CONTROL ANALITICO Y TRATAMIENTO CON OZONO DE RESIDUOS DE 5-FLUOROURACILO Y CITARABINA

R. Pérez Rey, A.S. Padrón Yaquis,* L. García León,* M.E. Martínez Pozo* y Ch. Baluja.

*Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones, Apartado Postal 6990, *Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Avenida 26 No. 1605 y Calzada de Puentes Grandes, Plaza de la Revolución, Código Postal 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.*

Recibido: 4 de abril de 1997.

RESUMEN. Durante la producción de medicamentos citostáticos se genera un volumen de residuos altamente peligrosos por sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas, entre otras. Por este motivo, dichos residuos deben ser tratados antes de incorporarlos a la red de alcantarillados para garantizar la protección del medio ambiente. En el presente trabajo se desarrolló y validó un método analítico por HPLC para el control de los residuos generados durante la producción de 5-fluorouracilo (5-FU) y citarabina. Para cada método se aportan y discuten los parámetros de validación: linealidad, intervalo, exactitud, precisión, límite de detección y límite de determinación. Se trataron residuos artificiales de diferentes concentraciones de ambos citostáticos a pH = 3y7c on ozono, como agente inactivante. Se demostró la posibilidad de emplear las propiedades oxidantes de este gas para la inactivación de los residuos peligrosos provenientes de la elaboración de dichos fármacos.

ABSTRACT. During the production of cytostatic drugs, a bulk of highly dangerous wastes with mutagenic and carcinogenic properties, are generated. This waste should be treated before pouring them into the sewerage system in order to guarantee the protection of the environment. In this work, an analytical HPLC method for the monitoring of the wastes generated during the production of 5-fluorouracil (5-FU) and cytarabine was developed and validated. For each method, the results corresponding to the validation parameters: linearity, range, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification are reported. Artificial wastes at several concentrations of both cytostatics (pH =3 and 7) using ozone, as inactivating agent, were treated. The possibility of employing the oxidizing properties of ozone for the inactivation of dangerous wastes from the production process of those drugs was demonstrated.

INTRODUCCION

El fluorouracilo y la citarabina son antimetabolitos fundamentales en la quimioterapia de las enfermedades neoplásicas, compuestos análogos de la pirimidina que tienen en común su capacidad de obstaculizar la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina. Estos compuestos también pueden imitar a los metabolitos naturales en grado tal que interfieren actividades celulares vitales como la síntesis y el funcionamiento de los ácidos nucleicos.[1]

Estos principios activos se han analizado cuantitativamente por diferentes métodos analíticos: espectrofotométricos, colorimétricos, electroquímicos, polarográficos y cromatográficos.[2-12] A pesar de las ventajas que brinda la espectrofotometría, se presentan problemas analíticos que esta no puede resolver y para lo cual se hace necesario utilizar otros métodos.

El empleo de la cromatografía (métodos cromatográficos) de forma combinada o individual constituye el método por excelencia en la mayoría de los laboratorios, debido a las ventajas que ellos representan. La complejidad de estas técnicas van desde las más simples como la cromatografía en papel y en capa fina hasta las más complejas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). A través de ellas, se puede llevar a cabo la identificación, purificación y determinación cuantitativa de las sustancias.[13-18]

Ha sido reconocido que los agentes citostáticos son altamente tóxicos y que los desechos correspondientes deben ser tratados como residuos infecciosos, altamente peligrosos y se recomienda especialmente que sean quemados o tratados químicamente.

Los objetivos de este trabajo estuvieron encaminados a desarrollar y validar un método de análisis cuantitativo, para la determinación de trazas de 5-fluorouracilo y de citarabina en residuales generados durante la producción de las formas terminadas respectivas, así como estudiar la reacción de estos principios activos con el ozono con el fin de proponer un procedimiento rápido y efectivo para su inactivación, que a su vez garantice la seguridad del personal y del medio ambiente.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos empleados fueron de calidad puros para análisis suministrados por Merck y las sustancias químicas de referencia de calidad USP (International Chemical References Substance, WHO Centre for Chemical References Substance, Stokholm, Sweden).

En las determinaciones cuantitativas se empleó un equipo de HPLC, provisto de bomba de doble pistón recíprocante, desgasificador, inyector automático, detector UV/Vis de longitud de onda variable e integrador acoplado a IBM con el paquete de programas EUROCHROM para el procesamiento de datos.

Se utilizaron residuos artificiales preparados a partir de las materias primas de cada principio activo suministrada por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ministerio de Salud Pública de Cuba.

La linealidad, el intervalo y la exactitud se estudiaron de forma simultánea.

Se realizó el cálculo de la precisión del método expresada en sus dos formas: repetibilidad y reproducibilidad. La

primera se hizo sobre la base de 10de terminaciones y la segunda se estudió mediante las valoraciones llevadas a cabo por dos analistas, en días diferentes.

Para evaluar la especificidad de los métodos cromatográficos se sometieron las muestras a condiciones drásticas de oxidación con NaOCl concentrado y posteriormente se aplicó la metodología de análisis propuesta.

Los límites de detección y determinación cuantitativa se estimaron a partir de la curva de regresión y se consideraron concentraciones bajas del analito por extrapolación a concentración cero.

La reacción se efectuó en un reactor de vidrio de 100 mL, con burbujeo de la mezcla ozono-oxígeno producida en un generador de laboratorio por descarga eléctrica silente. El ozono se produjo a razón de 1 mmol/h y el tiempo de reacción fued e2 -4h.

PARTE EXPERIMENTAL

Las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de 5-FU y citarabina en aguas residuales provenientes de la producción de formas terminadas correspondientes, así como los limites de la determinación cuantitativa y de detección se presentan en la Tabla I.

TABLA I
Condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de 5-FU y citarabina

Principio activo	Solvente	Columna	Detector UV (nm)	Flujo (mL/min)
5-FU	Agua	LiChrosorb RP-8	269	1,0
Citarabina	Agua		2801	,0

Se prepararon disoluciones de referencia de 5-FU con diferentes concentraciones: 7,5; 9; 10; 11 y 12,5 g/mL .

Las muestras químicas de referencia de Citarabina se prepararon a diferentes niveles de concentración que comprenden 0,75; 1,50; 3,02; 7,55; 15,10; 30,20; 48,32 y 60,40 µg/mL .

Para el tratamiento con ozono, lo residuos artificiales de cada principio activo se prepararon a diferentes concentraciones: (15,38 y 1,53 mmol/L de 5-FU y 8,20y 1,65 mmol/L de citarabina) a diferentes pH (3,0 y 7,0) ajustados con amortiguador fosfato.

RESULTADOS

La ecuación de la recta de linealidad correspondiente a 5-FU se expresa según

$$y = 2,1672x + 0,1431$$

con un coeficiente de correlación lineal de 0,999 9, la $t_{cal} < t_{tab}$ (1,07<2 ,45)yS $b_{relativa} = 0,84\%$.

La ecuación de la recta obtenida en el caso de citarabina se expresa según

$$y = 1,348\,2x + 0,089\,73$$

con un coeficiente de correlación lineal de 0,999 94. Al aplicar la prueba de significación del intercepto este resultó no significativo, ya que el intervalo de confianza incluía el valor cero [–0,075 97; 0,255 43]. La ecuación cumplió con la prueba de linealidad,ya que la $Sb_{relativa} = 0,201\%$e ra inferior al2%.

Los resultados del estudio de la precisión y exactitud de ambos métodos se resumen en las Tablas II y III respectivamente.

Los cromatogramas de las disoluciones de las sustancias químicas de referencia y de los residuos de los citostáticost ratadosq uímicamentes em uestrane nl aF ig.1 .

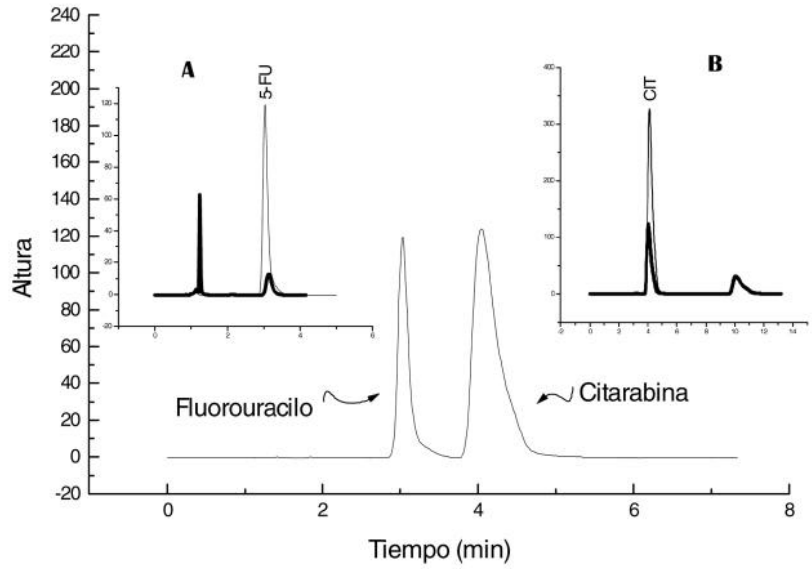


Fig. 1. Cromatogramas de las sustancias químicas de referencia y de los residuos de fluorouracilo (A) y citarabina (B) tratados qu ímicamente.

TABLA II
Estudio de la precisión de los métodos analíticos

Repetibilidad			
Citarabina		5-FU	
Muestra	(%)	Muestra	(%)
1	100,22	1	98,07
2	99,67	2	99,88
3	99,83	3	100,45
4	99,91	4	100,33
5	100,22	5	100,45
6	100,58	6	100,45
7	99,83	7	100,11
8	100,38	8	99,88
9	100,15	9	100,67
10	100,85	10	100,56
$\overline{X}$ = 100,164 S = 0,369 CV = 0,368 8 %		$\overline{X}$ = 100,085 S = 0,758 CV = 0,715 %	
Reproducibilidad (%)			
Analista I	Analista II	Analista I	Analista II
100,58	100,22	97,90	98,58
99,04	99,83	99,36	99,00
100,15	100,85	98,08	100,30
99,45	100,38	99,45	97,63
100,30	100,90	100,09	99,47
$\overline{X}$=1 00,06 S=0 ,69	$\overline{X}$ = 100,31 S = 0,50	$\overline{X}$ = 98,97 S = 0,94	$\overline{X}$ = 98,99 S = 0,99
$F_{calc.}$ = 1,90F $_{5\%}$ =5 ,05 GL=5 /5 $t_{calc.}$ =1 ,07		$F_{calc.}$ =1 ,05 $F_{5\%}$ =6 ,39 GL=4 /4 $t_{calc.}$ =0, 02	
$t_{5\%}$ =2 ,22 GL=1 0t		$_{5\%}$ =2 ,31 GL=8	
Intervalo de confianza: [99,74; 100,62]		Intervalo de confianza: [98,24; 99.68]	

CV Coeficiente de variación. S Desviación estándar. GL Grados de libertad.

TABLA III
Estudio de la exactitud de los métodos analíticos

Cantidad				CV		Recobrado	
Adicionada (x)		Recuperada (y)					
(µg)						(%)	
5-FU	Citarabina	5-FU	Citarabina	5-FU	Citarabina	5-FU	Citarabina
7,5	1,51	7,46	1,51	0,65	1,99	99,46	100,34
9	3,02	8,98	3,01	0,79	1,48	99,77	99,84
10	7,55	10,01	7,67	0,70	1,25	100,00	101,68
11	15,10	10,95	15,03	1,02	0,05	99,90	99,54
12,5	30,20	12,40	30,09	0,92	0,89	99,20	99,66
5 FU				Citarabina			
y=x+0, 997 4				y=x $-3{,}657 \cdot 10^{-6}$			
r=0, 999 97 n=2 8				r=0, 999 94 n=3 2			
$t_{calc.} < t_{tab.}$				$Sb_{relativa}$ = 0,20			
pendiente: 1,019 < 2,57				$t_{calc.}$ = 1,53			

En la figura 2 se muestra el comportamiento de las concentraciones de fluorouracilo y citarabina a través del tiempo de reacción con el ozono a diferentes pH y concentraciones iniciales. Como se observa, el tratamiento con ozono puede disminuir la concentración de ambos citostáticos hasta valores inferiores al límite de detección. Por otra parte, no hay diferencias notables entre los dos pH seleccionados, y el 5-fluorouracilo parece ser el más reactivo frente al ozono que la citarabina.

Los límites de detección y determinación cuantitativa estimados se resumen en la tabla IV. Son notables los valores bajos obtenidos, lo que verifica la validez del método cromatográfico seleccionado.

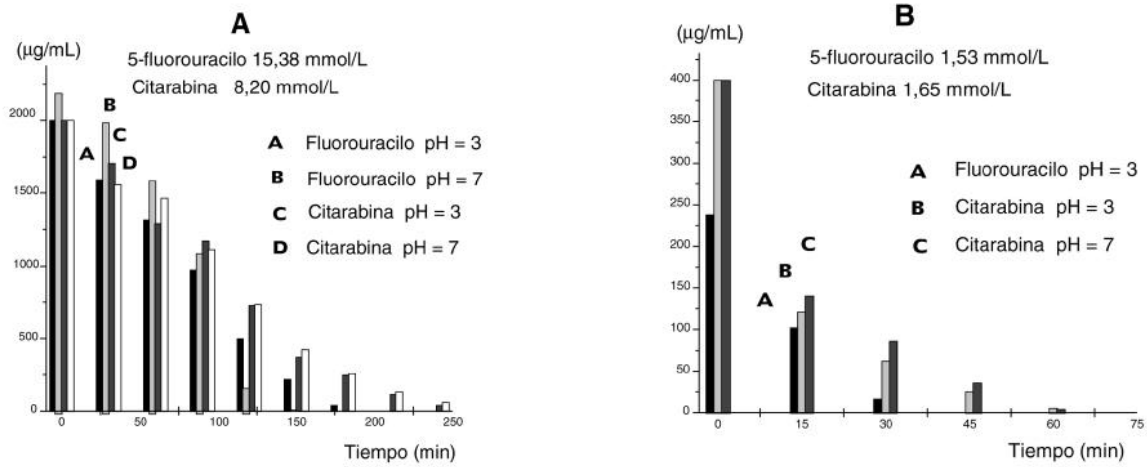


Fig. 2. Comportamiento cinético de la reacción del fluorouracilo y la citarabina con ozono a pH=3y 7.

TABLA IV
Límites de detección (LD)
y de la determinación cuantitativa (LC) estimados

Principio activo	LC	LD
	(ng)	
Fluorouracilo	5,3	17
Citarabina	114	50

DISCUSION

Las curvas de calibración, demostraron un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado con coeficientes de correlación lineal superiores a 0,999 9. Al aplicar la prueba de significación del intercepto, este resultó no significativo al ser la $t_{cal.} < t_{tab.}$ e incluir al valor cero el intervalo de confianza y cumplieron con la prueba de linealidad, ya que las $Sb_{relativa}$ fueron inferiores al2%.

En el caso de la repetibilidad, el coeficiente de variación alcanzado demuestra una buena precisión, ya que para métodosc romatográficoss ep ermitec omol ímitem áximo un2%.

Los resultados de la reproducibilidadindicaron la no existencia de diferencias significativas entre la precisión lograda por los dos analistas para un 95 % de probabilidad, ya que el valor calculado en la prueba de Fisher resultó menor que el tabulado. No se observaron diferencias significativas entre las medias de ambos analistas porque al aplicar la prueba t de Student el valor calculado resultó menor que el tabulado para un 95 % de probabilidad.

El coeficiente de variación para cada una de las concentraciones analizadas, mostró una adecuada precisión en el intervalo seleccionado.

Los valores de la pendiente y del coeficiente de correlación alcanzados en el estudio de recobrado demuestran la exactitud y la linealidad del método descrito.

Al aplicar la prueba de significación de la pendiente y el intercepto, resultaron no significativos, ya que el valor de la *Sb relativa* fue inferior al 2 % en ambos casos y el intervalo de confianza incluyó al valor uno y cero respectivamente.

Los resultados del análisis de la disolución de referencia y del residual de los citostáticos tratado químicamente demuestran la especificidad del método al no presentarse interferencias de señales adicionales en la zona de elución del producto principal.

Los límites de detección y de determinación cuantittiva encontrados muestran la alta sensibilidad del método analítico desarrollado para el análisis de trazas de estos fármacos.

La reacción del 5-FU y la citarabina con el ozono en el intervalo de concentraciones de trabajo, a diferentes pH, fue completa y rápida.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y valido un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el control de trazas de 5-FU y citarabina.

El tratamiento con ozono resulta un procedimiento efectivo y seguro para la inactivación de residuos de 5-FU y citarabina.

BIBLIOGRAFIA

1. Goodman A., Goodman L. y Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo III. Edición Revolucionaria, Instituto Cubano del Libro, Cuba, 1223-28,1230-83, 1984.
2. Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem materia. 2nd Ed., The Pharmaceutical Press, London, 468-472, 1986.
3. British Parmacopoeia. Vol. I: 289 and Vol. II: 919-920, London, 1993.
4. Kleinberg M.L . *et al.* **Am. J. Hosp. Pharm., 38**, 1301, 1981.
5. Buyuktimkin N . **Pharm. Ztg., 127**, 2111, 1982.
6. Sesin G.P. *et al.* **Am. J. N. Ther. Clin. Nutr., 9**, 23, 1982.
7. Martin H.I. *et al.* **Rev. Soc. Esp. Farm. Hosp., 13**, 173, 1989.
8. Banerjee S.K. **Indian J. Pharm. Sci., 55** ,42, 1993.
9. Connors K.A. Curso de análisis farmacéutico. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 195-245, 443-445, 1981.

10. Dogrukol-ak D. and Tuncel M. **Pharmazie, 49**, 928, 1994.
11. Lloyd D.K. and Cypess A.M. **J. Chromatogr. Biomed. Appl., 106**, 117,1991.
12. Mahrous M.S. and Abdel-Khalek M.M. **Analitycal Letters, 25**, 1491, Aug., 1992.
13. Dietrich P. and Buechele B. **Pharmazie, 47**, 868,1992.
14. Ricardi A. and Serridei T. **J. Chromatogr. Biomed. Appl., 89**, 302, 1989.
15. Tonelli D. *et al.* **J. Chromatogr. Biomed. Appl.,** 223, 1983.
16. Lavreshin A.N. **Farmatsiya Moscow, 34**, 46, 1985.
17. Okamoto T. *et al.* **J. Nippon Hosp. Pharm. Assoc.**, 268, 1981.
18. Connors K.A. *et al.* Chemical stability of pharmaceutical. A Hand book for Pharmacists. 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 468-472,1986.