



## Evaluación Comparativa de la Liberación *in vitro* de una Formulación de Ribavirina 200 mg Producida en Cuba contra Rebetol<sup>®</sup>, Producto Innovador

Narda M. JIMÉNEZ ALEMÁN\*, Alejandro S. PADRÓN YAQUIS & Jorge E. Calero CARBONEL

Departamento de Bioequivalencia. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).  
Ave. 26 # 1605 Esq. Puentes Grandes. Plaza de La Revolución. C. Habana. Cuba.

**RESUMEN.** Se compararon los perfiles de disolución de las cápsulas de Ribavirina 200 mg de producción nacional y del Rebetol<sup>®</sup> (laboratorios Schering-Plough), para demostrar su similitud. También se realizó la comparación en varios medios de disolución a diferentes valores de pH para evaluar una posible bioexoneración. Para la cuantificación del principio activo se utilizó un método por CLAR previamente validado. La comparación se realizó en base a los factores de diferenciación y similitud. Los resultados mostraron que no existen diferencias en los perfiles de liberación para los ensayos de producción nacional y del producto innovador, así como para los diferentes medios de disolución a los valores de pH utilizados.

**SUMMARY.** "Comparative Evaluation of *in vitro* Release of a Rivabirin 200 mg Formulation produced in Cuba against Rebetol<sup>®</sup>, an Innovative Product". Dissolution's profile of Rivabirin 200 mg capsules (CIDEM, Cuba) and Rebetol<sup>®</sup> (Schering-Plough Laboratories) were compared to demonstrate their interchangeability. Comparison was also developed using various dissolution mediums, with different pH values, in order to evaluate a possible bioexoneration. A previously validated HPLC method was used to quantify the active principle and the comparison was carried out on the basis of differentiation and similarity factors. Results showed there are no differences between the release profiles of both formulations; neither using different dissolution media.

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas formulaciones genéricas de medicamentos requiere la realización de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pongan de manifiesto que estos son capaces de aportar la misma cantidad de principio activo que los ya establecidos. La biodisponibilidad de un fármaco en un determinado medicamento o producto farmacéutico puede variar de un laboratorio a otro e incluso en un mismo laboratorio pueden apreciarse diferencias relevantes entre los distintos lotes de fabricación.

La liberación *in vitro* de un fármaco a partir de la forma farmacéutica que lo contiene depende de las características fisicoquímicas del propio fármaco, de los excipientes empleados y de la tecnología utilizada para su fabricación; aunque éste se realice bajo las mismas condiciones, las curvas de disolución de un mismo fár-

maco dosificado a la misma dosis pero en formulaciones distintas pueden ser muy diferentes<sup>1,2</sup>. Por ello los estudios comparativos de disolución *in vitro* son útiles cuando la disolución es el paso limitante de la absorción y posibles para aquellos fármacos clase II<sup>3,4</sup>; además, permiten establecer especificaciones de disolución, predecir de manera adecuada el perfil *in vivo* a través del modelo encontrado y de las condiciones de prueba (perfil *in vitro*), anticipar un evento, formulaciones nuevas, cambios en el proceso de fabricación y si está documentada la correlación *in vitro-in vivo*, es posible predecir el comportamiento *in vivo* por lo que el perfil *in vivo* predicho puede ser empleado como un sustituto de bioequivalencia y por consiguiente una posible bioexoneración<sup>5-7</sup>.

Según los criterios de la FDA, para establecer

**PALABRAS CLAVE:** Intercambiabilidad, Perfiles de disolución, Ribavirina.

**KEY WORDS:** Dissolution's profile, Interchangeability, Rivabirin.

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: tomasroberto@infomed.sld.cu

criterios de correlación de liberación *in vitro-in vivo* se determinan los factores de diferenciación ( $f_1$ ) y de similitud ( $f_2$ )<sup>8,9</sup>.

La ribavirina, también conocida como tribavirina, es un polvo cristalino de color blanco, libremente soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol anhidro. Se absorbe rápidamente, aunque no completamente, tras la administración oral, alcanzando concentraciones terapéuticas rápidamente. Posee propiedades antivirales de amplio espectro inhibiendo diferentes tipos de virus tanto en modelos *in vitro*, como en animales. Se emplea fundamentalmente en el tratamiento de herpes virus, en infecciones virales respiratorias, hepatitis viral aguda A y crónicas B y C y para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>10,11</sup>.

Este trabajo tiene como objetivo realizar la comparación de los perfiles de disolución de Ribavirina 200 mg de producción nacional contra Rebetol®, medicamento líder, con el fin de demostrar similitud en la liberación del fármaco para ambas formulaciones, confiabilidad del proceso tecnológico utilizado para su fabricación y para evaluar una posible bioexoneración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio comparativo del perfil de disolución se utilizaron tres lotes de Ribavirina producción nacional (PN) 05003, 05004 y 05005 y un lote de Rebetol® (Schering-Plough, Europa) como producto innovador identificado como 5RCJA60A01.

La comparación de los perfiles de disolución se realizó con el método de disolución reportado en la monografía para el control de la calidad del producto (agua) a los diferentes tiempos de extracción 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min. De igual forma se realizó la comparación en diferentes medios buffer: a pH 1,2 (ácido clorhídrico 0.1 N), a pH 4,5 (solución amortiguadora-acetato de amonio) y a pH 6,8 (solución de fosfatos- dihidrógeno fosfato de potasio monobásico), los cuales se prepararon como se describe en la bibliografía<sup>12</sup>; en este caso los tiempos de extracción para establecer la comparación fueron 5, 10, 15, 20 y 30 min.

Para la cuantificación del principio activo se empleó un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) que se basa en la separación selectiva de la ribavirina en presencia de los excipientes de la formulación y/o sustancias relacionadas. Se empleó un cromatógrafo líquido Knauer constituido por: desgasificador, bomba de doble pistón recíprocante, detector

UV-visible de longitud de onda variable, autoinyector Kontron e integrador acoplado a interfase con software ChromGate 2000 para el procesamiento de los datos. Se utilizó como fase estacionaria octadecilsilano de 5  $\mu\text{m}$  en un sistema isocrático de fase reversa cuya fase móvil resultó una solución de dihidrógeno fosfato de potasio monobásico 0,01M ajustada a pH 4,5 con ácido fosfórico, filtrada y desgasificada, con posterior detección ultravioleta (UV) a 207 nm, flujo de la fase móvil a 1.0 mL/min y un volumen de inyección (Loop) de 20  $\mu\text{L}$ , empleando el método del estándar externo.

Todos los reactivos empleados fueron de calidad puros para análisis y los solventes de grado HPLC (Merck).

Se utilizó un disolutor Erweka de 6 plazas con aparato 1 (cesta) y 900 mL de medio de disolución a una temperatura constante de  $37 \pm 5$  °C y 75 rpm de velocidad de agitación<sup>13,14</sup>.

Los datos de porcentaje de principio activo liberado contra tiempo para los lotes de producción nacional y el medicamento líder fueron evaluados según los criterios de la FDA para la liberación *in vitro* y se determinaron los factores de diferenciación ( $f_1$ ) y de similitud ( $f_2$ ), para lo que se establece que dos curvas son iguales si  $f_1 < 15$  y cercano a cero y si  $f_2 \leq 50$  (límite inferior) y como límite superior  $f_2$  cercanos a 100.

El procesamiento estadístico se llevó a cabo mediante el programa Microcal Origin (Versión 7.0), utilizando para el análisis de las medias un ANOVA de una sola vía con un nivel de significación de 0.05.

## RESULTADOS

En las Tablas 1 y 2 se reportan los resultados de las medias de 12 cápsulas, desviaciones estándares y coeficientes de variación de los porcentajes de Ribavirina disuelta, muestreadas a los diferentes intervalos de tiempo en cada caso. Como resultado de la comparación estadística de los perfiles de disolución entre los porcentajes de liberación para los tres lotes de Ribavirina producción nacional y de Rebetol® (Schering-Plough) para los diferentes medios de disolución reportado en la monografía para el control de la calidad y bufereados a diferentes pH (1,2, 4,5 y 6,8), demostró que no existen diferencias significativas para una probabilidad de 0.05 a todos los tiempos de muestreo. En todos los casos en 20 min se disuelve no menos del 90 % de principio activo declarado en las formulaciones.

En la Tabla 3 se reportan los resultados de

Tiempo (min)	lote 5RCJA60A01(líder)			lote 05003			lote 05004			lote 05005		
	Media	DSV	CV	Media	DSV	CV	Media	DSV	CV	Media	DSV	CV
5	55,23	17,99	32,57	50,92	9,48	18,62	48,44	12,39	25,57	57,33	12,93	22,56
10	83,6	11,82	14,13	73,33	9,54	13,01	80,74	15,09	18,69	87,25	11,89	13,63
15	94,72	2,66	2,80	89,80	10,72	11,93	93,94	8,88	9,46	91,94	8,56	9,31
20	99,18	1,23	1,24	96,97	7,83	8,08	96,94	3,91	4,03	94,10	3,60	3,83
30	99,76	1,04	1,04	98,76	4,15	4,20	98,46	2,08	2,12	97,57	3,04	3,11
45	99,29	0,91	0,92	100,07	1,83	1,83	98,86	1,70	1,72	96,83	2,28	2,35
60	98,82	1,35	1,37	98,40	2,28	2,31	96,88	2,97	3,07	97,82	1,25	1,28

**Tabla 1.** Resultados de la liberación del principio activo (expresados en %) con respecto al tiempo en el método de disolución reportado en la monografía oficial para el control de la calidad del producto. **DSV:** desviación estándar, **CV:** coeficiente de variación.

líder		Tiempo (min)														
		pH- 1,2					pH- 4,5					pH- 6,8				
		5	10	15	20	30	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30
líder	Media	55,8	95,9	99,2	99,3	100,1	38,7	67,5	88,9	95,3	99,1	39,5	77,9	92,8	98,9	99,8
	DSV	5,22	0,88	0,37	0,32	0,22	2,27	2,50	1,84	0,85	0,16	2,08	1,29	0,75	0,24	0,20
	CV	9,35	0,91	0,37	0,32	0,22	5,86	3,70	2,06	0,89	0,16	5,27	1,65	0,81	0,24	0,20
05003	Media	59,3	94,8	100,0	100,3	100,4	42,3	69,6	91,1	95,4	99,3	39,1	69,6	95,0	98,8	100,2
	DSV	2,20	1,01	0,26	0,44	0,28	4,07	3,17	1,48	1,02	0,22	1,96	1,89	0,90	0,28	0,31
	CV	3,71	1,06	0,25	0,43	0,27	9,63	4,55	1,62	1,06	0,22	5,01	2,71	0,94	0,28	0,31
05004	Media	56,6	95,7	99,2	99,1	99,9	40,8	70,8	90,7	96,0	99,2	44,6	78,9	92,1	98,6	98,6
	DSV	3,39	0,65	0,40	0,30	0,28	2,18	1,56	0,93	0,59	0,41	1,92	1,59	1,02	0,26	0,44
	CV	5,99	0,67	0,40	0,30	0,28	5,34	2,20	1,02	0,61	0,41	4,30	2,01	1,10	0,26	0,44
05005	Media	62,0	97,5	98,8	99,7	100,3	39,1	69,5	89,8	96,2	98,5	42,5	78,1	92,8	98,1	100,3
	DSV	2,83	0,72	0,51	0,20	0,27	2,41	2,25	2,04	0,86	0,46	1,54	1,62	1,05	0,56	0,44
	CV	4,56	0,73	0,52	0,20	0,27	6,16	3,23	2,27	0,89	0,47	3,62	2,07	1,13	0,57	0,43

**Tabla 2.** Resultados de la liberación del principio activo (expresados en %) con respecto al tiempo en los diferentes medios de disolución bufereados. **DSV:** desviación estándar, **CV:** coeficiente de variación.

los factores de diferenciación ( $f_1$ ) y similitud ( $f_2$ ) en la comparación de los perfiles de liberación del producto líder con los ensayos 05003, 05004 y 05005 de producción nacional en los diferentes medios de disolución. Los valores de  $f_1$  en todos los casos fue menor que 4, cercanos a cero y los de  $f_2$  se encuentran entre 65 y 76 para el agua y entre 69 y 98 para los medios de disolución a diferentes pH, todos comprendidos dentro del rango de aceptación (50-100) por las regulaciones existentes para la comparación de perfiles de disolución.

En las Figuras 1 a 4 se muestran los gráficos de los valores medios del porcentaje de Ribavirina disuelta en función del tiempo para los tres lotes pruebas y del producto de referencia. El porcentaje de principio activo disuelto a los 15

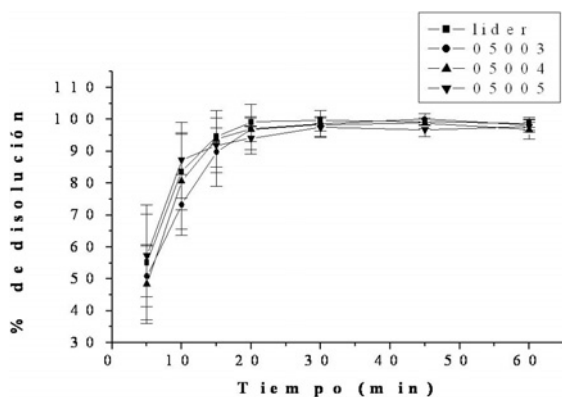
min en todos los lotes estudiados se encuentra entre 67% y 98%, aproximadamente.

## DISCUSIÓN

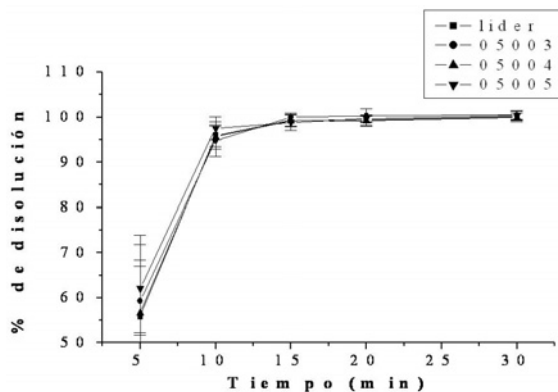
Los resultados obtenidos en los perfiles de disolución de las formulaciones de Ribavirina producida en Cuba y del producto líder demuestran que existe similitud entre ellas. La disolución de no menos del 90% del principio activo de ambas formulaciones en los primeros 20 minutos se corresponde con los límites establecidos en la monografía descrita para el control de la calidad del producto; además todos los lotes cumplen con la condición establecida por la FDA que considera como bioequivalentes a nivel de liberación, dos formas farmacéuticas iguales que contengan el mismo fármaco a la

	agua			pH- 1.2			pH- 4.5			pH- 6.8		
	05003	05004	05005	05003	05004	05005	05003	05004	05005	05003	05004	05005
$f_1$	3.54	2.59	2.44	1.08	0.39	1.78	3.09	2.59	0.93	1.53	0.96	0.68
$f_2$	65.89	74.50	75.18	84.84	98.56	75.71	72.70	83.07	91.17	69.72	78.97	88.16

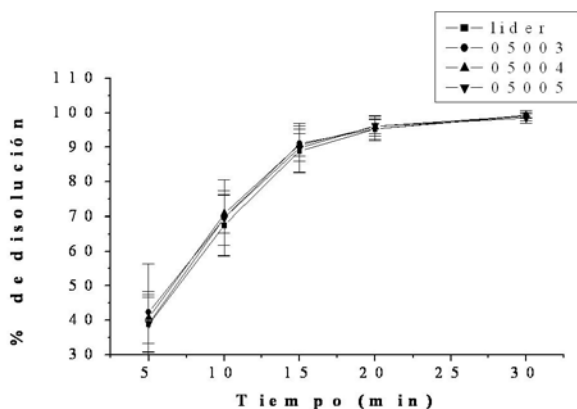
**Tabla 3.** Resultados del cálculo de los factores de diferenciación y de similitud en la comparación de los perfiles de liberación del producto líder con los ensayos 05003, 05004 y 05005 de producción nacional en los diferentes medios de disolución.  $f_1$ : factor de diferenciación,  $f_2$ : factor de similitud.



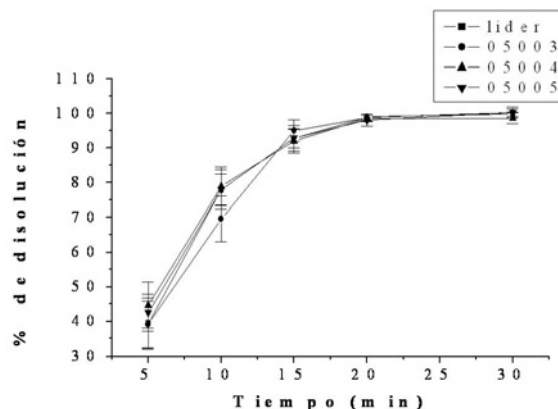
**Figura 1.** Comparación gráfica de los perfiles de liberación del producto líder con los ensayos de producción nacional en el método de disolución reportado en la monografía oficial para el control de la calidad del producto.



**Figura 2.** Comparación gráfica de los perfiles de liberación del producto líder con los ensayos de producción nacional en el medio de disolución a pH = 1.2.



**Figura 3.** Comparación gráfica de los perfiles de liberación del producto líder con los ensayos de producción nacional en el medio de disolución a pH = 4.5.



**Figura 4.** Comparación gráfica de los perfiles de liberación del producto líder con los ensayos de producción nacional en el medio de disolución a pH = 6.8.

misma dosis cuando la disolución demuestra que al menos el 60 por ciento del principio activo está solubilizado en 30 min y al menos el 85% en 1 h <sup>2,7-8</sup>. Los valores de  $f_1$  y  $f_2$  obtenidos confirman que no existen diferencias entre los perfiles de liberación de los ensayos pruebas (producción nacional) y el perfil de liberación del ensayo del producto de referencia (líder), en

el método de disolución reportado en la monografía oficial y en los bufereados a diferentes pH. La rápida disolución del principio activo en el tiempo para ambas formulaciones obedece posiblemente a que la finalidad terapéutica de este medicamento requiere de una rápida disolución (15 min según lo establecido por las autoridades reguladoras).

## CONCLUSIÓN

Existe similitud entre el perfil de liberación de las formulaciones de producción nacional ensayadas y el producto de referencia Rebetol® tanto en el medio de disolución de control de la calidad del producto como en los medios de disolución establecidos a diferentes valores de pH: 1,2, 4,5 y 6,8, demostrándose confiabilidad del proceso tecnológico utilizado para su fabricación y una posible bioexoneración.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sousa Lobo J.M.P. (2001) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **27**: 811-7.
2. Polli, J.E. (1999) *Pharm. Dev. Technol.* **4**: 89-96.
3. Emami, J. (2006) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **9**: 31-51.
4. FDA & CDER (2000) *Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage. Forms based on a Biopharmaceutics Classification System*, Disponible en URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
5. Williams, R.L. & T.S. Foster (2005) "Disolución: una perspectiva continua". En Farma. Edición especial.
6. FDA & Center for Drugs Evaluation and Research (CDER) (1997) *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*, Disponible en URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>, págs. 1-11.
7. FIP (1996) *Guidelines for dissolution testing of solid oral products*. Joint Report of the Section for Official Laboratories and Medicines Control Services and the Section of Industrial Pharmacists. *Drug Inf. J.* **30**: 1071-84.
8. Freitag, G. (2001) "Guidelines on dissolution profile comparison", *Drug Inf. J.* **35**: 865-74.
9. Ma, M.-Ch., B.C. Wang, J.-P. Liu & Y.Tsong (2000) *J. Biopharm. Stat.* **10**: 229-49.
10. Expediente del producto. N° de Registro: 1839.
11. Martindale, W. (2004) *The extra Pharmacopoeia*. MicroMedex Inc. Versión Electrónica.
12. United States Pharmacopoeia XXX (2007) "Buffer solutions". Versión electrónica.
13. Hanson, W.A. (1991) "Handbook of Dissolution Testing." 2 ed. EUA: Aster Publishing Corporation.
14. FDA (2000) *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>