

# Evaluación preliminar de reconocimiento de patrones en gotas secas de metotrexato

Carlos A. Martínez-Miwa<sup>1,2</sup>, R. Magdalena Sánchez-Albores<sup>3</sup>,  
Yohana J. P. Carreón<sup>3</sup>, Jorge Gonzalez-Gutiérrez<sup>3</sup>, Mario Castelán<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Politécnico Nacional,  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados,  
Mexico

<sup>2</sup> Universidad Tecnológica de Coahuila,  
Mexico

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Chiapas,  
Mexico

{carlos.miwa, mario.castelan}@cinvestav.edu.mx,  
{magdalena.sanchez, yojana.carreon, jorge.ggutierrez}@unach.mx,  
carlos.miwa@utc.edu.mx

**Resumen.** El metotrexato (MTX) es un agente terapéutico ampliamente utilizado cuyo control de calidad es crucial para garantizar su eficacia y seguridad. En este trabajo, se propone un enfoque basado en redes neuronales convolucionales (CNN), específicamente la arquitectura VGG-16, para la clasificación automática de residuos de gotas secas de MTX con distintos grados de adulteración. Se analizaron imágenes de gotas secas de metotrexato en concentraciones del 100 %, 80 %, 60 % y 40 %. Las soluciones con 80 %, 60 % y 40 % de metotrexato correspondían a mezclas adulteradas con 20 %, 40 % y 60 % de agua, respectivamente. En todas las muestras, la concentración de NaCl se mantuvo constante en 2 %. Se implementó un método de segmentación basado en la transformada de Hough para la extracción de parches. Se generó un conjunto de datos enriquecido con imágenes de la periferia y el centro de cada gota. Los resultados obtenidos muestran una precisión promedio de clasificación superior al 90 %, con una mayor efectividad en la identificación de adulteraciones en la región periférica de las gotas. Los resultados son preliminares y muestran el potencial del aprendizaje profundo para la detección automatizada de alteraciones en MTX, con impacto en control de calidad en la industria farmacéutica.

**Palabras clave:** Metotrexato, gotas secas, aprendizaje profundo.

## Preliminary Evaluation of Pattern Recognition in Dried Methotrexate Drops

**Abstract.** Methotrexate (MTX) is a widely used therapeutic agent whose quality control is crucial to ensure its efficacy and safety. This study proposes an approach based on convolutional neural networks (CNN), specifically the VGG-16 architecture, for the automatic classification of dried drop residues of MTX with varying degrees of adulteration. Images of dried methotrexate drops were analyzed at concentrations of 100 %, 80 %, 60 %, and 40 %. The 80 %, 60 %, and 40 % methotrexate solutions corresponded to mixtures adulterated with 20 %, 40 %, and 60 % water, respectively. In all samples, the NaCl concentration was kept constant at 2 %. A segmentation method based on the Hough transform was implemented for patch extraction. An enriched dataset was generated with images from both the periphery and the center of each drop. The results show an average classification accuracy above 90 %, with greater effectiveness in detecting adulteration in the peripheral region of the drops. These preliminary results highlight the potential of deep learning for the automated detection of alterations in MTX, with implications for quality control in the pharmaceutical industry.

**Keywords:** Methotrexate, dried drops, deep learning.

### 1. Introducción

El metotrexato, análogo de la ametopterina, es un agente quimioterapéutico y supresor del sistema inmunitario, empleado principalmente para tratar padecimientos oncológicos, enfermedades autoinmunes y embarazos ectópicos [15,2]. Este tipo de compuestos, desafortunadamente, es susceptible a ser adulterado, menguando su funcionalidad y comprometiendo la salud de los pacientes [6,7]. En consecuencia, la identificación de alteraciones en su composición resulta crucial [11,24,21].

Dentro de las técnicas clásicas para el control de la calidad de medicamentos se encuentran la espectroscopía de masas (MS) [20,23], la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [12,8] y la cromatografía en capa fina (TLC) [18,13]. Estas estrategias posibilitan la cuantificación de contaminantes e impurezas, incluso en muy bajas concentraciones [21].

En épocas más recientes, un método ampliamente utilizado y prometedor para detectar estas alteraciones es el análisis de los patrones formados por gotas secas, los cuales reflejan las propiedades fisicoquímicas del medicamento [4]. Estos patrones se ven influenciados por diversos factores, por ejemplo, la composición química, las condiciones ambientales y los flujos internos generados durante la evaporación, como los flujos de Marangoni [16]. El efecto Marangoni es ocasionado por el gradiente de tensión superficial en la interfase de fluidos. Este fenómeno, inicialmente documentado por el científico James Thomson en 1855 [10], se manifiesta por la tendencia de las regiones de alta tensión superficial a atraer partículas

circundantes con mayor fuerza que las regiones de baja tensión superficial [9,1]. No obstante, la variabilidad en las estructuras resultantes dificulta su análisis con métodos convencionales como la matriz de co-ocurrencia de niveles de gris (GLCM) [14,5], que resulta insuficiente ante la complejidad de estas formaciones. Más aún, la inspección visual que suponen estos procesos es dependiente de la experiencia del personal a cargo y propensa a errores de medición, consecuencia de los límites de la naturaleza humana, a saber, la fatiga visual o el cansancio.

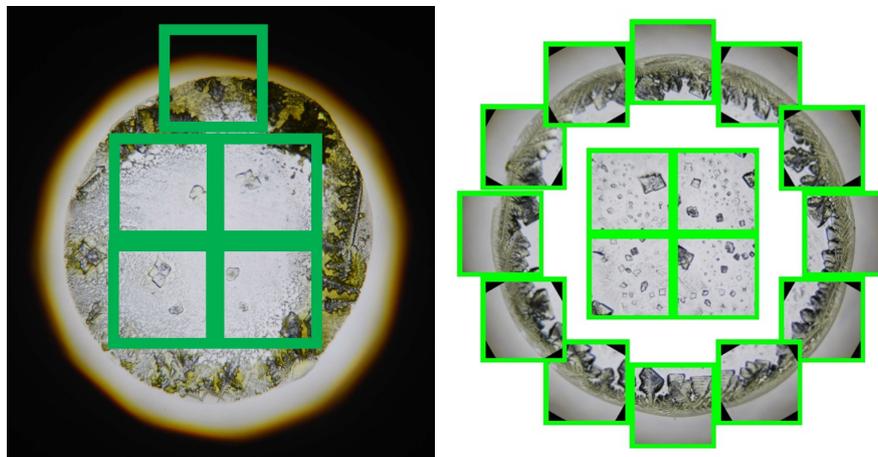
Para superar estas limitaciones, en la literatura se ha propuesto la implementación de herramientas de aprendizaje de máquina (*Machine Learning* o ML) o aprendizaje profundo (*Deep Learning* o DL). En contraste con la interpretación humana, que depende meramente de la memoria y sus capacidades físicas, las técnicas de aprendizaje de máquina “aprenden” información de bases de datos extensas. Asimismo, la información adquirida está presente casi en la totalidad del tiempo, dado que los modelos almacenan internamente los patrones aprendidos, pudiendo acceder a ella de forma automática y constante. En [22], los autores exploran las propiedades moleculares y posibles impurezas en fármacos. Dentro del estudio [19], se implementa ML para predecir efectos secundarios de diversos medicamentos, permitiendo revelar impurezas o interacciones inesperadas con otras proteínas. Por otro lado, [3] presentan un modelo de DL para analizar la actividad de moléculas de compuestos en la industria farmacéutica. Aunque ha demostrado ser una herramienta poderosa, los datos que requiere este algoritmo son privados y no están disponibles de manera pública, lo que limita su efectividad y reproducibilidad.

En este trabajo se propone el uso de aprendizaje profundo mediante redes neuronales convolucionales (CNN), específicamente la arquitectura VGG-16 [17]. Este enfoque permite una clasificación precisa de las gotas secas adulteradas de MTX, optimizando la detección de irregularidades y fortaleciendo los procesos de control de calidad en la industria farmacéutica.

Nuestros hallazgos no solo destacan el potencial del aprendizaje profundo para superar los desafíos de clasificación, sino que también proporcionan una base para implementar esta tecnología en aplicaciones de control de calidad más amplias. Este enfoque promete optimizar la detección de adulteraciones en productos farmacéuticos, garantizando estándares de calidad más altos y contribuyendo significativamente a la seguridad del paciente.

## 2. Análisis de imágenes de metotrexato

La base de datos analizada en el presente estudio representa imágenes de MTX bajo tres diferentes grados de adulteración (GA): MTX+2% agua, MTX+4% agua y MTX+6% agua. Además, se incluye un grupo control correspondiente a MTX+10% agua. Inicialmente, se observaron variaciones en la cantidad de imágenes por cada grado de adulteración. Se contaba con 128 imágenes de control, 65 de MTX+2% agua, 53 para MTX+4% agua y 48 para MTX+6% agua. Con el propósito de garantizar la coherencia y minimizar posibles sesgos,



**Fig. 1.** Estrategia de extracción de parches propuesta para cada imagen de gotas. Se muestrearon doce parches a lo largo de la circunferencia de la gota a intervalos de 30 grados, mientras que se extrajeron ocho parches adicionales de la región central (cuatro a 0 grados y cuatro a 30 grados).

todos los conjuntos se estandarizaron a 48 imágenes, coincidiendo con el grupo más pequeño.

El proceso de selección utilizó una transformada de Hough para evaluar la imagen de cada gota, conservando sólo aquellas que mejor se ajustaban a una forma circular. Por cada imagen, se extrajeron veinte parches o regiones para ampliar los conjuntos de datos y enriquecer la información disponible para el entrenamiento. Doce parches se obtuvieron a lo largo del perímetro de cada gota a intervalos de 30°, mientras que los ocho parches restantes provinieron de cuatro secciones del centro de la gota, muestreadas a 0° y 30°. La elección de rangos de 30 grados responde a la intención de explorar diversas zonas de la imagen que proporcionen datos relevantes, evitando la superposición entre ellas y, por ende, la duplicación de información. Este procedimiento se ilustra en la figura 1. A la izquierda se aprecia la localización de las regiones a extraer, cuatro centrales y una en la periferia como ejemplo. En la parte derecha se incluye una demostración de las veinte regiones analizadas en cada gota de MTX. Como resultado, cada GA se conformó por 960 imágenes en total.

### 3. Experimentación

La distribución de imágenes para la etapa de experimentación se detalla en el cuadro 1. El conjunto de entrenamiento involucra 784 imágenes (70%), 224 para prueba (20%) y 112 de validación (10%). Estos tres subconjuntos se evaluaron utilizando la red VGG-16 en una computadora equipada con un procesador AMD Ryzen 7, una unidad SSD de 1 TB y una GPU NVIDIA GeForce RTX 3050.

**Tabla 1.** Distribución de imágenes para cada GA. Algunas cantidades reflejan números decimales. Éstos corresponden a porciones de una imagen adicional. Por ejemplo, en el conjunto de entrenamiento se tienen la totalidad de parches de 33 imágenes, más el 60 % de parches de la imagen 34.

	Distribución de imágenes por GA			Total
	Entrenamiento	Validación	Prueba	
Número de Imágenes	33.6	4.8	9.6	48
Número de Parches	672	96	192	960

**Tabla 2.** Porcentajes medios de precisión (mAP) obtenidos tras la fase de entrenamiento de cada conjunto de datos de gotas con adulteración (GA).

Grado de Adulteración (GA)	Precisión Promedio en Entrenamiento (mAP)
MTX+2 % agua	0.98
MTX+4 % agua	0.99
MTX+6 % agua	0.91

El proceso de entrenamiento consistió en 30 épocas con imágenes redimensionadas a  $224 \times 224$  píxeles. Se llevaron a cabo tres experimentos principales: 1) entrenamiento de la red VGG-16 por separado para cada GA; 2) clasificación de los parches del conjunto de prueba para determinar si pertenecían a una muestra adulterada o de control; y 3) distinción de las regiones según procedieran de la periferia o del centro de la gota.

La red de clasificación VGG-16 se entrenó en tres ocasiones, una por cada GA, para diferenciar si los parches del conjunto de entrenamiento pertenecían a una gota adulterada de MTX o a una imagen de control. Se empleó la misma cantidad de imágenes de entrenamiento para los distintos GA y el grupo control, según la tabla 1.

## 4. Resultados

En la tabla 2 se presentan los resultados de entrenamiento con respecto a la media de la precisión promedio (mAP, por sus siglas en inglés). Cabe destacar que, si bien la precisión disminuye a medida que aumenta el nivel de adulteración, ésta sigue siendo notablemente alta, lo que sugiere que la red aprendió efectivamente suficientes características para distinguir entre las gotas adulteradas y las de control.

Posteriormente, el conjunto de prueba de cada GA se evaluó utilizando los modelos VGG previamente entrenados. De esta manera, fue posible comprobar la efectividad del aprendizaje de la red al presentársele imágenes inéditas, es

**Tabla 3.** Número de parches clasificados como verdadero control (VC), falso control (FC), verdadero experimental (VE) y falso experimental (FE) para todas las GA. Para todas las bases de datos, se incluye la precisión promedio de clasificación.

Grado de Adulteración (GA)	Parches VC	Parches FC	Parches VE	Parches FE	mAP
MTX+2 % agua	190	16	176	2	0.96
MTX+4 % agua	184	11	181	8	0.95
MTX+6 % agua	188	22	170	4	0.94

decir, no incluidas en la etapa de entrenamiento. De acuerdo a las predicciones, los parches de prueba se etiquetaron como verdadero control (VC), falso control (FC), verdadero experimental (VE) y falso experimental (FE), tal y como se muestra en la tabla 3. En la última columna se indican las precisiones promedio (mAP). Es evidente el predominio de las clasificaciones verdaderas sobre las falsas, lo cual se reafirma con el alto grado de precisión de clasificación en cada una de las bases de datos. Esto pone de manifiesto la eficacia del proceso de aprendizaje conseguido con el trabajo aquí presentado.

Las imágenes de cada categoría se dividieron, a su vez, en dos subgrupos: las del centro de la gota y las de la corona. La tabla 4 muestra la precisión media de la clasificación en las tres GA. En particular, los parches extraídos de las gotas experimentales obtuvieron una mayor precisión que los de las gotas de control. Estos resultados sugieren que la corona de la gota proporciona la información más confiable para identificar la presencia de adulteración. No obstante, es importante señalar que la región central también constituye una valiosa fuente de datos, especialmente cuando la información procedente del “anillo de café”, como se conoce a la corona, es insuficiente.

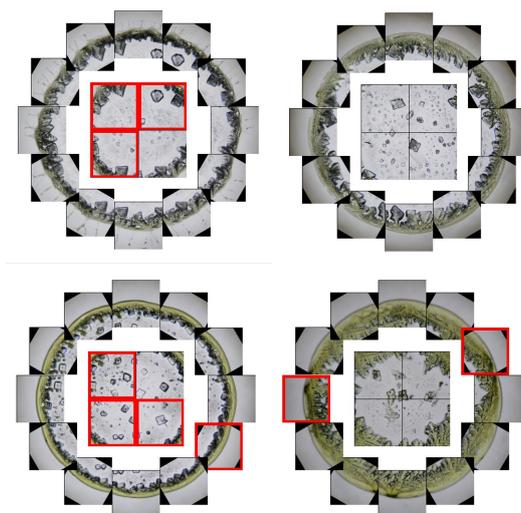
La figura 2 ejemplifica la categorización de los parches de tres gotas evaporadas junto a una imagen de control, cada una de las cuales representa un grado diferente de adulteración. Los recuadros rojos indican las regiones clasificadas como falsas (FC y FE), mientras que las áreas no enmarcadas se refieren a las zonas verdaderas (VC o VE).

## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren evidencia preliminar de que el aprendizaje profundo constituye un método confiable para clasificar gotas secas adulteradas de compuestos farmacológicos, en específico metotrexato. Nuestro método ofrece una alternativa robusta a los métodos tradicionales que enfrentan desafíos significativos, tales como las limitaciones humanas o la dependencia de bases de datos sumamente extensas o de difícil acceso. La implementación de algoritmos de CNN, en especial la red VGG-16, exhibió un desempeño altamente favorable al identificar características en las imágenes de gotas

**Tabla 4.** Precisión de clasificación de los parches del centro y de la corona. Para cada GA, los parches se agrupan en imágenes de control (arriba) e imágenes experimentales (abajo). En general, el mejor rendimiento se obtuvo con las imágenes de la periferia, mientras que las imágenes adulteradas arrojaron la mayor precisión de clasificación.

GA	Categoría	Centro	Corona	Media
MTX+2% agua	Control	0.87	0.96	0.92
MTX+4% agua	Control	0.98	0.92	0.95
MTX+6% agua	Control	0.80	0.96	0.88
Media	Control	0.88	0.95	0.92
GA	Categoría	Centro	Corona	Media
MTX+2% agua	Experimental	0.97	1.0	0.99
MTX+4% agua	Experimental	0.90	1.0	0.95
MTX+6% agua	Experimental	0.97	0.98	0.98
Media	Control	0.95	0.99	0.97



**Fig. 2.** Ejemplos de clasificaciones de parches para cada GA: 2% (arriba a la izquierda), 4% (arriba a la derecha), 6% (abajo a la izquierda) y una imagen de control (abajo a la derecha). Las regiones rojas indican parches clasificados erróneamente (FC o FE), mientras que los parches sin colorear representan clasificaciones verdaderas (FC y FE).

secas de MTX, las cuales hicieron posible diferenciar de manera correcta aquellas imágenes de MTX con adulteración de las que no se encontraban alteradas.

**Agradecimientos.** Se agradece al proyecto CONAHCYT CF-2023-G-454 por el apoyo otorgado a esta investigación. C.A.M.M. reconoce a la Universidad Tecnológica de Coahuila por las facilidades y el respaldo proporcionados.

**Contribución de los autores** Diseño de algoritmos, programación, escritura de borrador: C.A.M.M., M.C.; generación de base de datos de MTX: R.M.S.A., Y.J.P.C., J.G.G.; pruebas de laboratorio: R.M.S.A., Y.J.P.C., J.G.G.; supervisión: J.G.G., M.C.; financiamiento: J.G.G., M.C. Todos los autores participaron en la escritura del artículo y dieron su autorización en la versión final.

## Referencias

1. Abbas, M., Khan, N.: Numerical study for bioconvection in marangoni convective flow of cross nanofluid with convective boundary conditions. *Advances in Mechanical Engineering*, vol. 15, no. 11, pp. 16878132231207625 (2023)
2. American Society of Health-System Pharmacists: Methotrexate. <https://www.drugs.com/monograph/methotrexate.html> (2016), [Online; accessed 11-March-2025]
3. Cao, A., Zhang, L., Bu, Y., Sun, D.: Machine learning prediction of on/off target-driven clinical adverse events. *Pharmaceutical Research*, vol. 41, no. 8, pp. 1649–1658 (2024)
4. Carreón, Y. J., Díaz-Hernández, O., Escalera Santos, G. J., Cipriano-Urbano, I., Solorio-Ordaz, F. J., González-Gutiérrez, J., Zenit, R.: Texture analysis of dried droplets for the quality control of medicines. *Sensors*, vol. 21, no. 12, pp. 4048 (2021)
5. Carreón, Y. J., Ríos-Ramírez, M., Moctezuma, R., González-Gutiérrez, J.: Texture analysis of protein deposits produced by droplet evaporation. *Scientific reports*, vol. 8, no. 1, pp. 9580 (2018)
6. Cronstein, B. N.: The mechanism of action of methotrexate. *Rheumatic disease clinics of North America*, vol. 23, no. 4, pp. 739–755 (1997)
7. Friedman, B., Cronstein, B.: Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint bone spine*, vol. 86, no. 3, pp. 301–307 (2019)
8. Jia, H., Li, R., Li, Y., Lu, F., Ma, L., Xu, X.: Improved analysis hplc-esi/triple method for mapping the methotrexate by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, pp. 124529 (2025)
9. Khan, M. I., Qayyum, S., Chu, Y.-M., Khan, N. B., Kadry, S.: Transportation of marangoni convection and irregular heat source in entropy optimized dissipative flow. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, vol. 120, pp. 105031 (2021) doi: 10.1016/j.icheatmasstransfer.2020.105031
10. Marangoni, C.: Sull'espansione delle gocce d'un liquido galleggianti sulla superficie di altro liquido. *Fratelli Fusi* (1865)
11. Megía, M. F., ALMIÑANA, M. A., CASTERA, M. T.: Manejo de la intoxicación por metotrexato: a propósito de un caso. *FARMACIA HOSPITALARIA*, vol. 2004, no. 28/5, pp. 371 (2004)
12. Muchakayala, S. K., Katari, N. K., Saripella, K. K., Schaaf, H., Marisetti, V. M., Ettaboina, S. K., Rekulapally, V. K.: Implementation of analytical quality by design and green chemistry principles to develop an ultra-high performance liquid chromatography method for the determination of fluocinolone acetonide impurities from its drug substance and topical oil formulations. *Journal of Chromatography a*, vol. 1679, pp. 463380 (2022)

13. Nizomiddinovich, T. F., Abdimannonovich, I. S., Zoirovich, A. J.: Of organic substances by thin layer chromatographic method. *TADQIQOTLAR*, vol. 57, no. 1, pp. 19–21 (2025)
14. Pal, A., Gope, A.: Texture identification in liquid crystal-protein droplets using evaporative drying, generalized additive modeling, and k-means clustering. *The European Physical Journal E*, vol. 47, no. 5, pp. 35 (2024)
15. Puig, L.: Methotrexate: New therapeutic approaches. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, vol. 105, no. 6, pp. 583–589 (2014) doi: 10.1016/j.adengl.2014.05.011
16. Sefiane, K.: Patterns from drying drops. *Advances in colloid and interface science*, vol. 206, pp. 372–381 (2014)
17. Simonyan, K., Zisserman, A.: Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. *CoRR*, vol. abs/1409.1556 (2014)
18. Sowers, M. E., Ambrose, R., Bethea, E., Harmon, C., Jenkins, D.: Quantitative thin layer chromatography for the determination of medroxyprogesterone acetate using a smartphone and open-source image analysis. *Journal of Chromatography A*, vol. 1669, pp. 462942 (2022)
19. Staszak, M., Staszak, K., Wieszczycka, K., Bajek, A., Roszkowski, K., Tylkowski, B.: Machine learning in drug design: Use of artificial intelligence to explore the chemical structure–biological activity relationship. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, vol. 12, no. 2, pp. e1568 (2022)
20. Taupik, M., Djuwarno, E., Mustapa, M. A., Kunusa, W. R., Kilo, J., Sahumena, M. H.: The type fragmentation patterns confirmed acetaminophen by using liquid chromatography-mass spectroscopy (lcms) from herbal medicine (jamu). *Journal of Islamic Science and Technology*, vol. 7, no. 2, pp. 341–353 (2021)
21. Torregiani, L., Caro, Y. S., De Zan, M. M.: Monitorización terapéutica de metotrexato en pacientes leucémicos mediante cromatografía líquida de alta resolución. desarrollo, validación y aplicación clínica del método analítico. *Revista del Laboratorio Clínico*, vol. 11, no. 2, pp. 64–72 (2018)
22. Wallach, I., Dzamba, M., Heifets, A.: Atomnet: a deep convolutional neural network for bioactivity prediction in structure-based drug discovery. *arXiv preprint arXiv:1510.02855*, (2015)
23. Wang, Z., Hughes, N.: Simultaneous analysis of 7 antibiotics in urine by liquid chromatography triple quadruple tandem mass spectroscopy and solid phase extraction. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, vol. 78, no. 3 (2024)
24. Zhao, S. S., Bukar, N., Toulouse, J. L., Pelechacz, D., Robitaille, R., Pelletier, J. N., Masson, J.-F.: Miniature multi-channel spr instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 64, pp. 664–670 (2015) doi: 10.1016/j.bios.2014.09.082