAS}), foi enxaguado completamente com 5 mL de água ultrapura para remover qualquer excesso de caseína e Ab adsorvido fisicamente na superfície do eletrodo. Após a construção do imunossensor, o mesmo deve permanecer armazenado em temperatura entre 2 a 8°C antes de realizar a medição do ensaio.

4.3. ENSAIOS ELETROQUÍMICOS

Os ensaios eletroquímicos foram realizados em temperatura ambiente, usando um sistema composto por três eletrodos, os eletrodos de trabalhos foram compostos por eletrodos de carbono vítreo comercial e eletroquimicamente modificado, ambos com 3 mm de diâmetro (GCE, ^AGCE/Ab^{CAS}), como contra-eletrodo foi utilizado um fio de platina e como eletrodo de referência um eletrodo composto por Ag/AgCl saturado com KCl 3M (adquirido de Lab solutions, São Paulo, Brasil). Os ensaios de CV e EIS foram realizados com um Autolab PGSTAT[®] modelo 204 com módulo FRA32M (Metrohn Autolab, Eco Chemie, Holanda) juntamente com seu software NOVA 2.1[®].

Os ensaios de CV e EIS foram realizadas em 2 mL de solução KCl 100 mM com ferrocianeto de potássio 5 mM. Os parâmetros de operação para medição da EIS foram definidos da seguinte forma: (i) frequência inicial: 10 kHz, (ii) frequência final: 0,1 Hz, (iii) potencial médio: 0,25 V e (iv) amplitude potencial: 10 mV. As varreduras da CV foram realizadas entre 0,0 e 1,0 V com uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹. Os gráficos dos voltamograms e impedâncias para apresentação final deste estudo foram tratados no software Origin Pro 8[®] (Northampton, MA, EUA). Todas os experimentos foram realizados em triplicata, avaliando sempre o desvio padrão relativo (RSD).

4.4. DETERMINAÇÃO DO RITUXIMABE

Para a caracterização do imunossensor desenvolvido, foram preparadas soluções estoques de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 µg ml⁻¹ RTX em 100 mM de PBS pH 7,0. Assim, o ^AGCE/Ab^{CAS} modificado foi exposto por 10 minutos em cada solução estoque de RTX. Uma leitura do branco também foi realizada sem a presença de RTX.

Amostras de urina e soro sanguíneo foram coletadas de um ser humano saudável, sem qualquer doença e sem o uso de medicação contínua. Ambas as amostras foram diluídas em 100 mM PBS com um fator de diluição de 1:5 (200 µL de amostra biológica, 800 µL de tampão). Após a diluição, o RTX foi incrementado até a concentração final de 8 µg mL⁻¹, considerado como concentração ideal o ponto médio da linearidade do método. Em seguida, o imunossensor ^AGCE/Ab^{CAS} foi exposto por 10 minutos nas soluções contendo as amostras biológicas para detecção do fármaco RTX. Todos os experimentos foram realizados em triplicata à temperatura ambiente (25°C ± 2°C). As amostras controles de urina e sangue foram diluídas em 100 mM PBS com um fator de diluição de 1:5 (200 µL de amostra biológica, 800 µL de tampão), avaliando a seletividade do imunossensor na matriz.

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas aplicadas na validação do método analítico foram calculadas por meio do software action stat 3.7[®], Estatcamp—Brasil, aplicado de acordo com as diretrizes exigidas pelo conselho internacional para harmonização de requisitos técnicos para produtos farmacêuticos de uso humano (ICH Q2).

Artigo – Impedimetric Immunosensor for On-Site Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples

Autores: Edson Silvio Batista Rodrigues, Giovanna Nascimento de Mello e Silva, Isaac Yves Lopes de Macêdo, Wallans Torres Pio dos Santos, Guilherme Rocha Lino de Souza, Gabriel Henrique Santos, Isabela Jubé Wastowski, Hatice Ceren Ates, Can Dincer and Eric de Souza Gil

Revista: Journal of The Electrochemical Society

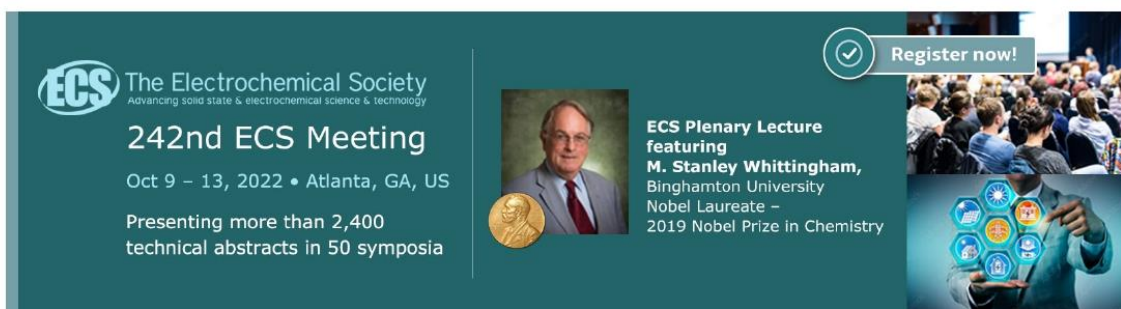
Situação: Publicado

OPEN ACCESS

Impedimetric Immunosensor for On-Site Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples


To cite this article: Edson Silvio Batista Rodrigues *et al* 2022 *J. Electrochem. Soc.* **169** 057529


View the [article online](#) for updates and enhancements.





The Electrochemical Society
Advancing solid state & electrochemical science & technology

242nd ECS Meeting
Oct 9 – 13, 2022 • Atlanta, GA, US
Presenting more than 2,400
technical abstracts in 50 symposia


ECS Plenary Lecture
featuring
M. Stanley Whittingham,
Binghamton University
Nobel Laureate –
2019 Nobel Prize in Chemistry




 Register now!

This content was downloaded from IP address 191.54.128.3 on 13/09/2022 at 12:49



Impedimetric Immunosensor for On-Site Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples

Edson Silvio Batista Rodrigues,¹  Giovanna Nascimento de Mello e Silva,¹ Isaac Yves Lopes de Macêdo,¹ Wallans Torres Pio dos Santos,² Guilherme Rocha Lino de Souza,³ Gabriel Henrique Santos,³ Isabela Jubé Wastowski,⁴ Hatice Ceren Ates,^{5,6} Can Dincer,^{5,6,z}  and Eric de Souza Gil^{1,z} 

¹Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Brazil

²Department of Pharmacy, Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri, Brazil

³Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

⁴Institute of Biological Sciences, State University of Goiás, Brazil

⁵Department of Microsystems Engineering—IMTEK, University of Freiburg, Germany

⁶FIT Freiburg Center for Interactive Materials and Bioinspired Technologies, University of Freiburg, Germany

Rituximab (RTX) is a specific monoclonal antibody for CD20 protein, which are mostly found in lymphocytes B. RTX is notably indicated for lymphomas, autoimmune disorders, leukemia and transplant rejections. A higher efficiency is achieved by adjusted doses, which is tailored by individual body weight and RTX pharmacokinetic parameters. Therefore, the individualized dosing is a usual practice to achieve the therapeutic success of this expensive drug. Therapeutic monitoring of RTX is commonly performed by chromatographic methods or immunoassays. These methods, however, suffer from lack of standardization in workflows, long turnaround times and high instrumentation costs with complex sample preparation. In this regard, immunosensors emerge as a feasible alternative to overcome these limitations. Herein, we developed an impedimetric immunosensor, which can detect RTX from both invasive and non-invasive samples, in this way our immunosensor is applicable in blood plasma and urine samples allowing a new analysis approach. A linear correlation between the charge transfer resistance and RTX from 2 to 14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (r^2 of 0.99) along with limit-of-detection and limit-of-quantification of 130 and 400 ng ml^{-1} , respectively, was obtained. The immunosensor implemented proved to have sufficient precision and accuracy for on-site RTX detection in both blood serum and urine samples. Such affordable, label-free and highly sensitive electrochemical immunosensors could pave the way for on-site therapeutic drug monitoring, quality control and extended stability monitoring of different drugs, in a simple manner along with short turnaround times and low costs.

© 2022 The Author(s). Published on behalf of The Electrochemical Society by IOP Publishing Limited. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License (CC BY, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse of the work in any medium, provided the original work is properly cited. [DOI: 10.1149/1945-7111/ac725b]



Manuscript submitted February 15, 2022; revised manuscript received May 18, 2022. Published May 31, 2022.

Supplementary material for this article is available [online](#)

Centuries ago, the great Paul Ehrlich, presaged that the monoclonal antibodies (mAbs) would be the cornerstone of the modern therapeutics.¹ From the past two decades, the Ehrlich's dream has become a reality and albeit the high cost, mAbs have been widely used on the treatment of allergic² autoimmune and inflammatory diseases.³ Besides, mAbs drugs brought a new hope to fight cancer.⁴

In this context, Rituximab (RTX), a chimeric mAb, has emerged as an alternative therapeutic treatment of various diseases, including autoimmune disorders, inflammatory diseases and several cancer types.^{5–9} However, the pharmacokinetics and the resulting clinical response of mAbs are highly variable, and are affected by multifactorial factors like comorbidity, age, sex, diet and family medical history. Hence, utilization of personalized dosage for each patient with therapeutic monitoring of RTX could improve patient outcomes and reduce healthcare costs.^{2,10,11} The standard posology for RTX is 375 mg m^{-2} , which is administered through intravenous infusions. The course can be repeated accordingly to the treatment regimen, whereas owing to the therapeutic purpose and clearance the plasmatic concentration can vary widely from 10 to 400 mg ml^{-1} .⁵

Therapeutic drug monitoring (TDM) of RTX requires highly sensitive and selective methods, such as immunoassays and chromatography. Despite their reliability, immunoassays require well-equipped laboratories, expensive reagents, as well as, trained personnel and longer time.¹¹ Meanwhile, the size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) and reversed phase liquid chromatography (RP-HPLC) share the same drawbacks, worsened by the high costs and low durability of columns and peculiar operational conditions.^{8,12,13} Therefore, in comparison to

low molecular weight drugs, the chemical analysis of larger mAbs poses difficult challenges, independently, of the matrix complexity of samples. Hence, aside TDM applications, owing to the increasing global interest in the advanced biopharmaceuticals, especially to effectively treat cancer and other lethal diseases, the development of meritorious methods is of utmost importance for quality control (QC) and regulatory purposes.¹⁴ Finally, due to the high cost of RTX and frequent adjustments related to posology, a common hospital practice is to avail the extended stability.^{15,16} Thus, other relevant request for quantitative determinations of RTX and other mAbs would be the extended stability monitoring (ESM).

As an alternative, electroanalysis appears as an attractive approach for TDM, QC or ESM applications, to face the analytical and at the same time allow for the miniaturization required for point-of-care (POC) analysis. Furthermore, electroanalysis offer the possibility to combine simplicity, speed with adequate accuracy and sensitivity.^{17–24} In addition, in relation to mAbs, immunosensors stand out as highly specific detection systems, which can be easily coupled to electrochemical transducers.^{18–21} Offering a non-destructive method along with label-free detection, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is one of the most convenient approaches to monitor immunocomplexes after biorecognition events.^{19–21}

In this work, we have developed and tested an impedimetric immunosensor for the on-site and low-cost quantification of RTX in both non-invasive (urine) and invasive (blood serum) human biological samples for TDM, CQ or ESM applications. Herein, the recognition of RTX is achieved by a polyclonal antibody (pAb) against RTX immobilized on the surface of an oxidized glassy carbon electrode (GCE) which is simultaneously and label-free measured by the EIS.

^zE-mail: can.dincer@imtek.de; ericsgil@ufg.br

Experimental

Reagents and materials.—Casein from bovine milk technical grade was purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA), Potassium ferrocyanide and potassium chloride (KCl) were purchased from Vetec Química Fina Ltd. (Rio de Janeiro, Brasil). Rituximab, 10 mg mL⁻¹ (MabThera, Roche, Switzerland) was kindly donated by AVFarma, Pharmaceutical Assistance and Services, Rio de Janeiro, Brazil.

Casein (CAS, 0.5%) was prepared with sodium borate buffer (100 mM, pH 9.0). 0.5 M potassium ferrocyanide was diluted in purified water (conductivity: 0.1 $\mu\text{S cm}^{-1}$) obtained from Milli-Q purification system Millipore S/A (Molsheim, France). Thereafter, potassium chloride (KCl) was added to this solution up to a concentration of 100 mM.

Immunoglobulin Y (IgY) pAb against RTX was produced in white leghorn laying hens immunized intramuscularly with four doses of 200 μg of Rituximab mixed with Freund adjuvant intervals of two weeks. The specific antibody titer was monitored by ELISA. The IgY was obtained from chick egg yolks using the polyethylene glycol (PEG) precipitation method²¹ and quantified by the Bradford method.²⁵ The integrity and purity of the antibodies were evaluated by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis. All RTX assay solutions were prepared with phosphate-buffered saline (PBS) (100 mM, pH 7.0), urine and blood serum. This study was approved by the Institutional Ethics Committee for Human Subjects (Protocol 2.855.528).

Preparation of immunosensor.—The whole functionalization process of immunosensor is illustrated in Scheme 1. Glassy carbon electrode was activated using amperometry at a constant potential of 1.2 V in 100 mM PBS (pH 7.0). For the immobilization of Ab, the activated GCE (^AGCE) was coated with Ab suspension at 1 mg mL⁻¹ by drop casting method. ^AGCE/Ab electrode was then dried at room temperature, and immersed in 5 mg mL⁻¹ CAS (0.5%) for 5 min to block the remaining unbound parts of the electrode. Subsequently, the prepared electrode, defined as ^AGCE/Ab^{CAS}, was rinsed thoroughly with 5 ml ultrapure water to remove unattached CAS and any excess of Ab physically adsorbed on the electrode surface. After the construction of the immunosensor, it must be stored at a temperature in a fridge (between 2 to 8 °C) before carrying out the assay measurement.

Electrochemical measurements.—All measurements were performed at room temperature using a three-electrode electrochemical setup, including the bare and electrochemically modified glassy

carbon electrodes with 3 mm diameter (^AGCE, ^AGCE/Ab^{CAS}) as working electrodes, a platinum wire as counter electrode, and Ag/AgCl saturated with KCl 3M as reference electrode (purchased from Lab solutions, São Paulo, Brazil). Cyclic voltammetry (CV) and EIS assays were performed with an Autolab PGSTAT[®] model 204 with FRA32M module (Metrohm Autolab, Eco Chemie, Netherlands) along with its NOVA 2.1[®] software.

CV and EIS measurements were conducted in 2 ml of 100 mM KCl with 5 mM potassium ferrocyanide. The operation parameters for EIS measurement were adjusted as follows: (i) initial frequency: 10 kHz, (ii) final frequency: 0.1 Hz, (iii) Average potential: 0.25 V and (iv) Potential amplitude: 10 mV. CV scans were conducted between 0.0 and 1.0 V with a scan rate of 100 mV s⁻¹. Plots of the voltammetric curves for final presentation in this study were drawn using Origin Pro 8[®] software (Northampton, MA, USA). All experiments were carried out in triplicates (unless indicated otherwise) to ensure the consistency of the response trend and calculate the relative standard deviation (RSD).

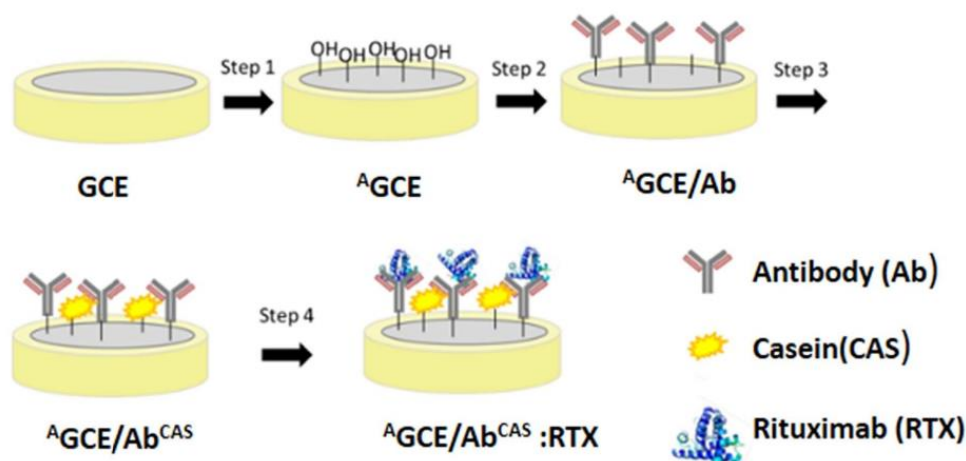
Determination of RTX.—For the characterization of the immunosensors developed, stock solutions of 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RTX in 100 mM PBS pH 7.0 were prepared. Thus, the modified ^AGCE/Ab^{CAS} was exposed for 10 min in the RTX stock solution. A control measurement was also performed without the presence of RTX.

Urine and blood serum samples were collected from a healthy human, without any disease and not on continuous medication. Both samples were diluted in 100 mM PBS with a dilution factor of 1:5 (200 μl of biological sample, 800 μl of buffer). After dilution, RTX was spiked to the final concentration of 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, considered the midpoint of the linearity of the method. Then, the immunosensor ^AGCE/Ab^{CAS} was exposed for 10 min to biological samples for detection of the RTX drug. All experiments were done at room temperature (25 °C \pm 2 °C) in triplicate.

Statistical analysis.—Statistical tests for method validation were calculated using action stat 3.7[®] software, Estatcamp—Brazil, applied according to the required the international council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH Q2) guidelines.

Results and Discussion

Electrochemical characterization.—We first evaluated the charge transfer resistance (Rct) after the immunocomplex formation



Scheme 1. The schematic representation of immunosensor preparation and RTX detection. Step 1: Electrochemical surface activation; Step 2: Ab immobilization; Step 3: CAS blocking and Step 4: RTX detection via EIS.

since the conductivity of working electrode vary after each incubation step. Herein, the Rct change were analyzed after each immunoassay step separately.

The first step consisted of activating the electrode through the application of potential by chronoamperometry, in which some π - π bonds are oxidized, slightly decreasing the conductive properties of carbon, consequently increasing the Rct. In turn, the oxidized groups produced in this activation stage allow the beginning of the second stage, which consists of the capture of non-selective proteins. Protein immobilization is effectively achieved by the ester or amide bond, but hydrogen bonds and van der Waals interactions have a minor contribution. This nonspecific interaction is mainly affected by the incubation time, the amount of hydrogen donors or receptors present in the target molecule and its concentration.

As expected, there was an increase in the Rct due to the significant resistance of the electrode surface produced by the binding of macro insulating species, in which large distortions of the CV profile (Fig. 1A) and a significant increase in the resistance of the Rct system in the EIS are observed (Fig. 1B), in higher amounts of RTX Ab or RTX drug (Table SI (available online at stacks.iop.org/JES/169/057529/mmedia), Supporting Information).

Immunosensor optimization.—When working with biological matrices, some assay and sensor parameters such as the density of Ab immobilized on the electrode surface or blocking strategy has to be carefully checked and optimized accordingly. Because the target of the sensor is the drug RTX, some smaller proteins are used in the free spaces of the electrode surface so that the sensor is selective for RTX and blocks different proteins. Furthermore, despite the molecular weight, the isolation process is also dependent on the incubation time of the immunosensor (Table SII, Supporting Information).

Concomitant immobilization of antibodies and minor proteins, that is, albumin and CAS are commonly performed. The increase in time-dependent adsorption of RTX-Ab was prevented by previous CAS immobilization. In fact, without this procedure, the electrode is isolated successively depending of minutes the incubation. In turn, signal stabilization was achieved within 10 min of the incubation time, when Δ GCE was blocked by CAS (Table SII, Supporting Information). It was observed that the free oxidized groups of the electrode were efficiently bound in CAS. Therefore, a 10 min time interval was chosen as the best incubation time for further tests.

Figure 1 illustrates EIS obtained in each stage of the preparation under optimized experimental conditions. The electrochemical parameters for Rct each stage of preparation, were evaluated.

According to the results (Fig. 1), the electrode preparation steps make the charge transfer process difficult. The first step, activation of the GCE, introduces oxides on the surface, which slows down the electron transfer kinetic of potassium ferrocyanide.¹⁸ At the following steps, a charge transfer impediment is also observed, probably due to the formation of an insulating layer on the surface electrode by immobilizing biological species, as it has been suggested previously in the literature.^{19–21}

Analytical method validation.—The detection principle was based on the variation of charge transfer resistance (Δ Rct) relative to the potassium ferrocyanide electrochemical probe after immunoreaction of RTX drug. The Δ Rct Δ Rct was calculated by the equation:

$$\Delta Rct = [Rct(t10) - Rct(t0)]$$

Where Rct(t0) and Rct(t10) are the Rct values before and after 10 min of immunoreaction.

The Nyquist plot obtained for increasing concentrations of RTX are presented in Fig. 2A. From the Δ Rct values of EIS of each concentration the calibration graph of the RTX was plotted (Fig. 2). A linear correlation of RTX was found between Rct and Rituximab concentration. The results found were ($r^2 = 0.99$), and limit-of-detection (LOD) and limit-of-quantification LOQ, respec.

To complement the linearity test of the method, statistical tools were applied to assist in the verification of the data found (Table SIII, Supporting Information). Precision tests were performed to complement the validation of the proposed method. Thus, researcher 1 performed the repeatability tests, carried out in a single day. After two days, intermediate precision tests were performed, where they were performed by another researcher in order to ensure the replicability of the analytical method. Table I shows the results found regarding the precision of the immunosensor.

The proposed method was accurate and replicable, presenting a relative standard deviation of 0.96% for researcher 1 and 1.27% when considering the data of researcher 2.

The F test demonstrated that there was no significant difference between the recovery values found between the two analysts, since $F_{cal} 1.04 < 6.39$ and P-value $0.48 > 0.05$ proving the accuracy of the proposed method, according to the results obtained in Table II.

After ensuring the replicability of the proposed method, recovery tests were performed at three different spiked concentrations. RTX was spiked in the sample as 80%, 100% and 120%, and each analysis were performed in triplicate (Table II).

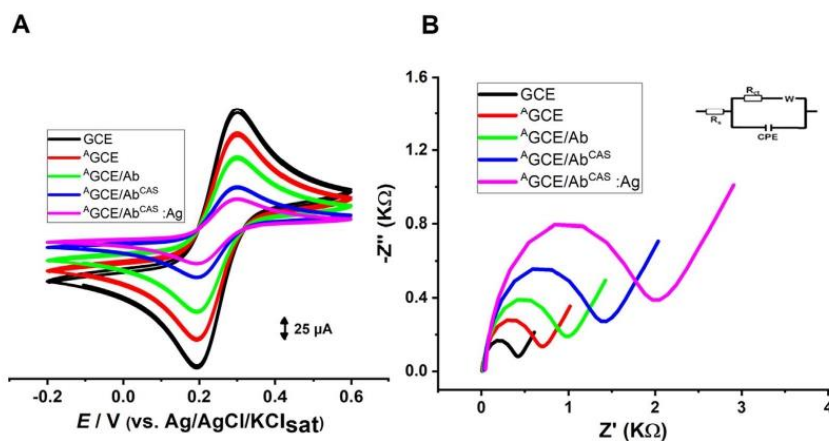


Figure 1. (A) CV and (B) EIS measurements and the equivalent circuit model used for fitting of the impedance data (inset) of the bare and modified glassy carbon electrodes.

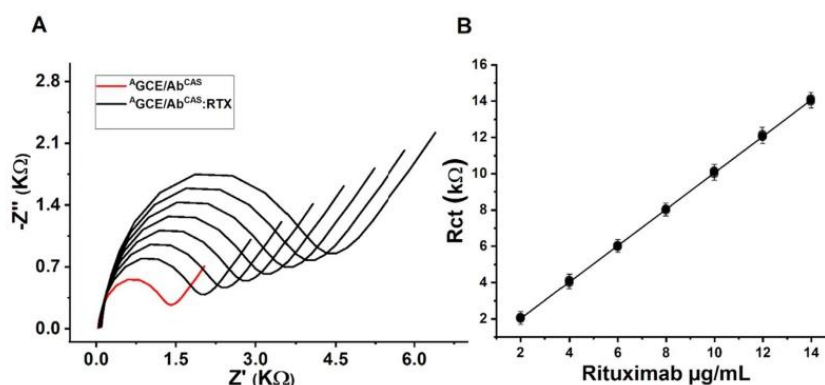


Figure 2. Nyquist plots (A) for concentrations 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of RTX and the resulting calibration curve using the developed immunosensor (B). All measurements were performed in triplicates.

Table I. Precision and repeatability values of EIS-based immunosensor for RTX detection.

Samples	Sample amount (%)	Sample recovery (%)	Precision intermediary (n = 6)	Sample recovery (%)	Precision repeatability (n = 6)
RTX	100%		98.47		98.54
			99.45		99.7
			100.87		100.58
			98.11		98.31
			96.68		96.54
			99.14		99.04
			RSD (%) = 1.27		RSD (%) = 0.96

Table II. Recovery tests with EIS immunosensor developed using samples spiked with different RTX concentrations.

Samples	Sample amount (%)	Measured amount (%)	Recovery (%)
RTX	80	81.14	101.43
		80.47	100.59
		80.12	100.15
	100	100.41	100.41
		98.47	98.47
		97.47	97.47
	120	121.45	101.21
		119.47	99.56
		119.87	99.89
		Recovery average (%)	
	Recovery relative standard deviation (%)		1.30
	Acceptance level (%)		90.0 to 110.0
	RSD acceptance level (%)		≤ 5.0
	Confidence interval 95%		1.0
	Average \pm IC95%		99.0% to 101.0%

The accuracy of the proposed method showed satisfactory results for all 3 solutions spiked with different concentrations of RTX, with a maximum deviation of 5%. Maintaining an adequate confidence interval between 99.0% to 101.0%, which proves the accuracy of the method, our immunosensor can quantify RTX accurately.

Detection of RTX in invasive and non-invasive human samples.—As an alternative to invasive sampling for TDM or quality control of drugs, the efficiency of the immunosensor to quantify RTX in urine was tested. The $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ RTX PBS solution was used as positive control, whereas 100 μl of $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ RTX stock solution was diluted in 5 ml of each biological sample, in order to achieve the same concentration. The $^{\text{A}}\text{GCE}/\text{Ab}^{\text{CAS}}$ (produced according to Scheme 1 step 4) was immersed in each sample for 10 min and drug recovery in PBS, urine and blood was analyzed (Table III).

The results found for detection in biological matrices were obtained with spiked samples with a concentration of $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ RTX considered as 100% for reference value. The recovery values for RTX detection in both urine and plasma were similar to that obtained with PBS, indicating the selectivity and accuracy of the immunosensor to RTX in the presence of the matrix effect, where we had satisfactory responses for the detection and determination of RTX.

Recovery values for detection of RTX in urine and plasma were similar with recovery in an approximate range of 95 to 97% while the results obtained with PBS had a range between 98 and 99%, despite good recoveries we observed a subtle difference between biological samples and artificial samples in PBS, this is due to the complexity of the biological matrix that can contain several interferences. Even in the face of these factors, the immunosensor

Table III. Recovery tests performed with the developed impedimetric immunosensor in various biological matrices spiked with different RTX concentrations.

Samples	Sample recovery (%) (n = 3)	RSD (%) (n = 3)
PBS	98.11	0.57
	99.42	
	99.12	
Urine	96.76	0.54
	97.52	
	96.24	
Blood serum	95.76	0.76
	97.56	
	96.54	

was selective for the detection and quantification of RTX in the presence of the matrix effect with accuracy and precision.

Considering the fact that in clinical samples the expected RTX concentration is about 1 to 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, our immunosensor could be used for RTX monitoring from both invasive and noninvasive samples.

Conclusions and Outlook

In this work, an impedimetric immunosensor was developed for RTX determination, which is a mAb drug widely used for the treatment of cancers of white blood cell system such as lymphoma. The optimized immunosensor has been validated, showing good accuracy and sensitivity with a LOD of 130 ng ml^{-1} . The selectivity of the optimized immunosensor was also demonstrated in urine and blood serum samples, while there is a matrix effect/interference from other biological agents.

The developed immunosensor can be used as a sensitive and low-cost tool for the on-site quantification of the drug RTX in biological samples for a personalized therapy. Whereas, further optimization using microfluidics to automatize the measurement procedure and/or utilizing nanoparticles to achieve a lower LOD would extend the applications of our technology. To the best of our knowledge, it is the first time that a pAb produced from chicken egg biotechnology is used as a biorecognition element to create a biosensor for RTX measurement. In addition, the simplicity of the immunoassay preparation steps and their standardization, is a promising concept to be employed for drug quality control and diagnosis of other diseases.

Acknowledgments

E.S.B.R., G.N.M.S., I.Y.L.M., W. T. P. S., G. R. L. S., G. H. S., I. J. W. and E. S. G. would like to thank the foundation for the protection and research of Goiás (FAPEG) for the program to support emerging centers, public call 07/2016, number 20170267000518 and AVFarma Co., Ltd. for RTX samples donation. H.C.A. and C.D. would like to thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) for funding this work under Grant Number 404478562.

Authorship Contribution Statement

Edson Silvio B. Rodrigues, Giovanna N. M. Silva and Isaac Yves Lopes de Macêdo: Methodology, Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing—original draft, Visualization. Edson Silvio B. Rodrigues, Wallans T. P. Santos, Guilherme R. L. Souza, Gabriel Henrique Santos and Isabela J. Wastowski: Methodology, Resources, Writing—review & editing, Supervision. H. Ceren Ates: Writing—review & editing, Supervision. Can Dincer and Eric S. Gil: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing—review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

ORCID

Edson Silvio Batista Rodrigues <https://orcid.org/0000-0003-2965-0421>

Can Dincer <https://orcid.org/0000-0003-3301-1198>

Eric de Souza Gil <https://orcid.org/0000-0001-9161-0127>

References

1. K. Strebhardt and A. Ullrich, "Paul ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress." *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 473 (2008).
2. Y. Chen, W. Wang, H. Yuan, Y. Li, Z. Lv, Y. Cui, J. Liu, and S. Ying, "Current state of monoclonal antibody therapy for allergic diseases." *Engineering*, **7**, 1552 (2021).
3. E. Andreakos, P. C. Taylor, and M. Feldmann, "Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases." *Curr Opin Biotechnol.*, **13**, 615 (2002).
4. Y. Si, A. L. Melkonian, K. C. Curry, Y. Xu, M. Tidwell, M. Liu, A. F. Zaky, and X. (Margaret) Liu, "Monoclonal antibody-based cancer therapies." *Chin. J. Chem. Eng.*, **30**, 301 (2021).
5. M. Eltahir et al., "Profiling of donor-specific immune effector signatures in response to rituximab in a human whole blood loop assay using blood from CLL patients." *Int. Immunopharmacol.*, **90**, 107226 (2021).
6. H. C. Ates, J. A. Roberts, J. Lipman, A. E. G. Cass, G. A. Urban, and C. Dincer, "On-site therapeutic drug monitoring." *Trends in Biotechnol.*, **38**, 1262 (2020).
7. M. van Rosmalen, Y. Ni, D. F. M. Vervoort, R. Arts, S. K. J. Ludwig, and M. Merckx, "Dual-color bioluminescent sensor proteins for therapeutic drug monitoring of antitumor antibodies." *Anal. Chem.*, **90**, 3592 (2018).
8. R. Jacobs, T. Langer-Jacobus, M. Duong, K. Stahl, H. Haller, R. E. Schmidt, and M. Schiffer, "Detection and quantification of rituximab in the human urine." *J Immunol Methods.*, **451**, 118 (2017).
9. P. Hong, S. Koza, and E. S. P. Bouvier, "A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates." *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **35**, 2923 (2012).
10. Y. A. Trabik, E. M. Moenes, M. A. Al-Ghobashy, M. Nebsen, and M. F. Ayad, "Analytical comparability study of anti-CD20 monoclonal antibodies rituximab and obinutuzumab using a stability-indicating orthogonal testing protocol: effect of structural optimization and glycoengineering." *J. Chromatogr. B*, **1159**, 122359 (2020).
11. N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, and L. Cuadros-Rodríguez, "Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines." *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 9351 (2013).
12. S. A. Berkowitz, J. R. Engen, J. R. Mazzeo, and G. B. Jones, "Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars." *Nat. Rev. Drug Discovery*, **11**, 527 (2012).
13. A. Truffot, J. F. Jourdil, B. Seitz-Polski, P. Malvezzi, V. Brglez, F. Stanke-Labesque, and E. Gautier-Veyret, "Simultaneous quantification of rituximab and ecilizumab in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with rituximab ELISA kits." *Clin. Biochem.*, **87**, 60 (2021).
14. J. Vigneron, A. Astier, Rer Nat R. Trittler, J. D. Hecq, M. Daothers, I. Larsson, B. Pourroy, and F. Pinguet, "SFPO and ESOP recommendations for the practical stability of anticancer drugs: An update." *Eur J Oncol Pharm.*, **8**, 376 (2014).
15. F. Z. Issaad, L. I. N. Tomé, N. v. Marques, C. Mouats, V. C. Dicleuscu, and A. M. Oliveira-Brett, "Bevacizumab anticancer monoclonal antibody: native and denatured redox behaviour." *Electrochim. Acta*, **206**, 246 (2016).
16. L. F. Garcia, E. S. B. Rodrigues, G. R. L. de Souza, I. J. Wastowski, F. M. de Oliveira, W. T. P. dos Santos, and E. S. Gil, "Impedimetric biosensor for bovine herpesvirus Type 1-antigen detection?" *Electroanalysis*, **32**, 1100 (2020).
17. G. Hampson, T. H. Ward, J. Cummings, M. Bayne, A. L. Tutt, M. S. Cragg, C. Dive, and T. M. Illidge, "Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects." *J. Immunol. Methods.*, **360**, 30 (2010).
18. F. S. Felix and L. Angnes, "Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications." *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 470 (2018).
19. Y. Gu, J. Wang, M. Pan, S. Li, G. Fang, and S. Wang, "Label-free impedimetric immunosensor based on one-step co-electrodeposited poly-(pyrrole-co-pyrrole-1-propionic acid) and reduced graphene oxide polymer modified layer for the determination of melamine." *Sens. Actuators, B.*, **283**, 571 (2019).
20. A. Afkhami, P. Hashemi, H. Bagheri, J. Salimian, A. Ahmadi, and T. Madrakian, "Impedimetric immunosensor for the label-free and direct detection of botulinum neurotoxin serotype a using Au nanoparticles/graphene-chitosan composite." *Biosens. Bioelectron.*, **93**, 124 (2017).
21. D. Pauly, P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs, and R. Schade, "Igy technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation." *J. Vis. Exp.*, **51**, 3084 (2011).
22. H. C. Ates et al., "Biosensor-enabled multiplexed on-site therapeutic drug monitoring of antibiotics." *Adv. Mater.*, **34**, 2104555 (2021).
23. A. Scott, R. Pandey, S. Saxena, E. Osman, Y. Li, L. Soleymann, and A. Smartphone, "Operated electrochemical reader and actuator that streamlines the operation of electrochemical biosensors." *ECS Sens. Plus*, **1**, 014601 (2022).
24. J. Chung, L. Sepunaru, and K. W. Plaxco, "On the disinfection of electrochemical aptamer-based sensors." *ECS Sens. Plus*, **1** (2022).
25. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72** (1976).

Material Suplementar

Impedimetric immunosensor for on-site measurement of rituximab from invasive and non-invasive samples

Edson Silvio Batista Rodrigues^a, Giovanna Nascimento de Mello e Silva^a, Isaac Yves Lopes de Macêdo^a, Wallans Torres Pio dos Santos^b, Guilherme Rocha Lino de Souza^c, Gabriel Henrique Santos^c, Isabela Jubé Wastowski^d, Hatice Ceren Ates^{e, f}, Can Dincer^{e, f*} and Eric de Souza Gil^{a*}

^a Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Brazil;

^b Faculty of Pharmacy, Federal University of the Valleys of Jequitinhonha and Mucuri, Brazil;

^c Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^d Institute of Biological Sciences, State University of Goiás, Brazil;

^e Department of Microsystems Engineering – IMTEK, University of Freiburg, Germany;

^f FIT Freiburg Center for Interactive Materials and Bioinspired Technologies, University of Freiburg, Germany.

*Corresponding authors

E-mail address: ericgil@ufg.br (E. S. Gil), can.dincer@imtek.de (C. Dincer)

Table S1. Charge transfer resistance effect of glassy carbon electrode activation and protein immobilization.

Electrode	R _{ct} (kΩ)
GCE	0.022
^A GCE	0.028
^A GCE/Ab	0.152
^A GCE ^{CAS}	0.489
^A GCE:RTX	0.521

Table S2. Effect of CAS blocking at the bare electrode on the signal stabilization using different incubation times of RTX.

Time (min)	Rct(k Ω)		
	AGCE:RTX	AGCE ^{CAS} :RTX	AGCE/Ab ^{CAS} :RTX
0	0.0265	0.4950	0.5300
5	0.0595	0.5450	0.6100
10	0.0835	0.5600	0.6900
15	0.0995	0.5750	0.7000
20	0.1155	0.5700	0.7100

Table S3. Statistical analysis of the measurement results obtained.

Test	$\alpha = 0.05$	
	Significance level	P-value
F Test Anova slope	< 0.05	1.9323 ⁻³²
T Test of Student Linear coefficient	> 0.05	0.7001
Shapiro-Wilk waste normality	> 0.05	0.4866
Breusch Pagan homoscedasticity	> 0.05	0.6695

As the p-value (0) found in the ANOVA F test is less than 0.05, we reject the null hypothesis (zero slope) at the significance level of 5%, whereas the p-value of 0.7001 of the t-test is greater than 0.05, therefore, we do not reject the null hypothesis (intercept equal to zero) at the significance level of 5%. The correlation coefficient found of 0.99 is satisfactory, so we conclude that there is an adequate linear relationship, as the p-value of 0.6695 of the Breusch Pagan Test is greater than 0.05, we do not reject the hypothesis of equality of variances at the level of significance. of 5%, therefore, we have a homoscedastic model, finally, as the p-value of 0.7001 of the Shapiro-Wilk test is greater than 0.05, we do not reject the hypothesis of normality of residues at the level of significance of 5%.

Neste trabalho, foi desenvolvido um imunossensor impedimétrico para determinação de RTX, um fármaco mAb utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda. O imunossensor desenvolvido foi validado, apresentando exatidão e precisão adequadas para esse tipo de método, onde foi estabelecido o limite de detecção de 130 ng mL⁻¹. A seletividade do imunossensor otimizado também foi demonstrada em amostras de urina e soro sanguíneo, mesmo na presença de matriz de outros compostos biológicos.

O imunossensor desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta sensível e de baixo custo para a quantificação *in loco* do fármaco RTX em amostras biológicas para uma terapia personalizada. Não obstante, uma otimização adicional usando microfluídica para automatizar o procedimento do ensaio e a utilização de nanopartículas podem obter limites de detecção menores, ampliando as aplicações da técnica. Até o presente momento, é a primeira vez que um pAb produzido a partir da biotecnologia de gema do ovo é usado como elemento de bioreconhecimento para criar um imunossensor para a determinação de RTX. Além disso, a simplicidade das etapas de preparação do imunoensaio e sua padronização, é um conceito promissor a ser empregado para controle de qualidade de medicamentos e diagnóstico de outras doenças.

AFKHAMI, A.; HASHEMI, P.; BAGHERI, H.; SALIMIAN, J.; AHMADI, A.; MADRAKIAN, T., Impedimetric immunosensor for the label-free and direct detection of botulinum neurotoxin serotype a using Au nanoparticles/graphene-chitosan composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 93, p. 124-131, 2017.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPEZ, M. T. P., Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova**, v, 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANDREAKOS, E.; TAYLOR, P. C.; FELDMANN, M., Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases, **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 6, p. 615-620, 2002.

ATES, H. C.; ROBERTS, J. A.; LIPMAN, J.; CASS, A. E. G.; URBAN, G. A.; DINCER, C. On-Site Therapeutic Drug Monitoring, **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 11, p. 1262-1277, 2020.

ATES, H. C.; MOHSENIN, H.; WENZEL, C.; GLATZ, R. T.; WAGNER, H. J.; BRUCH, R.; HOEFFLIN, N.; SPASSOV, S.; STREICHER, L.; LOZANO-ZAHONERO, S.; FLAMM, B.; TRITTLER, R.; HUG, M. J.; KÖHN, M.; SCHMIDT, J.; SCHUMANN, S.; URBAN, G. A.; WEBER, W.; DINCER, C., Biosensor-Enabled Multiplexed On-Site Therapeutic Drug Monitoring of Antibiotics, **Advanced Materials**, v. 34, p. 2104555, 2022.

BERKOWITZ, S. A.; ENGEN, J. R.; MAZZEO, J. R.; JONES, G. B., Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars, **Nature Review Drug Discovery**, v. 11, p. 527-540, 2012.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Resolução RE nº 166**, de 24 de julho de 2017, que Dispõe sobre Validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, DF, 25 de julho de 2017.

BRAZACA, L.C.; IMAMURA, A. H.; GOMES, N. O.; ALMEIDA, M. B.; SCHEIDT, D. T.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; OLIVEIRA JR, O. N.; JANEGITZ, B. C.; MACHADO, S. A. S.; CARRILHO, E., Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, p. 5507–5517, 2022.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Livraria Almedina Coimbra, 1996.

CHEN, G. C.; LIU C. H.; WU, W. C. Electrochemical immunosensor for serum parathyroid hormone using voltammetric techniques and a portable simulator, **Analytica Chimica Acta**, v. 1143, p. 84-92, 2021.

CHEN, Y.; WANG, W.; YUAN, H.; LI, Y.; LV, Z.; CUI, Y.; LIU, J.; YING, S., Current State of Monoclonal Antibody Therapy for Allergic Diseases, **Engineering**. 2021.

CREMERS, S.; GUHA, N.; SHINE, B. Therapeutic drug monitoring in the era of precision medicine: opportunities! **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 82, p. 900– 902, 2016.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy, **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 3, p.134-138, 2018.

CHALGHOUMI, R.; BECKERS Y.; PORTETELLE D.; THÉWIS A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 13, p. 295-308, 2009.

CHINNADAYYALA, S. R.; PARK, J.; ABBASI, M. A.; CHO, S., Label-free electrochemical impedimetric immunosensor for sensitive detection of IgM rheumatoid factor in human serum, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, p. 111642, 2019.

CHOWDHURY, A. D.; TAKEMURA, K.; LI, T. C.; SUZUKI, T.; PARK, E. Y., Electrical pulse-induced electrochemical biosensor for hepatitis E virus detection. **Nature Communications**, v. 10, p. 3737, 2019.

CIMAFONTE, M.; FULGIONE, A.; GAGLIONE, R.; PAPAIIANNI, M.; CAPPARELLI, R.; ARCIELLO, A.; BOLLETTI, C. S.; BORRIELLO, G.; VELOTTA, R.; DELLA, V. B., Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of *Escherichia coli* in Drinking Water, **Sensors**, v. 20, p. 274, 2020.

CORDEIRO, T. A. R.; MARTINS, H. R.; FRANCO, D. L.; SANTOS, F. L. N.; CELEDON, P. A. F.; CANTUÁRIA, V. L.; LANA, M.; REIS, A. B.; FERREIRA, L. F., Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, p. 112573, 2020.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R., Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis, **Química Nova**, v. 29, 2006.

DEVI, R. V.; DOBLE, M.; VERMA, R. S. Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 688–698, 2015.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010.

DUTTA, G.; NAGARAJAN, S.; LAPIDUS, L. J.; LILLEHOJ, P. B., Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 372-377, 2017.

EASTON, E. B.; FRUEHWALD, H. M.; RANDLE, R.; SALEH, F. S.; EBRALIDZE, I. I. Probing the degradation of carbon black electrodes in the presence of chloride by electrochemical impedance spectroscopy. **Carbon**, 2020.

ELTAHIRA, M.; FLETCHER, E.; DYNESIUS, L.; JARBLAD, J. L.; LORD, M.; LAURÉN, I.; ZEKARIAS, M.; YU, X.; CRAGG, M. S.; HAMMARSTRÖM, C.; LEVEDAHL, K. H.; HÖGLUND, M.; ULLENHAG, G.; MATTSSON, M.; MANGSBO, S. M. Profiling of donor-specific immune effector signatures in response to rituximab in a human whole blood loop assay using blood from CLL patients, **International Immunopharmacology**. v. 90, 2021.

EMIR, G.; DILGIN, Y.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A., Amperometric nonenzymatic glucose biosensor based on graphite rod electrode modified by Ni nanoparticle/polypyrrole composite, **Microchemical Journal**, v. 161, p. 105751, 2021.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes, **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 8-11, 2013.

FELIX, F. S.; ANGNES, L., Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470-478, 2018.

FERNANDO, J.; JONES, R., The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 33, n. 3, p. 131-135, 2015.

FERREIRA JUNIOR, A. **Anticorpos IgY policlonais: Ferramentas auxiliares para o estudo in vitro de Toxoplasma gondii**. 2012. 114f. Dissertação (Doutorado em Imunologia e Parasitologia) – Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

FRANCESCO, C. Modeling electrochemical impedance spectroscopy, **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 13, pp. 132-139, 2019.

FREUDENBERGER, K.; GAUGLITZ, U. H. H.; Recent advances in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.79, p. 257-268, 2016.

GAMRY. Basics of electrochemical impedance spectroscopy. <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedancespectroscopy/>. Acesso em 16 de março de 2022.

GARCIA, L. F.; RODRIGUES, E. S. B.; DE SOUZA, G. R. L.; WASTOWSKI, I. J.; DE OLIVEIRA, F. M.; DOS SANTOS, W. T. P.; GIL, E. S., Impedimetric biosensor for bovine herpesvirus Type 1-antigen detection. **Electroanalysis**. v.32, p. 1100-1106, 2020.

GOKBUGET, N.; HOELZER, D.; Treatment with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia: current knowledge and future prospects. **Annals of hematology**, v. 4, p. 201-205, 2004.

GOODE, J. A.; RUSHWORTH, J. V. H.; MILLNER, P. A., Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. **Langmuir**, v. 31, p. 6267–6276, 2015.

GU, Y.; WANG, J.; PAN, M.; LI, S.; FANG, G.; WANG, S., Label-free impedimetric immunosensor based on one-step co-electrodeposited poly-(pyrrole-co-pyrrole-1-propionic acid) and reduced graphene oxide polymer modified layer for the determination of melamine, **Sensors Actuators, B**, v. 283, p.571-578, 2019.

HALDER, M.; BALLS, M.; HENDRIKSEN, C.; CUSSLER, K. ECVAM's activities on biologicals. **Alternatives Laboratory Animals**, v. 30 Suppl 2, p. 125-8, Dec 2002.

HAMPSON, G.; WARD, T. H.; CUMMINGS, J.; BAYNE, M.; TUTT, A. L.; CRAGG M. S.; DIVE C.; ILLIDGE T. M., Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects, **Journal of Immunological Methods**, v. 360, p.30-38, 2010.

HAN, Y.; WANG, J.; ZHANG, H.; ZHAO, S.; MA, Q.; WANG, Z. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): An efficiency method to monitor resin curing processes. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 250, p. 78-86, 2016.

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E. S. P., A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 35, n. 20, p. 2923-2950, 2012.

HSU, H. P.; LI, N. S.; CHEN, Y. T.; PANG, H. H.; WEI, K. C.; YANG, H. W.; A serological point-of-care test for Zika virus detection and infection surveillance using an enzyme-free vial immunosensor with a smartphone, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 151, p. 111960, 2020.

HUSSEIN, H. A.; KANDEIL, A.; GOMAA, M.; EL NASHAR, R. M.; EL-SHERBINY, M.; HASSAN, R. Y. A, SARS-CoV-2-Impedimetric Biosensor: Virus-Imprinted Chips for Early and Rapid Diagnosis, **ACS Sensors**, v. 6, p. 4098-4107, 2021.

ICH – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). **ICH Steering Committee**, Switzerland, 2005.

JACOBS, R.; LANGER-JACOBUS, T.; DUONG, M.; STAHL, K.; HALLER, H.; SCHMIDT, R. E.; SCHIFFER, M., Detection and quantification of rituximab in the human urine, **Journal of Immunological Methods**. v. 451, p. 118-121, 2017.

KARLSSON, M.; LARSSON, A.; KOLLBERG, H. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage, **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004.

KAUSHIK, A.; YNDART, A.; KUMAR, S; JAYANT, R. D.; VASHIST, A.; BROWN, A. N.; LI, C. Z.; NAIR, M., A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein, **Scientific Reports**, v. 8, p. 9700, 2018.

KHAKSARI, S.; AMERI, A. R.; TAGHDISI, S. M.; SABET, M.; BAMI, S. M. J. G.; ABNOUS, K.; SHAEGH, S. A. M., A microfluidic electrochemical aptasensor for highly sensitive and selective detection of A549 cells as integrin $\alpha 6\beta 4$ -containing cell model via IDA aptamers, **Talanta**, p. 123781, 2022.

KIM, J.; CAMPBELL, A. S.; DE ÁVILA, B. E. F.; WANG, J., Wearable biosensors for healthcare monitoring. **Nature Biotechnololy**, v. 37, p. 389–406, 2019.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 31, p. 356–382, 1893.

LI, F.; YE, Q.; CHEN, M.; ZHOU, B.; ZHANG, J.; PANG, R.; XUE, L.; WANG, J.; ZENG, H.; WU, S.; ZHANG, Y.; DING, Y.; WU, Q., An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 179, p. 113073, 2021.

LOYPRASERT, S.; HEDSTRÖM, M.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P.; MATTIASSON, B., Sub-attomolar detection of cholera toxin using a label-free capacitive immunosensor, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1977-1983, 2010.

MACÊDO, I. Y. L. **Determinação de piroxicam por voltametria de pulso diferencial em eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de perovskita LaFeO₃ e eletrodo de mina grafite**. 69 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2017.

MALVANO F.; PILLOTON R.; ALBANESE D., A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of *Salmonella* spp., **Food Chemistry**, v. 325, p. 126868, 2020.

MENEGHELLO, A., TARTAGGIA, S., ALVAU, D., M., POLO, F., TOFFOLI, G. Biosensing Technologies for Therapeutic Drug Monitoring, **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 4354-4377, 2018.

NAH, J. S.; BARMAN, S. C.; ZAHED, M. A.; SHARIFUZZAMAN, M.; YOON, H.; PARK, C.; YOON, S.; ZHANG, S.; PARK, J. Y., A wearable microfluidics-integrated impedimetric immunosensor based on Ti₃C₂T_x MXene incorporated laser-burned graphene for noninvasive sweat cortisol detection, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 329, p. 129206, 2021.

NAVAS, N.; HERRERA, A.; ORTEGA, M. A.; GARCÍA, S. A.; CABEZA, J.; RODRÍGUEZ, C. L., Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 9351-9363, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OGUNGBILE, A. O.; ASHUR, I.; ICIN, I.; SHAPIRO, O. H.; VERNICK, S., Rapid detection and quantification of microcystins in surface water by an impedimetric immunosensor, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 348, p. 130687, 2021.

ÖZBEK, O.; ISILDAK, O.; ISILDAK, I., A potentiometric biosensor for the determination of valproic acid: Human blood-based study of an anti-epileptic drug, **Biochemical Engineering Journal**, v. 176, p. 108181, 2021.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013

PAULY, D.; CHACANA, P. A.; CALZADO, E. G.; BREMBS, B.; SCHADE, R., Igy technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation, **Journal of Visualized Experiments**, v. 51, p. 3084, 2011.

PELÁEZ, E. C.; ESTEVEZ, M. C.; PORTELA, A.; SALVADOR, J. P.; MARCO, M. P.; LECHUGA, L. M., Nanoplasmonic biosensor device for the monitoring of acenocoumarol therapeutic drug in plasma, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 119, p. 149-155, 2018.

PUI, C. H.; JEHA, S., New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nature reviews**. v. 6, p.149-165, 2007.

RODRIGUES, C. A.; LIMA, M. T. C.; DE DOMENICO, E. B. L., Boas Práticas na Administração do Rituximab: Revisão Integrativa da Literatura, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68, n. 3, 2022.

RODRIGUES, E. S. B.; DE MACÊDO, I. Y. L.; DA SILVA, L. L. L.; THOMAZ, D. V.; DA CUNHA, C. E. P.; DE OLIVEIRA, M. T.; BALLAMINUT, N.; ALECRIM, M. F.; DE CARVALHO, M. F.; ISECKE, B. G.; LEITE, K. C. S.; MACHADO, F. B.; GUIMARÃES, F. F.; MENEGATTI, R.; SOMERSET, V.; DE SOUZA, E. G., Electrochemical Characterization of Central Action Tricyclic Drugs by Voltammetric Techniques and Density Functional Theory Calculations, **Pharmaceuticals**, v. 12, p. 116, 2019.

RODRIGUES, E. S. B.; MACÊDO, I. Y. L. D.; SILVA, G. N. D. M. E.; DE CARVALHO E SILVA, A.; GIL, H. P. V.; NEVES, B. J.; GIL, E. D. S. DNA-Based Electrodes and Computational Approaches on the Intercalation Study of Antitumoral Drugs. **Molecules**, v. 26, p. 7623, 2021.

RODRIGUES, E. S. B.; SILVA, G. N. M.; DE MACÊDO, I. Y. L.; DOS SANTOS, W. T. P.; DE SOUZA, G. R. L.; SANTOS, G. H.; WASTOWSKI, I. J.; ATES., H. C.; DINCER, C.; GIL, E. S., Impedimetric Immunosensor for On-Site Measurement of Rituximab from Invasive and Non-Invasive Samples, **Journal of The Electrochemical Society**, v. 169, p. 057529, 2022.

ROMANHOLO, P. V. V.; RAZZINO, C. A.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; PRADO, T. M.; MACHADO, S. A. S.; SGOBBI, L. F., Biomimetic electrochemical sensors: New horizons and challenges in biosensing applications, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 185, 2021.

ROSMALLEN, V. M.; NI Y.; VERVOORT, D. F. M.; ARTS, R.; LUDWIG, S. K. J.; MERKX, M., Dual-Color Bioluminescent Sensor Proteins for Therapeutic Drug Monitoring of Antitumor Antibodies, **Analytical Chemistry**. v. 90, n. 5, p. 3592–3599, 2018.

SERRANO, S.H.; MACHADO, S.A.S.; GIL, E.S. Métodos Eléctroquímicos. In: GIL, E.S. **Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3.ed. São Paulo, SP: Pharmabooks, p.431-432, 2010.

SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application IgYtechnology**. 1th Edition **Aetex**. p.13, 1996.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 255-261, 1993.

SI, Y.; MELKONIAN A. L.; CURRY, K. C.; XU Y.; TIDWELL, M.; LIU, M.; ZAKY, A. F.; LIU, M. X., Monoclonal antibody-based cancer therapies, **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v. 30, p. 301-307, 2021.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2009.

SOLDATKIN, O. O.; KUCHERENKO, I. S.; SIEDIUKO, D. V.; KUCHERENKO, D. Y.; DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P., **Electroanalysis**, v. 33, p. 2187-2195, 2021.

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A., Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress, **Nature Reviews Cancer**. v. 8, p. 473-480, 2008.

TRABIK, Y. A.; MOENES, E. M.; AL-GHOBASHY, M. A.; NEBSEN, M.; AYAD, M. F., Analytical comparability study of anti-CD20 monoclonal antibodies rituximab and obinutuzumab using a stability-indicating orthogonal testing protocol: Effect of structural optimization and glycoengineering, **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v. 1159, 2020.

TRINDADE, E. K. G.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F., A probeless and label-free electrochemical immunosensor for cystatin C detection based on ferrocene functionalized-graphene platform, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 138, p. 111311, 2019.

TRUFFOT, A.; JOURDIL, J. F.; SEITZ-POLSKI, B.; MALVEZZI, P.; BRGLEZ, V.; STANKELABESQUE, F.; GAUTIER-VEYRET, E., Simultaneous quantification of rituximab and eculizumab in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with rituximab ELISA kits, **Clinical Biochemistry**, v. 87, p. 60-66, 2021.

TSAI, W. T.; SUN, I. W. Electrodeposition of aluminum on magnesium (Mg) alloys in ionic liquids to improve corrosion resistance. Woodhead Publishing Series in Metals and Surface Engineering, Corrosion Prevention of Magnesium Alloys, Woodhead Publishing, p. 393-413, 2013.

VIGNERON, J.; ASTIER, A.; TRITTLER, R.; HECQ, J. D.; DAOUPHARS, M.; LARSSON, I.; POURROY, B.; PINGUET, F., SFPO and ESOP recommendations for the practical stability of anticancer drugs: An update. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v.71, p. 376-379, 2013.

WAINSTEIN, A. J.; CALABRICH, A.; MELO, A. C.; BUZAID, A. C.; KATZ, A., ANJOS, C. A., BALDOTTO, C.; MATHIAS, C. M. C.; GOMES, E. E.; MOURA, F.; JUNIOR, G. C.; HARADA, G.; MARTA, G. N.; FERNANDE, G. S.; FARIA, L. D. B. B.; LALONI, B.; HOFF, P. M. G.; MUNHOZ, R. R.; BARROSO-SOUSA, R.; DE AZEVEDO, S. J.; DE LIMA, V. C. C.; JUNIOR, W. N. W., Diretrizes brasileiras para o manejo de eventos adversos relacionados ao sistema imunológico associados a inibidores de checkpoint. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 13, p. 1-15, 2017.

WEINER, L. M.; SURANA, R; WANG, S., Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 317-327, 2010.

WHO **World Health Organization**. Cancer - Fact-sheets [Internet]. [cited 2022 Jan 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

WONG, A. C.; WRIGHT, D. W.; CONRAD, J. A. Functionalized gold nanoparticles for detection of cancer biomarkers. In: PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. (Eds.), *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. **Dordrecht: Springer**, 2015.

ZHANG, B.; DING, C., Displacement-type amperometric immunosensing platform for sensitive determination of tumour markers, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 82, p. 112-118, 2016.

ZHANG, Y.; ZHANG, R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, p. 81-84, 2018.

ZHAO, Y.; LI, Y.; ZHANG, P.; YAN, Z.; ZHOU, Y.; DU, Y.; QU, C.; SONG, Y.; ZHOU, D.; QU, S.; YANG, R., Cell-based fluorescent microsphere incorporated with carbon dots as a sensitive immunosensor for the rapid detection of *Escherichia coli* O157 in milk, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 179, 113057, 2021.

ZHAO, Y.; MA, X.; WANG, Z.; XU, T.; WU, W.; FONG, H. Electrospun TiC/C composite nanofibrous felt and its energy-related applications, *Woodhead Publishing Series in Textiles, Electrospun Nanofibers*, **Woodhead Publishing**, p. 341-369, 2017.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery, **Drug Discovery Today**, v.8, p. 364-371, 2003.