



UNIVERSIDAD DE BURGOS

**Departamento de Química
Área de Química Analítica**

Trabajo Fin de Grado

***DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE
FÁRMACOS CON PROPIEDADES
ANTIÉPILÉPTICAS***

Autora: Ángela Iglesias García

Tutoras: M. Julia Arcos Martínez

M. Asunción Alonso Lomillo

Febrero de 2014

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO: 2013/14

Dña. M. Julia Arcos Martínez y Dña. M. Asunción Alonso Lomillo, directoras del trabajo fin de grado de Dña. Ángela Iglesias García, que lleva por título “Determinación analítica de fármacos con propiedades antiepilépticas”

Autorizan

No autorizan

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, 21 de febrero de 2014

Dña. M. Julia Arcos Martínez

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo

ÍNDICE

1.- Summary	3
2.- State of the art	5
2.1.- Epilepsy	5
2.2.-Antiepileptic drugs	5
2.2.1.-Levetiracetam	5
2.3.- Pharmacology of epilepsy	6
2.4.- Therapeutic antiepileptic drugs monitoring	7
2.5.- Analytical determinations	7
2.5.1.- Electrochemical determinations	8
3.- Objective	9
4. - Experimental	10
4.1.- Reagents	10
4.2.- Apparatus	10
4.3.- Screen-printed sensors and biosensors manufacturing	10
4.4.- Measuring procedure	11
5.- Análisis y discusión de resultados	11
5.1.- Determinación voltamperométrica de levetiracetam	11
5.2.- Determinación de levetiracetam utilizando biosensores electroquímicos	11
5.2.1.- Validación del método	13
6.- Conclusiones	19
7.- Referencias	20

1.- SUMMARY

The necessity of disposable biosensors for simple, rapid and inexpensive analysis in fields such as clinical, environmental or industrial has been highlighted over the past decade. In this way, screen-printed electrodes (SPEs) have been shown as inexpensive and reproducible devices for mass production of miniaturized biosensors [1-4]. These transducers, building by sequential layer deposition on the surface of ceramic or plastic substrates and curing steps, have been conventionally linked to the sensing element by adsorption, cross-linking, electropolymerization or covalent bonding. Bioelements are commonly immobilized after the printing and firing processes, because of the high temperatures reached during the curing step [5]. The immobilization procedure requires maintaining the initial properties of the enzyme intact. Thus, successful developments of biosensors largely rely on the cost and stability of the sensing elements [3].

Even if the above-mentioned immobilization procedures are efficient, they imply additional steps after fabrication of the screen-printed carbon electrodes (SPCEs), which extends the whole biosensor manufacturing. Screen-printing techniques also offer another attractive immobilization procedure consisting of printing the biological material. Enzymes, which are proteins able to catalyse specific chemical reactions *in vivo*, are by far the most commonly employed bioelements [1]. Enzymes can be integrated into the ink to form the sensing paste, which can be screen-printed resulting in biosensors fabricated by only one technology [6-8]. Undoubtedly, this immobilization procedure, which is known as automated immobilization, is particularly interesting for mass production of disposable biosensors.

This work presents a simple way for preparing SPCEs modified with Horseradish peroxidase (HRP) for the determination of Levetiracetam (LEV). This second-generation antiepileptic drug (AEDs) has been previously determined using a SPCE-biosensor based on the immobilization of Horseradish peroxidase (HRP) by pyrrole electropolymerization [9] and covalent bonding [10]. The screen-printing of HRP-containing ink (SPC_{HRP}ES) offers a higher rapidity and simplicity in the manufacturing process of biosensors for LEV determination.

2.- STATE OF THE ART

2.1.- EPILEPSY

The human brain contains millions of nerve cells, each of which is connected to many others. Messages are passed between them by the extraordinarily rapid secretion of tiny packets of specialized chemicals known as neurotransmitters. When this happens coordinately, the brain integrates information from the outside world, enables us to perceive events around us, arranges our response to them by movements or other actions and also, organizes our social behavior.

During an epileptic seizure the normal, quiet and integrated function of nerve cells is interrupted. Instead, they are stimulated in a disorderly manner and show an excessive electrical activity and as the seizure develops, more and more nerve cells become involved.

There are numerous types of seizures and many potential causes of epilepsy. This illness is very common, affecting 3-4 per cent of people by the time they reach the age of 75. Epileptic seizures will stop with drug treatment for at least 60 per cent of the cases [11].

2.2.-ANTIEPILEPTIC DRUGS

AEDs are those which decrease the frequency and/or severity of seizures in people with epilepsy [12]. The first effective compound used for the treatment of seizures was potassium bromide, discovered serendipitously in 1850.

In 1910, phenobarbital, which then was used to induce sleep, was found to have antiseizure activity and became the drug of choice for many years. Then, a number of similar medications were developed, including primidone, phenytoin, ethosuximide, clonazepam, diazepam or carbamazepine. These anticonvulsants belong to the group of the first-generation AEDs and were the mainstays of seizure treatment until the 1990s, when newer AEDs with good efficacy, fewer toxic effects and better tolerability were developed. Among these new AEDs, so-called second-generation antiepileptic drugs are gabapentin, lamotrigine, oxcarbazepine, and LEV [13].

2.2.1.-Levetiracetam

LEV is a white to off-white crystalline powder with a faint odor and a bitter taste. It is a pyrrolidone derivative (S-enantiomer of α -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide) and its molecular weight is 170.2 g/mol (Figure 1) [14].

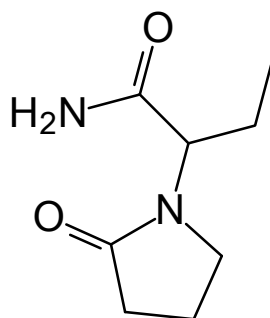


Figure 1.- Chemical structure of LEV

This second-generation AED, licensed in the United States in 1999 [15] and approved for clinical use in 2002 [16], is one of the most used medicine in seizure clinics. Its effectiveness even when used alone may permit a broad spectrum of application [16]. It has been also successfully used in combination with other AEDs and potentiates the protective effects of these drugs without additional toxicity [17].

LEV absorption is independent of food and dosage. It is not metabolized in the liver and does not bind to blood proteins (less than 10 %). Metabolism is affected mainly by enzymatic hydrolysis, which takes place independently of cytochrome P-450. Its plasma half-life is around 7 hours depending on the dose, being 95 % of drug elimination via urine [16].

2.3.- PHARMACOLOGY OF EPILEPSY

Pharmacology analyzes the breakdown and synthesis, biological activity, biological effects, and delivery of drugs [2].

Antiepileptic drug treatment provides excellent therapeutic effects in more than the two-third of the epileptic patients. AEDs influence the chronic hyperexcitability of the brain developed during the epileptogenesis. As an effect, it decreases the excitability and/or increases the inhibition of the pathological cells, which prevents the precipitation of the epileptic seizure (anticonvulsive effect) [18].

The anticonvulsive effect is only symptomatic and it doesn't cure the disorder. In the majority of the cases the treatment is prolonged for years or lifelong, that's why issues such as toxicity, acute dose-dependent side effects, therapeutic compliance or convenience of medical administration must be borne in mind [19].

Monotherapy is considered the ideal treatment for epilepsy, with a single AED. This is due to the reduction of side effects, no drug interactions, better compliance and lower costs. If monotherapy doesn't work, it is switched to combination therapy with two or more drugs, which is known as polytherapy. The introduction of new compounds into the marketing has widened the choices for clinicians treating patients with epilepsy [20].

2.4.- THERAPEUTIC ANTIEPILEPTIC DRUGS MONITORING

Monitoring of plasma or serum concentrations of the older AEDs began to come into use in the late 1960s, initially as a research procedure that seemed as if it might find a future application in the management of epilepsy. This monitoring of plasma levels of AEDs was initiated in highly specialized services because very complex analytical methods such as gas chromatography, first, and liquid then, were used [21].

At the present time monitoring of plasma AEDs concentrations appears to be requested a little less frequently than in the recent past and to be settling into a more balanced and cost-effective pattern of use after its initial phase of exuberant utilization. However, the reasons that led to monitor plasma levels of classical AEDs are still in force to justify the monitoring of the new generation ones [21].

The drugs used in the treatment of epilepsy have very low therapeutic index, so there is very little difference between the toxic and the safe concentration. In addition, there is a wide inter-individual variability, genetically conditioned in the ability of each individual to metabolize AEDs. This fact combined with the influence of many factors, such as age or pregnancy, pathologies, such as kidney or liver failure and interactions, make the relationship between dose and therapeutic effects quite poor. Furthermore, epilepsy treatment is very prolonged, sometimes lifelong, so it is important to detect acute intoxication, prevent chronic toxicity and detect interactions with other drugs [20].

Measuring of LEV serum levels is performed mainly for standard indications and for monitoring of levels in the elderly or those adults with impaired renal function of this nearly exclusive renal excreted drug. Potential monitoring of this drug during the third trimester of pregnancy may be beneficial. Clearance of LEV is increased in children, with one study showing an approximate 40% increase of clearance of the drug in 6-12 year-olds [17].

2.5.- ANALYTICAL DETERMINATIONS

A few analytical methods have been reported for the determination of LEV in pure drug, pharmaceutical dosage forms and biological samples using high-performance liquid chromatography (HPLC) [22-25], gas chromatography (GC) [22], capillary electrophoresis (CE) [26] and HPLC/electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS) [27, 28].

Most of them require pre-treatments of the samples such as solid-phase extraction, deproteinization by addition of organic solvents or formation of insoluble salts. Electrochemical procedures have been described as friendly-methodology that can avoid these inconveniences.

2.5.1.- Electrochemical determinations

Electroanalytical chemistry encompasses a group of qualitative and quantitative analytical methods based on the electrical properties of a solution of the analyte when it is made part of an electrochemical cell. These procedures have certain general advantages over other types of procedures, such as specificity for a particular oxidation state of an element, low capabilities of detection or instrumentation relatively inexpensive [29].

Voltammetric methods are particularly convenient, accurate and precise in the analysis where the active ingredient, oxidizable or reducible, can be determined in the presence of inactive excipients. This procedure, which is based on the measurement of a current as a function of an applied potential, eliminates the time spent on the extraction of the species to determine and the losses incurred in the process, common operations on photometric and chromatographic methods, while the reliability and accuracy are at least comparable, if not better, than the methods mentioned [29].

In recent years there has been a growing interest in the development of miniaturized electrodes in electrochemical instruments. Screen-printed technology has been shown as an attractive method for mass production of sensors at low cost. The technology has the advantages of design flexibility, process automation, good reproducibility, a wide choice of materials and reduced expense. These sensors recognize the chemical information present in the sample and transform it into an easily processable signal [30].

When the receptor material has a biological origin, sensors are called biosensors. Enzymes are capable of catalyzing chemical reactions in a specific way. This specificity is the primary key for its use in the manufacturing of biosensors because enzymes have a much higher specificity than other chemical catalysts since only certain substrates are capable of access to the active sites of the enzyme. The utility of screen-printed technology to biosensors development has been widely shown in the last years, pointing out its promising introduction into the commercial market [31].

Active agent LEV is susceptible of redox processes and, therefore, electrochemical procedures for its determination have been described. The use of electrochemical biosensors allows the analysis of the changes produced during this drug administration, which can have any influence in the therapy response and, therefore, be translated into variation or even suppression of it [20].

The proposed methods combine miniaturized home-made screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and a sensing element, Horseradish Peroxidase (HRP), leading to selective biosensors for LEV determination [9, 10]. Horseradish Peroxidase (HRP) utilizes hydrogen peroxide to oxidize a wide variety of organic and inorganic one-electron donor compounds, such as aromatic phenols, phenolic acids, indoles, amines and sulfonates [32]. The mechanism of peroxidase electrochemical biosensors is well-known. It involves the oxidation of native HRP by

H₂O₂ to an intermediate compound, which is subsequently reduced by a substrate donor or directly at the electrode, regenerating the native enzyme [32-34]. Integration of the recognition element with the signal transducer has been showed to be the critical step for the success of biosensors.

On one hand, HRP has been immobilized by the electrochemical formation of polymer layers of controlled thickness, which constitutes a reproducible and non-manual procedure of biosensor fabrication. The electrochemical method involves the entrapment of biomolecules in organic polymers during their electrogeneration on an electrode surface, preserving a better access of substrate to the immobilized biomolecules and facilitating macromolecular interactions [9].

On the other hand, monolayer strategies for enzyme immobilization have become increasingly popular because they provide controlled and oriented recognition interfaces. The electrochemical grafting of diazonium salts has also been applied to SPEs. Thus, LEV becomes the substrate of the enzymatic reaction at the electrode surface, implying the formation of a product that can be monitored by chronoamperometry (Figure 2.) [10].



Figure 2.- Enzymatic mechanism for LEV determination

Both procedures have shown good performance for LEV determination in terms of reproducibility and capability of detection. However, immobilization procedure can be simplified in order to develop potentially marketed biosensors.

3.- OBJECTIVE

The main goal of this research activity is the development of a biosensor, based on the screen-printed methodology, for the electrochemical detection and quantification of LEV.

In order to simplify the enzyme immobilization procedure and, thus, the biosensor manufacturing, the enzyme has been directly screen-printed as an additional step on the fabrication of the miniaturized devices.

4. - EXPERIMENTAL

4.1.- REAGENTS

SPCEs produced by the Electronalysis Research Group in the University of Burgos have been used [6].

All solutions were prepared with water purified with a Milli-Q device, which provided a resistivity of 18.2 M Ω cm.

HRP (EC 1.11.1.7., Sigma, Steinheim, Germany) was used as received.

Stock standard solutions of LEV (kindly donated by UCB Pharma S.A.) were prepared by dissolving the adequate amount in water.

50 mM phosphate buffer and 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) solutions were used as supporting electrolyte. 1 M NaOH solutions (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) was used to adjust the pH value.

4.2.- APPARATUS

Electrochemical measurements were made by an Autolab electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands).

The pH of the solutions was measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pHmeter.

4.3.- SCREEN-PRINTED SENSORS AND BIOSENSORS MANUFACTURING

Screen-printed configurations of three electrodes (working, Ag/AgCl reference and counter electrode) were fabricated by sequential layer deposition onto 0.5 mm thickness polyester films (HiFi Industrial Film, Dardilly, France).

The printing process began with a carbon conducting ink, which is cured at 60 °C for 30 minutes. This first layer defined not only the conductive tracks, but also the carbon counter and working electrodes (SPCEs). Next, a Ag/AgCl ink was screen-printed over it and cured at 120 °C for 20 minutes. In order to prevent the conducting paths from the solution, the dielectric ink was finally screen-printed and cured at 80 °C for 30 minutes.

HRP containing ink was prepared by thoroughly mixing of the carbon ink with HRP (0.4 % w/w) [6-8]. The mixture was sonicated for 20 minutes and immediately screen-printed on the working electrodes. The resulting biosensors were cured at 40 °C for 1 hour in an oven (SPC_{HRP}Es). The biosensors were kept at 4 °C when not in use.

4.4.- MEASURING PROCEDURE

Cyclic and differential pulse voltammetric measurements were carried out in a cell containing 5 mL of a buffer solution, pH = 7, using different working electrodes (carbon paste, glassy carbon and screen-printed electrodes).

Chronoamperometric measurements were made using (SPC_{HRP}Es) in a cell containing 5 mL of buffer solution, pH 7, with constant stirring. A prepotential of 500 mV vs Ag/AgCl screen-printed reference electrode (Ag/AgCl SPE) was applied during 30 seconds. Then, an operational potential of - 300 mV was applied vs Ag/AgCl SPE. Once a stable baseline was registered, hydrogen peroxide was added into the electrochemical cell to a final concentration of 1.9 mM. After reaching a steady-state current again, successive additions of LEV were performed.

5.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1.- DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE LEVETIRACETAM

El comportamiento electroquímico del fármaco antiepiléptico LEV en distintos electrodos se analizó utilizando diferentes técnicas voltamperométricas, en electrolito de soporte a diferentes valores de pH.

Se registraron voltamperogramas cíclicos de adiciones sucesivas de 100 µl de una disolución 10.0 mM de LEV empleando SPCEs en electrolito de soporte pH 7, entre -1.5 a 1.5 V vs Ag/AgCl SPE.

De igual manera, se realizaron experiencias mediante voltamperometría diferencial de impulsos mediante distintas adiciones de una disolución 10.0 mM de LEV, en electrolito de soporte pH entre - 1.5 a 1.5 V vs Ag/AgCl SPE. En este caso se utilizaron electrodos de carbono vitrificado, pasta de carbono, SPCEs y SPAuEs.

Desafortunadamente no se obtuvo respuesta electroquímica del LEV en ninguno de los casos (Figura 3) por lo que se propuso el empleo de biosensores amperométricos para la determinación de este principio activo.

5.2.- DETERMINACIÓN DE LEVETIRACETAM UTILIZANDO BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

Como se ha mencionado anteriormente, la concentración de este principio activo en una disolución se puede relacionar con la intensidad registrada cronoamperométricamente utilizando biosensores basados en el enzima HRP de acuerdo con el mecanismo propuesto en la figura 2.

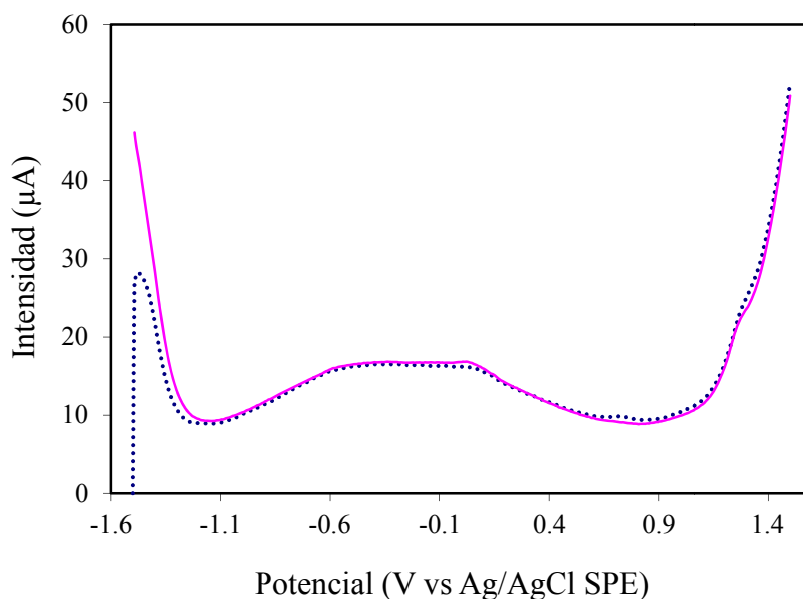


Figura 3.- Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en tampón fosfato pH 7 (línea discontinua) y en una disolución 0.5 M de LEV (línea continua), utilizando un electrodo de carbono vitrificado.

Como consecuencia de la reducción enzimática del LEV en presencia de H_2O_2 , se registra una intensidad de oxidación en el electrodo que puede relacionarse con la concentración del fármaco en disolución [9, 10].

Inicialmente, se realizó una caracterización de los biosensores serigrafados para comprobar la correcta inmovilización del enzima. Para ello se registraron voltamperogramas cíclicos en 100 μl de KCl entre 0.8 y -0.4 V vs Ag/AgCl SPE, a una velocidad de 50 mV s^{-1} (Figura 4).

La transferencia electrónica de forma directa del enzima HRP da lugar a un pico catódico a $+0.3$ V aproximadamente, que corresponde a la reducción de la forma electroactiva HRP-Fe(III) a HRP-Fe(II) en el barrido catódico, con una conversión completa de ésta a HRP-Fe(III) en el barrido anódico [35].

En los biosensores electroquímicos basados en el enzima HRP existe una gran dependencia entre la corriente cronoamperométrica registrada y variables como la concentración de H_2O_2 , el pH del electrolito de soporte y el potencial de trabajo. Se realizaron por tanto diferentes experiencias teniendo en cuenta distintos valores de estas variables experimentales, de acuerdo con los trabajos previamente descritos. Los valores óptimos de las variables experimentales que maximizan la sensibilidad del biosensor fueron pH del electrolito de soporte = 7.0, potencial de trabajo = -0.3 V vs Ag/AgCl SPCE y concentración de $\text{H}_2\text{O}_2 = 1.9 \text{ mM}$.

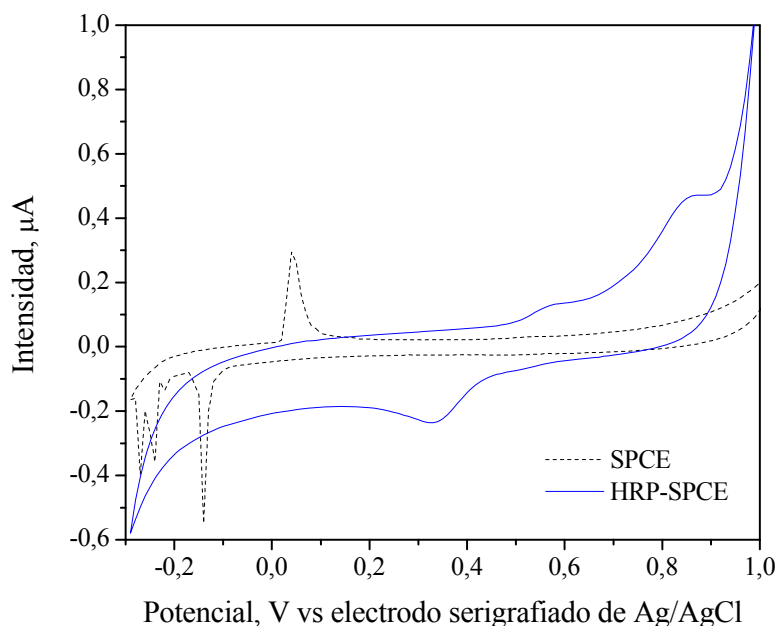


Figura 4.- Voltamperograma cíclico registrado con un SPC_{HRPE} en una disolución 100 mM de KCl a 50 mVs^{-1} .

En la figura 5 se muestra un cronoamperograma registrado en un biosensor SPC_{HRPE} en las condiciones óptimas de las variables experimentales. Para la obtención de dicho cronoamperograma, se realizaron sucesivas adiciones de 50 μl de una disolución 0.5 M de LEV, tras la estabilización de la señal debida a la reducción del agua oxigenada utilizado en la regeneración del enzima.

En las condiciones optimizadas de las variables experimentales se realizaron experiencias de control utilizando electrodos serigrafiados de carbono sin modificar con el enzima HRP, en los que no se obtuvo respuesta alguna, pudiéndose comprobar así la selectividad del biosensor desarrollado hacia el analito objeto de estudio.

5.2.1.- Validación del método

La validación de un método analítico se define como el proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que dicho método posee unas características de funcionamiento adecuadas para la aplicación que se le quiere dar. Dichas características de funcionamiento se determinan a través de la precisión, la capacidad de detección, la exactitud, el intervalo dinámico, la sensibilidad, la selectividad y la robustez, los llamados parámetros de calidad. La precisión, la capacidad de detección y la exactitud se consideran parámetros primarios ya que su impacto sobre la calidad de un método analítico es mayor [36].

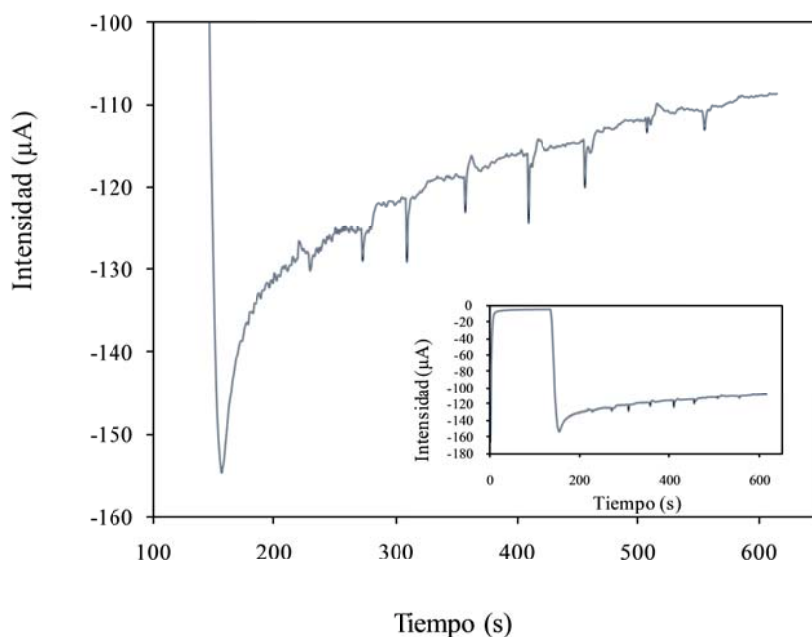


Figura 5.- Cronoamperograma registrado para adiciones sucesivas de una disolución de 0.5 M de LEV, utilizando un SPC_{HRPE} , en las condiciones optimizadas: $pH = 7$, $E_w = -0.3 V$ vs $Ag/AgCl$ SPE y $C_{H_2O_2} = 1.9$ mM.

▪ Precisión del método

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas. Así pues, evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar réplicas de medidas sobre una misma muestra. Se expresa estadísticamente a través de la desviación estándar, bien en términos absolutos bien en términos relativos. En general, la desviación estándar aumenta con la concentración mientras que la desviación estándar relativa (RDS) disminuye, es decir, se estabiliza a concentraciones elevadas.

Es recomendable distinguir entre unas condiciones de mínima variación de los factores de influencia y unas condiciones de máxima variación de los mismos sobre la precisión, lo que se conoce como condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. Las condiciones de repetibilidad son aquellas en las que las medidas se realizan aplicando el mismo método a un mismo material, con los mismos equipos y reactivos, el mismo operador y en un intervalo corto de tiempo, generalmente una sesión de trabajo. Cuando las medidas se obtienen con el mismo método, sobre las mismas muestras, pero con reactivos, equipos, condiciones ambientales y operadores distintos se habla de condiciones de reproducibilidad [36].

Para estimar la reproducibilidad del procedimiento se realizaron varias curvas de calibración mediante adiciones sucesivas de 50 μl de una disolución de 0.5 M de LEV, en las condiciones óptimas citadas anteriormente utilizando cada vez distintos $\text{SPC}_{\text{HRPES}}$. Los parámetros de calibrado y la desviación típica, fueron óptimamente evaluados. Con el objetivo de detectar la existencia de puntos anómalos, se utilizó el programa PROGRESS [37], que evalúa el intervalo lineal y la presencia de datos anómalos mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) y una vez eliminados estos del conjunto de calibración, construye nuevamente con los restantes puntos una recta de calibración mediante una regresión en mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Esta regresión OLS proporciona una correcta valoración de la pendiente (sensibilidad) y del término independiente del calibrado, siendo ambos importantes para juzgar la calidad del calibrado y a partir de ésta, la del método analítico.

En la figura 6 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas a partir de ellos, una vez eliminados los puntos anómalos, en los diferentes calibrados realizados con distintos $\text{SPC}_{\text{HRPES}}$.

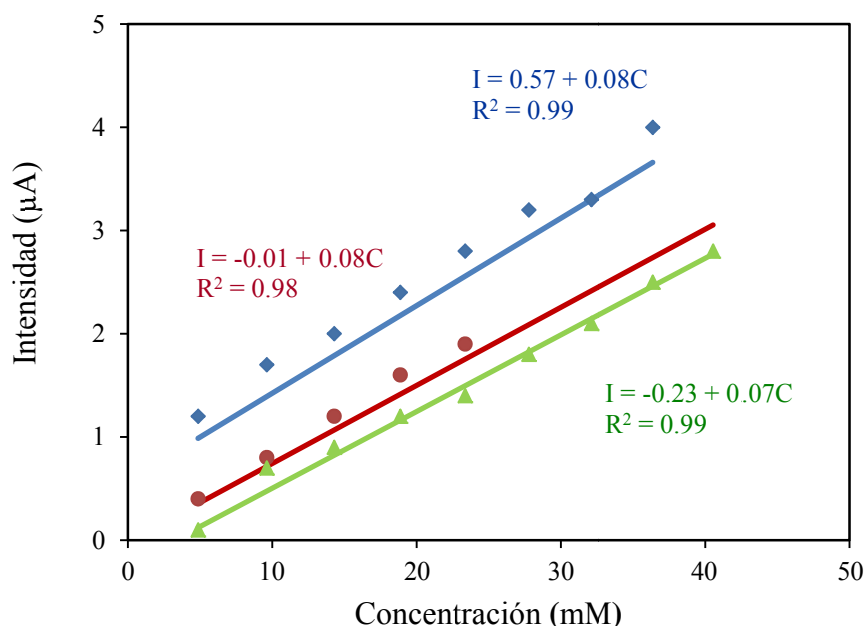


Figura 6.- Rectas de calibrado para el cálculo de la reproducibilidad del método.

A su vez, la tabla 1 recoge los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión utilizados para la estimación de la reproducibilidad.

La reproducibilidad de los $\text{SPC}_{\text{HRPES}}$ en el rango de concentración de 4.8 a 40.5 mM, en términos de desviación estándar relativa (RDS) asociada a las pendientes de las rectas de calibración construidas, fue de 7.3% para $n = 3$.

Tabla 1.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anomalos
Nº de datos	8	8	6
Pendiente	0.09	0.08	0.08
Término independiente	0.48	0.81	0.57
Coefficiente de determinación (R^2)	0.99	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.13	-	0.09
Nº de datos	5	5	5
Pendiente	0.08	0.08	0.08
Término independiente	-0.01	-0.07	-0.01
Coefficiente de determinación (R^2)	0.98	0.94	0.98
Desviación estándar residual	0.09	-	0.09
Nº de datos	9	9	8
Pendiente	0.07	0.08	0.07
Término independiente	-0.16	-0.26	-0.24
Coefficiente de determinación (R^2)	0.99	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.09	-	0.06

▪ Capacidad de detección

Se define la capacidad de detección como la concentración o la cantidad de analito derivada de la medida más pequeña y que puede detectarse con una certeza razonable mediante un determinado procedimiento analítico. Es muy habitual, y cada día aún más, analizar componentes de muestras a niveles bajos de concentración. En estos casos, hay que discriminar entre muestras en las que se detecta analito y muestras en las que no. Además, una vez detectado el analito, se ha de fijar un límite a partir del que poder estimar cuantitativamente y de forma fiable su concentración [36].

A menor ruido y mayor sensibilidad del método, mayor será también la capacidad de discriminación entre el blanco y las muestras o patrones a baja concentración. Dado que todas las medidas experimentales están siempre sujetas a errores, será necesario recurrir siempre a criterios estadísticos y de probabilidad. Al determinar la presencia o la ausencia de analito en una muestra se han de evitar dos tipos de errores [36]:

- Los falsos positivos (α), denominados errores de tipo α , que consisten en dictaminar la presencia de analito cuando en realidad la muestra no lo contiene.

- Los falsos negativos (β), denominados errores de tipo β , en los que se determina que no hay analito cuando en realidad la muestra lo contiene.

Este procedimiento analítico fue también caracterizado mediante su capacidad de detección, teniendo en cuenta α y β [18, 38]. En el cálculo de este índice de calidad también se precisaron regresiones validadas entre la concentración y la señal analítica, construidas en el rango de 4.8 a 40.5 mM [39].

El valor mínimo de concentración detectable, 1.6 ± 0.3 mM ($\alpha = \beta = 0.05$; $n = 3$), fue menor que el valor del primer estándar utilizado para construir las curvas de calibrado 4.8 mM. Por lo tanto, desde un punto de vista analítico, este último valor se estimó como capacidad de detección del método [40].

▪ Exactitud del método: Determinación de levetiracetam en fármacos comerciales

La IUPAC define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor real del mensurando. En una nota asociada a esta definición se añade que es un concepto cualitativo utilizado para describir el error asociado a un resultado y para ello hace falta un parámetro que permita medir cuantitativamente la exactitud. Este parámetro es el error, que se define como la diferencia entre el resultado de la medida y el valor real del mensurando. Estas definiciones son más bien estadísticas, donde aparece el valor verdadero o real como últimas referencias. Desde el punto de vista metrológico se habla más bien de trazabilidad, sustituyendo estos valores que no son conocidos por los valores de referencia de patrones y materiales de referencia certificados [36].

La exactitud de un método analítico se puede demostrar de diversas formas, pero no todas poseen la misma categoría metrológica ni se pueden aplicar con la misma facilidad. Las más utilizadas son el empleo de materiales de referencia certificados, la comparación con un método de referencia, el análisis de muestras adicionadas y el análisis de muestras manufacturadas con un contenido de analito conocido, como es este caso [36].

De este modo, finalmente los biosensores basados en el enzima HRP se emplearon para analizar el contenido de LEV en un fármaco comercial de marca registrada Keppra.

Se disolvió una gragea de 1000 mg en 10 ml de agua, se sometió a un baño de ultrasonidos y, por último, se centrifugó. Esta muestra se analizó mediante el método de interpolación en una curva de calibrado [41].

Para ello, se registraron varios cronoamperogramas, utilizando SPC_{HRPES} , en las condiciones óptimas de las variables experimentales. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, una vez estabilizada la señal cronoamperométrica se añadió a la celda electroquímica una disolución de agua oxigenada 1.9 mM, y al estabilizarse nuevamente esta señal de reducción, se añadieron 200 μ l de la disolución del fármaco comercial a la celda electroquímica registrándose una señal de oxidación (Figura 7).

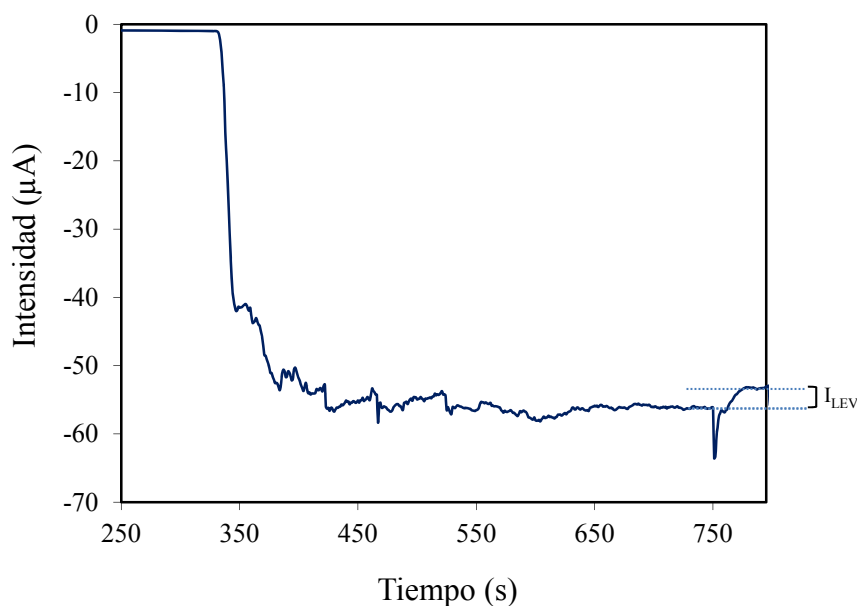


Figura 7.- Cronoamperograma registrado para la determinación de LEV en disolución de una gragea de 1000 mg de fármaco comercial utilizando un SPC_{HRPE} , en las condiciones optimizadas: $pH = 7$, $E_w = -0.3 V$ vs $Ag/AgCl$ SPE y $C_{H_2O_2} = 1.9 mM$.

Dicha señal de oxidación está relacionada con la concentración de LEV en el fármaco comercial, por lo que interpolando este valor en las curvas de calibración anteriormente obtenidas (Figura 5) se obtiene el valor de concentración deseado. La tabla 2 muestra los buenos resultados obtenidos con este procedimiento en términos de RSD y de intervalo de confianza para la media, lo que confirma su exactitud.

Tabla 2.- RSD e intervalo de confianza para la media de los valores de LEV obtenidos en las muestras del fármaco, utilizando SPC_{HRPEs} .

Cantidad de LEV en las grageas (mg)	Cantidad de LEV detectada (mg)	RSD (%)	Intervalo de confianza al 95% para la media
1000	1209.5	134.7	1118.9 ± 152.4
	964.1		
	1183.2		

6.- CONCLUSIONES

Con los datos recogidos en este trabajo se puede concluir que:

- El empleo de biosensores construidos a partir de electrodos de carbono serigrafiados con el enzima HRP supone una técnica sencilla, reproducible y económica para la detección cronoamperométrica de LEV.
- Los análisis mediante cronoamperometría están muy influenciados por variables experimentales como la concentración de peróxido de hidrógeno, el potencial de trabajo y el pH del medio de análisis.
- Las condiciones óptimas de las variables experimentales son 7, - 0.3 V vs. Ag/AgCl SPE y 1.9 mM para el pH, el potencial de trabajo y la concentración de peróxido de hidrógeno, respectivamente.
- La reproducibilidad del método propuesto asociada a las pendientes de las curvas de calibración en términos de RSD, en el intervalo de concentración de 4.8 a 40.5 mM, fue de 7.3% (n = 3).
- La capacidad de detección obtenida para el LEV en las condiciones óptimas de las variables experimentales fue de 4.8 mM ($\alpha = \beta = 0.05$; n = 3).
- La reproducibilidad de métodos similares para la determinación de LEV asociada a las pendiente de las rectas de calibración obtenidas en trabajos anteriores, 6.2% y 7.7%, es del mismo orden que la obtenida con el procedimiento aquí desarrollado.
- Por el contrario, las capacidades de detección de dichos métodos presentan valores ligeramente inferiores, del orden de 10^{-5} M para $\alpha = \beta = 0.05$. Este hecho puede ser atribuido a que los SPC_{HRP}ES utilizados han sido almacenados durante más de un año, lo que sin duda alguna conlleva la pérdida de actividad enzimática. Sin embargo, esto pone de manifiesto la idoneidad de los mismos para su utilización en la determinación de LEV sin pérdida significativa de sensibilidad, incluso después de largos períodos de tiempo desde su fabricación, lo que facilitaría su comercialización.
- Los dispositivos empleados tienen carácter desechable, sin embargo, han permitido realizar varias medidas con un mismo SPCE obteniéndose resultados satisfactorios.
- Los biosensores utilizados han demostrado su viabilidad para realizar análisis cuantitativos de LEV en muestras complejas, como el fármaco comercial Kepra.

7.- REFERENCIAS

- [1] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 73 (2007) 202.
- [2] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, S. Alegret, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 69 (2000) 153.
- [3] J.M. Cooper, A.E.G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, 2004.
- [4] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, in: R. Comeaux, P. Novotny (Eds.), *Biosensors: Properties, Materials and Applications (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine)*, Nova Publishers, Hauppauge NY, 2009, p. 1.
- [5] J. Wang, P.V.A. Pamidi, D.S. Park, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 2705.
- [6] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. del Torno-de Roman, M.J. Arcos-Martínez, *Anal Chim Acta*, 688 (2010) 49.
- [7] L. Asturias-Arribas, M. Asuncion Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M. Julia Arcos-Martínez, *Talanta*, 111 (2013) 8.
- [8] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Electroanal*, 25 (2013) 1316.
- [9] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martínez, *Bioelectrochemistry*, 74 (2009) 306.
- [10] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, A. Hernández-Martín, M.J. Arcos-Martínez, *Analytical Biochemistry*, 395 (2009) 86.
- [11] R. Appleton, A. Marson, *Epilepsy*, Oxford University Press, 1995.
- [12] *Neuropharmacology of Antiepileptic Drugs*,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2513/>
- [13] *Antiepileptic Drugs*, <http://emedicine.medscape.com/article/1187334-overview>
- [14] *Levetiracetam Keppra*, <http://www.rxlist.com/keppra-drug.htm>
- [15] J.E. Gibbs, C.E. Walker, H.R. Cock, *Epilepsia*, 47 (2006) 469.
- [16] H. Stefan, T.J. Feuerstein, *Pharmacol Therapeut*, 113 (2007) 165.
- [17] A. Dasgupta, *Therapeutic drug monitoring : newer drugs and biomarkers*, Academic, Oxford, 2012.

- [18] ISO11843, Capability of detection (Part I 1997 and Part II 2000) Genève.
- [19] R. Nassiri, Z. Stelmasiak, *Neurologia i neurochirurgia polska*, 34 Suppl 8 (2000).
- [20] M.E. Burgoa Calvo, Estudio electroquímico de fármacos antiepilépticos. Aplicación al análisis de muestras reales, Tesis Doctoral, Universidad de Burgos, 2008.
- [21] M.J. Eadie, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46 (1998) 185.
- [22] T.A.C. Vermeij, P.M. Edelbroek, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 662 (1994) 134.
- [23] N. Ratnaraj, H.C. Doheny, P.N. Patsalos, *Therapeutic Drug Monitoring*, 18 (1996) 154.
- [24] V. Pucci, F. Bugamelli, R. Mandrioli, A. Ferranti, E. Kenndler, M.A. Raggi, *Biomedical Chromatography*, 18 (2004) 37.
- [25] J. Martens-Lobenhoffer, S.M. Bode-Boger, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 819 (2005) 197.
- [26] Z.K. Shihabi, K. Oles, M. Hinsdale, *Journal of Chromatography A*, 1004 (2003) 9.
- [27] T.D. Guo, L.M. Oswald, D.R. Mendu, S.J. Soldin, *Clinica Chimica Acta*, 375 (2007) 115.
- [28] D.S. Jain, G. Subbaiah, M. Sanyal, U. Pal, P.S. Shrivastav, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006) 2539.
- [29] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Thomson Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2007.
- [30] M. Tudorache, C. Bala, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 565.
- [31] B.R. Eggings, *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2002.
- [32] M. ElKaoutit, I. Naranjo-Rodriguez, M. Domínguez, M.P. Hernández-Artiga, D. Bellido-Milla, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 7131.
- [33] B. Serra, B. Benito, L. Agüí, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Electroanal*, 13 (2001) 693.
- [34] M.A. Alonso-Lomillo, J.M. Kauffmann, M.J. Arcos Martinez, *Biosens Bioelectron*, 18 (2003) 1165.

- [35] Y. Liu, R. Yuan, Y.Q. Chai, D.P. Tang, J.Y. Dai, X. Zhong, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 115 (2006) 109.
- [36] Á. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau, *Técnicas espectroscópicas en química analítica, Síntesis*, Madrid, 2012.
- [37] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*. (1989) Wiley. New York.
- [38] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd ed, Port City Press Inc, Baltimore, 2000.
- [39] R. Cela, M. Blanco, *Avances en quimiometría práctica*, Universidade, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago de Compostela, 1994.
- [40] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Biosens. Bioelectron.*, 25 (2010) 1333.
- [41] D.C. Harris, R. Balahura, *Análisis químico cuantitativo*, Reverté, Barcelona, 2001.

