



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Eletroanálise de fármacos em células eletroquímicas
miniaturizadas**

João Diogo Ruivo Correia de Oliveira

Orientador(es) | Jorge Ginja Teixeira

Évora 2021





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

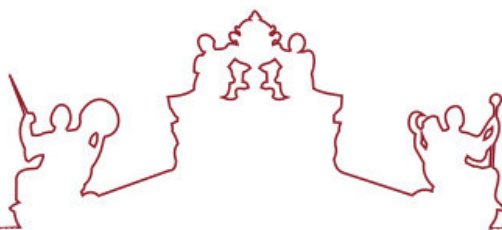
Dissertação

**Eletroanálise de fármacos em células eletroquímicas
miniaturizadas**

João Diogo Ruivo Correia de Oliveira

Orientador(es) | Jorge Ginja Teixeira

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Célia Maria Antunes (Universidade de Évora)

Vogais | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora) (Arguente)
Jorge Ginja Teixeira (Universidade de Évora) (Orientador)

“Your assumptions are your windows on the world. Scrub them off every once in a while, or the light won't come in.”

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

Início este texto por agradecer a todas as pessoas que me apoiaram no decorrer do meu trabalho e à instituição. Agradeço primeiramente à Universidade de Évora, onde realizei todo o meu percurso académico até à data.

Quero também deixar o meu especial agradecimento ao meu orientador, e mais que isso, amigo, Professor Jorge Teixeira, onde reconheço as excelentes virtudes enquanto ser humano, como a compreensão, amizade, apoio, acessibilidade e disponibilidade. Agradeço também a disposição deste nosso projeto. Tem sido uma honra aprender consigo, desde o início do meu percurso académico.

Quero agradecer também à minha família, pois tiveram o maior papel de todos como seria de esperar. Ao meu sobrinho que é o maior motivo da minha alegria, vê-lo crescer.

Dedico esta tese aos meus avós, à minha avó Silvina que continua a oferecer o seu amor incondicional, e em especial ao meu Avô Manuel, que tanto me aturou e educou, no que diz respeito aos meus anos de vida, e que agora partiu, para que fosse sempre a melhor versão no dia de amanhã e ao meu Avô Felisberto também já falecido.

Aos meus bons amigos, Paulo Sousa e Rafaela Silva. Obrigado por toda a vossa honestidade, apoio, incentivo, em todos os momentos.

A todos os que passaram na minha caminhada, e em especial na minha vida académica, pois sem vós nunca teria vivido esta experiência da mesma forma. Agradeço todo o saber que me passaram desde as suas próprias tradições até às lições de vida. Agradeço todo o apoio e motivação que me foi dado por estes.

Enumerando, Bruno Madeira, Pedro Alves, Luís Galvão, José Carvalho, Ricardo Silva, Carolina Almeida, a todos um muito obrigado, e em especial a um amigo que já partiu, a honra de ter tido a tua amizade, um grande abraço Paulo Sousa

RESUMO

Atualmente verifica-se que o desenvolvimento de células eletroquímicas miniaturizadas constitui uma área de elevada aplicação no âmbito da análise de fármacos e outras drogas. O presente trabalho desenvolve-se neste contexto.

Recorrendo à voltametria cíclica e voltametria de varrimento linear, e à utilização de elétrodos de carbono de tinta impressa comerciais, revestidos com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, este trabalho centra-se na investigação eletroanalítica pioneira do fármaco bilastina, um anti-histamínico de segunda geração. No trabalho investiga-se o comportamento anódico da bilastina num meio hidrometanólico e desenvolve-se uma metodologia voltamétrica com potencial para ser utilizada na deteção e quantificação da bilastina em amostras reais.

Os resultados mostraram que a bilastina sofre um processo de oxidação irreversível, que depende do pH do meio. O método de quantificação desenvolvido possui boas características analíticas, sendo que o sensor pode ser reutilizado. Na quantificação da bilastina nas amostras reais obtêm-se boas taxas de recuperação.

Palavras-chave: Anti-histamínico, Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, elétrodos de carbono de tinta impressa, quantificação voltamétrica

ABSTRACT

Currently, it is verified that the development of miniaturized electrochemical cells constitutes an area of high application in the field of pharmaceuticals and other drug analysis. The present work is developed in this context.

Using cyclic voltammetry and linear scanning voltammetry, and the use of commercial screen-printed carbon electrodes coated with multi-walled carbon nanotubes, this work focuses on pioneering electroanalytical research of the drug bilastine, a second-generation antihistamine. In this work we investigate the anodic behaviour of bilastine in a hydro-methanolic medium, and a voltammetric methodology with potential to be used in the design and quantification of bilastine in real samples is developed.

The results showed that bilastine undergoes an irreversible oxidation process that depends on the pH of the medium. The quantification method developed has good analytical characteristics, and the sensor can be reused. In the quantification of bilastine in the actual samples, good recovery rates are obtained.

Key-words: Anti-histaminic, Multiple Wall Carbon Nanotubes, Screen Printed Carbon Electrode, Voltammetric Quantification

ÍNDICE GERAL

Conteúdo

1. Problemática	1
2. Introdução	3
3. Técnicas Analíticas.....	5
4. Procedimento Experimental	11
a) Equipamento e medições.....	11
b) Reagentes e soluções	12
c) Preparação de soluções	12
d) Equipamento Auxiliar	13
e) Preparação de Soluções para Análise Voltamétrica.....	13
f) Quantificação	14
5. Apresentação e Discussão de Resultados	16
6. Conclusões.....	38
7. Perspetivas futuras.....	39
8. Referências bibliográficas	40
Anexos	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Voltametria cíclica (CV): (a) Potencial aplicado ao longo do tempo, (b) curva corrente vs potencial de um sistema reversível a diferentes velocidades de varrimento. (adaptado)	7
Figura 2. Respostas voltamétricas cíclicas da bilastina ($4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (a) sensor MWCNTs-SPCE (15 μL de dispersão) e (c) sensor SPCE não modificado. As linhas a tracejado (b) e (d) representam as respostas dos brancos. Potencial inicial (Ei): 0.200 V; Velocidade de varrimento: 50 mV s^{-1}	16
Figura 3. Intensidade corrente de pico vs quantidade de dispersão MWCNT/DHP na superfície do SPCE. $[\text{BIL}] = 4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ solução de eletrólito de suporte (pH 6.76). Mesmas condições voltamétricas que na Fig. 2.....	17
Figura 4. Três voltamogramas consecutivos da BIL $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no sensor MWCNTs/SPCE. Condições iguais à Fig. 1.	19
Figura 5. Efeito do tempo de repouso no pico anódico da bilastina ($4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$): voltamogramas cíclicos para três períodos diferentes e variação do potencial do pico com o tempo de duração. Velocidade de varrimento: 50 mV s^{-1}	20
Figura 6 (A,B). Voltamogramas cíclicos obtidos a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} em solução de eletrólito de suporte a diferentes valores de pH, contendo BIL $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, com Ei: 0,200V.....	21
Figura 7. Dependência do potencial de pico em relação ao pH da solução de eletrólito de suporte. (inserção: dependência do pico de corrente com o pH).....	22
Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos a velocidades de varrimento de (a) 25, (b) 50, (c) 100, (d) 200, (e) 300 and (f) 400 (mV s^{-1}), em solução de eletrólito de suporte pH 6.76 contendo BIL $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Potencial inicial (Ei): 0.200 V. A inserção (A) mostra o gráfico de $\log I_p$ vs. $\log v$	24
Figura 9. Nas Figuras (A) e (B) estão dispostos, respectivamente, a dependência da corrente de pico com a velocidade de varrimento e com a raiz quadrada da velocidade de varrimento.	25
Figura 10. Dependência do potencial de pico em relação ao logaritmo da velocidade de varrimento.....	26
Figura 11. Não ativação (a, b) vs. ativação eletroquímica (c, d) da superfície do elétrodo: voltamogramas de varrimento linear sem BIL (a, c) e com BIL $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b, d). Velocidade de varrimento: 50 mV s^{-1}	27
Figura 12. Curvas de calibração por LSV da bilastina a 50 (a azul) e 100 mV s^{-1} (a vermelho).....	28
Figura 13. Voltamogramas LSV obtidos a 50 mV s^{-1} em eletrólito de suporte pH 6,76 sob as condições experimentais otimizadas para as concentrações de BIL (a) 0, (b) 0.2, (c) 0.4, (d) 0.8, (e) 1.6, (f) 2.0, (g) 2.8, (h) 3.6, and (i) $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Potencial inicial: (Ei): 0.200 V.....	28
Figura 14. Repetibilidade do sensor após ser sujeito a procedimento de recondicionamento para concentrações de BIL (a) $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, and (c) $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$	30
Figura 15. Voltamogramas de varrimento linear com bilastina apenas (BIL), com ureia (+U), glucose (+G), e ácido ascórbico (+AA). A linha a tracejado é o sinal voltamétrico do eletrólito de suporte (s.e.). Velocidade de varrimento: 100 mV s^{-1}	33
Figura 16. Voltamogramas de varrimento linear a 50 mV s^{-1} com amostra dopada com o fármaco e sem, e com 4 adições padrão (linhas solidas). Na inserção está representada a curva de calibração da adição padrão para a quantificação de bilastina.....	34

- Figura 17.** Voltamograma de varrimento linear a 100 mV s^{-1} com urina dopada (s. urina) e amostra não dopada e com 4 adições padrão (linhas solidas). A linha a tracejado é o sinal voltamétrico da solução de eletrólito de suporte. A linha verde é o sinal voltamétrico da urina não dopada (u. urine). Na inserção está representada a curva de calibração da adição padrão para a quantificação de bilastina. Adicionalmente está representado a curva de calibração da adição padrão para a amostra de urina não dopada..... 35
- Figura 18.** Voltamogramas de varrimento linear obtidos a 50 mV s^{-1} da amostra dopada com fármaco sem e com 3 adições padrão (linhas sólidas). A tracejado está representado o sinal voltamétrico da solução de eletrólito de suporte. A inserção mostra a respectiva curva de calibração da adição padrão para a quantificação de BIL. A quantidade de solução utilizada foi metade da representada na Fig. 15. 35
- Figura 19.** Voltamogramas de varrimento linear obtidos a 100 mV s^{-1} da amostra dopada com fármaco sem e com quatro adições padrão (linhas solidas). A tracejado está representado o sinal voltamétrico da solução de eletrólito de suporte. A inserção mostra a respectiva curva de calibração da adição padrão para a quantificação de BIL. A quantidade de solução utilizada foi igual á representada na Fig. 15. 36
- Figura 20.** Voltamogramas de varrimento linear obtidos a 100 mV s^{-1} da amostra de urina dopada (s. urine) sem e com 3 adições padrão (linhas solidas). A inserção mostra a respectiva curva de calibração da adição padrão para a quantificação de BIL, sendo que neste ensaio a quantidade de bilastina adicionada foi 77,8% da quantidade adicionado na Fig. 16..... 37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de solução adicionadas no protocolo 1.	15
Tabela 2. Quantidades de solução adicionadas no protocolo 2.	15
Tabela 3. Características analíticas da determinação de BIL por LSV em duas velocidades de varrimentos diferentes (3 repetições cada).	29
Tabela 4. Efeito de potenciais interferentes na resposta voltamétrica a uma concentração de BIL de 1.6 µg mL ⁻¹	32
Tabela 5. Determinação de bilastina em Bilaxten®, e amostra dopada e não dopada de urina.	36

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação proposta da electrooxidação da molécula de Bilastina.	18
Esquema 2. Proposto da perda de próton antes da transferência eletrónica da molécula de Bilastina.	23

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1. Molécula de Bilastina.	3
Ilustração 2. Representação de uma célula eletroquímica convencional (a), e de um eletrodo impresso de carbono (b). (WE) eletrodo de trabalho, (CE) contra eletrodo, (RE) eletrodo de referência. (adaptado)	6

Índice de Abreviaturas

A: ampere

AA: Ácido Ascórbico

BIL: Bilastina

CE: Contra-életrodo

CNT: Carbon Nanotubes, Nanotubos de carbono

CV: Cyclic Voltammetry, Voltametria Ciclica

CVR: Carbono Vitreo Reticulado

DHP: Dihexadecil Phosphate, Fostato DiHexadecilo

e^- : eletrão

E_i : Potencial de início

$E_{p,a}$: Potencial de pico anódico

$E_{p,c}$: Potencial de pico catódico

FIA: Flux injection analysis, Análise por injeção de fluxo

+G: Glucose

H^+ : Protão Hidrogénio

I: Intensidade de corrente

$I_{p,a}$: Corrente pico anódico

$I_{p,c}$: Corrente pico catódico

LOD: Limit of Detection, Limite de Deteção

LOQ: Limit of Quantification, Limite de Quantificação

LSV: Linear Sweep Voltammetry, Voltametria varrimento linear

μA : microampere

μg : micrograma

μM : micromolar

mM: milimolar

mV: milivolt

MWCNT: Multi Walled Carbon Nanotubes, Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

PA: Princípio ativo

PC: Pasta de Carbono

RE: Reference Electrode, Eléctrodo de Referência

s: segundo

SPCE: Screen-Printed Carbon Electrode, Eléctrodo de carbono de tinta impressa

SWCNT: Single-Walled carbon nanotube, nanotubos de carbono de parede simples

+U: Ureia

UV-VIS: Intervalo de radiação entre ultravioleta e o visível

V: volt

v: velocidade de varrimento

WE: Working Electrode, Eléctrodo de Trabalho

1. Problemática

Atualmente, é importante estudar aprofundadamente os fármacos existentes, não só a nível dos seus efeitos e do controlo de processos conducente ao fabrico dos mesmos e da comercialização (incluindo contrafação), mas também relativamente aos seus impactos, ou análise no sistema bioquímico onde atuam.

Devido ao constante desenvolvimento de fármacos inovadores com princípios ativos novos e à sua crescente introdução no mercado, torna-se importante desenvolver novas metodologias analíticas que permitam obter informações mais completas e rigorosas sobre estas novas classes de substâncias.

Os principais métodos utilizados na monitorização e quantificação destes compostos são, essencialmente, técnicas cromatográficas, que são bastante sensíveis e seletivas com limites de deteção baixos, contudo são técnicas demoradas e relativamente complicadas de executar, além dos custos associados a equipamentos, materiais e consumíveis utilizados. Em alternativa, tem vindo a ser desenvolvido nos últimos anos um interesse em técnicas, com sucesso, neste tipo de quantificações, denominadas de técnicas eletroanalíticas. A grande vantagem preza-se pelas quantidades ínfimas de amostra, reagentes e soluções auxiliares que podem ser utilizadas, a simplicidade e rapidez nos processos envolvidos, bem como o baixo custo e portabilidade do equipamento eletroquímico utilizado (Rossier, Vollet, Carnal, & Lagger, 2002; Sripirom, Sim, Khunkaewla, Suginta, & Schulte, 2018).

A miniaturização das células eletroquímicas torna-se vantajosa dado os pequenos volumes de amostra a utilizar para a análise qualitativa, bem como quantitativa tornando-se assim mais barata, fácil e rápida de montagem. Aliado aos potenciostatos controlados por *software*, todos os tipos de voltametria aplicados à eletrólise são exequíveis nestas minicélulas eletroquímicas (Chang, Xie, Li, & Zhu, 2016; Sripirom et al., 2018).

A bilastina, daqui em diante designada por BIL, é um fármaco anti-histamínico de uso crescente, para o qual se conhece um número escasso de métodos analíticos para a sua determinação, quer nas formulações farmacêuticas que constitui, quer em fluidos biológicos humanos. Neste sentido torna-se importante

desenvolver e estabelecer novas metodologias rápidas e precisas para a determinação de bilastina em aplicações, como o controle de qualidade das próprias preparações farmacêuticas e controle clínico de consumidores de BIL.

Entre os métodos analíticos bem descritos para determinação de bilastina, estão incluídos muito poucos métodos cromatográficos (Berrueta, Bakkali, Gonzalo, Lucero, & Orjales, 2001; Lasseter, Sologuren, La, & Stacy, 2013; Ouarezki, Guermouche, & Hassane, 2019; Popovi & Staji, 2016), que são eficazes, mas relativamente demorados e caros, e os métodos espectrofotométricos mais simples com base na medição de absorvância molecular na região UV (Ouarezki et al., 2019; Rambabu, 2020).

Cientes desta limitação e do fato de que atualmente os métodos eletroanalíticos possuem créditos bem estabelecidos e constituem uma forte alternativa para a detecção e determinação de moléculas biologicamente relevantes (Gumustas & Ozkan, 2011; Ozkan, 2015), um dos principais objetivos deste trabalho, foi desenvolver uma nova metodologia eletroquímica simples e sensível, para a quantificação de BIL em formulações farmacêuticas e amostras biológicas, nomeadamente na urina uma vez que a BIL é maioritariamente excretada sem metabolização hepática. Outro objetivo relevante deste trabalho foi obter um entendimento preciso sobre o comportamento de eletrooxidação da molécula alvo, contribuindo assim para ampliar o conhecimento sobre esta molécula orgânica e abrir caminho para outros desenvolvimentos eletroanalíticos, para determiná-la.

2. Introdução

2.1 BILASTINA

A bilastina (Ilustração 1) é quimicamente conhecida por ácido 2-[4-(2-(4-[1-(2-etoxietil)benzimidazole-2-il] piperidin-1-il)etil)fenil]-2-metilpropanóico, ou de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), como ácido p-[2-[4-[1-(2-etoxietil)-2-benzimidazolil] piperidino] etil]- α -metilhidratrópico).

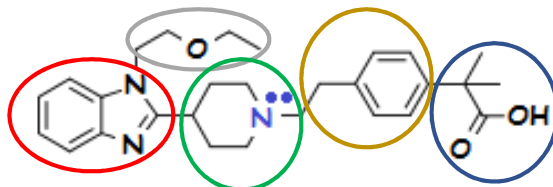


Ilustração 1. Molécula de Bilastina. ácido 2-[4-(2-(4-[1-(2-etoxietil)benzimidazole-2-il] piperidina-1-il)etil)fenil]-2-metilpropanóico.

É um anti-histamínico de 2ª geração, uma importante classe de inibidores reversíveis com elevada seletividade para os recetores histaminicos-h1. Uma das características deste anti-histamínico é o fato de não ter propriedades sedativas, ou fracamente sedativas, e ter ausência de capacidade de atravessar a barreira sangue-cérebro, atuando principalmente fora do sistema nervoso central (Canonica et al., 2003; Jáuregui, García-lirio, Soriano, & Gamboa, 2012; Kawauchi, Yanai, Wang, & Itahashi, 2019). Pertencendo ao grupo dos anti-histamínicos piperidínicos e classificado como potente e não sedativo, possui também um perfil de segurança excelente (El-kommos, El-gizawy, Atia, & Hosny, 2015; Jáuregui et al., 2012). A bilastina é prescrita como posologia oral para alívio sintomático de urticaria espontânea ou crónica e rinoconjuntivite alérgica (Canonica et al., 2003; Corcostegui, Labeaga, Berisa, & Orjales, 2005; El-kommos et al., 2015). A nível das fases ed ADME, a bilastina é rapidamente absorvida e não interage com o sistema citocromo P450 (Cy-P450), não sofrendo por isso uma metabolização significativa em humanos e por isso é excretada maioritariamente como composto original na urina (Jáuregui et al., 2012), (Bachert, Kuna, & Zuberbier, 2010; Lasseter et al., 2013) (<https://go.drugbank.com/drugs/DB11591>, acedido a 4 junho). A bilastina não é nenhum derivado estrutural, metabolito ou enantiómero de nenhum histamínico conhecido, é sim uma molécula projetada e desenvolvida pela farmacêutica espanhola FAES Farma, com a intenção de atingir todos os requisitos de um anti-histamínico de segunda geração (Jáuregui et al., 2012). A BIL apresenta uma eficácia semelhante a outros fármacos anti-histamínicos tais como a

cetirizina, levocetirizina e fexofenadina (Church & Labeaga, 2017; Jáuregui *et al.*, 2012), e é comercializada sob a forma de comprimidos ou xarope sob diferentes nomes como por exemplo, Bilaxten®, Blexten®, Bilacad® entre outros [<https://www.drugs.com/international/bilastine.html>, acessado a 4 junho].

2.2 ANÁLISE DE PA's EM FÁRMACOS

Nos últimos anos, houve um extraordinário progresso na descoberta, síntese e meios de distribuição dos princípios ativos (PA), utilizados no diagnóstico prevenção e tratamento de doenças (De la Guardia & Esteve-Turrilas, 2019).

Contudo, é necessário controlar os processos de fabricação das formulações farmacêuticas, bem como adequar a dosagem das mesmas, e ainda assegurar a qualidade do PA. Um dos pontos importantes é assegurar a dosagem eficaz e controlar a sua concentração no fluido de transporte ou tecido alvo, após a sua administração. É necessário, por isso, a recolha de dados quantitativos bem como qualitativos.

As técnicas utilizadas, recorrentemente, possuem elevada exatidão e precisão, como é o caso da cromatografia líquida (Wren & Tchelitcheff, 2006), eletroforese capilar (Suntornsuk, 2010), métodos espectroscópicos diretos (Weston *et al.*, 2005) ou métodos eletroquímicos (Gil & Melo, 2010). Sendo estes últimos suportados pelos princípios da biosustentabilidade.

De uma forma geral, muitos dos princípios ativos dos fármacos, têm elevado potencial de se oxidarem ou reduzirem prontamente, ao contrário dos excipientes da formulação farmacêutica (revestimento, cápsula, entre outros), nos meios complexos em que estão inseridos. Estes processos envolvem a transferência de elétrons, que estão acopladas as reações químicas, sendo por isso as técnicas eletroanalíticas as mais apropriadas, como é o caso por exemplo da voltametria cíclica.

No caso da avaliação da formulação terapêutica, a preparação da amostra consiste em dissolver o fármaco num solvente adequado, e a análise pode ser executada diretamente, sem que exista qualquer interferência dos excipientes, mostrando-se estas técnicas superiores às convencionais e métodos espectroscópicos.

3. Técnicas Analíticas

3.1. Técnicas Voltamétricas

O termo voltametria refere-se a um conjunto vasto de técnicas eletroquímicas, onde por indução de um potencial elétrico variável controlado numa célula eletrolítica, ocorrem processos de transferência de elétrons, em alguns casos de iões, e também processos interfaciais não-faradáicos.

Por norma, a voltametria é utilizada com o objetivo de determinar e caracterizar analiticamente espécies com capacidades para serem reduzidas ou oxidadas num eletrodo, isto é, espécies eletroativas (Mirceski, Skrzypek, & Stojanov, 2018). No entanto, a aplicação deste tipo de técnicas estende-se também à caracterização, deteção e quantificação, direta ou indireta, de espécies químicas, ou processos, em que não ocorrem processos faradáicos.

As técnicas voltamétricas, atualmente, requerem quantidades de amostra muito reduzidas, desde os microlitros até aos mililitros, de solução eletrolítica, uma vez que os eletrodos utilizados têm uma área superficial inferior ao centímetro quadrado, e também já existem conceções miniaturizadas como eletrodos impressos num suporte inerte, eletrodos desenvolvidos em pontas de pipeta, ou eletrodos interdigitados com dimensões micrométricas. Na seguinte ilustração (Ilustração 2) apresenta-se um sistema eletroquímico usual, uma célula voltamétrica composta por três eletrodos, o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e pelo contra-eletrodo. No contra-eletrodo ocorrem reações eletroquímicas desconhecidas, ou sem interesse, no entanto são tomadas medidas de modo a torná-las irrelevantes não perturbando o sinal eletroquímico obtido. O eletrodo de referência, deve apresentar sempre uma composição química constante, o que permite que o seu potencial elétrico também o seja. Por sua vez, o eletrodo de trabalho é o eletrodo passível (ou não) de modificação, onde o potencial é induzido ao sistema e onde se produzem as reações ou fenómenos em análise.

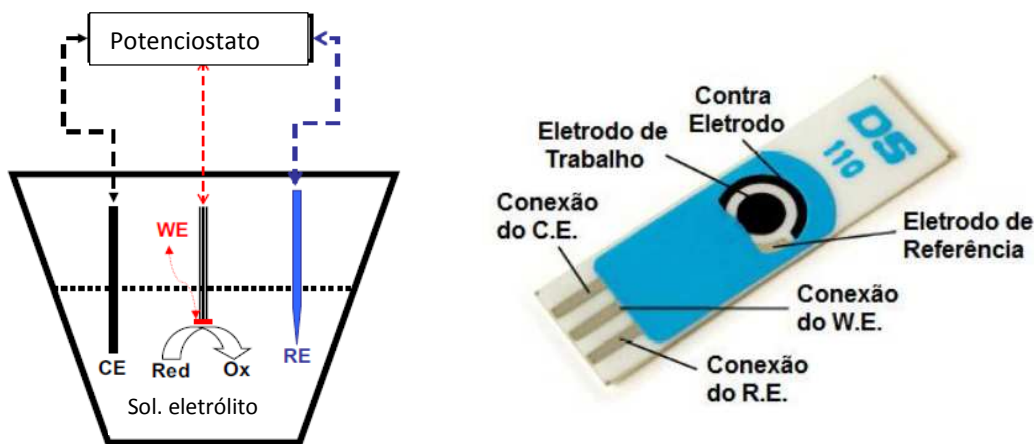


Ilustração 2. Representação de uma célula eletroquímica convencional (a), e de um eletrodo impresso de carbono (b). (WE) eletrodo de trabalho, (CE) contra-eletrodo, (RE) eletrodo de referência. (adaptado)

3.2. Voltametria Cíclica e Voltametria de varrimento linear

Os métodos de varrimento de potencial, como é o caso da voltametria de varrimento linear (Linear Sweep Voltammetry, LSV) e da voltametria cíclica (Cyclic Voltammetry, CV), são os mais utilizados para o diagnóstico de processos eletroquímicos, ou identificação e quantificação de espécies eletroativas (Ozkan *et al.*, 2015).

A diferença entre estes dois métodos, LSV e CV, é que o primeiro envolve apenas um varrimento unidirecional, enquanto a CV é bidirecional formando um ciclo, ou múltiplos ciclos. A CV, é comumente utilizada em fases iniciais de estudos de sistemas eletroquímicos, pois fornece informação qualitativa, permite um rápido escrutínio sobre pares redox, elucida a cinética das reações eletroquímicas e permite a rápida determinação de potenciais reações químicas que precedam ou sucedam a transferência de elétrons, na superfície do eletrodo (De la Guardia & Esteve-Turrillas, 2019; Ozkan *et al.*, 2015).

Nas LSV e CV convencionais, as medições eletroquímicas são normalmente efetuadas em soluções em repouso de uma espécie eletroativa num eletrólito de suporte inerte. A concentração destas espécies eletroativas é normalmente entre 10 μM e 1 mM.

A técnica LSV/CV consistem, portanto na aplicação de um potencial, que aumenta ou diminui linearmente (ou em escada) em função do tempo de acordo

com $E = E_i + vt$, sendo E_i o potencial inicial, v a velocidade de varrimento (mV/s) (Figura 1).

O E_i é escolhido, normalmente, para que as espécies químicas sob análise não estejam inicialmente oxidadas ou reduzidas. Desta forma o potencial varia para um E_{max} ou E_{min} onde depois, no caso da CV faz o percurso inverso (janela selecionada, que permite a análise do processo de oxidação e redução) registrando a corrente (I , amperes (A)) ao longo do potencial aplicado (E , volt (V)).

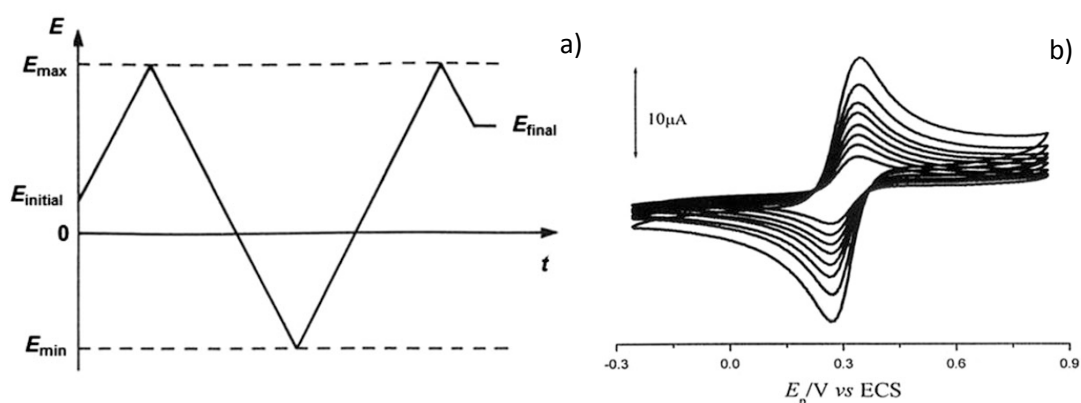


Figura 1. Voltametria cíclica (CV): (a) Potencial aplicado ao longo do tempo, (b) curva corrente vs potencial de um sistema reversível a diferentes velocidades de varrimento. (adaptado)

À medida que o potencial aplicado se aproxima do potencial associado ao processo redox, forma-se uma corrente anódica ou catódica, atingindo um pico máximo, seguido de um decréscimo, associado ao consumo da espécie eletroativa na superfície do eletrodo.

A vantagem da CV é que esta é capaz de gerar novas espécies, durante o varrimento de potencial num dado sentido, e no varrimento subsequente no sentido inverso provar a existência das mesmas. Nesta técnica os parâmetros mais importantes são as magnitudes das correntes de pico, $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$, e os respectivos potenciais a que ocorrem $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$. Contudo, a obtenção de valores de picos precisos é a tarefa mais complicada, mas atualmente com a ajuda de programas informáticos adequados e especificamente desenvolvidos para o efeito, a análise de voltamogramas cíclicos tornou-se mais fácil (Mabbott, 1983; Rountree, McCarthy, Rountree, Eisenhart, & Dempsey, 2017).

Indo ao encontro de sistemas irreversíveis de CV, quando a cinética tem maior efeito em abrandar a transferência eletrónica, os picos diminuem em altura e ficam mais largos, sendo que os potenciais dos picos catódicos e anódicos

ficam mais separados. Pode observar-se nos sistemas totalmente irreversíveis, a ausência de reação reversa, como é de notar o caso da maioria dos compostos farmacêuticos.

Na maior parte das determinações quantitativas, é utilizado apenas a LSV, obtendo um pico voltamétrico logo no primeiro varrimento. Contudo, alguns investigadores continuam a preferir usar a CV para quantificar os compostos farmacêuticos. No entanto, o limite de detecção (Limit of detection, LOD) em ambas técnicas é controlado pela razão das correntes faradaicas em relação à corrente de carga (correntes capacitivas)(Ozkan *et al.*, 2015).

Estas técnicas são apropriadas para a determinação rápida, simples e precisa de princípios ativos, com uma sensibilidade suficiente.

As principais vantagens da CV e LSV são a especificidade, dado a larga escala de tempo e boa resolução dos picos nos voltamogramas, a rapidez com que são produzidas as curvas Corrente vs. Potencial (voltamogramas), e a sensibilidade analítica. Outra vantagem é, por exemplo, a capacidade de hifenização com outras técnicas analíticas, como análises por injeção em fluxo (FIA), ou acoplamento a técnicas cromatográficas, eletroforese capilar, espectrometria UV/Vis, espectroscopia Raman, entre outras.

A CV é uma técnica bastante apelativa para o diagnóstico qualitativo das reações químicas que precedem ou antecedem a transferência eletrónica, associada aos princípios ativos de formulações farmacêuticas, biomoléculas, ou produtos inorgânicos. Permite, também esclarecer os mecanismos redox de moléculas com elevada importância biológica, permitindo observações e a compreensão dos processos redox *in vivo*, importantes em neurociência e atividade farmacológica (Ozkan *et al.*, 2015).

3.3. Eléttodos

Os eléctrodos que compõem o sistema são de elevada importância, desta forma, devem ser concebidos ou modificados de modo a que correspondam às expectativas do estudo, ou se adequem às análises a efetuar.

Uma das substâncias elementares mais utilizada como eléctrodo sólido é o carbono, pouco dispendioso, tendo já sido utilizados diversos alótropos de carbono. A forma como os átomos de carbono se ligam entre eles, ou seja como 4 dos 6 eletrões de valência do átomo de carbono, preenchem as orbitais

híbridas, sp, sp² e sp³, aquando das ligações carbono-carbono, originam alótropos de carbono que são utilizados em ou como elétrodos, exemplificando: carbono vítreo reticulado (CVR), carbono vítreo (CV), pasta de carbono (PC), elétrodos de tinta de carbono impressa (SPCE), e nanotubos de carbono (Carbon nanotubes, CNT), entre outros. Contudo, as propriedades destes diferem ao nível da estrutura da superfície, funcionalidade química da superfície, e propriedades eletrónicas, o que pode determinar fortemente a cinética e mecanismo da reação redox. (Ozkan *et al.*, 2015).

A utilização dos elétrodos de carbono, em estudos eletroanalíticos de compostos farmacêuticos eletroativos, deve-se à elevada estabilidade química e eletroquímica dos materiais à base de carbono.

Neste estudo, foram utilizados elétrodos de tinta de carbono impressa comerciais (Screen-Printed Carbon Electrodes, SPCE).

A tecnologia de impressão em superfície é utilizada na produção em massa de plataformas sensoras eletroquímicas, normalmente descartáveis, com um custo-volume de produção relativamente baixo, e que possibilitam a obtenção de resultados altamente reprodutíveis. A configuração completa da plataforma eletroquímica inclui o eletrodo de trabalho, o contra eletrodo e o eletrodo de referência, todos eles sob a forma de um eletrodo impresso. Esta configuração é bastante conveniente para trabalhar com microvolumes de solução, ou então para modificar facilmente a superfície do eletrodo de trabalho com diversos materiais, de modo a otimizar o desempenho analítico deste.

Os SPES também têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de biossensores em diferentes configurações para um largo espectro de aplicações analíticas (De la Guardia & Esteve-Turrillas, 2019; Ozkan *et al.*, 2015) e podem ser feitos de carbono, ouro, platina, bismuto ou tintas de nanotubos de carbono (Díaz-cruz, 2020). A superfície lisa onde são impressos é normalmente de cerâmica ou materiais plásticos.

Contudo, por vezes os elétrodos necessitam ser modificados para obtermos respostas mais eficazes, ou amplificar o sinal elétrico na medição. As modificações podem ter diferentes naturezas, desde físicas a químicas. Uma das formas de modificação, como a que é proposta neste estudo, foi a utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Os CNT's são alótropos de carbono, como mencionado anteriormente, com uma nanoestrutura cilíndrica. O interesse nos nanotubos é o fato de aumentarem a superfície específica do eletrodo de trabalho, melhorando significativamente o sinal analítico. Existem diferentes tipos de CNTs como por exemplo os de parede singular (single-walled CNT, SWCNT) e os de paredes múltiplas (multi-walled CNT, MWCNT) (Kolahi-ahari, Deiminiat, & Rounaghi, 2020).

Os nanotubos de carbono são um importante grupo de nanomateriais com propriedades químicas, eletrônicas, mecânicas e geométricas únicas, resultando por isso numa elevada condução elétrica, resistência ao calor, e estabilidade química. Estruturalmente podem ser comparados a uma folha de grafeno enrolada em forma de tubo (Pellicer, Gomez-caballero, Unceta, & Goicolea, 2010).

A preparação com nanotubos requer a sua deposição numa superfície condutora (eletrodo de trabalho), imobilizados de forma orientada ou não, e requer por norma, ou a utilização de um agente dispersante de modo a tornar a superfície/camada homogênea, ou de um polímero que funcione como uma matriz fixa. Desta forma, o sinal analítico é normalmente maior, do que o obtido com outros eletrodos constituídos à base de carbono, devido à maior área superficial criada (Fanjul-bolado, Lamas-ardisana, Hernández-santos, & Costagarcía, 2009; Messina, Bertolino, Salinas, Raba, & Martinez, 2008; Pellicer *et al.*, 2010; Sims, Li, Kachoosangi, Wildgoose, & Compton, 2009).

O conjunto destas características torna os nanotubos de carbono aptos para o desenvolvimento de inúmeros sensores/elérodos e de novas metodologias, com vista a aplicações eletroanalíticas.

4. Procedimento Experimental

a) Equipamento e medições

O equipamento utilizado para as determinações voltamétricas, cíclicas e varrimento linear, foi um potenciostato/ galvanostato AUTOLAB® PGSTAT302N, acoplado a um computador pessoal, e controlado pelo *software* NOVA (versão 2.1). Este *software* permite o controlo das condições exercidas sobre o sistema eletroquímico em análise, bem como a aquisição, armazenamento e análise dos dados obtidos.

Todas as análises foram realizadas numa configuração de três elétrodos impressos numa plataforma de cerâmica, comercialmente designado por elétrodo de tinta de carbono impressa (SPCE; da Metrohm-DropSens® (Espanha), ref. DRP-110). Estes continham o elétrodo de trabalho, com 4 mm de diâmetro, de tinta de carbono, que foi utilizado simples e modificado com uma película de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, um contra elétrodo de tinta de carbono e um pseudo-elétrodo de referência de tinta de prata, relativamente ao qual são medidos todos os potenciais aplicados.

As voltametrias cíclicas foram efetuadas a velocidades de varrimento no intervalo de 25 a 400 mV s^{-1} , com um passo de potencial de 2,44 mV. A voltametria linear foi efetuada a velocidades de varrimento de 50 e 100 mV s^{-1} .

Ambas as análises são efetuadas entre 0,100 V e 0,900 ou 1,100V, com um volume de solução a ser analisada de 100 μL sobre os três elétrodos, a uma temperatura constante de 21 °C.

O pH das soluções foi controlado com um medidor de pH (Metrohm® pH/mV meter, Model 827) e um elétrodo de vidro combinado, também da Metrohm AG®.

Na homogeneização das soluções e dispersões utilizou-se um banho de ultrassons (Branson, Model 2510 da Branson®).

b) Reagentes e soluções

- Bilastina, >98% pureza (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd).
- Bilaxten[®] (comprimidos 20mg), Laboratórios Vitoria
- Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, >95% pureza, (7-15 nm o.d. × 3-6 nm i.d. × 0.5-200 μm comprimento), Sigma-Aldrich
- Diehexadecil hidrogenofosfato, Sigma-Aldrich;
- Na₂HPO₄, Merck;
- KH₂PO₄;
- HCl;
- NaOH;
- MgCl₂;
- CaCl₂;
- Na₂SO₄;
- Ureia;
- Glucose;
- Ácido ascórbico;
- Água ultrapura (resistividade ≥ 18 MΩ cm);
- MeOH.

c) Preparação de soluções

Bilastina

A solução padrão de trabalho de Bilastina foi primeiro dissolvida numa quantidade apropriada de metanol e depois diluída com água ultrapura na proporção MeOH:H₂O de 50:50 v/v, de concentração final 20 μg mL⁻¹ (≡ 43 μmol L⁻¹). A solução foi submetida a banho de ultrassons durante 15 min. e preservada em frigorífico.

Solução de eletrólito de suporte

A solução de eletrólito de suporte consistiu em 2.5 mL de 0.100 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ e 10% MeOH, com pH 6.76, a qual foi preparada a partir da solução tampão de fosfato (0.125 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6.50) e MeOH:H₂O (50:50 v/v).

d) Equipamento Auxiliar

Preparação e otimização do eletrodo modificado com filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs-SPCE)

Na preparação de (MWCNTs-SPCE) foi disperso 1 mg de MWCNTs em 1 mL de água ultrapura contendo 1 mg de DHP, e agitou-se em banho ultrassônico durante 30 min., obtendo assim uma dispersão de 1 mg/mL.

De seguida, colocou-se em vários SPCEs e sobre a superfície do eletrodo de trabalho a dispersão líquida de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, utilizando um intervalo de 7-20 μ L (para descobrir qual a melhor quantidade de MWCNTs), que foi depois deixada a secar num exsiccador de vácuo.

Para estudar o efeito do DHP¹ preparou-se de forma semelhante um eletrodo com DHP sobre a tinta de carbono do eletrodo de trabalho, com uma quantidade fixa da solução preparada de 1mg DHP/1 mL água ultrapura.

e) Preparação de Soluções para Análise Voltamétrica

As soluções de trabalho com as concentrações pretendidas foram sempre preparadas antes dos procedimentos de análise a partir da diluição da solução de *stock* de bilastina e substituição da adição de MeOH:H₂O (50:50 v/v)² pelo volume necessário da mesma solução.

Para os ensaios de pH, o ajuste para os valores estudados foi feito por adição de pequenas quantidades de soluções (da ordem dos μ L) de 1 M HCl ou 1 M NaOH.

Preparações farmacêuticas e amostras de urinas dopadas

Para preparar a solução de Bilaxten[®] utilizou-se um comprimido devidamente pesado, e depois moído num almofariz com auxílio do pilão. Cada comprimido pesava cerca de 126 mg, e continha uma quantidade declarada de 20 mg de bilastina. Para o efeito pesou-se e moeu-se apenas uma fração de um comprimido (5,9 mg), que foi dissolvido em 25 mL de metanol e posteriormente

¹ O DHP é um agente dispersante, que permite a obtenção de uma dispersão homogénea de nanotubos na água e uma superfície estável sob a superfície do eletrodo.

² Um aumento no conteúdo de MeOH superior a 10% leva a um aumento indesejado da corrente capacitiva e degradação do sensor.

diluído com 25 mL de água ultrapura. A solução foi submetida a banho de ultrassons durante 15 min. antes da utilização.

As amostras de urina foram recolhidas de um voluntário adulto, saudável, nunca submetido a administração de bilastina ou outro fármaco. O volume de amostra recolhido foi de 100 mL, os quais foram armazenados no frigorífico a 4°C, por um período de tempo nunca superior a 2 semanas.

A amostra de urina foi utilizada sem qualquer tratamento físico-químico, e a sua dopagem foi efetuada com adição de uma quantidade apropriada da solução *stock*, obtendo-se assim duas alíquotas de urina (1 mL) com uma concentração teórica de 2,8 e 3,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente. Ambas as amostras de urina dopadas, conjuntamente com uma não dopada, foram designadas por solução de amostra de urina.

f) Quantificação

O método adotado para a quantificação de Bilastina na solução da amostra da fórmula farmacêutica (Bilaxten®), ou nas soluções de amostra de urina, foi a adição padrão.

Após homogeneização das soluções colocou-se 100 μL das mesmas sob a plataforma do sensor, iniciando-se de seguida os procedimentos voltamétricos estabelecidos.

Deve ressaltar-se que entre cada medição voltamétrica de cada adição padrão, efetuava-se um teste utilizando apenas o eletrólito de suporte, e após cada medição, a solução lá depositada era absorvida por papel de filtro e o sensor era limpo persistentemente com água desionizada e seco ao ar.

Para a preparação das diferentes soluções, estão registados os diferentes volumes utilizados dos diferentes reagentes, nas referidas tabelas de cada protocolo.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

Protocolo 1

Método da adição padrão para a quantificação de BIL em amostra de Bilaxten®
Preparação de soluções (Tabela 1):

1. Uma alíquota apropriada (50 ou 25 μL) de solução da amostra de Bilaxten® (equivalente a $18.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ BIL, 50% MeOH) foi transferida para uma série de mini-frascos de 1.5 mL;
2. Adicionou-se a cada mini-frasco solução de eletrólito de suporte, 1000 μL ;
3. As adições padrões foram feitas nos mini-frascos utilizando a solução stock de bilastina ($43 \mu\text{M} = 20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, 50 % MeOH);
4. Todas as soluções foram diluídas até um volume final de 1.25 mL (originando tampão fosfato 0.1 M, pH 6.76, e 10% MeOH) adicionando uma alíquota apropriada de 50% de solução de MeOH.

Tabela 1. Quantidades de solução adicionadas no protocolo 1.

Soluções (BIL adicionada/ $\mu\text{g mL}^{-1}$)	S ₀ (0.0)	S ₁ (0.4)	S ₂ (0.8)	S ₃ (1.2)	S ₄ (1.6)
Solução de amostra de Bilaxten® (μL)	50*	50*	50*	50*	50*
Tampão Fosfato 0.125 M (μL) (Solução stock eletrólito de suporte)	1000	1000	1000	1000	1000
Solução stock BIL $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (μL)	-	25	50	75	100
Solução 50% MeOH (μL)	200	175	150	125	100

* Em alguns casos, 25 μL .

Protocolo 2

Método da adição padrão para a quantificação de BIL em amostra de urina:
Preparação de soluções (Nota: Dependendo do pH da urina, se necessário, ajustou-se previamente para pH 6,76).

1. Procedimento idêntico ao protocolo 1 de acordo com a Tabela 2

Tabela 2. Quantidades de solução adicionadas no protocolo 2.

Soluções (BIL adicionada/ $\mu\text{g mL}^{-1}$)	S ₀ (0.0)	S ₁ (0.4)	S ₂ (0.8)	S ₃ (1.2)	S ₄ (1.6)
Solução de amostra de urina (μL)	125	125	125	125	125
Tampão Fosfato 0.125 M (μL) (Solução stock eletrólito de suporte)	1000	988	975	963	950
Solução stock BIL $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (μL)	-	25	50	75	100
Solução 50% MeOH (μL)	125	112	100	87	75

5. Apresentação e Discussão de Resultados

PARTE I

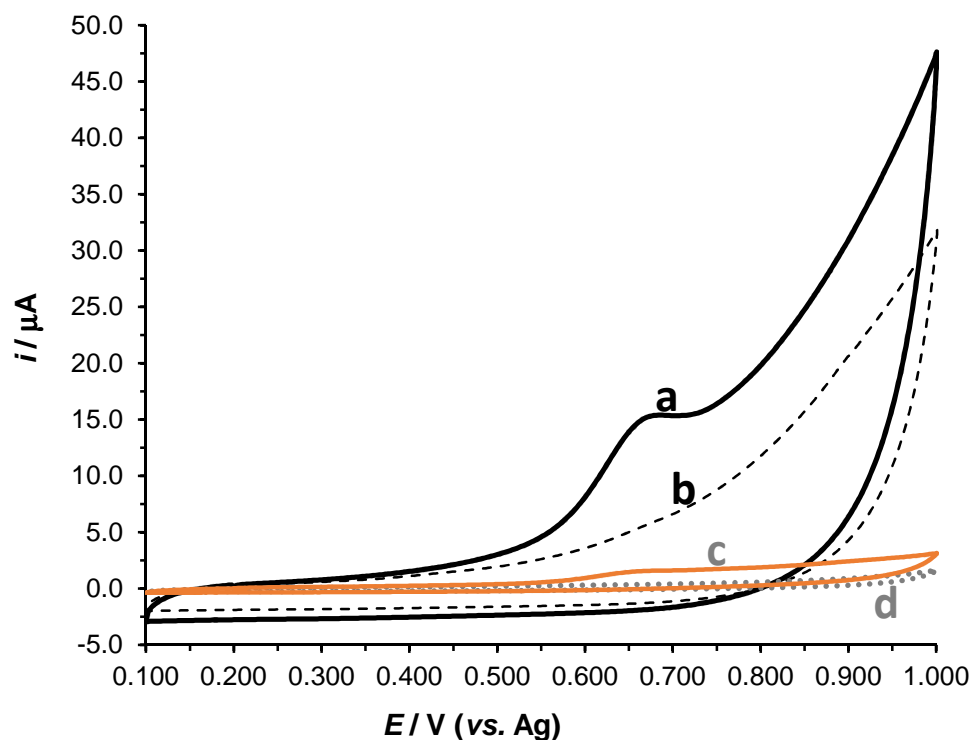


Figura 2 Respostas voltamétricas cíclicas da bilastina ($4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (a) sensor MWCNTs-SPCE ($15 \mu\text{L}$ de dispersão) e (c) sensor SPCE não modificado. As linhas a tracejado (b) e (d) representam as respostas dos brancos. Potencial inicial (E_i): 0.200 V ; Velocidade de scan: 50 mV s^{-1} .

Inicialmente começou por se analisar o comportamento da bilastina numa composição de tampão fosfato 0.1 M , com um pH $6,76$, e 10% de MeOH (metanol), através de voltametria cíclica. As medições foram desenvolvidas num intervalo de potencial de $0,100 \text{ V} - 1,000 \text{ V}$ a uma velocidade de 50 mV s^{-1} . Iniciaram-se as medições após 10 segundos da deposição da gota na superfície do sensor (tempo de repouso em potencial de circuito aberto), seguido de 5 segundos ao potencial de início ($0,200\text{V}$). Na Figura 2, são apresentados os voltamogramas cíclicos da bilastina ($4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em elétrodos de tinta de carbono impressa modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas(a) e não-modificados(b), e os respetivos brancos (c) e (d).

Dentro da janela de potencial estudada, pode observar-se um comportamento anódico irreversível por parte da bilastina, sendo possível observar um único pico de oxidação por volta dos $0,661 \text{ V}$. Destaca-se o fato de, no sensor modificado, o pico ser cerca de 7 vezes superior ao do sensor não

modificado. O que segue a norma do que já foi demonstrado em inúmeros trabalhos, onde são utilizados os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (Veiga, Dordio, Carvalho, Martins, & Ginja Teixeira, 2010), no sentido de melhorar a detecção de moléculas orgânicas. Desta forma, também se confirma neste trabalho, que a deposição de uma certa quantidade de nanotubos aumenta a quantidade de troca de elétrons da bilastina para o elétrodo de trabalho.

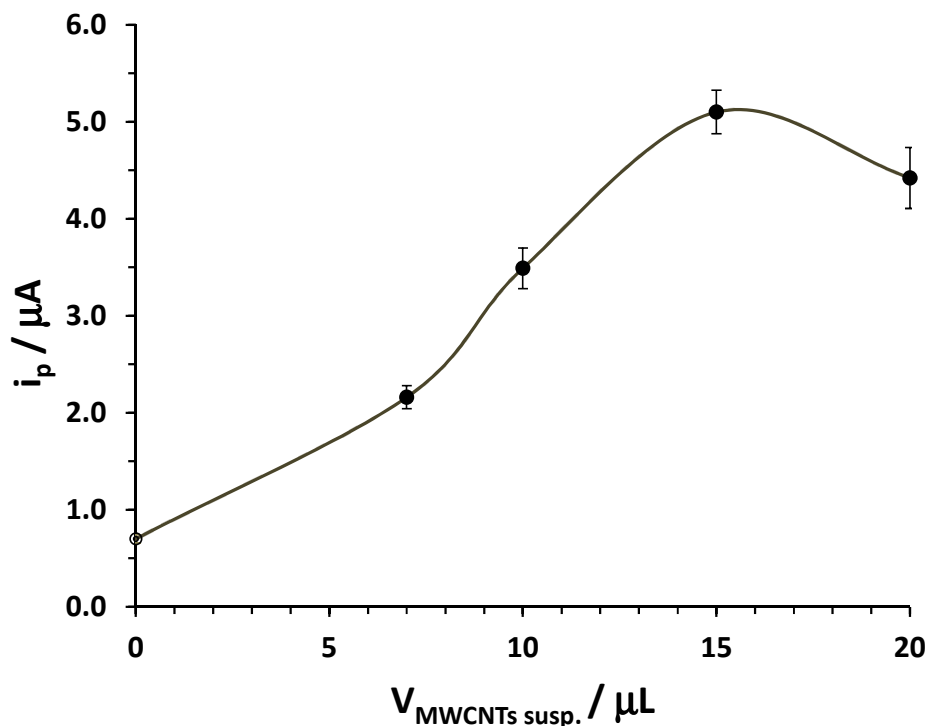


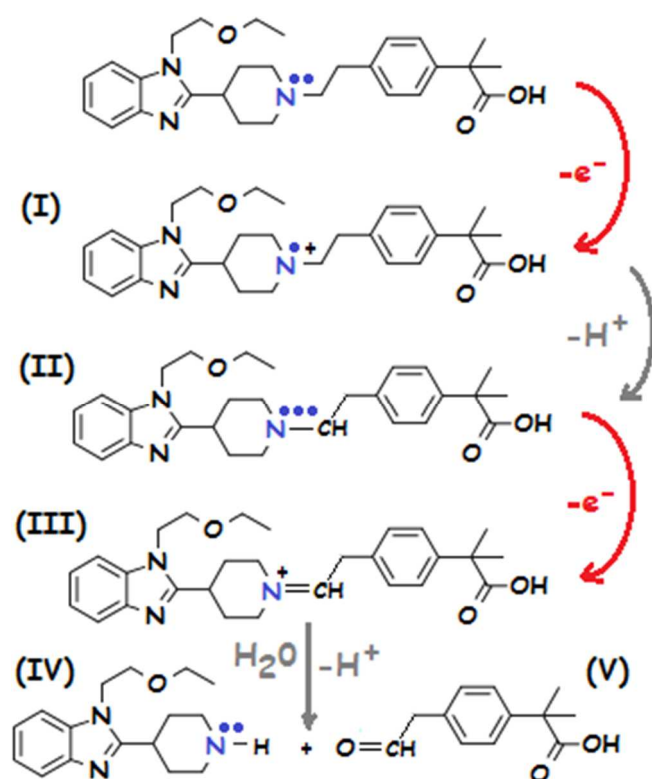
Figura 3 Intensidade corrente de pico vs quantidade de dispersão MWCNT/DHP na superfície do SPCE. [BIL] = $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ solução de eletrólito de suporte (pH 6.76). Mesmas condições voltamétricas que na Fig. 2.

De acordo com a informação disposta na Figura 3 foi determinado que o volume ótimo da dispersão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, para a determinação analítica da bilastina, é $15 \mu\text{L}$. Sendo que para volumes superiores, o microfilme criado parece ficar mais espesso e menos homogêneo, obtendo por isso um valor de i_p menor e sendo menos reprodutível. Por outro lado, o ensaio voltamétrico com DHP-SPCE mostrou que o agente dispersante, DHP, não interferia no sinal da Bilastina, sendo que o voltamograma era bastante semelhante ao obtido com o SPCE não modificado.

Eletoanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

A bilastina contém uma amina terciária cíclica no anel da piperidina na sua estrutura molecular, um grupo que tem uma grande capacidade de doar elétrons, e é provável que a eletrooxidação da Bilastina se inicie nesse átomo de azoto. Desta forma, é válido também para outras moléculas orgânicas que contenham centros eletroativos em átomos de azoto em aminas terciárias, como é o caso de moléculas com um grupo amina terciária alifática, como por exemplo o tramadol (Kolahi-ahari et al., 2020), ou outros casos particulares onde as moléculas têm um anel de piperazina (Beitollahi, Karimi-maleh, & Khabazzadeh, 2008; Fischer, González-Martín, & Dejmková, 2020; Ghoneim & Hassanein, 2020), ou piperidina (Dogan & Ozkan, 2005; Ott, Cunha-silva, Kuberski, & Cox, 2020), como a bilastina.

Posto isto, é muito provável que o processo anódico observado deva começar também com a perda de um elétron por parte do átomo de azoto, originando um radical do catião aminium (I) que desprotona e forma um radical neutro (II) (Esquema 1).



Esquema 1. Reação proposta da electrooxidação da molécula de Bilastina.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

De seguida, este radical perde um eletrão num passo subsequente para formar uma base Schiff quaternária (III), que é rapidamente hidrolisada para produzir uma amina secundária (IV) e um aldeído (V).

Em condições de pH em que inicialmente o átomo de azoto não está protonado, a bilastina sofre provavelmente um processo anódico de 2 eletrões-2 prótons. A valores de pH para os quais o azoto está fortemente protonado, o processo anódico é mais difícil de ocorrer, ou nem sequer ocorre naquele grupo da molécula.

Contudo, é necessário ainda estudar de forma mais aprofundada, a provável conversão da bilastina em aldeído e amina secundária, de modo a confirmar a validade e conhecer a verdadeira identidade dos produtos finais da oxidação eletroquímica da bilastina.

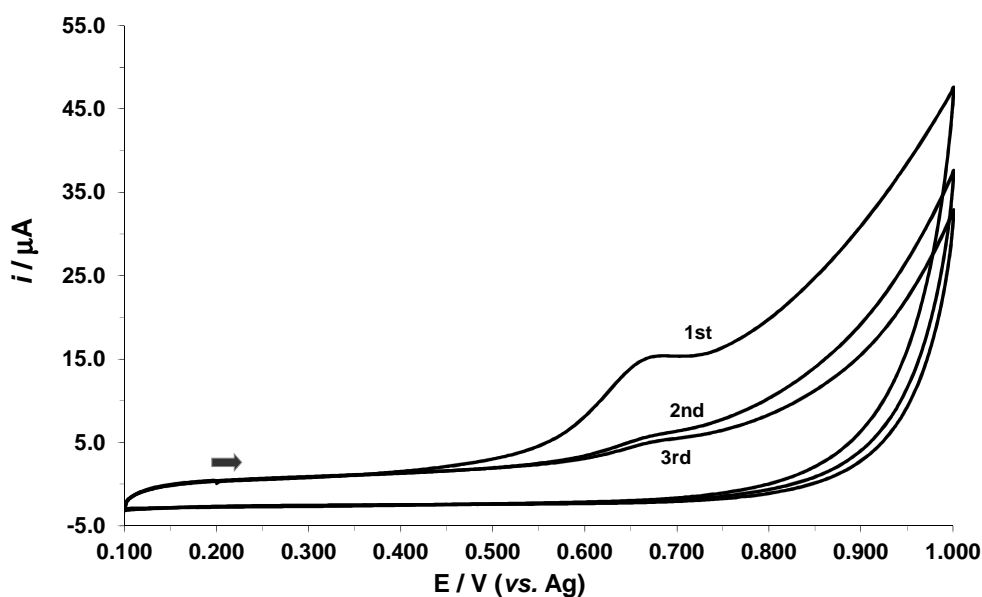


Figura 4 Três voltamogramas consecutivos da BIL 4.0 µg mL⁻¹ no sensor MWCNTs/SPCE. Condições iguais à Figura 1.

Em varrimentos voltamétricos cíclicos consecutivos, observou-se que os sinais eletroquímicos da bilastina iam diminuindo consecutivamente no elétrodo modificado (Figura 4), sugerindo assim que a superfície do elétrodo é bloqueada pela adsorção dos produtos de oxidação resultantes da bilastina. É necessário então, tomar medidas que impeçam este bloqueio, e que favoreçam a possibilidade de reutilização do elétrodo.

PARTE 2 – OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REPOUSO E POTENCIAL DE PARTIDA

Considerando que o potencial aplicado e o período anterior à medição voltamétrica podem ter impacto no sinal analítico, foi crucial proceder ao estudo do efeito destes dois fatores, nos valores de corrente e potencial de pico.

Ao aplicar uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} , observou-se que para um potencial de partida mais positivo que 0.250V , e para um dado tempo de repouso, a corrente de pico diminuía. Selecionou-se então um potencial de início, $0,200\text{V}$, onde a corrente de pico variava muito pouco com o aumento do tempo de repouso de 10 a 65 s.

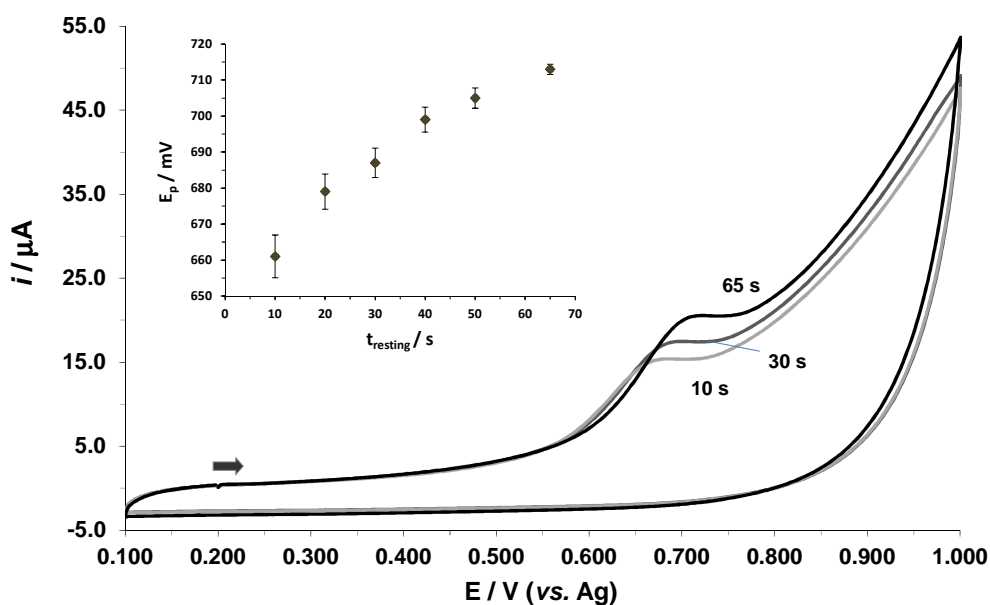


Figura 5 Efeito do tempo de repouso no pico anódico da bilastina ($4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$): voltamogramas cíclicos para três períodos diferentes e variação do potencial do pico com o tempo de duração. Scan rate: 50 mV s^{-1} .

Contudo, a observação mais significativa foi que o potencial de pico se tornava mais reprodutível e os valores mais positivos com a variação do tempo, como podemos ver na Figura 5. É por isso possível estimar que, durante este período de repouso, a distribuição das moléculas de bilastina seja mais uniforme na superfície do eletrodo, além de que é possível que ocorra também alguma adsorção, estabilizando as moléculas e tornando-as menos suscetíveis à oxidação eletroquímica. Escolheu-se, portanto, 65 segundos de tempo de repouso.

Influência do pH

A bilastina contém dois grupos ionizáveis na sua estrutura, nomeadamente o átomo de azoto no centro piperidina ($pK_{a2} = 9.43$) e outro no grupo carboxilo ($pK_{a1} = 4.06$) (esquema 1), e por isso o pH da solução determina a sua forma química (por exemplo, a um pH neutro a bilastina existe nas formas parcialmente ionizadas, bem como na forma zwitteriônica (Kawauchi *et al.*, 2018). Como tal, é importante estudar o efeito do pH na resposta anódica da bilastina no sensor modificado. Desta forma, foi levado a cabo uma série de testes a diferentes valores de pH dentro do intervalo 3.5-9.9, utilizando a solução do eletrólito de suporte selecionado.

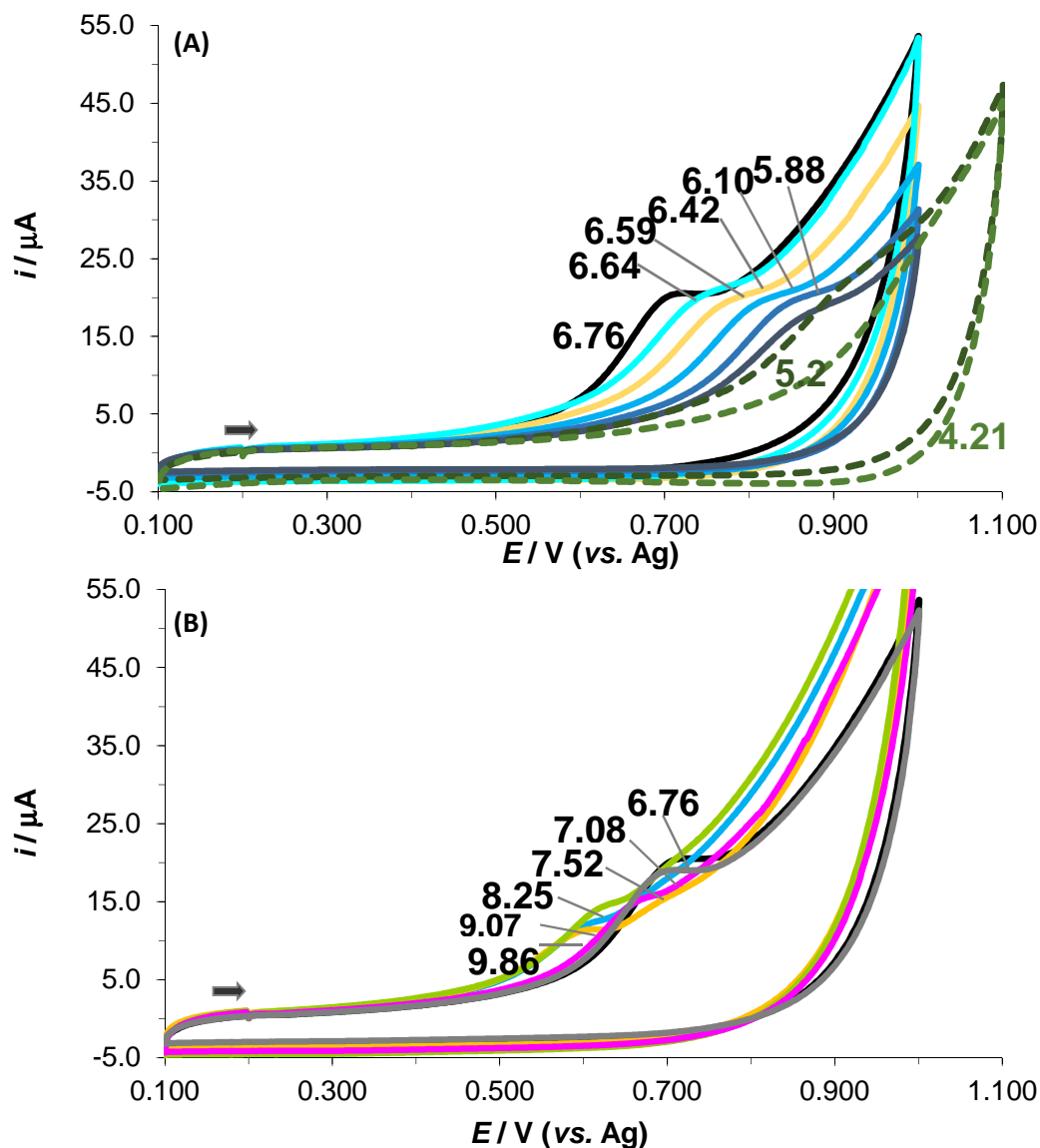


Figura 6 (A,B) Voltamogramas cíclicos obtidos a uma velocidade de varrimento de 50mV s^{-1} em solução de eletrólito de suporte a diferentes valores de pH, contendo BIL $4.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$, com E_i : 0,200V.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

A pH inferior a 4,2 não existe qualquer tipo de resposta anódica associada à bilastina. Contudo, de acordo com o aumento do pH entre 4,21-6,42 o potencial de pico (E_p) é alterado para valores menos positivos, variando linearmente com um declive de $-94,5 \text{ mV/pH}$ (Figura 7).

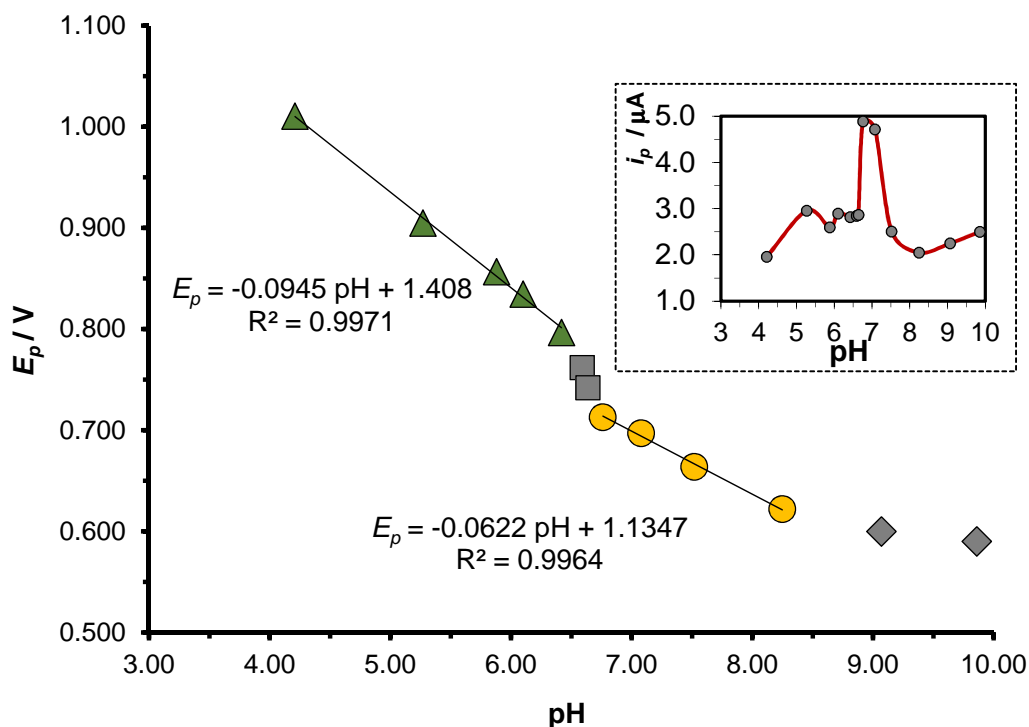


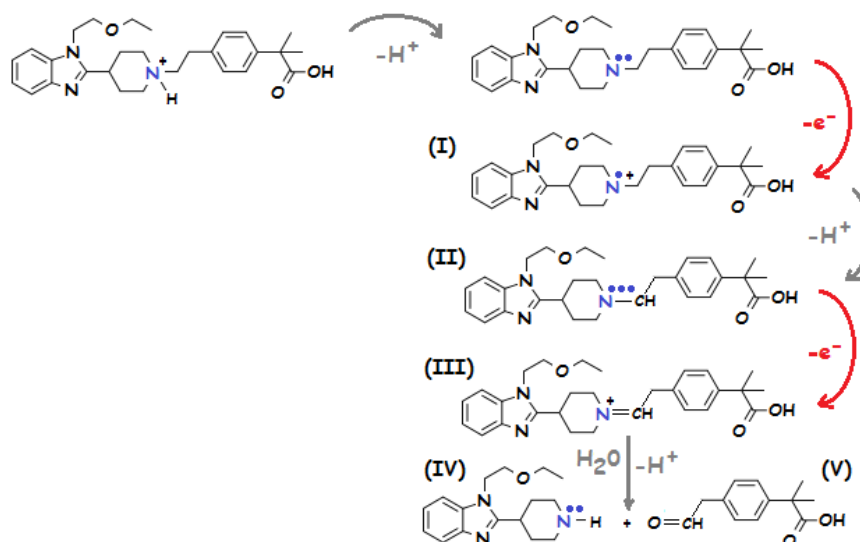
Figura 7. Dependência do potencial de pico em relação ao pH da solução de eletrólito de suporte. (inserção: dependência do pico de corrente com o pH).

Acima deste intervalo, e numa gama muito curta, existe uma variação abrupta dos valores de E_p no sentido de valores menos positivos. Esta alteração drástica é seguida de outro intervalo de pH (6,76-8,25) onde o E_p varia linearmente, mudando $-62,2 \text{ mV/pH}$. Acima de pH 8,25, o E_p ainda varia com o aumento do pH, mas mais ligeiramente. A variação apresentada no intervalo 6,78-8,25, cerca de 60 mV por unidade de pH, indica que a eletrooxidação da bilastina envolve um número igual de eletrões e prótons (Costentin, 2008), o que vai de acordo com o mecanismo proposto no esquema 1. Se for também assumido que o E_p varia linearmente, no intervalo de pH 9-9,9, a interseção entre a equação da regressão linear e o intervalo 6,76-8,25 dá um pH aproximado de 8,48.

Supostamente, este valor deve corresponder ao pKa do nitrogénio presente na amina em meio hidrometanólico, 9,43 em água pura (Kawauchi *et al.*,

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

2018)(<https://www.drugbank.ca/drugs/DB11591>, consultado em 2020 Setembro). Por outro lado, o declive maior (-94,5 mV/pH) que se observa no intervalo de pH 4,21-6,42 indica que o processo no elétrodo é mais complexo e difícil nestas condições anódicas mais ácidas. De facto, declives de aproximadamente -90 mV por unidade de pH indicam que a razão entre o número de prótons e o número de eletrões envolvidos no processo eletródico é perto de 1,5. Este resultado é consistente com o mecanismo de eletrooxidação proposto, se assumirmos que o átomo de nitrogénio presente no anel piperidina está fortemente protonado. Como dito anteriormente, nestas condições mais ácidas, é mais provável que o átomo de azoto liberte o protão antes da transferência eletrónica, como proposto no Esquema 2.



Esquema 2. Proposto da perda de protão antes da transferência eletrónica da molécula de Bilastina.

O balanço final do processo anódico, nestas condições, provavelmente corresponde à perda de três prótons e 2 eletrões (isto é, $n^{\circ} \text{H}^{+} / n^{\circ} \text{e}^{-} = 1,5$). A variação abrupta entre as duas regiões lineares do E_p -pH confirma que o número de prótons envolvidos na reação eletródica muda drasticamente, entre os dois intervalos de pH. Pode ser observado, também, que a corrente de pico é sensível a variações entre pH 6,7 e 7,1, atingindo um máximo a cerca de 6,8 (inserção da Figura 7). Dados estes resultados, o estudo prosseguiu neste intervalo de pH.

INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO NO PICO ANÓDICO

Foi estudado, de seguida, a dependência da corrente de pico (i_p) bem como do potencial de pico (E_p) em relação à velocidade de varrimento no intervalo de 25-400 mV s^{-1} , utilizando um pH de 6,8 (Figura 8).

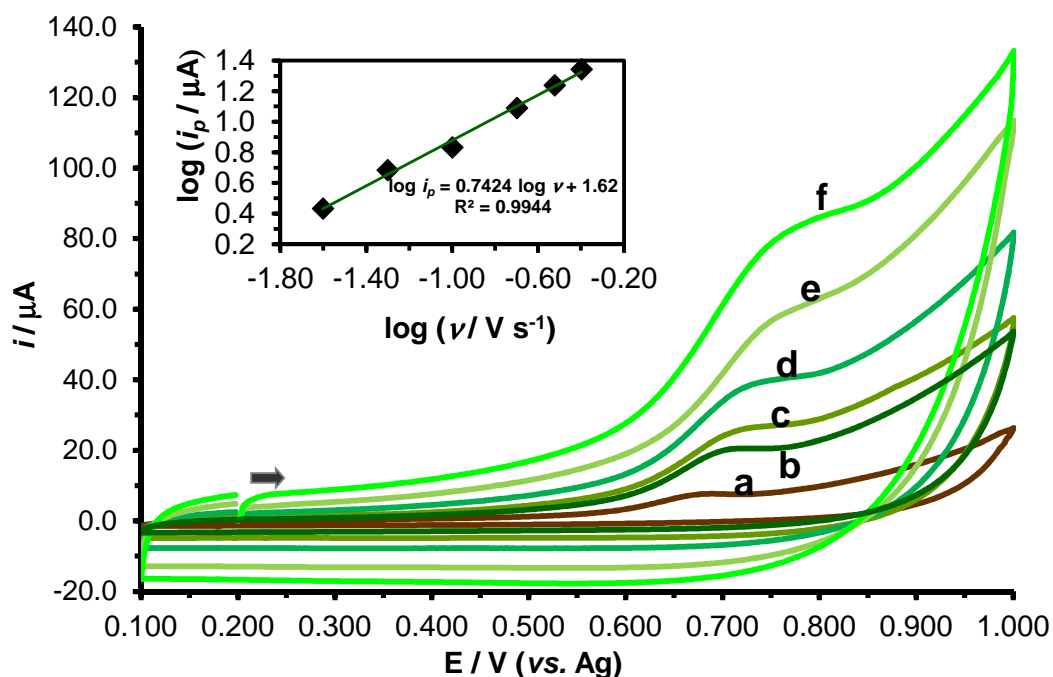


Figura 8 Voltamogramas cíclicos obtidos a velocidades de varrimento de (a) 25, (b) 50, (c) 100, (d) 200, (e) 300 and (f) 400 (mV s^{-1}), em solução de eletrólito de suporte pH 6.76 contendo BIL 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Potencial inicial (E_i): 0.200 V. A inserção (A) mostra o gráfico de $\log i_p$ vs. $\log v$.

Ao analisar o gráfico inserido na fig.8 (onde o i_p e v estão expressos em μA e V s^{-1} , respetivamente), observou-se uma relação linear com um declive de 0,74, o que dá indicação de um processo anódico “misto” de difusão-adsorção a nível de transferência de carga (Bard, Faulkner, Swain, & Robey, 2001; D Pletcher, R Greff, R Peat, L.M. Peter, 2011).

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

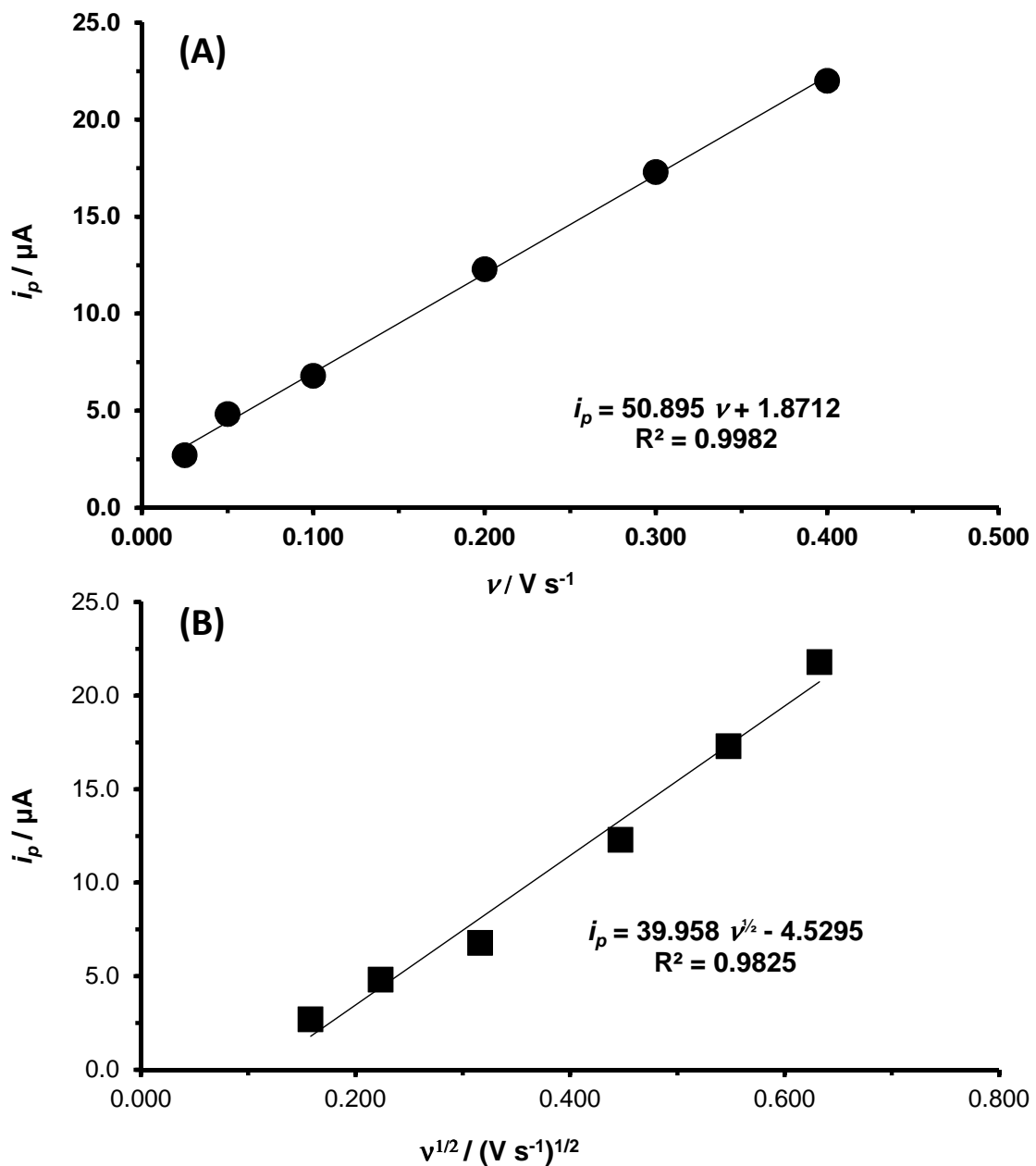


Figura 9. Nas Figuras (A) e (B) estão dispostos, respectivamente, a dependência da corrente de pico com a velocidade de varrimento e com a raiz quadrada da velocidade de varrimento.

De fato quando comparadas as equações das regressões lineares, i_p versus a velocidade de varrimento (Figura 9A) e a raiz quadrada da velocidade de varrimento (Figura 9B), em particular o valor R^2 , parece que o processo de adsorção é predominante em relação à difusão da bilastina.

Observou-se, que à medida que se aumentava a velocidade de varrimento, os valores de E_p se tornavam mais positivos, provando a irreversibilidade da reação de elétrodo em estudo (D Pletcher, R Greff, R Peat, L.M. Peter, 2011).

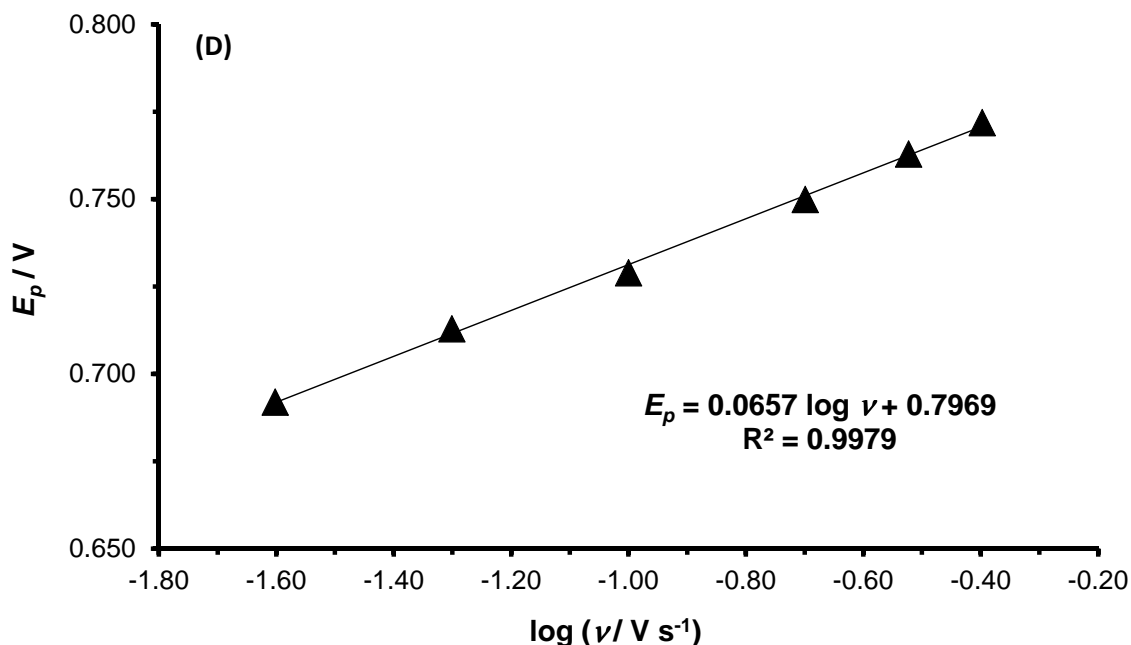


Figura 10 Dependência do potencial de pico em relação ao logaritmo da velocidade de varrimento.

O gráfico de E_p vs $\log v$ (Figura 10) assume uma linearidade com um declive 0,0657. Assumindo que o processo de transferência de carga é essencialmente controlado por adsorção, e que a análise de Laviron (Laviron, 1974, 1979) pode ser utilizada neste caso em particular, é possível combinar a expressão teórica do declive, $2,303RTF^{-1}[(1 - \alpha) ne^{-}]^{-1}$ (onde R, T e F têm o significado habitual e $(1 - \alpha)$ o coeficiente de transferência de elétrons do processo anódico), com o declive da relação E_p vs. $\log v$, para estimar o número de elétrons (ne^{-}) envolvidos na reação anódica.

Usando os dados obtidos e a aproximação $(1 - \alpha) = 0,5$, geralmente adotado para processos eletródicos irreversíveis (Bard *et al.*, 2001), estimou-se que na oxidação da bilastina no MWCNTs/SPCE estavam envolvidos dois elétrons, de acordo com o proposto no Esquema 1.

Com base nos dados recolhidos sobre a influência do pH na eletrooxidação da bilastina, a pH 6,8 corresponde à perda de $2 e^{-}$ e $2 H^{+}$ no processo anódico, enquanto a pH mais ácidos, provavelmente, envolve a perda de $2 e^{-}$ e $3 H^{+}$.

INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO PRELIMINAR DO ELÉTRODO

Para saber qual o efeito do passo de ativação eletroquímica preliminar na resposta do elétrodo e para poder antecipar a possível reutilização do elétrodo num trabalho analítico de rotina, efetuou-se uma série de voltametrias de varrimento linear com elétrodos previamente ativados e comparou-se com os dados até agora obtidos e discutidos sem ativação (Figura 11).

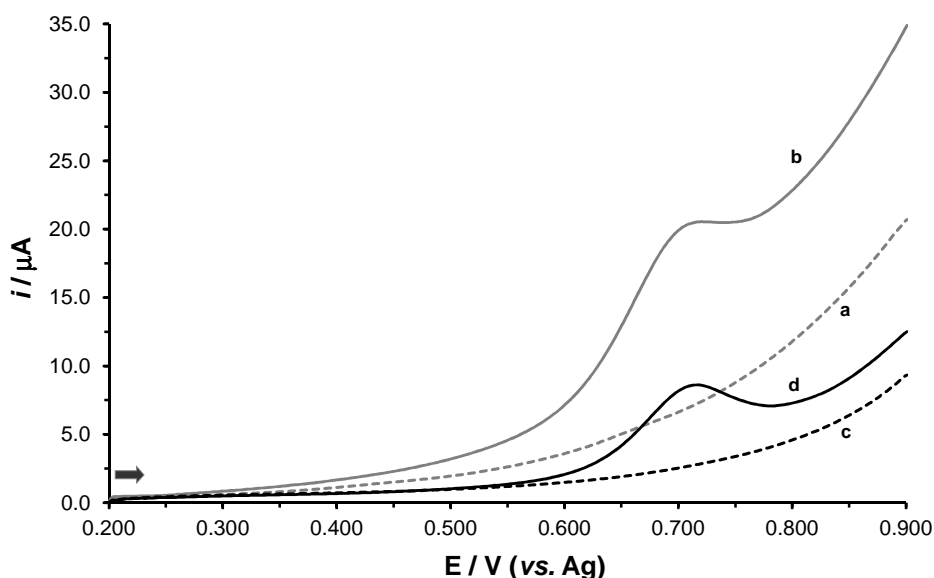


Figura 11 Não ativação (a, b) vs. ativação eletroquímica (c, d) da superfície do elétrodo: voltamogramas de varrimento linear sem BIL (a, c) e com BIL $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b, d). Velocidade de varrimento: 50 mV s^{-1} .

Para obter os voltamogramas de varrimento linear de elétrodos eletroquimicamente ativados contendo apenas o eletrólito de suporte, utilizou-se numa segunda análise um elétrodo já utilizado. Entre as duas utilizações o elétrodo foi lavado com água desionizada e depois seco.

Os voltamogramas de varrimento linear dos elétrodos ativados com eletrólito de suporte contendo bilastina foram obtidos da mesma forma. Comparando os resultados, a resposta anódica da bilastina não varia de forma significativa, mas a corrente de carga/capacitiva diminui favoravelmente, facilitando a determinação da corrente de pico (I_p). Desta forma, as medições nos ensaios seguintes iniciaram-se com ativação na solução do eletrólito de suporte.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

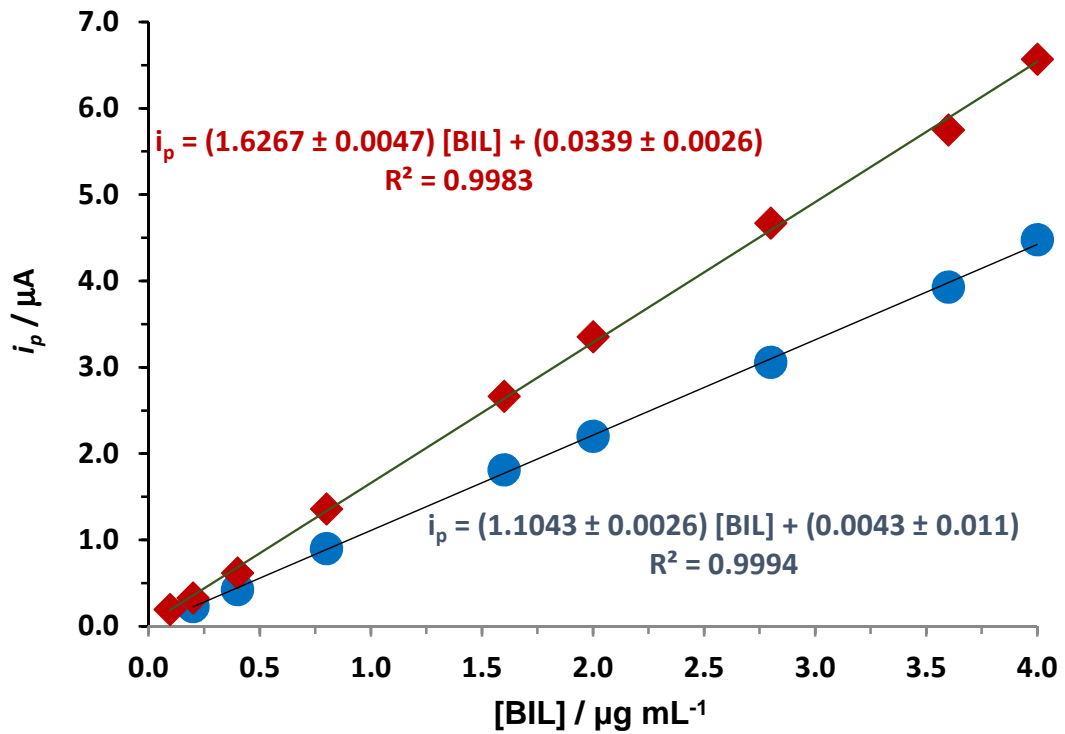


Figura 12 Curvas de calibração por LSV da bilastina a 50 (azul) e 100 mV s^{-1} (vermelho).

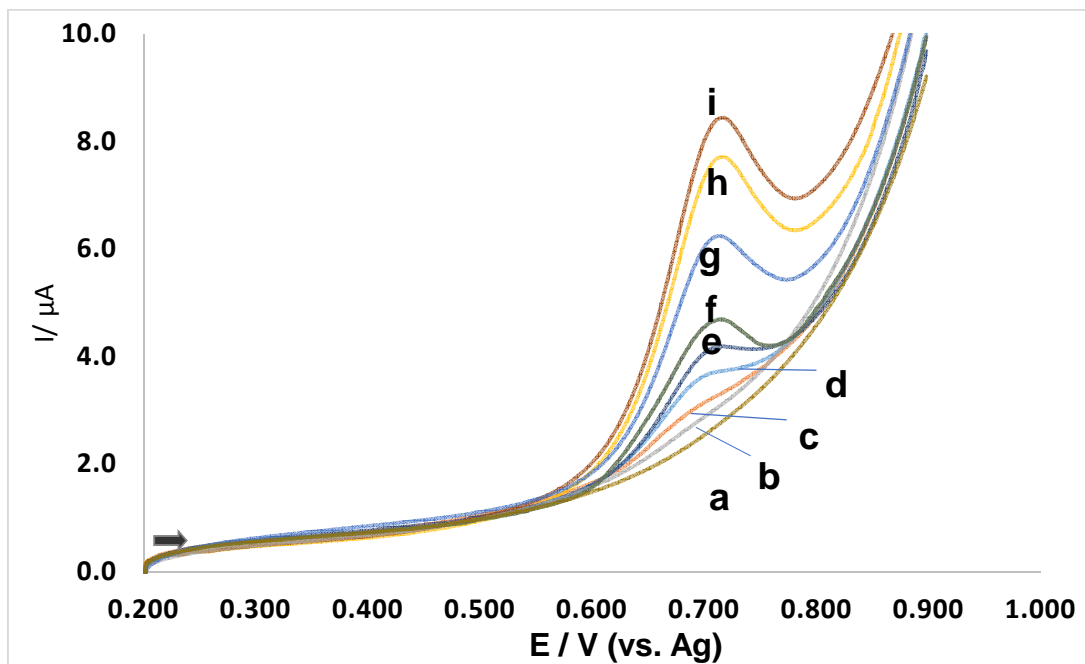


Figura 13 Voltamogramas LSV obtidos a 50 mV s^{-1} em eletrólito de suporte pH 6,76 sob as condições experimentais otimizadas para as concentrações de BIL (a) 0, (b) 0.2, (c) 0.4, (d) 0.8, (e) 1.6, (f) 2.0, (g) 2.8, (h) 3.6, and (i) 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Potencial inicial: (Ei): 0.200 V.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

Sob as condições experimentais otimizadas, como descrito anteriormente, utilizando velocidades de varrimento diferentes (50 and 100 mV s^{-1}) construíram-se duas curvas de calibração (Fig. 12) através de voltametria de varrimento linear (LSV, Fig. 13). Cada curva, resulta da média de três varrimentos efetuados de forma independente em diferentes sensores. A uma velocidade de varrimento menor obteve-se uma boa linearidade, mas no sentido de aumentar a sensibilidade e diminuir os limites de detecção (LOD, “limit of detection”) e quantificação (LOQ, “limit of quantification”) da determinação da bilastina, efetuaram-se as análises a uma velocidade de varrimento superior.

Na tabela seguinte (Tabela 3), apresentam-se os dados obtidos, e como pode ser verificado, o maior ganho com o aumento da velocidade de varrimento foi a nível do aumento da sensibilidade e um alcance dinâmico ligeiramente maior no limite inferior. Além disso, foi possível confirmar que a reprodutibilidade da modificação do eléctrodo de trabalho é bastante aceitável pois a velocidades de varrimento de 50 e 100 mV s^{-1} , os valores de RSD a uma concentração de bilastina de $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram, respetivamente, 4,37% e 4,51%.

Tabela 3 Características analíticas da determinação de BIL por LSV em duas velocidades de varrimentos diferentes (3 repetições cada).

Características Analíticas	50 mV s^{-1}	100 mV s^{-1}	100 mV s^{-1}
Alcance Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.2 – 4.0	0.1 – 4.0	0.1 – 2.0
R^2	0.9994	0.9983	0.9995
Sensibilidade ($\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$)	1.1043	1.6267	1.6717
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1} / \mu\text{M}$) ^[a]	0.110 / 0.24	0.108 / 0.23	0.059 / 0.13
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1} / \mu\text{M}$) ^[a]	0.367 / 0.70	0.360 / 0.78	0.197 / 0.42

^a LOD e LOQ foram calculados utilizando, respetivamente, as equações $LOD = 3s/m$ e $LOQ = 10s/m$ (onde s é o desvio padrão do pico de corrente do branco ($n = 3$), e m é o declive da curva de calibração).

Apesar dos poucos métodos existentes (não eletroquímicos) oferecerem um intervalo de concentração com uma gama mais larga, o método voltamétrico desenvolvido apresenta uma série de vantagens analíticas que o classificam como um excelente método para quantificar reduzidas quantidade de bilastina,

nomeadamente procedimentos simples de preparação de amostras e sensores, consumo muito reduzido de reagentes e soluções, produção diminuta de resíduos, rapidez e custo reduzido, e portabilidade se for utilizado um mini-potenciostato portátil.

REUTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE 3 ELÉTRODOS

Para validar se o sensor voltamétrico pode ser reutilizado em análises de rotina, realizaram-se diferentes procedimentos experimentais para testar a repetibilidade e reprodutibilidade do sensor.

Sabendo que após sucessivas voltametrias cíclicas o sinal anódico da bilastina ficava cada vez mais fraco (Fig. 3), e que o efeito persistia após um procedimento de lavagem e secagem rápida do eletrodo com água desionizada, experimentou-se uma etapa de lavagem um pouco mais exaustiva, esguichando água de forma intermitente durante cerca de 2 a 3 minutos sobre a superfície do sensor, deixando depois a secar ao ar. Após, e sempre antes da análise voltamétrica com a solução de bilastina, procedia-se a um varrimento voltamétrico com a solução eletrolítica de suporte (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,76, e 10% MeOH), e repetia-se o processo de limpeza.

Este conjunto de procedimentos de recondicionamento foi testado, utilizando diferentes concentrações de bilastina.

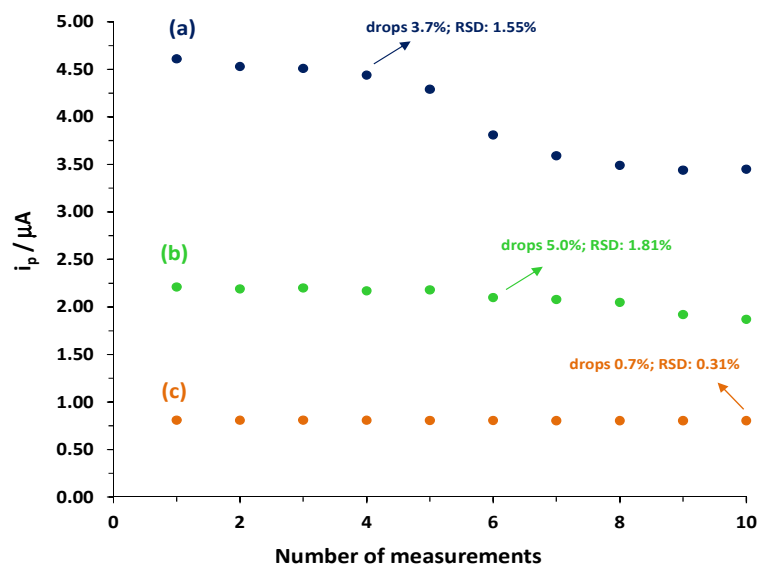


Figura 14 Repetibilidade do sensor após ser sujeito a procedimento de recondicionamento para concentrações de BIL (a) 4.0 µg mL⁻¹, (b) 2.0 µg mL⁻¹, and (c) 0.8 µg mL⁻¹.

Na Figura 14, apresentam-se os valores de 10 correntes de pico obtidos (a 50 mV s^{-1}) a concentrações de 4.0, 2.0 e $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ de bilastina. E como se pode observar na figura, a repetibilidade é excelente para baixas concentrações de bilastina, mantendo a resposta do sensor a 99,3% da resposta inicial, após 10 medições seguidas e descontinuadas pelo recondicionamento do sensor.

Para concentrações superiores, a queda da corrente de pico é maior à medida que o número de corridas a que o eletrodo é submetido aumenta. Contudo, considerando o intervalo de trabalho estabelecido para o sensor e a concentração de bilastina utilizada, os resultados indicam que o mesmo sensor pode ser utilizado várias vezes (pelos menos 4 vezes, para concentrações superiores) antes de ser descartado.

O fenómeno que, provavelmente, ocorre nos processos de recondicionamento, principalmente na etapa de lavagem, é a libertação dos produtos de oxidação adsorvidos na superfície do eletrodo.

Para testar a reprodutibilidade (ou se preferível, a precisão entre dias ou intermédia) e a estabilidade ao longo do tempo, um dado sensor foi sujeito análise voltamétrica semanal, durante um mês. Foram aplicados os procedimentos de recondicionamento durante estas análises, e os sensores foram guardados em locais secos. Os resultados mostraram que a resposta ao pico anódico da bilastina é bastante reprodutível e o sensor é estável (a uma concentração de $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, o valor de RSD é 1,26%, mantendo o sensor 98% da sua resposta inicial ao fim de um mês).

EFEITO DE POTENCIAIS INTERFERENTES

Para verificar se o eletrodo proposto permitia uma deteção efetiva da bilastina, particularmente em amostras de urina, desenvolveu-se um teste preliminar para avaliar a possibilidade de existir interferência de alguma(s) espécie(s) orgânica(s). Para a bilastina, utilizou-se a típica concentração encontrada na urina após 12h da administração oral, de acordo com literatura ($3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Lasseter *et al.*, 2013). E, para cada interferente virtual utilizaram-se como valores de referência, valores encontrados tipicamente na urina humana (*i.e.*,

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

magnésio (0.1 mg mL^{-1}), cálcio (0.5 mg mL^{-1}), cloreto (6 mg mL^{-1}), sulfato (0.8 mg mL^{-1}), ou excedendo esses limites (*i.e.*, ureia (10 mg mL^{-1}), glucose (1.0 mg mL^{-1}), e ácido ascórbico (0.2 mg mL^{-1}))(Zhao, Zhang, & Song, 2001).

A influência de cada substância no sinal anódico da bilastina foi avaliada individualmente, sobre condições experimentais ótimas. Previamente às medições voltamétricas todas as soluções foram diluídas para metade. Como mostra a Tabela 4 e a Figura 15, o ácido ascórbico parece ser um interferente forte numa razão de concentração AA : Bil = 62,5, sendo que os restantes não interferem de forma significativa, de acordo com os rácios utilizados.

Tabela 4 Efeito de potenciais interferentes na resposta voltamétrica a uma concentração de BIL de $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Potenciais espécies interferentes na urina	Variação de sinal
(razão de concentração: aditivo/BIL)	(%) \pm SD
Catiões: Mg^{2+} (62.5); Ca^{2+} (312.5)	~ 0
Aniões: Cl^- (3750); SO_4^{2-} (500)	~ 0
Ureia (3125)	-1.0 ± 0.04
Glucose (312.5)	-1 ± 0.05
Ácido Ascórbico (62.5)	-13.9 ± 0.2

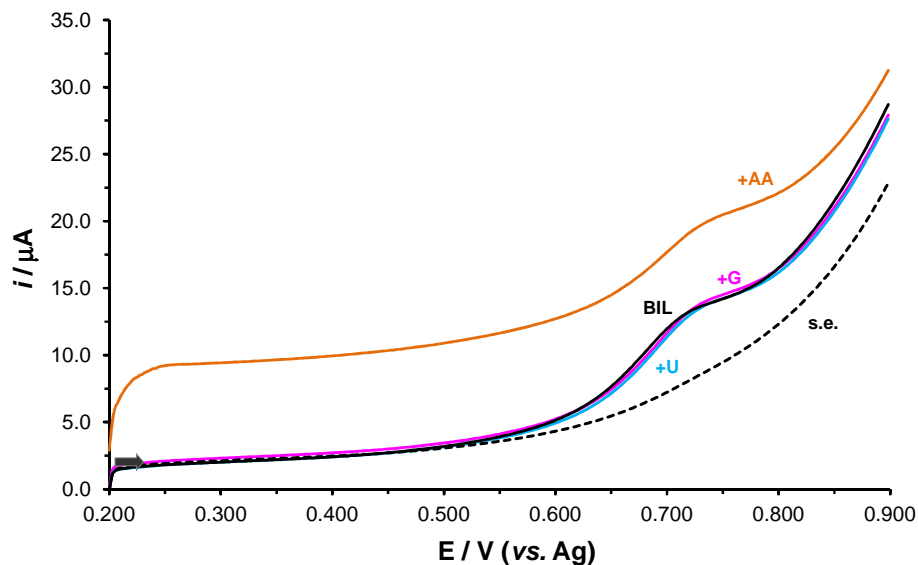


Figura 15 Voltamogramas de varrimento linear com bilastina apenas (BIL), com ureia (+U), glucose (+G), e ácido ascórbico (+AA). A linha a tracejado é o sinal voltamétrico do eletrólito de suporte (s.e.). Velocidade de varrimento: 100 mV s^{-1} .

Determinação Analítica da BIL

Para a determinação analítica em amostras reais utilizou-se o sistema MWCNTs-SPCE já otimizado anteriormente, e utilizaram-se comprimidos comerciais e amostras de urina dopadas e não dopadas. Para além da bilastina como princípio ativo existem também outros compostos inativos que compõem o comprimido utilizado na determinação e quantificação da bilastina, nomeadamente sílica anidra, estearato de magnésio, celulose cristalina e glicolato de amido de sódio.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

As amostras de urina, que possuem uma composição variável, foram recolhidas de um indivíduo que não esteve sujeito a ação de nenhum outro fármaco, e após 3 horas da ingestão de uma refeição (apenas água). O conteúdo de bilastina em todas as amostras foi feito pelo método da adição padrão, nas condições já otimizadas. Cada amostra foi analisada em sensores novos, mas todas as análises da mesma amostra foram realizadas no mesmo sensor.

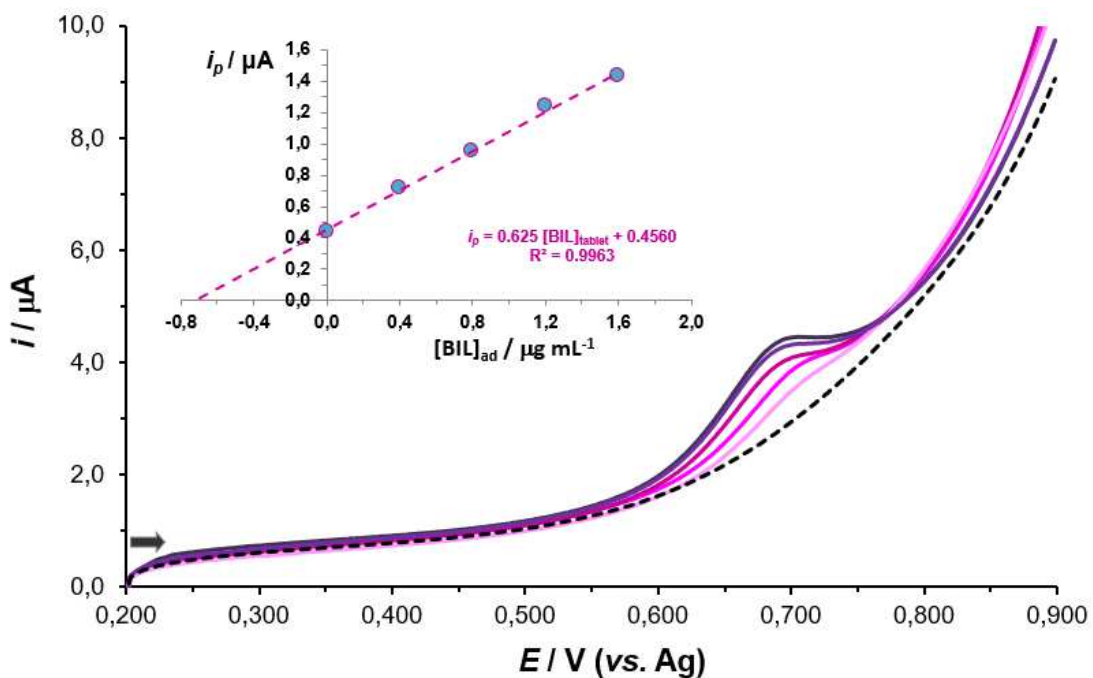


Figura 16. Voltamogramas de varrimento linear a 50 mV s⁻¹ com amostra dopada com o fármaco e sem, e com 4 adições padrão (linhas solidas). Na inserção está representada a curva de calibração da adição padrão para a quantificação de bilastina.

A Figura 15 mostra os voltamogramas LSV e a respetiva curva de adição padrão para uma das soluções de Bilaxten[®]. Por outro lado, na Figura 16, apresentam-se os resultados correspondentes à curva de adição padrão de uma das amostras de urina dopadas. Para comparação, está incluída na figura o voltamograma de LSV obtido de uma urina não dopada e respetiva curva de calibração. Outros resultados apresentam-se das Figuras 17 à 20.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

Os resultados obtidos para cada amostra estão resumidos na Tabela 5.

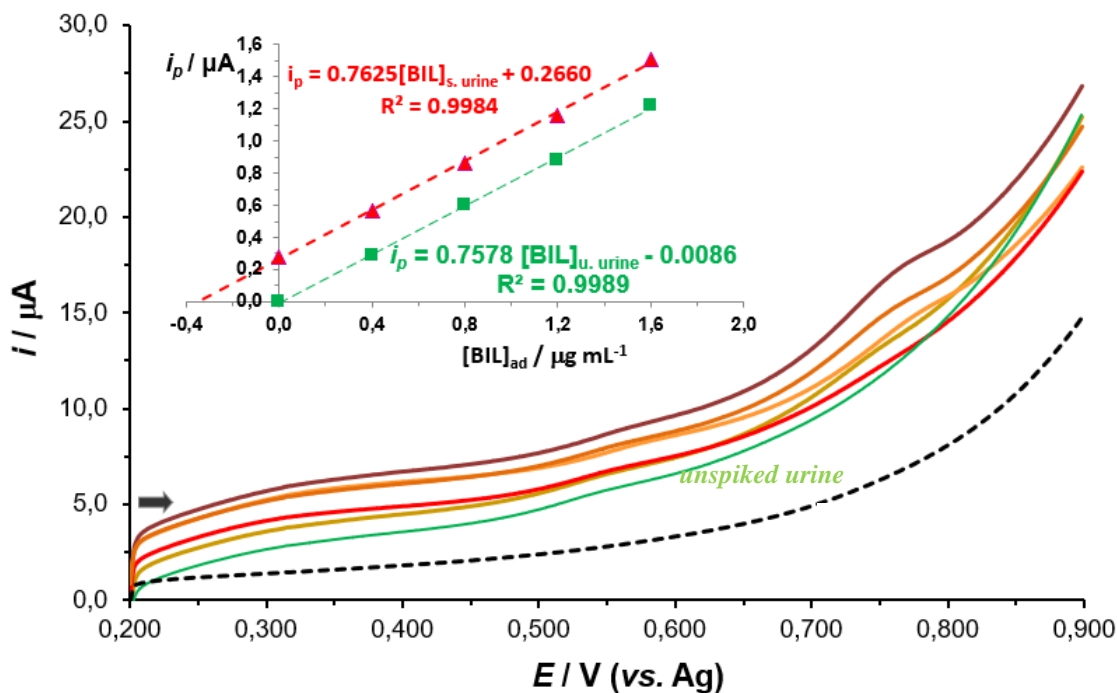


Figura 17. Voltamograma de varrimento linear a 100 mV s^{-1} com urina dopada (s. urina) e amostra não dopada e com 4 adições padrão (linhas solidas). A linha a tracejado é o sinal voltamétrico da solução de eletrólito de suporte. A linha verde é o sinal voltamétrico da urina não dopada (u. urine). Na inserção está representada a curva de calibração da adição padrão para a quantificação de bilastina. Adicionalmente está representado a curva de calibração da adição padrão para a amostra de urina não dopada.

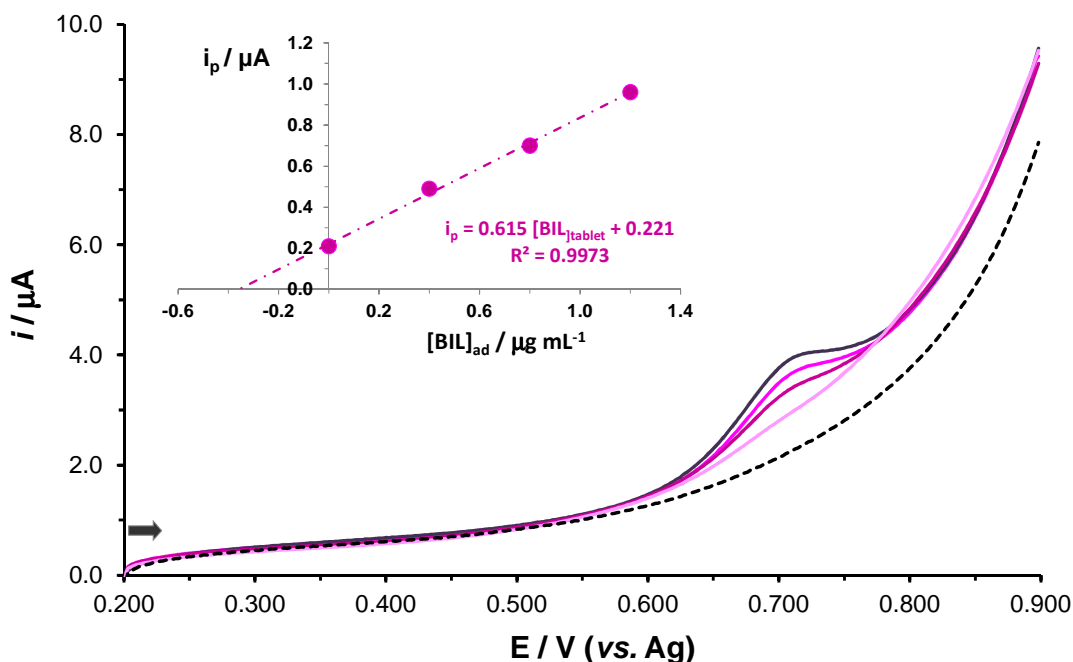


Figura 18. Voltamogramas de varrimento linear obtidos a 50 mV s^{-1} da amostra dopada com fármaco sem e com 3 adições padrão (linhas solidas). A tracejado está representado o sinal voltamétrico da solução de eletrólito de suporte. A inserção mostra a respectiva curva de calibração da adição padrão para a quantificação de BIL. A quantidade de solução utilizada foi metade da representada na Fig. 15.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

Tabela 5 Determinação de bilastina em Bilaxten®, e amostra dopada e não dopada de urina.

Amostra	BIL conteúdo	Quantidade encontrada ^[a]	Recuperação (%)	SD ± RSD (%)
Bilaxten® 20	20 mg/tablet	19.17 mg ^[b]	95.9	0.1068 ± 0.56
Bilaxten® 20	20 mg/tablet	19.49 mg ^[c]	97.5	0.0808 ± 0.42
Bilaxten® 20	20 mg/tablet	19.38 mg ^[d]	96.9	0.1179 ± 0.61
Urina dopada 1	0.28 µg mL ⁻¹	0.27 µg mL ^{-1[e]}	96.4	0.0093 ± 3.44
Urinada dopada 2	0.36 µg mL ⁻¹	0.35 µg mL ^{-1[e]}	97.2	0.0040 ± 1.14
Urina não dopada	desconhecido	n.d. ^[e,f]	–	–

^[a] Média de 4 ensaios; ^[b] A 50 mVs⁻¹, fator de diluição da amostra de 50; ^[c] A 50 mVs⁻¹, fator de diluição de amostra 25; ^[d] A 100 mVs⁻¹, fator de diluição de amostra 25; ^[e] A 100 mV s⁻¹, fator de diluição de amostra 10; ^[f] n.d. – não detetado.

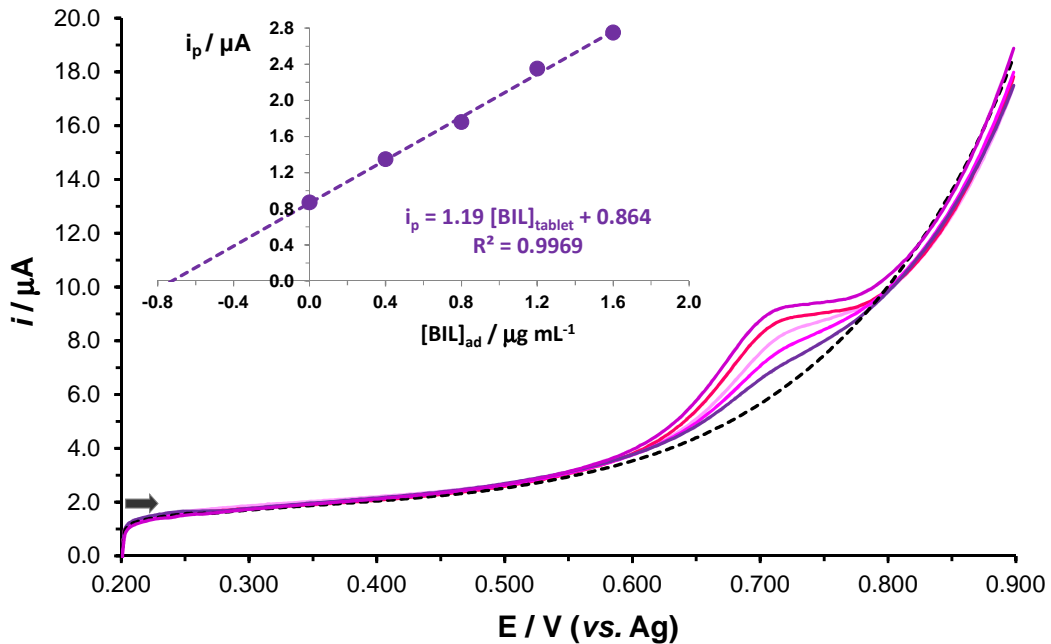


Figura 19 Voltamogramas de varrimento linear obtidos a 100 mV s⁻¹ da amostra dopada com fármaco sem e com quatro adições padrão (linhas solidas). A tracejado está representado o sinal voltamétrico da solução de eletrólito de suporte. A inserção mostra a respetiva curva de calibração da adição padrão para a quantificação de BIL. A quantidade de solução utilizada foi igual à representada na Fig. 15.

Eletrólise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

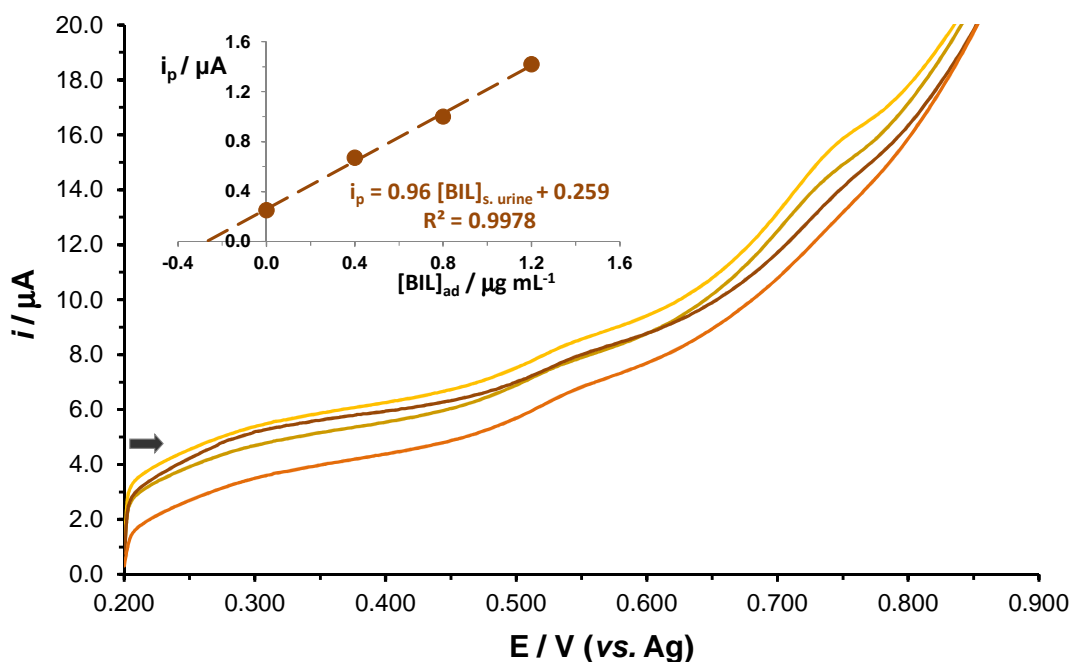


Figura 20 Voltamogramas de varrimento linear obtidos a 100 mV s^{-1} da amostra de urina dopada (s. urine) sem e com 3 adições padrão (linhas solidas). A inserção mostra a respectiva curva de calibração da adição padrão para a quantificação de BIL, sendo que neste ensaio a quantidade de bilastina adicionada foi 77,8% da quantidade adicionado na Fig. 16.

Os resultados obtidos com o sensor desenvolvido estão em acordo com o conteúdo descrito na embalagem da formulação comercial, e com o conteúdo conhecido nas amostras de urina dopadas. As boas percentagens de recuperação (Rec. %) obtidas indicam que o eletrodo modificado e o método voltamétrico propostos têm um elevado potencial para análises práticas de amostras contendo bilastina.

A composição química intrínseca, tanto das amostras de urina como dos comprimidos, não afetam significativamente a determinação da bilastina. Da mesma forma, o mesmo método de adição padrão prova ser uma alternativa bastante adequada para a determinação em amostras reais, excetuando, quando uma dada substância afeta fortemente o sinal da bilastina e a resposta do eletrodo.

6. Conclusões

Neste trabalho, demonstrou-se que o uso e a manipulação adequada de plataformas sensoras eletroquímicas miniaturizadas, e a sua aplicação na análise voltamétrica de uma substância farmacêutica em amostras reais, constituem uma alternativa analítica eficaz e vantajosa, face ao uso convencional de outras técnicas analíticas não-eletroquímicas empregues na análise de fármacos.

Neste contexto, foi investigado pela primeira vez o comportamento de eletrooxidação do anti-histamínico de 2ª geração, bilastina. Observou-se a existência de um processo de oxidação de 2 eletrões, dependente do pH, que parece ter uma correlação forte com a presença do grupo piperidina na sua estrutura. A utilização do sensor eletroquímico SPCE modificado com MWCNTS e o desenvolvimento de uma metodologia apropriada mostrou-se bastante simples, como também eficiente, rápida e económica face à análise da bilastina. Foi também aplicado com sucesso a metodologia à quantificação de bilastina, tanto na sua formulação comercial, bem como em amostras de urina dopadas, sem tratamento prévio das amostras.

Portanto pode ser considerado, que o conhecimento adquirido nesta abordagem, serve como um ponto de partida no que diz respeito a futuros trabalhos eletroquímicos sobre a bilastina, sejam eles focados nas propriedades redox e estabilidade, sejam eles direcionados no desenvolvimento de novas metodologias para a sua deteção e quantificação.

A metodologia aplicada pode também ser adaptada a outros fármacos, que sejam alvo de estudo e aplicado com sucesso, uma vez que a técnica é bastante sensível, e respeita os princípios preconizados a favor de uma Química verde, para além da rapidez e eficácia que apresenta na quantificação e caracterização dos sistemas em estudo.

7. Perspetivas futuras

Tendo os olhos postos no futuro, com base neste trabalho, um objetivo a executar seria alargar e aprofundar o estudo eletroquímico da bilastina, nomeadamente, utilizando e desenvolvendo outros elétrodos de trabalho que possuam potencial analítico para detetar e quantificar por via anódica a molécula de bilastina, bem como tentar identificar os seus produtos de eletrooxidação com recurso a outras técnicas, por exemplo, técnicas cromatográficas. Em linha com este plano, seria de considerar também a investigação do comportamento catódico da bilastina, em diferentes elétrodos de trabalho, bem como a possibilidade de quantificar a molécula nestas condições.

Será também de elevada importância, aplicar a técnica de miniaturização de células eletroquímicas em fármacos ou substâncias que careçam de informação ou métodos de análise, caminhando sempre no sentido das boas práticas da química sustentável, em métodos analíticos.

Eletróanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

8. Referências bibliográficas

- Bachert C, Kuna P, Zuberbier T. **(2010)**. Bilastine in allergic rhinoconjunctivitis and urticaria. *Allergy*, 65 (Suppl. 93): 1–13.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., Swain, E., & Robey, C. **(2001)**. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications* (second edition). John Wiley & Sons Ltd.
- Beitollahi, H., Karimi-maleh, H., & Khabazzadeh, H. **(2008)**. Nanomolar and Selective Determination of Epinephrine in the Presence of Norepinephrine Using Carbon Paste Electrode Modified with Carbon Nanotubes and Novel 2- (4-Oxo-3-phenyl-3 , 4-dihydro-quinazolinyl) - N ' -phenyl-hydrazinecarbothioamide. *Anal. Chem.*, 80, 24, 9848–9851.
- Berrueta LA, Fernández-Armentia M, Bakkali A, Gonzalo A, Lucero ML, Orjales A **(2001)**. Matrix solid-phase dispersion technique for the determination of a new antiallergic drug, bilastine, in rat faeces. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* , 760(1), 185-90.
- Holgate, S.T., Canonica, G.W., Simons, F.E.R., Taglialatela, M., Tharp, M., Timmerman, H., Yanai, K. and **(2003)**, Consensus group on new-generation antihistamines (CONGA): present status and recommendations. *Clinical & Experimental Allergy*, 33: 1305-1324.
- Chang, F., Xie, X., Li, M., & Zhu, Z. **(2016)**. A biconical microchannel and carbon fiber disk. *Analyst*, 141, 4859-4862.
- Church, M. and Labeaga, L. **(2017)**, Bilastine: a new H₁-antihistamine with an optimal profile for up dosing in urticaria. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 31: 1447-1452.
- Corcóstegui R, Labeaga L, Inneráritu A, Berisa A, Orjales A. Preclinical pharmacology of bilastine, a new selective histamine H₁ receptor antagonist: receptor selectivity and in vitro antihistaminic activity. *Drugs R D.*, 6(6):371-84.
- Costentin, C. **(2008)**. Electrochemical Approach to the Mechanistic Study of Proton-Coupled Electron Transfer. *Chem. Rev.*, 108, 7, 2145–2179.
- Pletcher, D., Greff, R., Peat, R., Peter, L. M., & Robinson, J. **(2001)**. *Instrumental methods in electrochemistry*. Elsevier.
- De la Guardia, M., & Esteve-Turrillas, F. (Eds.). **(2019)**. *Handbook of Smart Materials in Analytical Chemistry* (Volume 1). John Wiley & Sons Ltd.
- Díaz-cruz, J. M. **(2020)**. Enhanced voltammetric determination of metal ions by using a bismuthene-modified screen-printed electrode. *Electrochimica Acta*, 362, 137144.
- Golcu, A., Dogan, B., & Ozkan, S. A. **(2005)**. Anodic voltammetric behavior and determination of antihistaminic agent: fexofenadine HCl. *Analytical letters*, 38(12), 1913-1931.
- El-kommos, M. E., El-gizawy, S. M., Atia, N. N., & Hosny, N. M. **(2015)**. Analysis for commonly prescribed non-sedating antihistamines. *Analytical Chemistry Research*, 3, 1–12.
- Fanjul-bolado, P., Lamas-ardisana, P. J., Hernández-santos, D., & Costa-garcía, A. **(2009)**. Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. *Analytica Chimica Acta*, 638, 133–138.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

- Fischer, J., González-martín, J., & Dejmková, H. (2020). Voltammetric study of triazole antifungal agent terconazole on sp 3 and sp 2 carbon-based electrode materials. *Journal of Electroanalytical Chemistry* Volume 863, 114054.
- Ghoneim, M.M., Hassanein, A.M., Salahuddin, N.A. et al (2013). Trace determination of vardenafil hydrochloride in commercial formulation and human serum by adsorptive anodic stripping voltammetry at a carbon paste electrode. *J Solid State Electrochem* 17, 1891–1902.
- Gil, E. D. S., & Melo, G. R. D. (2010). Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(3), 375-391.
- Gumustas, Mehmet & Ozkan, Sibel. (2011). The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*. 511, 1-21.
- Jáuregui, I., García-lirio, E., Soriano, A. M., & Gamboa, M. (2012). An overview of the novel H1-antihistamine bilastine in allergic rhinitis and urticaria. *Expert Rev Clin Immunol.*, 8(1), 33-41.
- Kawauchi H, Yanai K, Wang D-Y, Itahashi K, Okubo K (2019). Antihistamines for Allergic Rhinitis Treatment from the Viewpoint of Nonsedative Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1):213.
- Kolahi-ahari, S., Deiminiat, B., & Rounaghi, G. H. (2020). Modification of a pencil graphite electrode with multiwalled carbon nanotubes capped gold nanoparticles for electrochemical determination of tramadol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 862, 113996.
- Lasseter, K. C., Sologuren, A., La, A., & Stacy, N. (2013). Evaluation of the Single-dose Pharmacokinetics of Bilastine in Subjects with Various Degrees of Renal Insufficiency. *Clin Drug Investig*, 33, 665–673.
- Laviron, E. (1974). Adsorption, Autoinhibition and Autocatalysis in Polarography and in Linear Potential Sweep Voltammetry. *Electroanalytical Chemistry and Interracial Electrochemistry*, 52, 355-393.
- Laviron, E. (1979). General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.*, 101, 19–28.
- Mabbott, G. A. (1983). An Introduction to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* 60(9), 697–702.
- Messina, A., Bertolino, F. A., Salinas, E., Raba, J., & Martinez, N. A. (2008). Chemical Screen-printed enzymatic biosensor modified with carbon nanotube for the methimazole determination in pharmaceuticals formulations. *Sensors and Actuators B: Chemical* 133, 256–262.
- Mirceski, V., Skrzypek, S., & Stojanov, L. (2018). Square-wave voltammetry. *ChemTexts*, 4(4), 1–14.
- Ott, C. E., Cunha-silva, H., Kuberski, S. L., & Cox, J. A. (2020). Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

voltammetry for forensic applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 873, 114425.

Ouarezki, R., Guermouche, S., & Hassane, M. (2019). Degradation kinetics of Bilastine determined by RP - HPLC method and identification of its degradation product in oxidative condition. *Chemical Papers*, 74, 1133–1142.

Ozkan, S. A., Jean-Michel, K., & Petr, Z. (2015). *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. Springer-Verlag.

Pellicer, C., Gomez-caballero, A., Unceta, N., & Goicolea, M. A. (2010). Using a portable device based on a screen-printed sensor modified with a molecularly imprinted polymer for the determination of the insecticide fenitrothion in forest samples. *Anal. Methods*, 2, 1280–1285.

Popovi, I., & Staji, A. (2016). Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, 385–393.

Rambabu, K. (2020). Stability Indicating Method Development and Validation for the Determination of Bilastine and its Impurities by UPLC Method. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 11(3), 1312–1321.

Rossier, J. S., Vollet, C., Carnal, A., & Lagger, G. (2002). Plasma etched polymer microelectrochemical systems. *Lab Chip*, 2, 145–150.

Rountree, K. J., Mccarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2017). A Practical Beginner ' s Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 95, 2, 197–206.

Sims, M. J., Li, Q., Kachoosangi, R. T., Wildgoose, G. G., & Compton, R. G. (2009). Electrochimica Acta Using multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the adsorptive stripping voltammetric determination of hesperidin. *Electrochimica Acta*, 54, 5030–5034.

Sripirom, J., Sim, W. C., Khunkaewla, P., Suginta, W., & Schulte, A. (2018). Simple and Economical Analytical Voltammetry in 15 μ L Volumes: Paracetamol Voltammetry in Blood Serum as a Working Example [Brief-report]. *Analytical Chemistry*, 90, 10105–10110.

Suntornsuk, L. (2010). Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Anal Bioanal Chem*, 398, 29–52.

Veiga, A., Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Martins, D., & Ginja Teixeira, J. (2010). Analytica Chimica Acta Ultra-sensitive voltammetric sensor for trace analysis of carbamazepine. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 182–189.

Weston, D. J., Bateman, R., Wilson, I. D., Wood, T. R., Creaser, C. S., Corporation, W., & Road, F. (2005). Direct Analysis of Pharmaceutical Drug Formulations Using Ion Mobility Spectrometry / Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry Combined with Desorption Electro spray Ionization. *Anal Chem*. 77(23), 7572–7580.

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

Wren, S. A. C., & Tchelitcheff, P. **(2006)**. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*, 1119, 140-146.

Zhao, C., Zhang, J., & Song, J. **(2001)**. Determination of L -Cysteine in Amino Acid Mixture and Human Urine by Flow-Injection Analysis with a Biamperometric Detector. *Analytical Biochemistry*, 297, 2, 170-176

Eletróanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

Anexos

Neste anexo apresenta-se um dos principais resultados do trabalho desenvolvido nesta tese: Artigo Científico aceite para publicação, no dia 8 de Novembro de 2020, na revista *Electroanalysis* (<https://doi.org/10.1002/elan.202060494>).

17/11/2020 Voltammetric study of the antihistamine drug bilastine: anodic characterization and quantification using a reusable MWCNTs modified screen printed carbon electrode - Ginja Teixeira - - Electroanalysis - Wiley Online Library

ELECTROANALYSIS

An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices

Full Paper

Voltammetric study of the antihistamine drug bilastine: anodic characterization and quantification using a reusable MWCNTs modified screen printed carbon electrode

Jorge Ginja Teixeira, João Oliveira

First published: 08 November 2020 | <https://doi.org/10.1002/elan.202060494>

Abstract

The anodic behaviour and the electroanalytical quantification of the second-generation antihistamine bilastine (BIL) were investigated for the first time. A multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) film-coated screen printed carbon electrode (SPCE), as well as cyclic (CV) and linear sweep (LSV) voltammetry, were used for that purpose. The results showed that BIL undergoes an irreversible two-electron oxidation process at the MWCNTs-SPCE sensor. It was also found that the sensor can be reused after a simple and rapid reconditioning procedure. The proposed method was applied to the quantification of BIL in pharmaceutical formulations and spiked urine samples, and good recoveries were obtained.

Supporting Information

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Filename	Description
elan202060494-s1-S1_1.docx 496.7 KB	Supplementary

Please note: The publisher is not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing content) should be directed to the corresponding author for the article.

Accepted Articles
Accepted, unedited articles published online and citable. The final edited and typeset version of record will appear in the future.

Related Information

Metrics

Details

© 2020 Wiley-VCH GmbH

Keywords

Screen printed carbon electrode (SPCE) Bilastine
Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) Antihistamine
Voltammetric determination

Publication History

Accepted manuscript online:
08 November 2020
Manuscript revised:
14 October 2020
Manuscript received:
22 September 2020

ELECTROANALYSIS

An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices

Accepted Article

Title: Voltammetric study of the antihistamine drug bilastine: anodic characterization and quantification using a reusable MWCNTs modified screen printed carbon electrode

Authors: Jorge Ginja Teixeira and João Oliveira

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *Electroanalysis* 10.1002/elan.202060494

Link to VoR: <https://doi.org/10.1002/elan.202060494>

WILEY-VCH

Eletroanálise de Fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas

1 **Voltammetric study of the antihistamine drug bilastine: anodic**
2 **characterization and quantification using a reusable MWCNTs**
3 **modified screen printed carbon electrode**

4 *Jorge Ginja Teixeira,^{a,b*} João Oliveira,^a*

5 ^a Chemistry Department of Science and Technology School, Évora University, CLAV Rua Romão Ramalho, 59, 7000-671
6 Évora, Portugal

7 ^b HERCULES Laboratory, Évora University, Palácio do Vimioso, Largo Marquês de Marialva, 8, 7000-809 Évora, Portugal

8 ^{*} e-mail: jmg@uevora.pt

9 Received: ((will be filled in by the editorial staff))

10 Accepted: ((will be filled in by the editorial staff))

11 **Abstract**

12 The anodic behaviour and the electroanalytical quantification of the second-generation antihistamine bilastine (BIL) were
13 investigated for the first time. A multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) film-coated screen printed carbon electrode
14 (SPCE), as well as cyclic (CV) and linear sweep (LSV) voltammetry, were used for that purpose. The results showed that
15 BIL undergoes an irreversible two-electron oxidation process at the MWCNTs-SPCE sensor. It was also found that the
16 sensor can be reused after a simple and rapid reconditioning procedure. The proposed method was applied to the
17 quantification of BIL in pharmaceutical formulations and spiked urine samples, and good recoveries were obtained.

18 **Keywords:** Antihistamine, Bilastine, Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), Screen printed carbon electrode
19 (SPCE), Voltammetric determination.

20 DOI: 10.1002/elan.((will be filled in by the editorial staff))

21 **1. Introduction**

22 Bilastine (BIL, Fig. 1), chemically known as 2-[4-(2-
23 (4-[1-(2-ethoxyethyl)benzimidazole-2-yl]piperidin-1-yl-
24 ethyl)phenyl]-2-methylpropanoic acid (or according to
25 the World Health Organization, as p-[2-[4-[1-(2-
26 ethoxyethyl)-2-benzimidazolyl]piperidino]etyl]- α -methyl-
27 hydratropic acid), is a second generation H₁
28 antihistamine, an important class of highly selective and
29 reversible inhibitor of histamine-1 receptors, with mild
30 sedative to nonsedative effects that do not cross the
31 blood-brain barrier and act mainly outside the central
32 nervous system [1-3]. Pertaining to the H₁-antihistamine
33 group of piperidines and classified as a potent and non-
34 sedating antihistamine with good-to-excellent safety
35 profile [1,4], bilastine is prescribed orally to symptomatic
36 relief in chronic spontaneous urticaria and allergic rhino-
37 conjunctivitis [5-3]. BIL is rapidly absorbed, does not
38 interact with the cytochrome P450 system and does not
39 undergo significant metabolism in humans, being mainly
40 excreted as the parent compound [1,9]. In fact, BIL is not
41 structurally derived, nor is it a metabolite or enantiomer
42 of any of known antihistamine, but an original molecule
43 designed and developed by FAES Farma (Spain), with
44 the intent of fulfilling all the requirements of a second-

45 generation antihistamine [1]. BIL presents an
46 effectiveness similar to other second-generation
antihistamine drugs, such as cetirizine, levocetirizine,
desloratadine and fexofenadine [1,8], and it is
commercialized in the form of tablets or syrup under
different brand names (e.g., Bilaxten[®], Blexten[®],
Bilacad[®] among others [10]).

Being a drug of increasing use, for which there are
known a scarce number of analytical tools for its
determination in pharmaceutical products and in
biological fluids, it becomes important to develop and
validate novel, rapid and accurate methodologies for the
quantification of bilastine in areas, like the quality control
of pharmaceutical preparations and clinical control of
BIL takers. Among the well-described analytical methods
for bilastine determination are included very few
chromatographic methods [7,11-13], which are effective
but relatively time consuming and expensive, and simpler
spectrophotometric methods based on molecular
absorbance detection in the UV region [14,15].

Aware of this limitation and on the fact that presently
the electroanalytical methods have well-established
credits and constitute a strong alternative towards the
detection and determination of biologically relevant
molecules [16,17], one of the major aims of this work

1