



Universidad Nacional Autónoma de México.  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Laboratorio de Investigación Farmacéutica.



Nombre del alumno: Daniel Ruiz Alonso.

Número de cuenta: 107006776.

Nombre del proyecto:

Evidencia documental para la generación de un protocolo de estudios de  
estabilidad en uso. Caso: Metotrexato.

Director: MASS Cynthia Espinosa Contreras.

Asesor (a): Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González.

Modalidad de titulación: Tesis experimental.

Grado académico a obtener: Químico Farmacéutico Biólogo.

Lugar y año de presentación de la tesis: CDMX, Diciembre 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice.

1. Agradecimientos .....	5
2. Introducción.....	6
3. Marco teórico.....	7
3.1 Estabilidad.....	7
3.2 Estudios de estabilidad.....	7
3.2.1 Estabilidad a largo plazo .....	7
3.2.2 Estabilidad intermedia.....	8
3.2.3 Estabilidad acelerada .....	8
3.2.4 Estabilidad en uso .....	8
3.3 Atributos de estabilidad .....	9
3.3.1 Físicos .....	10
3.3.2 Químicos .....	10
3.3.3 Microbiológicos.....	10
3.3.4 Biológicos.....	10
3.4 Criterios básicos para niveles aceptables de estabilidad.....	10
3.5 Métodos para determinar la estabilidad.....	11
3.5.1 Método de determinación de la estabilidad en tiempo real.....	11
3.5.2 Método de determinación de estabilidad de carácter acelerado .....	11
3.5.3 Método de determinación de estabilidad de muestras retenidas .....	12
3.5.4 Método de determinación de estabilidad por temperatura cíclica .....	12
3.6 Método indicativo de estabilidad .....	12
3.7 Normatividad en México sobre la estabilidad.....	13
3.7.1 Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015 .....	13
3.7.2 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.....	13
3.7.3 Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015 .....	14
3.7.4 Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013.....	14
3.8 Normativa internacional sobre la estabilidad.....	14
3.8.1 ICH Q1A: Pruebas de estabilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos.....	14

3.8.2 ICH Q1B: Pruebas de fotoestabilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos.....	14
3.8.3 ICH Q2B Validación de procedimientos analíticos: Metodología .....	15
3.8.4 ICH Q3A Impurezas en nuevas sustancias farmacológicas.....	15
3.8.5 ICH Q3B Impurezas en nuevos productos .....	15
3.8.6 ICH M4Q (R1) El documento técnico común para el registro de productos farmacéuticos para uso humano .....	15
3.8.7 Pautas de la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) .....	15
3.8.8 Pautas de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) .....	16
3.8.9 USP (Farmacopea de los Estados Unidos): Validación de Procedimientos Compensiales .....	16
3.8.10 Farmacopea japonesa .....	16
3.8.11 Pautas de ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Brasil) .....	16
3.9 Registro de un medicamento .....	16
4. Planteamiento del problema .....	18
5. Objetivo.....	18
6. Hipótesis.....	18
7. Metodología.....	19
8. Diagrama de flujo.....	20
9. Resultados.....	21
9.1 Recopilación de información.....	21
9.1.1 Factores que influyen en la estabilidad el producto farmacéutico .....	21
9.1.2 Protocolo de estabilidad.....	29
9.1.3 Generación de protocolo.....	29
9.1.4 Pruebas indicativas de estabilidad para las soluciones.....	30
9.1.5 Etiquetado e ingreso de muestras a las cámaras de estabilidad .....	30
9.1.6 Retiro de las muestras de las cámaras de estabilidad .....	31
9.1.7 Registro de resultados de análisis .....	32

9.1.8 Revisión de resultados .....	32
9.1.9 Transferencia de resultados .....	33
9.2 Protocolo de estabilidad generado .....	35
9.3 Análisis de los Métodos indicativos de estabilidad (SIM: Stability indicating method).....	39
10. Análisis de resultados.....	41
11. Conclusión .....	45
12. Bibliografía .....	46

## 1. AGRADECIMIENTOS

Terminar este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo de mi director, la maestra Cynthia Espinosa Contreras y mi asesor, la doctora Elizabeth Guadalupe Sánchez González, quienes con mucha paciencia encausaron mi trabajo con sus conocimientos, con el firme propósito de conseguir terminado este proyecto, además, doy muchas gracias por permitirme continuar con la tesis y laborar al mismo tiempo. Doy gracias al doctor Vicente Jesús Hernández Abad, por darme la oportunidad de estar en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica, compartir sus consejos y conocimientos como profesor. Al químico José Ignacio Vázquez Olvera, por su tiempo y asistencia, así como compartir sus conocimientos, lo aprecio mucho. Doy gracias por su apoyo y guía de la química Rocío Ramírez Hernández para este proyecto.

Doy gracias a mi madre, por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, por su sacrificio desde incluso antes de mi nacimiento, por su amor, por cada consejo, palabra y valores, que han sido los que me han guiado durante mi vida. Doy gracias a mi padre por su apoyo y sacrificio, porque a pesar de su ausencia física durante largos ratos, jamás la sentí, solo recuerdo su fe, su generosidad y su incansable ayuda en todo momento. Ustedes dos son por quienes creo fielmente en la antigua frase “no pidas una carga más ligera, sino unos brazos más fuertes”, a ustedes les he dedicado y seguiré dedicando cada uno de mis triunfos. Les pido perdón por quizás no ser el mejor hijo; a mi papa, por hacerte perder tu partido de Baseball y casi hacerte que tomes un vuelo desde tan lejos a buscarme y reportarme con las autoridades por no contestar múltiples llamadas y mensajes después de un buen tiempo y a mi mamá por haberte confrontado a tal grado de haberte hecho llorar.

Doy gracias a mi hermano porque, a pesar de ser menor que yo, me ha cuidado varias veces, me ha salvado la vida, me ha apoyado y divertido mucho tiempo. A mi novia por ser mi equipo para desde que la conozco, por su cariño y su coraje para no abandonarme, ni en mis peores momentos. Al resto de mi familia por todo su apoyo, cuando ni siquiera lo solicito y a Gustavo Blancas, a quien conozco desde preparatoria, a quien le enseñe muchos de mis conocimientos, pero me lo devolvió al final y quien se volvió mi mejor amigo.

En fin, gracias a todos ustedes. Por último, diré aquella vieja frase: “Quien da no debe acordarse, pero quien recibe no debe olvidar nunca”, simplemente, jamás olvidare todo lo que me han dado.

## 2. INTRODUCCIÓN

La calidad de los medicamentos a lo largo del tiempo de su uso, es trascendental dentro de la industria farmacéutica. La calidad dependerá en gran medida de las propiedades del mismo medicamento, así como de su sistema de protección y las precauciones que se tengan durante su distribución y almacenamiento. La legislación mexicana se enfoca de manera general en asegurar que éstos cumplan su función a lo largo de su tiempo de vida para el cual se encuentran especificados. Sin embargo, existe una cierta discontinuidad cuando corresponde a los medicamentos en uso, quienes poseen un tiempo de degradación menor, con respecto al resto de los medicamentos en almacenamiento y transporte. Adicional a ello, los protocolos de estabilidad, de acuerdo con lo pautado dentro de las normas mexicanas, no satisfacen las necesidades de dichos medicamentos, en cuestión a una degradación no controlada, repercutiendo al final en la incertidumbre del beneficio y seguridad de la salud de los pacientes.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Estabilidad**

La estabilidad puede definirse como la capacidad para la conservación de las propiedades de un producto, durante su periodo de reserva y uso dentro de ciertos límites de confianza. Dicho lo anterior, para un producto farmacéutico, se establece su estabilidad como aquella disposición de una formulación particular dentro de un sistema contenedor/cierre para permanecer dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas y toxicológicas,<sup>1, 2</sup> su importancia radica de manera sustancial posicionándose como un atributo de calidad esencial dado que la estabilidad debe ser correspondida dentro de un carácter de enfoque para que se proporcione una eficiencia en un producto farmacéutico.<sup>3, 4</sup>

#### **3.2 Estudios de Estabilidad**

Los estudios de estabilidad evalúan, para un producto farmacéutico, el efecto de factores ambientales, que incluyen pero no se limitan a, la temperatura, la luz, el oxígeno, la humedad, el dióxido de carbono.<sup>1</sup> así como también, el efecto del tamaño de partícula de un fármaco, el pH del vehículo y contaminación tanto de índole microbiana como de metales traza, etc.<sup>4, 5</sup> Estos estudios dan pauta para la estimación de la vida útil de un producto en cuestión, y a la determinación indirecta de las condiciones de almacenamiento adecuadas e, inclusive, dan una sugerencia para las disposiciones de etiquetado.<sup>1, 6</sup> por lo que es la única manera de asegurar si el medicamento se encuentra dentro de sus criterios de aceptación o no.

Dicho lo anterior, es factible establecer distintos tipos de estudios de estabilidad farmacológica dada su importancia. Estos estudios son básicamente los siguientes: <sup>4</sup>

- Estabilidad a largo plazo.
- Estabilidad intermedia.
- Estabilidad acelerada.
- Estabilidad en uso.

##### **3.2.1 Estabilidad a largo plazo**

Este tipo de estudios se realiza durante largos períodos de tiempo, y toma como referencia factores como la distribución del producto en diferentes regiones geográficas.<sup>7</sup> El objetivo principal de este estudio es determinar la vida útil del medicamento. El período mínimo para este



estudio es de 12 meses y las condiciones generales de temperatura y humedad predispuestas son las siguientes: <sup>4</sup>

- $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \pm 5\% \text{RH}$
- $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\% \text{RH}$

### **3.2.2 Estabilidad intermedia**

Estos estudios toman en consideración que el medicamento se almacenará por un largo plazo a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, sugiere un aumento de la tasa de degradación química o cambios físicos. El período mínimo para este estudio es de 6 meses y las condiciones generales de temperatura y humedad predispuestas son las siguientes: <sup>4</sup>

- $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \pm 5\% \text{RH}$

### **3.2.3 Estabilidad acelerada**

Estos estudios emplean condiciones de almacenamiento excesivas, lo anterior postula un aumento de la tasa de degradación física y química de carácter sustancial y los datos de estos estudios se utilizan para llevar a cabo estudios de estabilidad a largo plazo, es decir, primero se establece el tipo de productos de degradación que se puede generar para posteriormente, con el estudio a largo plazo determinar la vida útil del medicamento. El período mínimo para este estudio es de 3 meses (6 meses para medicamento nuevo) y las condiciones generales de temperatura y humedad predispuestas son las siguientes: <sup>4</sup>

- $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{RH}$

### **3.2.4 Estabilidad en uso**

Estos estudios de estabilidad, se emplean específicamente para medicamentos prescritos para consumo en dosis múltiples, los cuales, debido a la apertura y cierre repetitivos, se degradan más rápido que el resto. Por lo tanto, el propósito de estas pruebas consiste en establecer un período de tiempo durante el cual se puede utilizar un producto de dosis múltiples hasta mantener la calidad dentro de una especificación aceptada, una vez que el contenedor ha sido abierto.<sup>4</sup>

Es esencial que los medicamentos en uso una vez que llegan a los hospitales deben almacenarse adecuadamente, en especial si tienen condiciones especiales, como por ejemplo, aquellos que son sensibles a la luz, y por tanto incluyen pruebas fotosensibles dentro de este tipo de estudios. Sin

embargo, a pesar de que la información de fotosensibilidad se reporta en las características de algunos folletos, no se incluye en la caja de los empaques y además no existe tanta información sobre dichos estudios de estabilidad fotosensible, lo cual puede implicar pérdidas financieras significativas debido a un almacenamiento no adecuado.<sup>8</sup>

#### Ejemplos

Uno de los ejemplos, para los estudios de estabilidad en uso, es con las tabletas de lacidipina, la cual posee una sensibilidad significativa a la luz y a la humedad, dichas tabletas se almacenaron una vez que el contenedor ha sido abierto bajo condiciones ambientales, durante un periodo de 28 días, con una agenda de análisis de cada 7 días, donde se prepararon soluciones estándar de 2 µg/mL y realizando estudios, químicos, físicos y microbiológicos se concluyó que el medicamento es estable 4 semanas posteriores a la apertura de su contenedor.<sup>9</sup>

Por otra parte, a continuación se menciona otro ejemplo pero con el medicamento metotrexato en solución. De acuerdo con la literatura, una solución de metotrexato se diluyó a concentraciones de 0.2 y 20 mg/mL, adicionando a su vez, cloruro de sodio al 0.9% y de manera paralela en otra solución con la misma concentración de metotrexato, 0.5% de dextrosa. Para el efecto del tiempo y las condiciones, ambas sustancias se colocaron a 25°C, 60% de humedad relativa y ausencia de luz, durante un periodo de 28 días, una vez que el contenedor ha sido abierto. Para el análisis se tomó en consideración parámetros visuales, de pH, pérdida de peso y ensayos de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del contenido de metotrexato y caracterización de los productos de degradación, para dicho efecto, se realizaron análisis cada 3, 7, 14, 21 y 28 días. Se concluyó que en cloruro de sodio al 0.9%, el metotrexato a concentraciones de 0.2 y 20 mg / mL, es estable durante 28 días. Sin embargo, en solución de dextrosa al 5%, el metotrexato a una concentración de 20 mg / ml fue estable durante 28 días, mientras que a una concentración de 0.2 mg / ml, fue estable durante solo 3 días.<sup>10</sup>

### 3.3 Atributos de estabilidad

Cabe mencionar que los estudios de estabilidad se realizan de manera planificada siguiendo pautas emitidas por organizaciones, tales como la ICH, la OMS u otras agencias.<sup>1</sup>

Por otra parte, la velocidad a la que se degradan los productos farmacéuticos varía de manera significativa.<sup>3</sup> Lo anterior implica de manera imprescindible la importancia del establecimiento de

una gama de criterios para situar la estabilidad y por lo tanto se afirma que un estudio de estabilidad debe cubrir los siguientes atributos:

### **3.3.1 Físicos**

Implican que la formulación no ha sufrido ningún cambio en su apariencia, propiedades organolépticas y otras propiedades físicas (como puede ser dureza, fragilidad, tamaño de partícula, etc. para casos sólidos). En este tipo de estudios, el objetivo es que la naturaleza de liberación de fármaco (tasa y mecanismo particular) no debe alterarse. Y la importancia dentro de esta sección radica en la seguridad y eficiencia.<sup>11, 12</sup>

### **3.3.2 Químicos**

Implican falta de entidad química incorporada en una formulación. Debido a que es factible que los excipientes, a pesar de su función en la formulación, pueden interactuar entre ellos y los principios activos. Alternativamente, pueden contener impurezas o residuos y en consecuencia, formar productos de degradación, causando descomposiciones del producto farmacéutico.<sup>11, 12</sup> La importancia de esto, radica en la reducción de la efectividad, así como en la degradación, produciendo subproductos potencialmente tóxicos para el paciente.<sup>4</sup>

### **3.3.3 Microbiológicos**

Implican que la formulación no ha sufrido de ningún crecimiento de algún microorganismo. La importancia dentro de esta sección radica en la relación contraproducente que podría generar un producto farmacéutico con una incidencia de dicha índole.<sup>4</sup>

### **3.3.4 Biológicos**

Implica una alteración en aquella actividad producida por aquellos productos biotecnológicos como enzimas, hormonas, etc.<sup>13</sup> debido a la sensibilidad de los productos a factores como cambios de temperatura, luz, contenido iónico.<sup>14</sup>

## **3.4 Criterios básicos para niveles aceptables de estabilidad**

De acuerdo con la regulación nacional, concretada en la NOM-073-SSA1-2015, “Estabilidad de fármacos y medicamentos”, se encuentra establecido señalar una carencia de estabilidad para cuando se presenten cambios significativos en el producto farmacéutico. Dichos cambios

significativos, acontecen para distintas disposiciones en la descripción de la estabilidad acelerada, las cuales son: <sup>15</sup>

- El 5% de variación para la prueba de valoración inicial.
- El no cumplimiento del criterio de aceptación para potencia, en productos biológicos o inmunológicos.
- El no cumplimiento de la prueba de valoración, en vitaminas.
- El 10% de variación con respecto a la valoración inicial para remedios herbolarios con marcadores químicos sin actividad terapéutica.
- Cualquier producto de degradación en el que haya un cambio significativo en su límite de especificación.
- Cambio en los límites de pH establecidos, de acuerdo con la forma farmacéutica.
- Cambio en la especificación de disolución para 12 unidades de dosificación.
- El no cumplimiento de la prueba de apariencia o propiedades físicas.

### **3.5 Métodos para determinar la estabilidad**

Un método empleado para la determinación de la estabilidad es un procedimiento que se realiza en varias etapas del desarrollo de un producto farmacéutico, cuyo objetivo primordial es conceder prudentemente, hacia la garantía de que dicho producto en cuestión se mantendrá dentro de un margen razonable de calidad durante todo el tiempo especificado para su consumo, lo cual incluye el transporte, el almacén y el consumo del mismo. Estos métodos se han clasificado en los siguientes cuatro tipos: <sup>16</sup>

#### **3.5.1 Método de determinación de la estabilidad en tiempo real**

Este método se realiza con una duración prolongada para demostrar que no hay una degradación moderada del producto y proyectando de manera temprana su vida útil.<sup>16</sup>

#### **3.5.2 Método de determinación de estabilidad de carácter acelerado**

Este método se realiza sometiendo un producto a temperaturas superiores a las ambientales y de humedad, luz, agitación, gravedad, pH y empaque. Es imprescindible mencionar que estos análisis requieren de una duración breve, por lo cual la probabilidad de la inestabilidad en el sistema de medición del equipo empleado se reduce en comparación con las pruebas de estabilidad en tiempo real.<sup>16</sup>

### **3.5.3 Método de determinación de estabilidad de muestras retenidas**

Este método consiste en tomar muestras de medicamento que tendrán presencia en el mercado y evalúan los atributos de estabilidad retando al producto no solo en condiciones ideales de almacenamiento, sino también aquellas en el mercado real. En este estudio, se seleccionan muestras de al menos un lote por año, correspondientes a solo 2% a 5% de los lotes comercializados en una etapa posterior y éstas son analizadas en intervalos predeterminados, por ejemplo, si un producto tiene una vida útil de 5 años, es convencional analizar muestras a los 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 y 60 meses.<sup>16</sup>

### **3.5.4 Método de determinación de estabilidad por temperatura cíclica**

Este método establece distintas temperaturas, considerando las temperaturas de almacenamiento recomendadas y aquellas de degradación, las cuales serán intercaladas en distintos intervalos de tiempo (ciclos), que generalmente son 20 con una duración de 24 horas, lo anterior se fundamenta en el conocimiento de las propiedades del producto con la finalidad de imitar las condiciones probables en el almacenamiento durante su tiempo en el mercado.<sup>16</sup>

## **3.6 Método indicativo de estabilidad**

De acuerdo con el documento guía de la FDA, un método indicativo de estabilidad es un procedimiento analítico cuantitativo validado que brinda la facultad para detectar los cambios en las propiedades pertinentes de la sustancia farmacéutica y el producto farmacéutico. Dicho lo anterior, se miden los principios activos sin interferencia de productos de degradación, impurezas del proceso, excipientes u otras impurezas potenciales.<sup>17, 18</sup> Las muestras experimentales producidas en los estudios de degradación forzada, son aquellas que primordialmente demuestran que un método analítico propuesto es “indicativo de estabilidad”.<sup>18, 19</sup> Lo anterior se explica porque la degradación forzada tienen el potencial de formar más productos de degradación que aquellos que se forman durante los estudios de estabilidad, debido al estrés al cual se someten las muestras, y al mismo tiempo es factible disminuir la capacidad de un método para detectar la degradación real de los productos durante un estudio de estabilidad. Por lo tanto, el método se vuelve indicativo de estabilidad, por ser capaz de determinar al principio activo, a pesar de estar en un ambiente, en donde se encuentra la mayor cantidad de productos de degradación, los cuales fueron generados en condiciones de estrés de la degradación forzada y que pueden

disminuir la detección del principio activo. Vale la pena puntualizar que las directrices de la ICH no ofrecen una orientación de qué tanta degradación se requiere en los estudios de degradación forzada.<sup>20</sup>

### **3.7 Normatividad en México sobre la estabilidad**

En la República Mexicana, se han establecido un conjunto de documentos que competen la regulación de la estabilidad en aquellos fármacos, medicamentos, así como también aquellos productos denominados remedios herbolarios, los cuales son comercializados y estudiados dentro del territorio nacional, lo anterior con la finalidad de designar su periodo de vida útil. Para efecto de lo anterior, se mencionaran aquellos de carácter oficial que estipulan el marco regulatorio en materia de estabilidad farmacéutica:<sup>21</sup>

El artículo 233 de la Ley General de Salud, menciona explícitamente que “Quedan prohibidos la venta y suministro de medicamentos con fecha de caducidad vencida.”, dicho artículo implica que es imprescindible mantener dentro del territorio nacional, medicamentos que se consideren aptos para su consumo, y por tanto su importancia es tal, que se requiere el dar seguimiento a incidentes de carácter relacionado.<sup>21</sup>

#### **3.7.1 Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015**

La Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios, es el escrito de mayor peso en México (en la materia), cuyo objetivo de carácter general indicado es “establecer las especificaciones y los requisitos de los estudios de estabilidad, su diseño y ejecución, que deben de efectuarse a los fármacos, medicamentos, así como a los remedios herbolarios para uso humano, que se comercialicen en territorio nacional, así como aquellos medicamentos con fines de investigación”, para fines del presente proyecto, se toma en consideración la sección referente a estabilidad en uso que implica la generación de un protocolo de estabilidad para el medicamento.<sup>15</sup>

#### **3.7.2 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**

Sin embargo, pese a que la legislación farmacéutica en materia de estabilidad posee una norma a la que legalmente le compete dicha regulación, es factible encontrar algunos fragmentos que de igual manera especifican una referencia al tema en cuestión, como lo es la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 11ª edición, la cual en la sección de “Estudios de Estabilidad”,

dentro de otros elementos, proporciona una definición y el objetivo de los estudios de estabilidad, hace referencia a la NOM vigente referente a la materia, así como también consideraciones específicas regulatorias y del análisis de los resultados en estabilidad de medicamentos biotecnológicos.<sup>22</sup>

### **3.7.3 Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015**

Por otra parte, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, en su sección 16, hace referencia a las “buenas prácticas de almacenamiento y distribución”, las cuales, incumben a la estabilidad de manera indirecta, dado que son indispensables para garantizar la vida útil de los medicamentos.<sup>23</sup>

### **3.7.4 Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013**

Ahora bien, el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013, Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones, postula su sección exclusiva sobre estabilidad en los puntos “5.4.2.1.5, 5.4.2.1.6, 5.4.2.2.12, 5.4.2.2.13, 5.4.2.2.14, 5.4.2.2.15 y 5.4.2.2.17” con la finalidad de que sea autorizado un medicamento en territorio nacional. No obstante, a pesar de la importancia a la cual hace referencia, se trata de un proyecto.<sup>24</sup>

## **3.8 Normativa internacional sobre la estabilidad**

El Comité Internacional para la Armonización (ICH) de los Requisitos Técnicos para el Registro de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano ha establecido por su parte, un conjunto de directrices en materia de estabilidad, las cuales han sido trasladadas a nivel mundial.<sup>10, 17, 25, 26</sup>

### **3.8.1 ICH Q1A: Pruebas de estabilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos**

En la sección de pruebas de estrés, se expresa las condiciones que se recomiendan para estudios de degradación forzada, como de temperatura (superior a la prueba acelerada > 50 ° C), de humedad (75% de humedad relativa), oxidación y fotólisis. Esta sección establece considerar para dicho efecto, un método indicativo de estabilidad o SIM por sus siglas en inglés (Stability Indicating Method).<sup>8, 27</sup>

### **3.8.2 ICH Q1B: Pruebas de fotoestabilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos**

Expone los enfoques recomendados con la finalidad de la evaluación de la fotoestabilidad de

sustancias y productos farmacéuticos, durante su etapa de desarrollo. Sin embargo, no se establecen los niveles de exposición y también es factible que algunos de los productos de degradación originalmente planteados no se produzcan durante estos estudios, en cuyo caso, ya no es necesario su seguimiento.<sup>8, 27, 28</sup>

### **3.8.3 ICH Q2B Validación de procedimientos analíticos: Metodología**

El documento brinda información referente a la validación para diferentes protocolos analíticos, en donde la especificidad es un factor imprescindible.<sup>8, 27, 20</sup>

### **3.8.4 ICH Q3A Impurezas en nuevas sustancias farmacológicas**

Proporciona información de fármacos incluyendo aspectos como la identificación, los tipos y especificación de impurezas, los protocolos analíticos y la generación de informes, útil para garantizar la seguridad en estudios clínicos.<sup>27, 20</sup>

### **3.8.5 ICH Q3B Impurezas en nuevos productos**

En dicho documento, se establece información relacionada a los procedimientos analíticos que validan los productos de degradación en diversas condiciones de estrés.<sup>27, 20</sup>

### **3.8.6 ICH M4Q (R1) El documento técnico común para el registro de productos farmacéuticos para uso humano**

En el módulo 3: “Calidad”, se estipula la información sobre los tipos de estudios de estabilidad a realizar, los procedimientos y los resultados de los mismos, proporcionando las condiciones para el almacenamiento, la vida útil del almacenamiento y la fecha probable de reevaluación.

Por otra parte, existen más documentos de información legislativa relacionados en materia de estabilidad, aparte de las directrices de la ICH, algunos de cuales se menciona a continuación:<sup>27</sup>

### **3.8.7 Pautas de la EMA (Agencia Europea de Medicamentos)**

Es una guía que cubre los datos de los procedimientos utilizados en aquellos estudios de estabilidad realizados a productos farmacéuticos. La Sección 2.1.2 explica sobre las pruebas de estabilidad para API y formas de dosificación, además de contener los datos de fecha de reanálisis y fecha de caducidad de las sustancias.<sup>27</sup>



### **3.8.8 Pautas de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos)**

La FDA proporciona pautas para el análisis de la fotoestabilidad de nuevas moléculas de fármacos y sus productos (Q1B). Estas directrices ayudan a desarrollar SIM y también resume el proceso de validación que, a su vez, es de ayuda para los estudios de confirmación. Las condiciones de estrés utilizadas para los estudios de degradación forzada son pH, temperatura y oxígeno.<sup>25, 27, 28, 29</sup>

### **3.8.9 USP (Farmacopea de los Estados Unidos): Validación de Procedimientos Compendiales**

De acuerdo con estas pautas, entre otras que establece, si no se dispone de estándares de degradación o contaminantes, la especificidad puede estimarse comparando los datos con los resultados obtenidos de los analitos (que contienen contaminantes o productos degradados) a partir de un procedimiento alternativo en las mismas condiciones aceleradas.<sup>27</sup>

### **3.8.10 Farmacopea japonesa**

Dentro de la misma, se establece que el método propuesto de estabilidad debe ser específico, el cual debe permitir identificar y en adición, debe estimar la cantidad de analito presente en la muestra. Para estudios comparativos, si las impurezas estándar de referencia no están disponibles, las muestras se expondrán a condiciones de estrés y se podrán utilizar productos de degradación para estudios adicionales.<sup>27</sup>

### **3.8.11 Pautas de ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Brasil)**

El organismo de ANVISA fue desarrollado para promover la salud pública y proteger de los riesgos causados por la producción y el uso de diversos productos farmacéuticos, con la finalidad de mejorar la calidad de vida de las personas. Las pautas mencionan los requisitos de estabilidad y degradación forzada.<sup>27</sup>

## **3.9 Registro de un Medicamento**

En México, la COFEPRIS, es la organización que pone a disposición el registro de un medicamento, para lo cual, es imprescindible el factor del tipo de medicamento en cuestión alopático, vacuna, herbolarios, homeopáticos, vitamínicos, biotecnológico, así como también, el factor de la procedencia del medicamento en cuestión. Sin embargo, algunas de las cuestiones generales requeridas son:<sup>30</sup>

1. Autorizaciones, certificados y visitas

2. Pago de derechos, en términos de la Ley Federal de Derechos.
3. Información científica y técnica que ratifique: <sup>30</sup>
  - \*Estabilidad del producto terminado de acuerdo a la NOM correspondiente.
  - \*Identidad y pureza de sus componentes, como materia prima, producto terminado y material de envase.
  - \*Para genéricos, pruebas de intercambiabilidad; para biotecnológicos, pruebas de biocomparabilidad.
4. Titularidad de patente, sustancia, o ingrediente activo; lo anterior, inscrito en el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
5. Etiqueta del envase primario y secundario.
6. Identificación de origen y expediente con certificado de Buenas Prácticas de Fabricación.
7. Identificación de la licencia sanitaria y del aviso del responsable sanitario. <sup>30</sup>

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existe una gran variedad de marcas comerciales de solución de metotrexato en el mercado, y ellas pueden o no contener sustancias adicionales en sus presentaciones, las cuales podrían modificar el tiempo de vida útil del medicamento en cuestión. Aunado a lo anterior, a pesar de la información disponible sobre el producto farmacéutico en cuestión, no se encuentra disponible actualmente un protocolo documentado que permita dar pauta con respecto a la estabilidad en uso, la cual es imprescindible mientras se encuentra en uso en hospitales, primordialmente en lo que concierne al efecto de la luz, la cual es preciso enfatizar que se encuentra presente en todo momento en dichos lugares.

Estableciendo lo anterior, en el presente trabajo se genera un protocolo de estabilidad en uso de metotrexato para solución inyectable, tomando en consideración la literatura y la normatividad vigente.

#### **5. OBJETIVO**

Diseño de un protocolo para estudios de estabilidad en uso de metotrexato en solución de uso hospitalario.

#### **6. HIPÓTESIS**

Tomando en consideración evidencia documental del metotrexato en materia científica y normativa, en consecuencia, se establece un protocolo de estabilidad para su uso hospitalario en solución inyectable.

## 7. METODOLOGÍA

### 1. Revisión bibliográfica.

Se realizó una búsqueda en internet utilizando buscadores normales como Google y Yahoo sobre las características y factores que influyen en la estabilidad del metotrexato como fármaco y una vez como producto farmacéutico, así como sus condiciones de los estudios de estabilidad hasta el momento reportados y métodos analíticos indicativos de estabilidad que conciernen al producto farmacéutico. Algunas de las ecuaciones más empleadas fueron “Forced AND Stability”, “RTU OR Ready AND to AND Use AND drugs”, “Photostability AND drugs” y “Methotrexate AND Stability”. Por otra parte, se conjuntó la información obtenida de las características con respecto a la documentación del protocolo de estabilidad, de acuerdo a la normatividad existente.

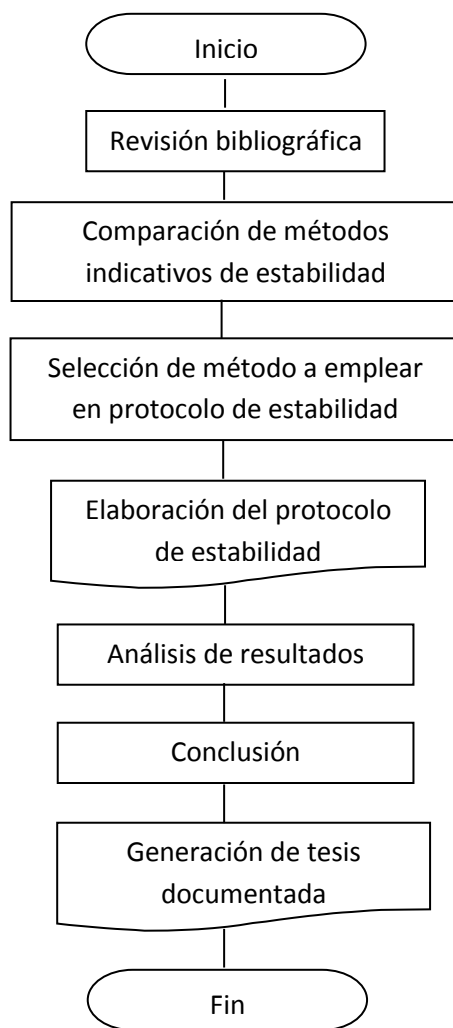
### 2. Comparación de los métodos indicativos de estabilidad.

Previamente se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los métodos indicativos de estabilidad. Una vez realizada la búsqueda y obtenidos dichos métodos, se realizó una comparación analizando el procedimiento con respecto a lo buscado en cuanto a las necesidades del protocolo.

### 3. Desarrollo del protocolo de validación del método indicativo de estabilidad.

El protocolo de estabilidad se desarrolló consultando la normatividad actual de los Estados Unidos Mexicanos, considerando las características de la NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. En la cual menciona los puntos a desglosar y para dicho efecto, se englobaron las características previamente descritas con respecto al metotrexato, ya en su producto farmacéutico.

## 8. DIAGRAMA DE FLUJO



## 9. RESULTADOS

### 9.1 Recopilación de información

Se realizó una recopilación de información debido a que es fundamental para sustentar el protocolo de estabilidad generado, así como también para dar cumplimiento a una serie de requisitos que la legislación mexicana actual demanda en materia de estabilidad para el protocolo en cuestión.

#### 9.1.1 Factores que influyen en la estabilidad el producto farmacéutico

El producto farmacéutico dependerá de 2 clases de factores para que mantenga dentro de un margen de calidad aceptable, en consecuencia se consideran aquellos relacionados con el producto que dependen de manera esencial del mismo fármaco junto con sus excipientes y el envase, con el cual se encontrará en contacto de manera directa. Y por otra parte, también se suman los factores ambientales, que estarán de manera externa al producto, pero que afectan a las propiedades del producto.<sup>3, 31, 32, 33</sup>

\*Factores ambientales:

-Luz

Se establece que el metotrexato presenta una degradación superior con la exposición a la luz con respecto al resto de los factores ambientales. Dicho efecto, implica la producción de 2 productos principales, los cuales son 2,4-diamino-6-pteridinacarbaldhído, así como también ácido 2,4-diamino-6-pteridinacarbóxico y ácido p-aminobenzoilglutámico. Lo anterior, toma efecto por el seguimiento de una reacción de orden cero.<sup>31</sup> Es necesario señalar que la literatura también apunta a una posibilidad de que el ion bicarbonato catalice dicha transformación del metotrexato.<sup>3, 31, 32, 33</sup>

-Choques en los envases del producto

Pese a que se no se trata de un sólido como una tableta, en donde un choque podría proporcionar condiciones que pongan en riesgo la dureza y friabilidad del producto; podría ser factible que ocurra desprendimiento de vidrio de manera interna y sea ahora parte del producto farmacéutico, ó finalmente, podría romperse por completo el envase, derramando el producto y dejándolo de esta manera, inservible en absoluto.<sup>13</sup>

#### -Variaciones de temperatura

Con respecto a la temperatura, se ha encontrado que el metotrexato es muy estable, siempre y cuando se conserve a una temperatura ambiente o inferior dentro de su contenedor y protegido de la luz. Sin embargo, de acuerdo con la literatura, el metotrexato se descompone con temperaturas superiores a las ambientales, produciendo ácido N-metilpteroglutámico.<sup>34</sup>

Lo anterior es factible ser facilitado, si dentro del transporte o almacenamiento, el metotrexato permanece un largo periodo fuera de su almacén, a una temperatura ambiente.

#### -Variaciones de presión

Un cambio en la presión, es capaz de afectar al sistema de cierre del producto farmacéutico, así como también podría alterar al mismo producto (dependiendo de sus propiedades). Aunado a lo anterior, se da fe que en este punto, la distancia de transporte es trascendental, ya que al seleccionar la vía aérea, se implica un cambio de presiones durante el vuelo y en consecuencia, provocar dicho estropeo.<sup>13</sup>

#### -Variaciones de pH

El metotrexato actúa como un ácido débil (ácido carboxílico del ácido glutámico), su base débil es la porción restante de aminopteridina.<sup>35</sup> Lo anterior implica resultados no satisfactorios en un pH alcalino; por encima del pH 8, ocurre una hidrólisis alcalina del grupo 4-amino de la amidina.

Para el caso opuesto, por debajo del pH 6, se obtienen productos, resultado de una hidrólisis ácida. Y muy específicamente, el metotrexato en soluciones acuosas fuertemente ácidas produce ácido glutámico y ácido 4-amino-4-desoxi-10-metilpteroico.<sup>1</sup> Lo anterior implica un pH de máxima estabilidad entre 6 y 8.<sup>3</sup>

#### \*Factores relacionados con el producto

En las soluciones parenterales, la estabilidad física incluye la interacción con un envase y los cambios en la composición química que dan lugar a cambios en la identidad, la pureza y la potencia del producto al exponerse a diversas condiciones.<sup>36, 37</sup>

-Propiedades físicas y químicas del fármaco y excipientes:

	Metotrexato	Cloruro de sodio	Ácido clorhídrico	Hidróxido de sodio
<b>Peso Molecular (g/mol)</b>	454.44	58.44	36.46	39.997
<b>Aspecto</b>	Polvo cristalino, color amarillo oscuro con olor perceptible y característico.	Sólido cristalino, color blanco inodoro.	Líquido transparente e incoloro.	Sólido blanco.
<b>Solubilidad</b>	Prácticamente soluble en agua y alcohol.	36g/100 mL en agua. Soluble en glicerol, muy poco soluble en etanol.	Soluble en agua.	1 g en 0.9 mL de agua. Soluble en alcoholes y glicerol. Insoluble en acetona y éter.
<b>Estabilidad</b>	Higroscópico y sensible a la luz.	Higroscópico.	Sensible a la luz.	Higroscópico.

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del fármaco y sus excipientes. Diseño de autor (Microsoft® Office Word 2007 para Windows®).

-Influencia del excipiente / carácter higroscópico

El fármaco presenta problemas de higroscopicidad, y aparte de ser ligeramente soluble en agua, además del resto de sus componentes sólidos el cloruro de sodio y el hidróxido de sodio, presentan la característica de ser higroscópicos, esto puede presentar problemas de estabilidad del principio activo, así como una sensibilidad a la humedad ambiental dado que es factible que el metotrexato quede disuelto en una solución saturada del excipiente.<sup>13</sup>

Por otra parte, se ha encontrado que la formulación parenteral del metotrexato, presenta una estabilidad fisicoquímica de 24 meses dentro de sus viales cerrados, y desde un punto de vista microbiológico, posterior a su apertura, no debería conservarse a una temperatura superior a los 8 °C por más de 24 horas. Sin embargo, si no se planea usar la solución inmediatamente, se ha



demostrado una estabilidad de hasta 30 días desde su apertura, protegido de la luz y a 2-8°C para cuando se prepara bajo condiciones asépticas, soluciones con 0,1 mg/mL de metotrexato en 9 mg/mL de cloruro de sodio (0,9%) o en 50 mg/mL de glucosa (5%).<sup>38</sup>

#### -Naturaleza química

El metotrexato (MTX) se conoce químicamente como ácido N- [4 - [[(2,4 - diamino - 6 - pteridinil) metil] metilamino] benzoil] - L - glutámico. Es un análogo de ácido fólico conocido inicialmente como ametofterina,<sup>39, 40</sup> el cual, presente en el organismo presenta afinidad a la enzima dihidrofolato reductasa,<sup>41</sup> brindando, en consecuencia, propiedades antiproliferativas de células epiteliales<sup>40</sup>.

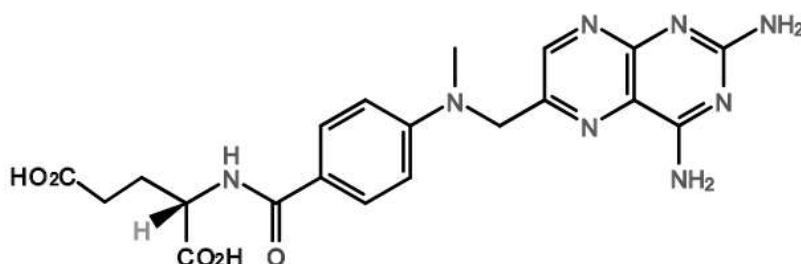


Figura 1. Estructura del metotrexato. Diseño del autor (ChemSketch ® 11.0 para Windows ®)

#### -Características del fármaco

El propio metotrexato, presenta problemas cuando se encuentra frente a ácidos y oxidantes fuertes. En combinación con hidrocloreuro de clorpromazina, droperidol, idarubicina, hidrocloreuro de metoclopramida, soluciones de heparina, fosfato sódico de prednisolona e hidrocloreuro de prometazina se ha observado la aparición de precipitados o turbidez. Lo anterior implica, posibles interacciones con sus excipientes a emplearse.<sup>38</sup> Ahora bien, con respecto a su estabilidad, la literatura establece al metotrexato funcional con una conservación de 3 años en condiciones de temperatura de -20°C. En adición, para su almacenamiento, se debe mantener protegido contra la luz. Presenta valores de pKa de 3.8, 4.8 y 5.6 (a una temperatura no especificada). No es estable en soluciones básicas, diluida en un medio NaOH 1M y después en solución salina permanece estable por 1 semana a 4-8 °C o 1 mes a -20°C.<sup>43</sup>

#### -Forma farmacéutica y composición

El metotrexato, se formula en tabletas, pero habitualmente se presenta en una fórmula parenteral, lo cual es benéfico en cuanto a evitar que el mismo fármaco de manera sólida llegue a degradarse en sí por su higroscopicidad, sin embargo, no se descarta la posibilidad de afectación por la adición de excipientes de igual manera higroscópicos, así como también se debe tener la precaución del control con el pH, la fuerza iónica que implica que el agregar sales inertes incrementa la estabilidad, disminuyendo su velocidad de degradación de manera significativa. Dicho lo anterior, es factible aclarar que los excipientes contenidos de manera general son: <sup>44</sup>

- Cloruro de sodio.
- Hidróxido de sodio (puede añadirse o no, por efectos de ajuste del pH).
- Ácido clorhídrico (puede añadirse o no, por efectos de ajuste del pH).
- Agua para preparaciones inyectables.

#### -Interacción fármaco-Agua

Su interacción con el agua es prácticamente nula, como se mencionó anteriormente en sus propiedades, incluso se considera prácticamente insoluble en agua, además de que para que ocurra una degradación, su pH del agua debe ser inferior a 6, ó superior a 8. Sin embargo, se desprende la idea de que el envase debe ser lo suficientemente impermeable, así como su sistema de cierre y de preferencia que éste se encuentre sellado con la finalidad de evitar el ingreso de agua en forma de humedad y que está afecte la concentración del producto farmacéutico siendo que el contenedor, de manera general es de pequeño volumen. <sup>44</sup>

#### -Interacción fármaco-excipiente

Es imprescindible mencionar que las interacciones de fármaco-excipiente pueden afectar la estabilidad. Ahora bien, con respecto al cloruro de sodio, existe una ausencia de interacción con el metotrexato. Sin embargo, la adición de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en su defecto, se efectúa con la finalidad de ajustar el pH de la solución parenteral, debido a la degradación que ocurre del metotrexato cuando se encuentra con este tipo de condiciones, lo que implica un cuidado particular con el ajuste del pH. <sup>44</sup>

#### -Interacción fármaco-envase

Se debe considerar el ambiente con el cual se encuentra en contacto directo el producto farmacéutico, debido a que la estabilidad del metotrexato depende del disolvente, del pH y de su concentración; por lo tanto existe una posible adsorción de los componentes de la solución en el vidrio del contenedor. Aunado a lo anterior, es factible que el fenómeno sea facilitado con la colisión de los mismos envases.<sup>44</sup>

-Proceso de fabricación / Condiciones ambientales y procesos tecnológicos

Para el método de manufactura, a manera resumida se establece una condensación del 2,3-dibromopropionaldehído con 2,4,5,6-tetraminopirimidina con la finalidad de producir ácido 6-bromometil-2,4-diaminopteridina y de manera terminal una condensación adicional del mismo con ácido N-(para- (metilamino) benzoil) glutámico para producir metotrexato.<sup>45</sup>

El proceso de la producción de metotrexato, establece una precipitación de sus partículas, las cuales pueden contener impurezas y estas, en un final, pueden llegar a producir una degradación del mismo una vez que se encuentre en su forma farmacéutica.<sup>46</sup>

Ahora bien, considerando que el metotrexato presenta higroscopicidad, es fundamental la eliminación del agua de las moléculas del fármaco para producir una mayor solubilidad, antes de su elaboración como medicamento parenteral. Lo anterior implica un proceso de secado, el cual puede llegar a destruir de manera considerable la estructura interna de los sólidos; por lo cual se podría afectar al fármaco al dejarlo con una predisposición a degradarse. Por otra parte, dentro de las características de disolución, los sólidos son más solubles cuando presentan partículas más pequeñas, sin embargo, el proceso de molienda llega a presentar fenómenos de fricción, los cuales pueden originar de igual manera una destrucción de la estructura molecular del fármaco.<sup>46</sup>

Aunado a lo anterior, es esencial mantener el control de todas las condiciones de fabricación, las cuales, al ser deficientes, pueden incluso generar la contaminación del producto. Actualmente, se ha presentado una problemática en el país, debido a inconsistencias en la manufactura del metotrexato. El 5 Junio del 2019, se declaró el cierre de la Central de Mezcla Productos Hospitalarios (filial de Grupo Pisa), por su relación con el brote de una bacteria de bacilo no patógena, en un lote de 17 000 ampollitas, lo que afectó a 69 pacientes en Jalisco en mayo del 2019.<sup>47</sup> Para lo cual, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), acusó al grupo Pisa de generar una situación de desabasto de metotrexato inducida. Posterior a

ello, examinó la planta, y encontró defectos en el proceso de elaboración del medicamento, lo que llevó a la contaminación de dicho medicamento. Por tanto, el titular de la COFEPRIS (José Alonso Novelo Baeza) ordenó que se revisaran las 17 plantas del grupo Pisa y posteriormente clausuró 7 de ellas. Para finales de Septiembre del 2019, se señala el análisis del lote de 38 mil 200 unidades (29 mil 230 de 50 miligramos y 8 mil 970 de 500 miligramos), para garantizar la seguridad y eficacia del medicamento. Mientras tanto el gobierno federal acordó comprar el metotrexato de manera importada, proveniente de China, India y Francia.<sup>48</sup>

#### -Efecto de la esterilización

La esterilización ocupa un papel fundamental en un producto farmacéutico de carácter parenteral, sin embargo, es factible una posibilidad en la modificación de las características del producto, como lo puede ser el pH, o la aceleración de una hidrólisis cuando se esteriliza por medio del calor; aunado a lo anterior, el metotrexato genera productos de degradación por hidrólisis cuando se encuentra fuera de sus parámetros de pH de máxima estabilidad (6-8). Por otra parte la irradiación como método de esterilización puede llegar a modificar la estructura del principio activo y en consecuencia, dejar al principio activo sin su función terapéutica, ó propiciar otro tipo completamente diferente de productos de degradación no estudiados en la pre-formulación. Y, finalmente, uno de los componentes del producto farmacéutico es el agua, y esta requiere de una esterilización para su uso debido a que se debe evitar un ingreso de microorganismos o materia orgánica proveniente de los tanques de almacenamiento del agua.<sup>13</sup>

#### -Naturaleza del contenedor o envase

El envase contendrá al producto farmacéutico y por lo cual, es de vital importancia, que tenga la capacidad de evitar pérdida del producto al exterior durante su periodo de almacenamiento y distribución, así como también para protegerlo del ambiente exterior.

Para formulaciones parenterales de metotrexato se sugieren viales para su empleo, los cuales son de vidrio tipo I incoloros y estériles, y estos a su vez están constituidos de borosilicatos, un material que es característico de una buena resistencia al daño alcalino y a saltos térmicos dado su bajo coeficiente de dilatación térmica. Este tipo de vidrio es ideal para soluciones e inyectables. El contenedor presenta en adición, su respectivo cierre el cual es descrito en la posterior sección “sistema de cierre del recipiente”.<sup>13, 38</sup>

#### -Tipos de envase

Existen principalmente 3 tipos de envase: vidrio, metal y plástico, sin embargo para formulaciones parenterales, se sugiere el empleo de vidrio dado su resistencia por un daño alcalino el cual puede llegar a ocurrir en envases metálicos, así como su resistencia a saltos térmicos el cual no sería tan soportado por los envases de plástico y que a su vez podrían ingresar componentes de su fabricación a la solución parenteral, como lo son agentes plastificantes, lubricantes, moldeantes y afectar al mismo producto farmacéutico. Además, también es importante, el volumen permitido por los envases, los cuales son mencionados a continuación:<sup>13, 38</sup>

- Vial de 2 mL (25 mg de metotrexato).
- Vial de 10 mL (250 mg de metotrexato).
- Vial de 20 mL (500 mg de metotrexato).
- Vial de 40 mL (1000 mg de metotrexato).

Cabe puntualizar que de los mencionados, puede que solamente estén comercializados algunos tamaños de envases. En la propuesta del protocolo se emplea el de capacidad de 20 mL.<sup>38</sup>

#### -Sistema de cierre del recipiente

En este punto, interesa el control del contenido de humedad, de oxígeno de microorganismos y de otros factores que pueden propiciar la degradación del producto farmacéutico. Y en este sentido, es de carácter significativo, que no solo el recipiente, sino también el cierre, quien debe impedir la entrada o salida de algún ente que ponga en riesgo la utilidad del producto farmacéutico. Existen una amplia cantidad de materiales como son la goma, el corcho, el plástico, etc. Algunos inclusive, añaden un sello adicional que apoya la finalidad del sistema de cierre. Los viales que se emplean para el metotrexato en solución, son cerrados con tapón de goma de bromobutilo tipo I, el cual es inodoro e impermeable, incluso para el aire. Estos viales, además de encontrarse cerrados con su tapón de goma, son cerrados con un sello de aluminio y cápsula de polipropileno. Para fines de la elaboración del protocolo, se considera el tapón de goma descrito en el párrafo anterior, el cual cierra al contenedor, pero no se toman en cuenta el sello, ni la capsula, debido a que no son las condiciones presentes para cuando el producto se encuentra en uso.<sup>13, 38</sup>

#### -Proceso de envasado

Dentro del proceso de envasado, debido a que las características de calidad desarrolladas, y manufacturadas, dependen de su conservación, en consecuencia, implica especial atención en

aquellas características que tienen capacidad de afectar al producto farmacéutico como la humedad, el oxígeno, la luz, microorganismos, temperatura, etc. Lo anterior aplica tanto al sistema de cierre y al envase en sí, así como también el área donde se planea envasar.<sup>13</sup>

### **9.1.2 Protocolo de estabilidad**

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios, se le denomina protocolo de estabilidad al diseño del estudio relativo a pruebas y criterios de aceptación, características del lote, manejo de las muestras, condiciones del estudio, métodos analíticos y materiales de envase primario y secundario. Esta propuesta de protocolo se basa en las características principales que pueden llegar a degradar al producto farmacéutico, como la luz y la temperatura, así como también toma en consideración al envase y sistema de cierre que se han especificado a emplear. También es fundamental establecer si el producto farmacéutico es nuevo o no, y también se toma en consideración las características ambientales del lugar en donde se piensa distribuir y comercializar.<sup>15</sup>

### **9.1.3 Generación de protocolo**

El protocolo es el documento que brinda la característica fundamental que prueba la estabilidad, este se genera de acuerdo a la legislación del país en donde se comercializará. En México, se plantean los siguientes puntos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios:<sup>15</sup>

- Nombre del fabricante y fármaco, domicilio.
- Para medicamentos, además, se especifica la forma farmacéutica, presentación y concentración, los remedios herbolarios no necesitan de la especificación de la concentración.
- Tipo, tamaño, número de lote y fecha de fabricación.
- Descripción del sistema contenedor-cierre.
- Condiciones de estudio.
- Tiempos de muestreo y análisis.
- Parámetros de prueba.
- Especificaciones de estabilidad.
- Referencia de los métodos analíticos.
- Cuando sea necesario, justificar, aquellos diseños reducidos de análisis.

- Nombre y firma del responsable sanitario.

La propuesta del protocolo contempla la mayoría de los puntos establecidos por la NOM-073-SSA1-2015, mencionados previamente. Cabe mencionar, que el nombre del fabricante y domicilio, no se incluyen para evitar conflictos de autorización con los dueños de la compañía fabricante del producto farmacéutico. En adición a lo anterior, el tamaño del lote, es un dato no contenido en el empaque y el número de lote de igual manera podría generar conflictos de autorización; por lo cual, tampoco se incluyen en la propuesta del protocolo.

#### **9.1.4 Pruebas Indicativas de estabilidad para las soluciones**

Se especifica a continuación, de manera general, las pruebas a realizar para líquidos parenterales, tomando en consideración la legislación mexicana vigente: <sup>15</sup>

- Apariencia / Descripción / Aspecto.
- Color.
- Olor (Si el producto farmacéutico presenta características aromáticas).
- pH.
- Valoración.
- Contenido de conservadores (para cuando se trata de un producto farmacéutico multidosis).
- Esterilidad (inicial y final).
- Pirógenos o endotoxinas bacterianas (inicial y final).
- Pérdida de peso (para cuando se involucra un envase primario semipermeable).

Dichas pruebas, se encuentran en la sección de parámetros de prueba, de la propuesta del protocolo, indicando la especificación y referencia.

#### **9.1.5 Etiquetado e ingreso de muestras a las cámaras de estabilidad**

Las cámaras de estabilidad deben mantener una temperatura controlada, así como también una humedad relativa específica. Por otra parte antes del análisis inicial del medicamento es el tiempo cero de estabilidad, siempre y cuando no hayan pasado más de 30 días naturales entre el tiempo en que se realizó este análisis y el tiempo de ingreso a las cámaras de estabilidad, si no se cumple

esta condición será necesario analizar nuevamente el medicamento considerando todas las pruebas establecidas en el protocolo de estabilidad.<sup>15</sup>

Ahora bien, el producto farmacéutico en su tiempo cero de estabilidad, se tiene que introducir contenido en su envase primario y de presentarse un envase secundario en su presentación, también debe de ingresar; éstos debe estar etiquetados cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios. Y en conjunto lo anterior, se realiza con la finalidad de simular al producto farmacéutico en condiciones reales de almacenamiento, en materia de dicho aspecto, puesto que el medicamento ya en su uso, se almacena junto con dichos envases. El metotrexato empleado en la propuesta del protocolo, se encuentra en la sección “tipos de envase” y “sistema de cierre del recipiente”, la cual de manera resumida conserva al metotrexato en un vial de vidrio tipo I, cerrado con una tapa de goma de bromobutilo tipo I, con su etiqueta colocada. Lo anterior para simular condiciones de exposición del metotrexato a la luz de las cámaras de estabilidad.<sup>49</sup>

#### 9.1.6 Retiro de las muestras de las cámaras de estabilidad

Como se mencionó en la sección previa, antes de iniciar los estudios de estabilidad, se debe realizar un análisis completo del producto farmacéutico (las pruebas también se encuentran estipuladas previamente). El tiempo de almacenamiento en las cámaras de estabilidad, se debe de dividir estableciendo aquella frecuencia de tiempo en la cual, el producto farmacéutico en cuestión será analizado. Lo anterior es de carácter fundamental, ya que tiene la finalidad de monitorear la degradación, y la NOM-073-SSA1-2015 estipula las siguientes condiciones de estudio, la cuales dan pauta abarcando almacenamiento, distribución y uso del medicamento:<sup>15</sup>

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	40 °C ± 2 °C / 75% ± 5% HR	3 meses	0, 1 y 3 meses
Estabilidad intermedia	30 °C ± 2 °C / 65% ± 5% HR	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo	25 °C ± 2 °C / 60% ± 5% HR o 30°C ± 2 °C / 65% ± 5% HR	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses

Cuadro 2. Condiciones generales de los estudios de estabilidad de acuerdo a la NOM-073-SSA1-2015. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Secretaria de Salud. 2015.



Sin embargo, de lo anterior es imprescindible indicar que dichas condiciones de estudio, junto con su frecuencia, son para casos generales de productos farmacéuticos y en consecuencia, para aquellos medicamentos multidosis y que requieren estabilidad en uso, la normatividad no establece especificaciones de aquellas condiciones de estudio. Sin embargo, se hace referencia a lo indicado en la etiqueta. Para la propuesta de protocolo, se proponen condiciones de estabilidad acelerada, evaluando al metotrexato a una temperatura ambiental, humedad relativa de  $60\% \pm 5\%$  HR y luz blanca. También se estipula el empleo de un mínimo de 2 lotes, los cuales podrán ser al menos 1 lote piloto y 1 debió de estar en estabilidad a largo plazo, de acuerdo a la NOM-073-SSA1-2015.<sup>15</sup>

#### **9.1.7 Registro de resultados de análisis**

Los resultados del estudio, se deben dividir de preferencia de manera tabulada con la finalidad de permitir una comparación de aquellos intervalos de tiempo. Estos se obtienen, gracias a las fórmulas de aquellos métodos que se emplean para su determinación, y en consecuencia, se emplearía a la legislación vigente (como la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos FEUM) o en su defecto la literatura para dicho efecto. En este sentido, es crucial la determinación del método a emplear, ya que los resultados podrían verse ser afectados por completo, dadas las condiciones del mismo o los cálculos empleados. Para la sección de las características físicas, es imprescindible establecer la especificación cualitativa que denote el producto farmacéutico.

Aunado a lo anterior, tomando en consideración a la Organización Panamericana de la Salud, es factible puntualizar las sugerencias que indican para el registro de los resultados de los análisis, para lo cual, se deben indicar los resultados para cada lote y para cada intervalo de tiempo al cual se analizó. Se indica también que los resultados deben estar contenidos en cuadros y gráficos para facilitar su visualización; además de la generación de un formulario en el cual se puedan resumir dichos resultados, dado que estos resultados servirán de base para determinar la estabilidad de un producto dado y, por consiguiente, el tiempo de conservación y las condiciones de almacenamiento que se proponen.<sup>50</sup>

#### **9.1.8 Revisión de resultados**

Una vez que se tienen los resultados, es factible el que cumplan con las especificaciones establecidas, puesto que esto implica el que durante el intervalo establecido, el producto

farmacéutico puede ser empleado para su fin. Para ello, se debe evaluar las características físicas, químicas, biológicas y microbiológicas. Y la normatividad, ya deja en claro el descartar desde un inicio dicho producto o no, si se presenta alguna de las siguientes características: <sup>15</sup>

- El 5% de variación para la prueba de valoración inicial.
- El no cumplimiento del criterio de aceptación para potencia, en productos biológicos o inmunológicos.
- El no cumplimiento de la prueba de valoración, en vitaminas.
- El 10% de variación con respecto a la valoración inicial para remedios herbolarios con marcadores químicos sin actividad terapéutica.
- Cualquier producto de degradación en el que haya un cambio significativo en su límite de especificación.
- Cambio en los límites de pH establecidos, de acuerdo a la forma farmacéutica.
- Cambio en la especificación de disolución para 12 unidades de dosificación.
- El no cumplimiento de la prueba de apariencia o propiedades físicas.


#### **9.1.9 Transferencia de resultados**

Cuando se tiene los resultados listos, con la finalidad de dar a conocer lo obtenido en el estudio de estabilidad tanto para uso interno de la compañía, así como con fines de registro y de uso para las autoridades competentes cuando sea el caso, se prepara finalmente un informe de estabilidad, en donde se consignan las condiciones, los resultados y las conclusiones. Se precisan los siguientes elementos, de acuerdo a la normatividad mexicana: <sup>15</sup>

- Nombre del fabricante del (los) fármaco(s), del medicamento o del remedio herbolario y del sitio donde se realizó el estudio de estabilidad.
- Nombre del fármaco, medicamento o remedio herbolario, forma farmacéutica, presentación y concentración.
- Número(s) y tamaño(s) del (los) lote(s) y fecha(s) de fabricación empleado(s).
- Descripción del sistema contenedor-cierre.
- Datos analíticos tabulados por condición de almacenamiento, con fecha de inicio y fecha del último periodo disponible.
- Cromatogramas, espectrogramas tipo o representativos o evidencia analítica generada durante el análisis inicial de los lotes en estabilidad y del último periodo disponible.

Los datos necesarios para confirmar un tiempo de conservación provisional tienen que presentarse al organismo encargado del registro farmacéutico. Para el caso del metotrexato se ha encontrado un registro de estudios de estabilidad en uso, la cual puntualiza su estabilidad posterior a su apertura inicial del vial, siendo 30 días a una temperatura de almacenamiento de 2°C y 24 horas para condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, lo anterior en condiciones del vial cerrado en la fase de almacenamiento del estudio.<sup>51</sup> Por otra parte, los resultados de los estudios continuos de estabilidad se verifican en el curso de las inspecciones del Programa de Atención Farmacéutica (PAF). Para custodiar la calidad y la inocuidad de los productos, con referencia especial a la degradación, las autoridades sanitarias nacionales deben vigilar la estabilidad y la calidad de las preparaciones presentes en el mercado mediante un programa de seguimiento que comprenda visitas de inspección y pruebas. Una vez que un producto ha sido registrado, se precisan estudios de estabilidad complementarios, en especial, cuando se hacen modificaciones importantes de la formulación, el proceso de fabricación, el envasado o el método de preparación. Los resultados de estos estudios habrán de comunicarse a las autoridades competentes de la reglamentación farmacéutica.<sup>50</sup>

## 9.2 Protocolo de estabilidad generado

	<b>Universidad Nacional Autónoma de México</b> <b>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza</b>			LIF
	Propuesta de protocolo de estabilidad en uso de metotrexato en solución de uso hospitalario			
	Versión 0	Fecha de Revisión 08 de Agosto del 2019	Fecha de emisión 19 de Agosto del 2019	Pág. 1 de 4
<b>Contenido:</b>				
1. Información respecto al producto farmacéutico:				Pág. 2
1.1 Nombre del principio activo.				Pág. 2
1.2 Forma farmacéutica.				Pág. 2
1.3 Presentación.				Pág. 2
1.4 Concentración.				Pág. 2
1.5 Tipo y fecha de fabricación.				Pág. 2
1.6 Descripción del sistema contenedor-cierre.				Pág. 2
2. Estudio de estabilidad				Pág. 2
2.1 Condiciones de estudio.				Pág. 2
2.2 Tiempo total del producto farmacéutico en cámaras de fotoestabilidad.				Pág. 2
2.3 Tiempos de muestreo y análisis.				Pág. 2
2.4 Parámetros de prueba.				Pág. 2
2.5 Especificaciones de estabilidad generales.				Pág. 2
3. Referencia de los métodos analíticos.				Pág. 3
4. Nombre y firma del responsable sanitario.				Pág. 4
Daniel Ruiz Alonso	Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González		MASS Cynthia Espinosa Contreras	
<b>Elaboró</b>	<b>Revisó</b>		<b>Autorizó</b>	



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

Propuesta de protocolo de estabilidad en uso de metotrexato  
en solución de uso hospitalario

LIF

Versión  
0

Fecha de Revisión  
08 de Agosto del 2019

Fecha de emisión  
19 de Agosto del 2019

Pág. 2 de 4

**1. Información respecto al producto farmacéutico.**

1.1 Nombre del principio activo: Metotrexato.

1.2 Forma farmacéutica: Solución inyectable.

1.3 Presentación: Caja con 1 frasco ampula con 20 ml.

1.4 Concentración: 25 mg/ml (500 mg en 20 mL).

1.5 Tipo y fecha de fabricación:

-Tipo: Producción.

-Fecha de fabricación: Junio del 2018.

1.6 Descripción del sistema contenedor-cierre: Viales de vidrio tipo I incoloros con capacidad de 2 mL y estériles son cerrados con tapón de goma de bromobutilo tipo I.

**2. Estudio de estabilidad.**

2.1 Condiciones de estudio: Condiciones de temperatura y humedad relativa ambientales. Muestras expuestas en cámaras de fotoestabilidad, cumpliendo con la normatividad ICH Q1B: Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products.

2.2 Tiempo total del producto farmacéutico en cámaras de fotoestabilidad: 28 días.

2.3 Tiempos de muestreo y análisis: Los tiempos de toma de muestra para su análisis son cada cuarto día.

Daniel Ruiz Alonso

Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez  
González

MASS Cynthia Espinosa  
Contreras

Elaboró

Revisó

Autorizó



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

LIF

**Propuesta de protocolo de estabilidad en uso de metotrexato  
en solución de uso hospitalario**

<b>Versión</b> 0	<b>Fecha de Revisión</b> 08 de Agosto del 2019	<b>Fecha de emisión</b> 19 de Agosto del 2019
---------------------	---	--

Pág. 3 de 4

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	T: 25 °C ± 2 °C HR: 60% ± 5% Luz: Blanca	16 días	0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días.

**2.4 Parámetros de prueba:**

Prueba	Especificación	Referencia
Esterilidad (inicial y final).	El producto cumple si no se observa crecimiento microbiano.	MGA 0381. Esterilidad. FEUM 11ª edición (pág. 366-372).
Pirógenos (inicial y final).	El producto cumple si ningún conejo muestra un incremento individual de 0.5 °C o mayor con respecto a su T control. Si uno lo hace, usar 5 conejos más y se cumple si no más de 3 de los 8 conejos aumentan de T individual de 0.5 °C o mayor y la suma del aumento de la T máx. de los 8 conejos no excede 3.3 °C.	MGA 0711. Prueba de pirógenos. FEUM 11ª edición (pág. 466-467).
Endotoxinas bacterianas (inicial y final).	0.4 Unidades de endotoxinas USP / mg de metotrexato sódico.	Monografía de Metotrexato inyectable. USP-41 ed. (pág. 2651).
Apariencia.	Solución transparente y libre de partículas.	PNO-003-LIF-FESZ
Color.	Amarillo canario	PNO-003-LIF-FESZ
pH.	7.0 - 9.0	Monografía de Metotrexato inyectable. USP-41 (pág. 2651).
Valoración.	90 - 110 % de la cantidad de Metotrexato indicada en la etiqueta.	Monografía de Metotrexato inyectable. USP-41 (pág. 2651). <sup>45</sup>

Daniel Ruiz Alonso	Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González	MASS Cynthia Espinosa Contreras
<b>Elaboró</b>	<b>Revisó</b>	<b>Autorizó</b>



2.5 Especificaciones de estabilidad generales: Se considerara descartable como estable el producto, si éste presenta alguna de las siguientes características:

- El 5% de variación para la prueba de valoración inicial.
- El cumplimiento de la prueba de valoración durante el periodo de estudio.
- Cambio en el pH establecido.
- El no cumplimiento de la prueba de apariencia o propiedades físicas.
- El no cumplimiento de la prueba de esterilidad y pirógenos o endotoxinas bacterianas.

### 3. Referencia de los métodos analíticos.

- Nagulu M, Uday V, Narsimha Y, Rama D. Development and Validation of Rapid and Sensitive HPLC Method for the Determination of Methotrexate in Human Serum. S. J. Pharm. Sci. 2009; 2(1): 8-13.
- Sabry S, Abdel-Hady M, Elsayed M, Fahmy O, Maher H. Study of stability of methotrexate in acidic solution Spectrofluorimetric determination of methotrexate in pharmaceutical preparations through acid-catalyzed degradation reaction. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003; 32: 409-423.
- P. Suguna, B. Sathyanarayana, G. Chandrasekhar and B. Narasimhulu. Validation of HPLC method for the analysis of methotrexate in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. J of Chem. and Pharm. Research, 2015; 7(9):27-35.

### 4. Nombre y firma del responsable sanitario.

Daniel Ruiz Alonso.

Daniel Ruiz Alonso	Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González	MASS Cynthia Espinosa Contreras
<b>Elaboró</b>	<b>Revisó</b>	<b>Autorizó</b>

### 9.3 Análisis de los Métodos indicativos de estabilidad (SIM: Stability indicating method)

Con base en estudios previos, se han establecido numerosos métodos para la cuantificación del metotrexato, para lo cual, destacan el análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección ultravioleta y detección de fluorescencia, acoplamiento a masas,<sup>52</sup> el radioinmunoensayo, el ensayo de inhibición de dihidrofolato reductasa, el inmunoensayo multiplicado por enzimas, el inmunoensayo de polarización de fluorescencia, el inmunoensayo enzimático y la electroforesis de zona capilar con fluorescencia inducida por detección con láser.<sup>2</sup>

<sup>32</sup> Tomando como referencia a los estudios de CLAR, las condiciones empleadas pueden llegar a ser diversas, por ejemplo:

Zhang emplea una fase móvil constituida por 15.5% de acetonitrilo y el porcentaje restante de una solución de fosfato dibásico de sodio y ácido cítrico con un pH final de 6.0 y realiza una medición a una longitud de onda de 270 nm.<sup>53</sup> Es imprescindible establecer que el autor emplea una columna de fase reversa c18 de sílice y el pH final de la solución es de 6.0, el cual al ser cercano al neutro, puede aumentar la solubilidad de la sílice notablemente, e incluso, puede no solo limitarse al equipo, sino también existe la posibilidad de degradar al metotrexato en un cierto porcentaje, dadas sus características.<sup>54</sup> El método concluye que el metotrexato es estable por 48 horas a una temperatura de 23°C.<sup>53</sup>

Por otra parte, Mayron y Gennaro proponen una solución amortiguadora de acetonitrilo con una solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio y ácido fosfórico con un pH final de 4.2 y realizan una medición a una longitud de onda de 300 nm.<sup>55</sup> Wright y Newton establecieron una fase móvil con solución amortiguadora de acetatos con un pH final de 2.8 y una medición a una longitud de onda de 280 nm. Sin embargo, la longitud de onda de 280 nm, no es la longitud de onda máxima del metotrexato (la cual es reportada en la literatura como 300-310 nm), por lo cual se infiere que no se posee la máxima absorbancia del principio activo en cuestión y que podría incluso perderse la lectura de los productos de degradación, lo cual es trascendental cuando se trata de un método indicativo de estabilidad. De acuerdo a los autores, el método concluye en que el metotrexato es estable por 8 meses a una temperatura de 25°C y protegido de la luz, pero el producto farmacéutico se almacena en jeringas y no viales, y con su empaque secundario sin apertura previa al estudio.<sup>56</sup>



En adición, McElnay, et al., emplearon una fase móvil agua: metanol (70:30 v/v) con ion sulfato de hidrógeno tetrabutilamonio como agente de par iónico y una detección a una longitud de onda de 303 nm. Cabe mencionarse que dicho estudio fue con el propósito de determinar la estabilidad por degradación acelerada del metotrexato y que la solución de metotrexato se colocó en la luz natural durante 12 horas, por un periodo de dos días.<sup>53, 57</sup> Y finalmente Cheung, et al., determinaron la estabilidad del metotrexato en una solución glucosada en un baño maría por seis horas, empleando una fase móvil de 1% de ácido acético, 70% agua destilada y 29% de acetonitrilo y una detección a una longitud de onda de 240 nm.<sup>58</sup> Las distintas mezclas de la fase móvil empleadas, implican una variación en el tiempo de retención. El metotrexato es una molécula poco polar, por lo cual una fase móvil muy polar lo desplazaría por completo y entonces, dependiendo del empaque empleado de la columna del equipo, la selección de los componentes de la fase móvil es vital, así como sus proporciones. Las cuales también implican el tiempo completo de corrida de la muestra en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución.<sup>58, 59</sup>

Conjuntando todo lo anterior, cabe destacar que la literatura más reciente, emplea en su mayoría de manera general, una fase móvil constituida por alrededor de 10% de acetonitrilo y el 90% de una solución amortiguadora de fosfatos, constituyentes que además son más accesibles con respecto a otros en su mayoría en materia económica, así como también constatan análisis realizados en una longitud de onda de alrededor de 300-310 nm.<sup>11, 60, 61</sup>

En condiciones de laboratorio se empleó, una longitud de onda de 310 nm debido a la longitud de onda máxima para dicho componente y una proporción de 15% acetonitrilo y 85% de solución amortiguadora de fosfatos 0.01M (fosfato monobásico de potasio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y fosfato dibásico de potasio  $\text{K}_2\text{PO}_4$ ). Lo anterior es debido a que la proporción acetonitrilo:fosfatos (10:90), proporciona un tiempo de retención mayor, pero un tiempo de duración del análisis menor que con respecto a otras combinaciones. En adición, la solución de fosfatos, se realizó a pH 3.5, dado que un pH superior o inferior, proporciona resultados variantes que provocan incluso la misma degradación del metotrexato.

## 10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En México ya se han presentado problemas con respecto al metotrexato, debido a inconsistencias en la manufactura de una de las grandes compañías, lo que incluso causó un desabasto inducido a nivel nacional, por lo que se decidió importar el medicamento, a la par de su producción en el país mientras se aclara y soluciona la situación de las inconsistencias. En conjunto con lo anterior, se puntualiza, el hecho actual de analizarse, por lo menos, 38 200 unidades del medicamento de tan solo lo producido en México por una sola compañía para el resto del 2019, más aparte, corresponderá hacer lo mismo con el resto de sus productoras dentro y fuera del país con la finalidad de garantizar su seguridad y eficacia, lo cual incluye, pero no se limita a la estabilidad; y el documento que brinda la característica para probar dicha estabilidad, es el protocolo de estabilidad. La propuesta de protocolo de estabilidad de este proyecto, se elaboró con los puntos establecidos en la NOM-073-SSA1-2015, dado que se trata de la normatividad mexicana en la materia pertinente por considerar que el estudio de estabilidad se propone en un laboratorio dentro de la Ciudad de México. Ahora bien, con respecto a la consideración de los diversos factores a tomar en cuenta para el producto farmacéutico en cuestión; tomando en consideración el efecto de la temperatura, debido a que se mantendrá alrededor de los 25°C, en consecuencia, para el metotrexato se ha encontrado ser una condición de estudio de estabilidad acelerada. En adición a lo anterior, la luz produce una cantidad significativa de productos de degradación y además, en un hospital, siempre se encuentra presente y eliminarla es complicado.

Por otra parte, se puntualiza el tener precaución con el material de envase ya que es vidrio, lo cual implica que sea factible un accidente y tanto ocurra un desprendimiento hacia la parte interna del envase, como también pueda romperse completamente el envase y en consecuencia, permitir el paso al exterior del producto y así perderse por completo para su uso destinado.

Con respecto al cambio de presión, no se han reportado en la literatura, reacciones de degradación del producto en solución.

A diferencia de la presión, el pH es un factor a considerar, puesto que se contempla un pH de máxima estabilidad de 6-8, y por ende, es vital mantener al metotrexato dentro de este intervalo, y en especial fuera de la sección alcalina, dada su hidrólisis que puede presentarse. En conjunto con lo anterior, la literatura postula análisis que requieren la preparación de la muestra para introducirse en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución, en donde se lleva a un pH ácido (salvo la excepción que pide un pH de 6); es cierto entonces que el análisis de la muestra

debe realizarse lo más pronto posible, con la finalidad de evitar una hidrólisis y generar productos de degradación que al final afectarán los resultados. Lo anterior de igual manera aplica para la sección de las interacciones fármaco-agua, cabe mencionar que el fármaco ya se encuentra en solución, por lo cual se evita los problemas causados en sólidos cuando hay presencia de agua.

Se puntualiza para la estabilidad de la muestra, que la formulación parenteral del metotrexato, presenta una estabilidad fisicoquímica de 24 meses en viales cerrados, sin embargo, una vez abiertos, se reduce su estabilidad a 24 horas para una temperatura de almacenamiento de 2-8°C. Aunado a lo anterior, se han llevado a cabo estudios que indican que la adición de cloruro de sodio (0.9%) o glucosa (5%) aumentan el tiempo de vida del producto parenteral en uso de manera significativa, pasando de una estabilidad de la muestra de un promedio de 1 día a 30 días de duración, considerando la temperatura de 2-8°C.

Incluso considerando un paso anterior al envasado, en el proceso de fabricación al producir un porcentaje de impurezas, quienes pueden llegar a producir una cantidad de productos de degradación desde un inicio, mas aparte, la molienda puede llegar a destruir la estructura interna del metotrexato. Como consecuencia, surge la importancia del análisis del tiempo cero o inicial, el cual especificará la cantidad de principio activo desde su comienzo.

Tomando en cuenta el envase en donde se encuentra el producto farmacéutico, se propone una posibilidad en la adsorción del producto por parte de las microporosidades del vidrio del envase. En consecuencia, es posible la disminución de la cantidad de producto tanto para su uso, como para su análisis. Además, es importante la composición del envase, la cual al ser de vidrio de borosilicatos, entonces posee un bajo coeficiente de dilatación térmica, y por lo cual, resiste saltos térmicos además de condiciones alcalinas, finalmente se evita una permeabilidad del agua; al igual que el sistema contenedor-cierre, que se trata de goma de bromobutilo, con la finalidad de evitar perdida del producto al exterior o ingreso de la humedad a su interior y entonces afectar la concentración y degradar al producto.

Ahora bien, con respecto al protocolo. Las cámaras de estabilidad no requieren encontrarse en temperaturas altas o superiores a las ambientales, ni con un porcentaje de humedad relativa alto, ya que no son las condiciones comunes en un hospital y además se encuentran ambas condiciones

bastante controladas. A diferencia de las condiciones anteriores, la luz es considerada uno de los factores más presentes en los hospitales, y de manera general, más importantes en la degradación.

Las pruebas de análisis se seleccionaron, considerando las puntualizaciones de la NOM-073-SSA1-2015, para soluciones inyectables; en las cuales, la apariencia es crucial dado que el metotrexato presenta un color amarillo, y la pérdida de su coloración es un indicio de la degradación del producto. Ahora bien, un pH que se ubique fuera del de su máxima estabilidad, pone en riesgo al producto posibilitando una hidrólisis y en consecuencia generando productos de degradación. El contenido de conservadores es una prueba que está sujeta a aquellos productos farmacéuticos multidosis. La esterilidad y la prueba de pirógenos o endotoxinas bacterianas se puntualiza que se realiza de manera exclusiva al inicio del estudio de estabilidad y una vez que se retira el producto farmacéutico de dicho estudio y su no cumplimiento desde el punto final permite el rechazar el resto del estudio dado que al ser un producto introducido al organismo de manera inyectada, se infiere una introducción de organismos contaminantes al organismo evadiendo barreras propias de protección, lo cual hace que un producto farmacéutico pierda su función principal y entonces se vuelve contraproducente. Se descarta la prueba de pérdida de peso, dado que se emplea un envase junto con un sistema de cierre, impermeable y esto entonces hace que no haya paso de líquidos ni de gases a través de sus barreras de éstos y por lo cual el producto se mantiene intacto en dicho sentido. Finalmente, la valoración, es la prueba que agrupa el ámbito de las demás pruebas, ya que la cantidad de productos de degradación causados por las condiciones a las cuales el producto farmacéutico se somete, tiene un valor numérico ahora de manera indirecta al cuantificar la cantidad de metotrexato presente. Y entonces, se vuelve trascendental, la selección del método a utilizar, ya que debe ser indicativo de estabilidad, por consiguiente, debe de estar validado y la especificidad en la cuantificación para diferir al principio activo de los productos de degradación es importante, ya que serán éstos quienes se encuentren en conjunto; así como también es necesario considerar las condiciones del laboratorio en donde se realice el análisis, puesto que la literatura especifica dichas condiciones, pero al reproducirlas en otro laboratorio, surge la discrepancia de resultados y entonces, es necesario realizar ajustes para que se obtengan resultados completamente exitosos y no se deteriore el resultado después de amenizar las condiciones a las cuales se somete le producto farmacéutico, simplemente por un método seleccionado que en el lugar de trabajo no funcionará de manera exitosa.

Por otra parte, la frecuencia de análisis que establece la NOM-073-SA1-2015, solamente aplican para un tiempo en las cámaras de estabilidad de un estudio que tiene una duración de 3 meses como mínimo; sin embargo el producto farmacéutico tiene una duración de 28 días, por lo cual ha sido pertinente el establecer una frecuencia de 4 días de análisis para un tiempo total de 28 días. Con lo anterior, es factible el abarcar el tiempo de uso de la solución de metotrexato y también tener una cantidad de análisis lo suficientemente amplia, como para tener una noción del posible monitoreo de su degradación.

Es de suma importancia la organización y distribución de los resultados obtenidos una vez que se finalice la sección del desarrollo experimental, para dicho efecto, se hace énfasis en el uso de tabulaciones y gráficos, con la finalidad de facilitar la lectura e interpretación de los resultados, así como también, la Organización Panamericana proporciona instrucciones para indicar el orden de la presentación de los resultados (las cuales son para cada lote y para cada intervalo de tiempo al cual se analizó). Lo anterior en conjunto, engloba un ambiente que favorece de manera significativa la documentación de la ejecución de las acciones propuestas en el protocolo; así como también el análisis de lo obtenido.

Finalmente, el establecer el método de análisis, que debe ser un método indicativo de estabilidad, es primordial, y además si se conjunta con la consideración características como el tiempo de la duración del análisis, el tiempo de retención del producto, la visibilidad de los productos de degradación formados y específicos, el costo de los reactivos empleados, entre otros factores. Y en este sentido, se debe puntualizar la obtención del método de análisis antes de la elaboración del mismo estudio de estabilidad, puesto que de nada serviría tener condiciones de degradación del producto farmacéutico cuando el método de análisis no es capaz de proporcionar resultados que sean confiables. Tomando en consideración lo anterior, se establece la determinación de la longitud de onda máxima del metotrexato, la cual fue 300-310, para lo que posteriormente da pauta a la obtención de productos de degradación los cuales son verificados con el método de análisis. La selección correcta de los constituyentes y proporciones de la fase móvil que permiten un costo menor que el emplear otros elementos, así como el tiempo acortado de la duración total del análisis con un tiempo de retención de alrededor de 2.5 minutos.

## 11. CONCLUSIÓN

Una vez finalizado el análisis de los resultados del presente documento, en consecuencia se ratifica la necesidad del desarrollo del protocolo de estabilidad de medicamentos en uso como lo es el metotrexato en solución, para lo cual se atribuye la fundamentación con respecto a la normatividad mexicana como lo es la NOM-073-SSA1-2015, así como puntualizaciones que ofrece la ICH y la Organización Panamericana de la Salud, así como también, las particularidades provenientes de la literatura. Se cumple el objetivo propuesto del proyecto debido a la generación de la propuesta de un protocolo de estabilidad en uso para el metotrexato en solución de uso hospitalario, el cual dará pauta documentada para la predicción del tiempo de caducidad del medicamento, así como también sugiere condiciones de almacenamiento y por tanto de etiquetado. En adición a lo anterior, la estabilidad de un producto farmacéutico en uso es trascendental para las condiciones de un hospital, siendo que su tiempo de uso es significativamente más corto que el de otro tipo de medicamentos y es un medicamento de costo elevado y limitado. En efecto resulta beneficioso un estudio que compruebe el tiempo indicado en el marbete para condiciones cotidianas en hospitales.

Es imprescindible y conveniente, en una futura modificación a las directrices la adición de especificaciones para este tipo de medicamentos, que se almacenan en hospitales y que su empleo podría en algún momento no ser el ideal para el paciente e incluso poner en riesgo su salud, siendo contraproducente su simple función para el cual estuvo planteada desde un inicio y de esta manera cumplir el compromiso de la industria farmacéutica tanto para con sus pacientes, en materia de seguridad como para una institución de salud en materia de estabilidad.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Sanjay B, Neha S, Dinesh S. Stability Testing of Pharmaceutical Products. J. of App. Pharm. Science. 2012. 2(3):129-138.
- 2.- Loyd A. pH and Solubility, Stability, and Absorption, Part II [Internet]. Compounding today: International Journal of Pharmaceutical Compounding. [Cons. 12/13/2018]. Available on: [https://compoundingtoday.com/Newsletter/Science\\_and\\_Tech\\_1112.cfm](https://compoundingtoday.com/Newsletter/Science_and_Tech_1112.cfm)
- 3.- Budania L. Physical Stability Testing of Drugs and Drug Products [Internet]. Pharmatutor: Budania L. [Cons. 12/13/2018]. Available on: <https://www.pharmatutor.org/articles/physical-stability-testing-drugs-products>
- 4.- Amrita P, Sukhada K, Ravi T. Stability studies: An integral part of drug development process. Int. J. of Pharm. Res. and Bio-Sci. 2013. 2(6):69-80.
- 5.- Sadila N, Sania B, Fatima Q. Stability of a Dosage Form and Forced Degradation Studies. J Bioequiv Availab. 2016. 8:191-193.
- 6.- Zhou D, Porter W, Zhang G. Drug Stability and Degradation Studies. Developing Solid Oral Dosage Forms. 2 ed. USA: Elsevier; 2007: 113-149.
- 7.- Sanchez-Quiles I, Nájera-Pérez M, Espuny-Miró A, Titos-Arcos J. Review of the Stability of Photosensitive Medications. Farm. Hosp: Elsevier; 2011. 35(4):204-215.
- 8.- Farah I, Huma I, Azhar I, et al. Forced Degradation Studies. J. of Analytical & Phar. Res. 2016. 3(6).
- 9.- Amit M, Paresh P, Shivang C. Evaluation of "In-Use" stability period of Lacidipine tablets in multi-dose plastic container-closure. Int. J. Pharm. Sci. Nanotech. 2013. 6(2):2022-2032.
- 10.- Nissen K, Jorgensen L, Berg D, et al. Stability study of methotrexate in 0.9% sodium chloride injection and 5% dextrose injection with limit tests for impurities. Am. J. Health Syst. Pharm. 2017. 74(9):211-213.
- 11.- Kishore K, Swapan R, Veerappan S. Drug-Excipient Interactions: Case Studies and Overview of Drug Degradation Pathways. Am. J. of Anal. Chem. 2016. 7(1):1-34.
- 12.- Venkateswara B, Rasmitha B, Navaneetha K, et al. A Review On Parenteral Production Technology. Int. J. of Pharm. and Biol. Sci. 2013. 3(1):596-610.
- 13.- Sarabia M, Raquel L, Patricia R, et al. Estabilidad de Fármacos y Medicamentos. CDMX: UNAM Cuautitlan; 2004.
- 14.-European Medicines Agency. Note for Guidance on Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. European Medicines Agency. 1996

- 15.- Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Secretaria de Salud. 2015.
- 16.- Sanjay B, Dinesh S, Neha S. Stability testing of pharmaceutical products. J. of Applied Pharm. Sci. 2012. 2(3):129-138.
- 17.- Kishore K, Satti P, Kishore V, et al. Forced Degradation studies: Practical approach - overview of regulatory guidance and literature for the drug products and drug substances. Int. Res. J. Pharm. 2013. 4(5).
- 18.- Deokate U, Gorde A. Forced degradation and Stability Testing: Strategies and Analytical Perspectives. PharmaTutor. 2014. 2(6):61-74.
- 19.- Bryans M, Marshall M, Rehfuss L, et al. Formulation Development of Parenteral Products. Introduction to Biomanufacturing. PA, USA: Montgomery County Community College; 2016: 2-31.
- 20.- Hicks S. Forced Degradation to Develop Stability-indicating Methods. Pham Outsourcing. 2012. 10(6).
- 21.- Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. Ley General de Salud, Secretaría de Salud, 2018.
- 22.- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 12° ed. México; Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2018.
- 23.- Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Secretaria de Salud. 2015.
- 24.- Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013, Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones. Secretaria de Salud. 2013.
- 25.- Reynolds D, Facchine K, Mullaney J, et al. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. Pharm. Tech. 2002. 48-56.
- 26.- Sajjad M, Akhtar N. Regulation of stability studies to enhance the efficiency of drug registrations to regulatory authorities. Arch. Pharm. Pract. 2015. 6(3):48-57.
- 27.- Venkataraman S, Manasa M. Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products - a review. Drug Invention Today. 2018. 10(2):137-146.



- 28.- Manish S, Manoharan M. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. J. Chromatogr. Sep.Tech. 2017, 8:1.
- 29.- Singh S, Junwal M, Modhe G, et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. Trends in An. Chem. 2013. 49:71-88.
- 30.- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Registro Sanitario de Medicamentos Nuevos [Internet]. [Cons. 01/15/2019]. Available on: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/registro-sanitario-de-medicamentos-nuevos>
- 31.- Connors K, Amidon G, Stella V. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists. 2a ed. Nueva Jersey USA: A Wiley-Interscience publication; 1986. pp 566-569.
- 32.- Sabry S, Abdel-Hady M, Elsayed M, Fahmy O, Maher H. Study of stability of methotrexate in acidic solution Spectrofluorimetric determination of methotrexate in pharmaceutical preparations through acid-catalyzed degradation reaction. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003; 32: 409-423.
- 33.- Chatterji D, Gallelli J. High-pressure Liquid Chromatographic Analysis of Methotrexate in Presence of Its Degradation Products. J. of Pharm. Sci. 1977; 66 (9): 1219-1222.
- 34.- Chatterji D, Gallelli J. Thermal and Photolytic Decomposition of Methotrexate in Aqueous Solutions. J. of Pharm. Sci. 1978; 67(4):526-531.
- 35.- Klaus F. Analytical Profiles of Drug Substances. Al-Badr A, Forcier G, Brittain H, Grady L editores. Vol 5. California: Academic Press; 1986. pp. 284-306.
- 36.- Suneetha A, China K. Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for Estimation of Ceftaroline Fosamil in Bulk and Its Parenteral Dosage Forms. ISRN. Anal. Chem. 2013. 1-5.
- 37.- Agnihotri J, Singh S, Bigonia P. Formal chemical stability analysis and solubility analysis of artesunate and hydroxychloroquine for development of parenteral dosage form. J. of Pharm. Res. 2013. 6:117-122.
- 38.- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica o resumen de las características del metotrexato. [Internet]. [Cons. 01/26/2019]. Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/en/ft/76356/FT\\_76356.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/en/ft/76356/FT_76356.pdf)
- 39.- Barnhart K, Coutifaris C, Esposito M. The pharmacology of Methotrexate. Exp. Opin. on Pharm. 2005. 2(3):409-417.
- 40.- Derbli M, Bueno A, Chaves E, et al. Methotrexate: Update on Pharmacology, Clinical Applications and Warnings. NY, USA: Nova Science Publishers Inc; 2012.

- 41.- Respaud R, Gaudy A, Arlicot C, Tournamille J, Viaud-Massuard M, Elfakir C. Implementation Study of Patient-Ready Syringes Containing 25 mg/mL Methotrexate Solution for Use in Treating Ectopic Pregnancy. *BioMed Research International*. 2014; 2014:1-4.
- 42.- Hroch M, Tuková J, Doležalová P, Chládek J. An improved high performance liquid chromatography method for quantification of methotrexate polyglutamates in red blood cells of children with juvenile idiopathic arthritis. *Biopharm. Drug Dispos*. 2009; 30: 138–148.
- 43.- Parfitt K, Martindale W. *Martindale: the complete drug reference*. 29<sup>th</sup> ed. London, UK: Pharmaceutical Press; 1989. p. 636.
- 44.- Chen ML, Chiou WL. Adsorption of Metotrexate onto Glassware and Syringes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1982; 71(1): 129-131.
- 45.- IARC. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Geneva: World Health Organization, Int. Agency for Research on Cancer, 1972- Present. (Multivolume work). p. V26 268.
- 46.- Genç L, Büyüktiryaki S. Preparation and characterization of methotrexate-loaded microcapsules. *Pharm. Dev. Tech*. 2013; 19(1): 42–47.
- 47.- Mávil E, Murata G, Ramírez JA. COFEPRIS detiene distribución de medicamento para tratar el cáncer: HIMFG. México: Noticieros Televisa; 2019.
- 48.- González M. Farmacéutica provocó desabasto de medicamentos contra el cáncer: COFEPRIS. México: Milenio digital, Multimedia edición nacional. 2019.
- 49.- Secretaría de Salud, *Diario Oficial de la Federación*. Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios. Secretaria de Salud. 2013.
- 50.- Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas: 31° informe. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1990 (OMS, Serie de Informes Técnicos, N° 790).
- 51.- Usarralde-Pérez Á, Toro-Chico P, Pérez-Encinas M. Actualización de los medicamentos citostáticos y otras mezclas intravenosas aplicando la metodología de la matriz de riesgo para la elaboración de medicamentos esteriles. *Farm. Hosp*. 2016; 40(4): 260-271.
- 52.- Wu CS, Tong YF, Wang PY, et al. Identification of impurities in methotrexate drug substances using high-performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2013; 27(9): 971–978.

- 53.- Zhang Y, Xu QA, Trissel LA, et al. Physical and chemical stability of methotrexate sodium, cytarabine, and hydrocortisone sodium succinate in Elliott's B solution. *Hosp Pharm.* 1996; 31: 965-70.
- 54.- Long W. Estabilidad a pH bajo y alto de una columna Agilent Poroshell HPH C18. *Agilent Tech.* 2015; 1-5.
- 55.- Mayron D, Gennaro A. Stability and compatibility of granisetron hydrochloride in i.v. solutions and oral liquids and during simulated Y-site injection with selected drugs. *Am J Health Syst Pharm.* 1996; 53: 294-304.
- 56.- Wright M, Newton J. Stability of methotrexate injection in prefilled, plastic disposable syringes. *Int J Pharm.* 1988; 45: 237-44.
- 57.- McElroy JC, Elliott DS, Cartwright-Shamoon J, et al. Stability of methotrexate and vinblastine in burette administration sets. *Int J Pharm.* 1988; 47: 239-47.
- 58.- Cheung YW, Vishnuvajjala BR, Flora KP. Stability of cytarabine, methotrexate sodium, and hydrocortisone sodium succinate admixture. *Am J Hosp Pharm,* 1984; 41: 1802-6.
- 59.- Kaur J, Bansal Y, Bansal G. Understanding unconventional routes to impurities from drugs in hydrolytic conditions. *Ind. J. of Pharm. Edu. and Res.* 2016. 50(3):161-190.
- 60.- Rawat T, Pandey I. Forced degradation studies for Drug Substances and Drug Products - Scientific and Regulatory Considerations. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2015. 7(5):238-241.
- 61.- Tonnesen H. *Photostability of Drugs and Drug Formulations.* Florida, USA: CRC press; 2004.