

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

## DESARROLLO TECNOLÓGICO Y ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE FOLINATO CÁLCICO 10 mg INYECTABLE LIOFILIZADO

Armando Gato del Monte,<sup>1</sup> Alfredo Fernández Sorre<sup>2</sup> y Esther Alonso Jiménez<sup>3</sup>

### RESUMEN

El folinato cálcico es un antídoto indicado para prevenir la toxicidad grave debido a sobredosis de metotrexato, o la terapia con dosis elevadas de este para tratar las reacciones severas a dosis bajas o moderadas de metotrexato, y como parte de los programas quimioterapéuticos en el tratamiento de varias formas de cáncer, así como en el tratamiento de anemias megaloblásticas. Se empleó la liofilización para la obtención de un producto con la calidad farmacéutica requerida según las especificaciones de la USP 23; además, se desarrolló una técnica analítica para el estudio de la estabilidad del liofilizado con la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución, mediante la cual se cuantificó el contenido del principio activo. Se propuso como fecha de vencimiento un período de 3 años a temperatura ambiente.

*DeCS:* TECNOLOGIA FARMACEUTICA; ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS; ANTIDOTOS/uso terapéutico; LIOFILIZACION; CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION; LEUCOVORINA/ /antagonistas & inhibidores.

La leucovorina es una mezcla de diastereoisómeros de los derivados 5-formil del ácido tetrahidrofólico. El compuesto biológicamente activo de la mezcla es el (-)-L-isómero, conocido como factor citrovorum o ácido fólico,<sup>1,2</sup> el cual está indicado:

1. En el tratamiento de anemias megaloblásticas debido a la deficiencia de ácido

fólico cuando no es factible la terapia oral.

2. En combinación con el 5-fluoracilo para la prolongación de la vida en el tratamiento paliativo de pacientes con cáncer.<sup>3-5</sup>

3. En la terapia de osteosarcoma después de la administración de una excesiva dosis de los antagonistas del ácido

<sup>1</sup> Licenciado en Química. Investigador Agregado.

<sup>2</sup> Máster en Ciencias en Tecnología Farmacéutica y Control de Medicamentos. Investigador Auxiliar.

<sup>3</sup> Técnica en Análisis Químico.

fólico, como la aminopterina (ácido 4-amino pteroliglutámico) y metotrexato (MTX) (ácido 4-amino N 10 metil pteroilglutámico).

La utilización de MTX fue un gran desarrollo desde sus primeras aplicaciones. Son exactamente conocidos sus mecanismos biológicos de acción, los métodos precisos de determinación de los niveles en sangre y de la terapia de salvación específica con folinato cálcico hasta disminuir sus efectos tóxicos colaterales.<sup>5</sup>

El folinato cálcico se presenta en forma de polvo amarillento o amarillo, inodoro, muy soluble en agua y prácticamente insoluble en alcohol. Cinco miligramos de leucovorin son equivalente a 5,40 mg de leucovorina cálcica anhidra, la cual contiene 0,004 mEq de calcio elemental por miligramo de leucovorina.<sup>6,7</sup>

Dicho producto aparece reportado en la literatura como una solución estéril en agua para inyección y este trabajo se encaminó a desarrollar una formulación de folinato cálcico 10 mg en forma liofilizada para la producción nacional, que cumpliera con las especificaciones de calidad de la USP 23,<sup>8</sup> la técnica analítica para la realización del estudio de estabilidad (Técnica No. 06, 1992. Departamento de Estabilidad CIDEM) y así la sustitución de las importaciones.

## MÉTODOS

El folinato cálcico, lote no. 762/T de la firma Braco, Italia, cuya potencia de 97,8 % según certificado de análisis del fabricante, isotonzante de calidad farmacéutica y agua estéril para inyección, se utilizó para la formulación del producto en condiciones asépticas.

El pH de la formulación se ajustó a los límites especificados para el producto, con la

utilización del pHmetro METROHM AG, Suiza.

La filtración se realizó a través de membrana esterilizante de acetato de celulosa con prefiltro de vidrio y transferido el producto bajo flujo laminar marca GELAIRE, Suiza, a viales de formato 6R, con tapones de goma butílicos de 20 mm de diámetro para liofilización.

El proceso de liofilización se llevó a cabo en una liofilizadora marca EDWARDS, modelo L-40 (Reino Unido), y la solución se congeló a una temperatura máxima de -40 °C.

La temperatura del condensador fue de -50 °C, el tiempo de enfriamiento de 2 h y el calentamiento a las platinas a 20 °C.

El sellado del producto se realizó con la máquina semiautomática selladora de bulbo Macrofar, Italia.

## Estabilidad

Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución como método analítico para el estudio de estabilidad por vida de estante y acelerada.

Se utilizó una bomba de doble pistón recíprocante, un detector ultravioleta de longitud de onda variable y una atenuación de 0,08 AUFS, así como una columna de 250 x 4 mm Lichrosorb RP-18 de 5 µm (KNAUER GmbH).

Para la inyección se utilizó una válvula Rheodyne 7125. El registro y la integración de los picos se realizaron mediante un integrador Shimadzu CR6-A.

Para la determinación y cuantificación del folinato cálcico se utilizó una muestra de referencia y se empleó el método de comparación absoluta o patrón interno.

Como fase móvil (fm) se preparó una mezcla de agua destilada, acetonitrilo y solución metanólica de yoduro de tetrametilamonio al 25 % (45:17,5:1), la cual

se ajustó a pH  $7,5 \pm 0,05$  con solución de hidróxido de sodio 0,1 mol/L. La mezcla se desgasificó con ultrasonido. El flujo de la fase móvil fue de 1,0 mL/min.

## RESULTADOS

Las propiedades físicas medidas a la solución de folinato cálcico, se encuentran

dentro de los límites de calidad que se especifican (tabla 1).

Los lotes analizados no difieren de las especificaciones de calidad de la USP 23 para el producto en estado líquido (tabla 2).

Las muestras analizadas a los 12 y 36 meses mantienen los valores de pH, humedad residual y valoración invariables (tabla 3).

TABLA 1. *Parámetros medidos a los lotes líquidos preparados*

| Parámetros              | 034         | Lotes<br>242 | 301         | Límites                                   |
|-------------------------|-------------|--------------|-------------|---|
| Descripción             | Responde    | Responde     | Responde    | Solución estéril en agua para inyecciones |
| pH de la solución       | 7,4         | 7,0          | 7,6         | 6,5 - 8,5                                 |
| Partículas materiales   | No presenta | No presenta  | No presenta | Libre de partículas materiales            |
| Volumen de llenado (mL) | 1,01        | 1,1          | 1,01        | $1,0 \pm 0,15$                            |

TABLA 2. *Parámetros medidos al producto liofilizado*

| Parámetros                         | 034      | Lotes<br>242 | 301      | Límites   |
|------------------------------------|----------|--------------|----------|---|
| Características organolépticas     | Responde | Responde     | Responde | Liofilizado de color blanco amarillento   |
| Identificación                     | Responde | Responde     | Responde | Las bandas de absorción del espectro IR de la muestra coinciden con la del material de referencia químico |
| PH de la solución reconstituida    | 6,9      | 7,0          | 6,7      | 6,5 - 8,5   |
| Uniformidad de contenido (%)       | 3,94     | 3,77         | 2,70     | DSR < 6   |
| Humedad residual (%)               | 0,12     | 0,03         | 0,06     | No mayor de 0,2 %   |
| Dilución y claridad de la solución | Responde | Responde     | Responde | Solución no más clara que igual volumen de diluyente  |
| Valoración (%)                     | 116,2    | 103,4        | 111,5    | 90,0 - 120,0 %  |

TABLA 3. *Resultados analíticos del estudio de estabilidad por vida de estante*

| Parámetros                       | 034    | Lotes<br>242 | 301    |
|----------------------------------|--------|--------------|--------|
| pH (12 meses)                    | 6,8    | 6,9          | 6,9    |
| Humedad residual (%), (12 meses) | 0,09   | 0,10         | 0,09   |
| Valoración (12 meses)            | 112,80 | 104,60       | 110,50 |
| pH (36 meses)                    | 6,8    | 7,0          | 6,8    |
| Humedad residual (%), (36 meses) | 0,10   | 0,09         | 0,09   |
| Valoración (%), (36 meses)       | 113,00 | 105,40       | 109,60 |

## DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados del estudio realizado a la formulación diseñada, la cual después de ajustada al pH en el entorno indicado y enrazada al volumen de la preparación, se filtró por membrana esterilizante de 0,2  $\mu\text{m}$  con prefiltro de vidrio. El filtrado obtenido después de dosificado respondió a las características organolépticas señaladas y a la ausencia de partículas materiales, especificadas en la USP 23.

La liofilización del folinato cálcico se efectuó a velocidad de congelación lenta con la finalidad de obtener cristales grandes, poco numerosos y repartidos de forma irregular; así se logró la cristalización total del agua, con un producto congelado de aspecto amorfo.

Teniendo en cuenta las condiciones de liofilización a que se sometió el producto en solución, se obtuvo una matriz compacta y homogénea, la cual se reconstituyó rápidamente al añadirse la cantidad del

vehículo adecuado, recobrando esta su aspecto líquido original, que física y químicamente responde a los requerimientos de la USP 23, según se refleja en la tabla 2, lo que permite el uso de este antídoto con la mayor rapidez posible en la terapia a que está indicado.

En los estudios de la estabilidad acelerada del producto no se apreciaron cambios en la concentración del principio activo, el cual presentó una alta resistencia a la degradación térmica ya que aun a altas temperaturas mantuvo una elevada actividad. Por tal motivo no fue posible aplicar la ecuación de Arrhenius para el cálculo de predicción de la fecha de vencimiento.

En la tabla 3 se observa que las muestras valoradas periódicamente, siguiendo el método de vida de estante, organoléptica y químicamente no presentan pérdida de potencia a los 36 meses desde la fecha de fabricación del producto, manteniéndose la humedad residual y el pH dentro de los límites establecidos.

## SUMMARY

---

Calcium folinate is an antidote for preventing serious toxicity due to methotrexate overdose and the therapy applied with high doses of this product is meant to treat severe reactions to low or moderate doses of methotrexate. It is used as part of chemical-therapeutic programs to treat different types of cancer and also in the treatment of megaloblastic anemia. Freeze-drying was employed to obtain a product of required pharmaceutical quality according to USP 23 standard. Also, an analytical technique for the study of the freeze-dried material stability by means of high-pressure liquid chromatography was developed, which allowed quantifying the contents of the active principle. It was proposed that the expiry date should be after three years at room temperature.

*Subject headings:* TECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL; DRUG STABILITY; antidotes/therapeutic use; FREEZE-DRYING; CHROMATOGRAPHY, HIGH PRESSURE; LEUCOVORIN/antagonists & inhibitors.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schilsky RL, Ratain MJ. Clinical pharmacokinetics of high-dose leucovorin calcium after intravenous and oral administration. *Cancer Int* 1990;87(17):1411-5.
2. Physician's Desk Reference. 54 ed. New Jersey: Medical Economics Company; 2000:1416-8.
3. Carlsson G, Gustavsson BG, Spears CP, Hafstrom LO. 5-Fluoracil plus leucovorin as adjuvant treatment of an experimental liver tumor in rats. *Anticancer Res* 1990;10(3):813-6.
4. USP, DI. Advise for the patient. *Drug Information in Lay Language*. 13 ed. Rockville: 1993:795.
5. High Dose Metotrexate International Workshop. *Chemioter Oncol* 1978;2:101-252.
6. AHFS. Drug information. Parkway: Staff; 1986:1910-12.
7. Index Merck. 11 ed. New Jersey: Merck; 1989:4141-2.
8. USP 23, NF 18. Leucovorin calcium injection. 23 ed. Rockville: Convention; 1995:873.

Recibido: 16 de enero del 2002. Aprobado: 7 de febrero del 2002.

Lic. *Armando Gato del Monte*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave. 16 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.