

**ANDRÉ LIMA DE OLIVEIRA COSTA**

**ÉSTER 2-MORFOLINOETIL E SAL SÓDICO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO:  
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O  
CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA E COMPRIMIDOS.**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Faculdade de Farmácia**

**2009**

**ANDRÉ LIMA DE OLIVEIRA COSTA**

**ÉSTER 2-MORFOLINOETIL E SAL SÓDICO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO:  
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O  
CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA E COMPRIMIDOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares.

**Belo Horizonte**

**2009**

C837e Costa, André Lima de Oliveira  
Éster 2-morfolinoetil e sal sódico do ácido micofenólico:  
desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle  
de qualidade de matéria prima e comprimidos / André Lima de  
Oliveira Costa. – 2009.  
219 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Duarte Vianna Soares  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.  
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas.

1. Ácido micofenólico - Teses. 2. Micofenolato de mofetila -  
Teses. 3. Micofenolato de sódio - Teses. 4. Medicamentos –  
Controle de qualidade - Teses. 5. Validação de método – Teses. 6.  
Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Pianetti, Gerson  
Antônio II. Soares, Cristina Duarte Vianna III. Universidade Federal  
de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 615.19

*Dedico este trabalho à Marina, minha irmã,  
pelos momentos de força, fé  
e sabedoria.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e proteção. Pela presença constante que ilumina meu caminho.

Aos meus pais, Elza e Marcos, exemplos de força e amor. Pelo apoio em todas as situações, pela preocupação e por viverem intensamente as minhas conquistas.

À Tatá, pelo carinho, pelos cuidados e por acreditar sempre no meu sucesso.

À Paula, que esteve comigo em todas as etapas desta jornada. Pelas contribuições técnicas, pelo incentivo e pelo amor, que faz da minha vida um grande motivo de felicidade.

Ao Gerson Antônio Pianetti, meu orientador, pela oportunidade, confiança e prontidão. Professor visionário, amigo e grande exemplo de profissional farmacêutico.

À professora Cristina Duarte Vianna Soares, minha co-orientadora, pela disposição e contribuição neste trabalho. Pela atenção dedicada, pela compreensão e amizade.

À professora Maria Auxiliadora Fontes Prado que contribuiu nos experimentos de extração e análise de ressonância magnética nuclear.

À professora Maria Irene Yoshida que ajudou nas análises térmicas.

Às professoras Lígia Maria Moreira de Campos e Elzília de Aguiar Nunan, que participaram da minha formação acadêmica na área do controle de qualidade.

Ao Tiago Assis Miranda, índio, pela vital contribuição nas análises. Pela disposição, dedicação e pró-atividade.

Aos farmacêuticos do Laboratório de Controle de Qualidade: Fernando, Isabela, Ana Gabriela, José Antônio, Paula, Taízia, Giovanni, André Nascimento, Marcelo, Flávia, Betânia, Miriam, Tânia e Sônia. Pela amizade, convivência e discussões técnicas.

Ao Leonardo, Diego, Gustavo, Luciano e Écio, pelo companheirismo.

Aos amigos da Fundação Ezequiel Dias, pela amizade, convivência e contribuições técnicas.

À Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, pelo fornecimento dos medicamentos. Ao Augusto Afonso Guerra Júnior, Kleyde de Carvalho Teixeira, Maria Helena Lemos Gontijo e Élide Lúcia Carvalho Martins pelo apoio ao projeto.

Ao Laboratório Sanval pelo fornecimento das matérias-primas. Marco Aurélio e Janaína Duarte pela disposição.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG pela presteza e convivência desde os tempos da graduação.

À Farmacopéia Brasileira pelo apoio ao projeto.

Por isso eu pergunto  
A vocês no mundo  
Se é mais inteligente  
O livro ou a sabedoria

O mundo é uma escola  
A vida é o circo  
Amor palavra que liberta  
Já dizia o Profeta

*Marisa Monte*

## RESUMO

O ácido micofenólico (MPA) é um inibidor seletivo, não-competitivo e reversível da enzima monofosfato de inosina desidrogenase, sendo comercializado como pró-fármaco na forma de micofenolato de mofetila (MMF) em formulação de comprimidos de liberação imediata e na forma de micofenolato de sódio (MSD) em formulação de comprimidos gastrorresistentes. Ambos os derivados de MPA são utilizados na terapia de imunossupressão em pós-transplantes. A determinação de parâmetros de qualidade para matérias-primas e comprimidos dos derivados do MPA é importante para viabilizar ações de fiscalização sanitária e favorecer medidas de implementação da produção de comprimidos de MMF e MSD nos laboratórios oficiais da rede pública. A qualidade de MMF matéria-prima foi avaliada de acordo com testes físico-químicos estabelecidos na Farmacopéia Européia. Método por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para quantificação de MMF e produtos de degradação (hidrólise) em comprimidos. Método alternativo por espectrofotometria no ultravioleta foi utilizado para quantificação de MMF em comprimidos. Os métodos foram equivalentes quanto à precisão e exatidão, entretanto o método espectrofotométrico não é seletivo para as impurezas. O perfil de dissolução de MMF comprimidos foi avaliado utilizando medicamento genérico e referência em diferentes meios de dissolução (HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0) com pás 50 rpm. Os dois produtos apresentaram dissolução (n = 12) superior a 85% em 15 minutos nas condições estabelecidas, demonstrando que o princípio ativo é facilmente liberado pelas formulações. Testes físico-químicos quanto à identidade, pureza e teor foram propostos para MSD matéria-prima. Método por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para quantificação de MSD em matéria-prima e comprimidos. Método por espectrofotometria no ultravioleta foi desenvolvido e validado para o doseamento de MSD em comprimidos e demonstrou-se equivalente quanto à precisão e exatidão em comparação ao método cromatográfico. A resistência do revestimento entérico dos comprimidos de MSD ao fluido gástrico foi verificada qualitativamente no teste de desintegração e quantitativamente no teste de dissolução. A liberação do princípio ativo em tampão fosfato foi avaliada em pH 5,5 , 6,0 e 6,8. Monografias farmacopéicas foram propostas para MMF e MSD matéria-prima e comprimidos com base nos dados experimentais obtidos.

**Palavras-chave:** ácido micofenólico, micofenolato de mofetila, micofenolato de sódio, revestimento entérico, controle de qualidade, CLAE, espectrofotometria no ultravioleta, dissolução.

## ABSTRACT

Mycophenolic acid (MPA) is a specific, non-competitive and reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase. It is marketed as pro-drug mycophenolate mofetil (MMF) in immediate release tablets, as well as sodium mycophenolic (MSD) in enteric-coated tablets formulation. The derivatives of MPA are used in the immunosuppression therapy of post-transplant patients. The evaluation of the quality parameters for drug substance and tablets containing the derivatives of MPA is important to surveillance actions, regulatory matters and to promote national manufacturing by the public official laboratories. The quality of MMF drug substance was evaluated according to physicalchemical tests described in European Pharmacopoeia. An assay method for MMF and its degradation products (hydrolysis) in tablets using high performance liquid chromatography was developed and validated. Alternative method by ultraviolet spectrophotometry was used to assay MMF in tablets. The methods were equivalent on precision and accuracy, however, the spectrophotometric method is not selective for impurities. The dissolution profile of MMF tablets was evaluated using generic and reference drugs at different conditions (HCl 0.1 mol/l, HCl 0.01 mol/l and phosphate buffer 0.1 mol/l pH 3.0) with paddles 50 rpm. Both products showed dissolution (n = 12) greater than 85% in 15 minutes, demonstrating that the drug is easily released by formulations. Physicalchemical tests concerning the identity, purity and assay for analysis of MSD drug substance was proposed. A method using high performance liquid chromatography was developed and validated to assay MSD in drug substance and tablets. A method by ultraviolet spectrophotometry was also developed and validated to assay MSD in tablets, and showed the same precision and accuracy compared to the chromatography method. The resistance of the enteric coating tablets at gastric fluid was checked qualitatively on disintegration test and quantitatively on dissolution test. The release of the drug was evaluated in phosphate buffer solution at pH 5.5 , 6.0 and 6.8. Pharmacopoeial monographs were proposed for MMF and MSD drug substance and tablets based on the obtained experimental data.

**Keywords:** mycophenolic acid, mycophenolate mofetil, sodium mycophenolic, enteric-coated, quality control, HPLC, ultraviolet spectrophotometry, dissolution.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Atuação dos agentes imunossupressores nas etapas do ciclo de ação imunológica em transplantes (adaptado de ROITT <i>et al.</i> , 2003).....	39
<b>Figura 2</b> - Inibição da proliferação linfocitária induzida pelo ácido micofenólico (SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005).....	40
<b>Figura 3</b> - Transformação de micofenolato de mofetila em seu principal metabólito via catálise enzimática (RENNER <i>et al.</i> , 2001). ....	42
<b>Figura 4</b> - Distribuição mensal de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg, micofenolato de sódio 360 mg e micofenolato de sódio 180 mg pela SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008.....	45
<b>Figura 5</b> - Custo da distribuição mensal de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg, micofenolato de sódio 360 mg e micofenolato de sódio 180 mg da SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008.....	46
<b>Figura 6</b> - Custo unitário de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg de acordo com os preços praticados nos contratos da SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008. ....	47
<b>Figura 7</b> - Variações do custo no tratamento individual pós-transplante com micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio, de acordo com os preços praticados nos contratos da SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008. ....	48
<b>Figura 8</b> - Solubilidades aquosas do ácido micofenólico, micofenolato de mofetila, acetil-micofenolato de mofetila e acetil-isopropilideno glicerol em função do pH a 25 °C (LEE <i>et al.</i> , 1990).....	50
<b>Figura 9</b> - Estruturas moleculares do (I) ácido micofenólico, (II) micofenolato de mofetila e (III) micofenolato de sódio.....	51
<b>Figura 10</b> - Estruturas moleculares dos produtos de degradação térmica e oxidativa de micofenolato de mofetila em solução aquosa com diferentes valores de pH (HOOIJMAAIJER <i>et al.</i> ,1999).....	52
<b>Figura 11</b> - Estruturas moleculares das substâncias relacionadas descritas para micofenolato de mofetila matéria-prima (THE EUROPEAN..., 2007).....	53
<b>Figura 12</b> - Equação da reação entre MMF e o titulante ácido perclórico 0,1 mol/l SV em meio não aquoso.....	68

<b>Figura 13</b> - Espectro infravermelho de micofenolato de mofetila matéria-prima (superior) e substância química de referência (inferior). .....	104
<b>Figura 14</b> - Espectro infravermelho do padrão de ácido micofenólico. ....	104
<b>Figura 15</b> - Espectro infravermelho de micofenolato de sódio matéria-prima. ....	104
<b>Figura 16</b> - Espectro ultravioleta de micofenolato de mofetila matéria-prima 25 µg/ml em HCl 0,1 mol/l. ....	106
<b>Figura 17</b> - Espectro ultravioleta de micofenolato de sódio matéria-prima 18 µg/ml em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8. ....	106
<b>Figura 18</b> - Espectro ultravioleta do padrão de ácido micofenólico 18 µg/ml em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8. ....	107
<b>Figura 19</b> - Curvas de análise térmica diferencial derivada, termogravimetria e termogravimetria derivada de (A) micofenolato de mofetila matéria-prima, (B) micofenolato de sódio matéria-prima e (C) ácido micofenólico padrão, obtidas por técnica simultânea em fluxo de nitrogênio 50 ml/min e razão de aquecimento 10 °C/min. ....	109
<b>Figura 20</b> - Cromatograma da substância química de referência de micofenolato de mofetila para identificação de impurezas no ensaio de substâncias relacionadas. ....	110
<b>Figura 21</b> - Cromatograma obtido para <i>solução teste</i> de MMF matéria-prima no ensaio de substâncias relacionadas. ....	112
<b>Figura 22</b> - Cromatograma obtido para <i>solução (a)</i> de MMF matéria-prima no ensaio de substâncias relacionadas. ....	112
<b>Figura 23</b> - Cromatograma representativo de micofenolato de mofetila matéria-prima dessecado durante 5 horas a 60 °C sob vácuo, obtido nas condições descritas em 5.1.3.3. ....	113
<b>Figura 24</b> - Cromatogramas de micofenolato de sódio matéria-prima obtidos em diferentes condições de análise (seção 5.1.5.1, Tabela 7). ....	117
<b>Figura 25</b> - Cromatograma representativo da solução de micofenolato de sódio matéria-prima 36 µg/ml em fase móvel. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm. ....	118
<b>Figura 26</b> - Cromatogramas representativos das soluções de micofenolato de sódio matéria-prima 36 µg/ml em mistura de metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45) e no diluente metanol e água (55:45), injetadas 24 horas após o preparo. Condições	

cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm. ....	119
<b>Figura 27</b> - Cromatogramas das soluções de micofenolato de sódio matéria-prima após hidrólise em (A) HCl 0,1 mol/l, (B) água e (C) NaOH 0,1 mol/l sob refluxo durante 60 minutos. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm.....	120
<b>Figura 28</b> - Cromatograma da solução de micofenolato de sódio 360 µg/ml preparada após 120 dias de exposição da matéria-prima à temperatura, luz e umidade do ambiente. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm.....	121
<b>Figura 29</b> - Curva analítica de micofenolato de sódio para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.....	122
<b>Figura 30</b> - Cromatogramas das soluções de ácido micofenólico padrão (superior) e micofenolato de sódio matéria-prima (inferior). Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm. ....	123
<b>Figura 31</b> - Cromatograma da solução de micofenolato de sódio matéria-prima 0,015 µg/ml. ....	125
<b>Figura 32</b> - Cromatograma da solução de micofenolato de sódio matéria-prima 0,038 µg/ml. ....	126
<b>Figura 33</b> - Espectro infravermelho do resíduo de micofenolato de mofetila. ....	127
<b>Figura 34</b> - Espectro ultravioleta do resíduo de micofenolato de mofetila 25 µg/ml em HCl 0,1 mol/l.....	128
<b>Figura 35</b> - Espectro RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.....	129
<b>Figura 36</b> - Espectro RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.....	130
<b>Figura 37</b> - Cromatograma da solução teste do resíduo de micofenolato de mofetila obtido no ensaio de substâncias relacionadas. ....	131
<b>Figura 38</b> - Cromatograma da solução de (A) micofenolato de mofetila SQR e das soluções amostra de (B) CellCept <sup>®</sup> e (C) medicamento genérico nas condições cromatográficas descritas em 5.3.6.....	132
<b>Figura 39</b> - Cromatograma das soluções de ácido micofenólico padrão (superior) e amostra de Myfortic <sup>®</sup> (inferior) nas condições cromatográficas descritas em 5.1.5.	133

<b>Figura 40</b> - Sobreposição dos espectros de absorção na faixa $\lambda$ 200 a 400 nm das soluções placebo e amostra de micofenolato de mofetila 25 $\mu\text{g/ml}$ em HCl 0,1 mol/l.....	135
<b>Figura 41</b> - Curva analítica de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta. ....	135
<b>Figura 42</b> - Variações no tempo de retenção de micofenolato de mofetila e ácido micofenólico em função do pH da solução de trietilamina 0,3%. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 0,3% (35:65), fluxo 1,5 ml/min, coluna $C_8$ a 45 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm. ....	138
<b>Figura 43</b> - Cromatogramas de micofenolato de mofetila obtidos em diferentes condições de análise (seção 5.3.6.1). ....	140
<b>Figura 44</b> - Cromatogramas das soluções placebo e padrão de micofenolato de mofetila. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna $C_8$ a 45 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm. ....	141
<b>Figura 45</b> - Cromatograma da solução de micofenolato de mofetila 500 $\mu\text{g/ml}$ preparada após 120 dias de exposição do fármaco à temperatura, luz e umidade do ambiente. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna $C_8$ a 45 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm. ....	141
<b>Figura 46</b> - Cromatogramas representativos da hidrólise de micofenolato de mofetila em HCl 0,1 mol/l sob refluxo nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna $C_8$ a 45 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm. ....	142
<b>Figura 47</b> - Porcentagens relativas das áreas do pico de micofenolato de mofetila e de seus produtos de degradação provenientes dos cromatogramas da hidrólise em HCl 0,1 mol/l sob refluxo durante 120 minutos.....	143
<b>Figura 48</b> - Cromatograma representativo da hidrólise do ácido micofenólico em HCl 0,1 mol/l sob refluxo durante 60 minutos. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna $C_8$ a 45 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm.....	144
<b>Figura 49</b> - Curva analítica de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	144
<b>Figura 50</b> - Cromatograma da solução de micofenolato de mofetila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ .....	147
<b>Figura 51</b> - Cromatograma da solução de micofenolato de mofetila 0,3 $\mu\text{g/ml}$ .....	148

<b>Figura 52</b> - Valores das áreas do pico de MMF obtidos pela injeção de solução a 50 µg/ml em fase móvel nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas após o preparo. ....	148
<b>Figura 53</b> - Sobreposição dos espectros de absorção na faixa $\lambda$ 200 a 400 nm da solução placebo e da solução de MSD, equivalente a 18 µg/ml de MPA, em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8. ....	151
<b>Figura 54</b> - Curva analítica de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta. ....	151
<b>Figura 55</b> - Cromatogramas das soluções placebo e micofenolato de sódio padrão de trabalho. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 30 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm. ....	154
<b>Figura 56</b> - Curva analítica de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	155
<b>Figura 57</b> - Sobreposição dos cromatogramas das amostras de CellCept <sup>®</sup> e medicamento genérico obtidos a partir da injeção de 25 µl de solução 500 µg/ml de micofenolato de mofetila. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna C <sub>8</sub> a 45 °C e detecção em $\lambda$ 250 nm. ....	159
<b>Figura 58</b> - Sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão de ácido micofenólico (MPA) e micofenolato de mofetila SQR (MMF) utilizadas na quantificação de impurezas em comprimidos de micofenolato de mofetila. ....	162
<b>Figura 59</b> - Curvas analíticas de (A) ácido micofenólico e (B) micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de quantificação de impurezas por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	163
<b>Figura 60</b> - Cromatograma da solução padrão de ácido micofenólico 0,15 µg/ml. .	164
<b>Figura 61</b> - Cromatograma da solução padrão de ácido micofenólico 0,50 µg/ml. .	164
<b>Figura 62</b> - Perfis de dissolução preliminares para comprimidos de CellCept <sup>®</sup> 500 mg em diferentes meios de dissolução, utilizando sistema de agitação com pás 50 rpm. ....	166
<b>Figura 63</b> - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de HCl 0,1 mol/l a (37 ± 0,5) °C e sistema de agitação pás 50 e 75 rpm. ....	168
<b>Figura 64</b> - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de HCl 0,01 mol/l a (37 ± 0,5) °C e sistema de agitação pás 50 e 75 rpm. ....	168
<b>Figura 65</b> - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 a (37 ± 0,5) °C e sistema de agitação pás 50 e 75 rpm. ....	169

<b>Figura 66</b> - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de diferentes meios a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás em velocidades de 50 rpm. ....	170
<b>Figura 67</b> - Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta na faixa $\lambda$ 200 a 400 nm da solução placebo e da solução de MMF padrão de trabalho 25 $\mu$ g/ml em (A) HCl 0,01 mol/l e (B) tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0. ....	173
<b>Figura 68</b> - Curvas analíticas de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método espectrofotométrico em (A) HCl 0,01 mol/l e (B) tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0. ....	173
<b>Figura 69</b> - Valores de absorvâncias das soluções de micofenolato de mofetila nos meios HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0, para verificação da estabilidade durante 60 minutos a $(37 \pm 0,5)$ °C. ....	174
<b>Figura 70</b> - Perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,1 mol/l a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás 50 rpm. ....	175
<b>Figura 71</b> - Perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,01 mol/l a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás 50 rpm. ....	175
<b>Figura 72</b> - Perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás 50 rpm. ....	176
<b>Figura 73</b> - Perfil de dissolução de comprimidos de Myfortic <sup>®</sup> obtido a partir de seis unidades, sistema de agitação pás 50 rpm e de acordo com o procedimento do Método A para dissolução de comprimidos com revestimento entérico (THE UNITED STATES..., 2009). ....	178
<b>Figura 74</b> - Perfis de dissolução de comprimidos de Myfortic <sup>®</sup> obtidos em diferentes condições. ....	179
<b>Figura 75</b> -. Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta na faixa $\lambda$ 200 a 400 nm da solução placebo e da solução de MSD, equivalente a 18 $\mu$ g/ml de MPA, em tampão fosfato 0,05 mol/l (A) pH 6,0 e (B) pH 5,5. ....	182
<b>Figura 76</b> - Curvas analíticas de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método espectrofotométrico em tampão fosfato 0,05 mol/l (A) pH 6,0 e (B) pH 5,5. ....	183

**Figura 77** - Valores de absorvâncias das soluções de micofenolato de sódio nos meios tampão fosfato 0,05 mol/l pH 5,5, 6,0 e 6,8 para verificação da estabilidade durante 120 minutos a 37 °C..... 183

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Quantidade mensal máxima por tratamento individual e valor unitário financiado pela União no fornecimento de comprimidos de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio. ....	47
<b>Tabela 2</b> - Limiar para produtos de degradação em novos medicamentos. ....	55
<b>Tabela 3</b> - Condições cromatográficas para determinação de micofenolato de mofetila, ácido micofenólico, impurezas e metabólitos.....	57
<b>Tabela 4</b> - Termos descritivos de solubilidade de acordo com a Farmacopéia Brasileira. ....	63
<b>Tabela 5</b> - Tempos de retenção relativos e limites para impurezas em micofenolato de mofetila matéria-prima.....	66
<b>Tabela 6</b> - Condições cromatográficas estabelecidas para a determinação do teor de micofenolato de sódio matéria-prima. ....	69
<b>Tabela 7</b> - Condições cromatográficas testadas para determinação do teor de micofenolato de sódio matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência. ...	69
<b>Tabela 8</b> - Parâmetros e especificações de conformidade do sistema para métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (BRUCE <i>et al.</i> , 1998; SNYDER <i>et al.</i> , 1997).....	70
<b>Tabela 9</b> - Preparo das soluções de micofenolato de sódio matéria-prima para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	71
<b>Tabela 10</b> - Preparo das soluções fortificadas para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.....	72
<b>Tabela 11</b> - Condições cromatográficas utilizadas para verificação da robustez do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	74
<b>Tabela 12</b> - Formulação simulada para comprimidos de micofenolato de mofetila...	79
<b>Tabela 13</b> - Preparo das soluções de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta. ....	80
<b>Tabela 14</b> - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. ....	81

<b>Tabela 15</b> - Condições cromatográficas estabelecidas para a determinação do teor de micofenolato de mofetila em comprimidos. ....	83
<b>Tabela 16</b> - Preparo das soluções de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	85
<b>Tabela 17</b> - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	86
<b>Tabela 18</b> - Condições cromatográficas utilizadas para verificação da robustez do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	87
<b>Tabela 19</b> - Formulação simulada para comprimidos de micofenolato de sódio.....	89
<b>Tabela 20</b> - Preparo das soluções de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método por espectrofotometria no ultravioleta.....	90
<b>Tabela 21</b> - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. ....	91
<b>Tabela 22</b> - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	93
<b>Tabela 23</b> - Preparo das soluções do placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de quantificação de ácido micofenólico em comprimidos de micofenolato de mofetila. ....	97
<b>Tabela 24</b> - Atribuições das principais bandas de absorção de micofenolato de mofetila no infravermelho .....	105
<b>Tabela 25</b> - Atribuições das principais bandas de absorção de ácido micofenólico no infravermelho.....	105
<b>Tabela 26</b> - Atribuições das principais bandas de absorção de micofenolato de sódio no infravermelho.....	105
<b>Tabela 27</b> - Determinação da temperatura de fusão de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matérias-primas.....	107
<b>Tabela 28</b> - Atribuições e parâmetros cromatográficos dos picos das impurezas de micofenolato de mofetila obtidos no cromatograma da <i>solução (b)</i> do método de substâncias relacionadas. ....	111

<b>Tabela 29</b> - Quantificação da impureza F na amostra de micofenolato de mofetila matéria-prima. ....	112
<b>Tabela 30</b> - Porcentagens da perda por dessecação de micofenolato de mofetila matéria-prima, a 60 °C sob vácuo. ....	113
<b>Tabela 31</b> - Porcentagens de perda por dessecação de micofenolato de sódio matéria-prima a 105 °C. ....	114
<b>Tabela 32</b> - Resultados da precisão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em matéria-prima por volumetria de neutralização em meio não aquoso..	116
<b>Tabela 33</b> - Parâmetros de conformidade do sistema resultantes dos cromatogramas de micofenolato de sódio matéria-prima em diferentes condições de análise (seção 5.1.5.1, Tabela 7). ....	117
<b>Tabela 34</b> - Porcentagens de recuperação das quantidades do padrão de ácido micofenólico incorporadas à matéria-prima de micofenolato de sódio para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	122
<b>Tabela 35</b> - Resultados da precisão do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.....	124
<b>Tabela 36</b> - Resultado da injeção, em quintuplicata, da solução padrão de ácido micofenólico para avaliação da adequação do sistema. ....	124
<b>Tabela 37</b> – Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em matéria-prima para verificação da robustez do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	125
<b>Tabela 38</b> - Determinação da temperatura de fusão do resíduo de micofenolato de mofetila.....	127
<b>Tabela 39</b> - Atribuição dos sinais do espectro RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.....	129
<b>Tabela 40</b> - Atribuição dos sinais do espectro RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.....	130
<b>Tabela 41</b> - Quantificação da impureza F no resíduo de micofenolato de mofetila.	131
<b>Tabela 42</b> - Resultados da determinação de peso para comprimidos de CellCept <sup>®</sup> , medicamento genérico de micofenolato de mofetila e Myfortic <sup>®</sup> . ....	133
<b>Tabela 43</b> - Resultados do teste de dureza dos comprimidos de CellCept <sup>®</sup> , medicamento genérico de micofenolato de mofetila e Myfortic <sup>®</sup> . ....	134

<b>Tabela 44</b> - Porcentagens de recuperação das quantidades de micofenolato de mofetila incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.....	136
<b>Tabela 45</b> - Resultados da determinação do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® para avaliação da precisão do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta. ....	137
<b>Tabela 46</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® em equipamentos distintos para verificação da robustez do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.....	137
<b>Tabela 47</b> - Parâmetros de conformidade do sistema resultantes dos cromatogramas de micofenolato de sódio em diferentes condições de análise (seção 5.3.6.1).....	140
<b>Tabela 48</b> - Porcentagens de recuperação das quantidades de micofenolato de mofetila incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	145
<b>Tabela 49</b> - Resultados da determinação do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® para avaliação da precisão do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	146
<b>Tabela 50</b> - Resultado da injeção, em quintuplicata, da solução padrão de micofenolato de mofetila para avaliação da adequação do sistema. ....	146
<b>Tabela 51</b> - Resultado das determinações do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® para verificação da robustez do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	147
<b>Tabela 52</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de mofetila no medicamento genérico, utilizando os métodos de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta. ....	150
<b>Tabela 53</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de mofetila obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos de CellCept® e medicamento genérico, utilizando o método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta. ....	150
<b>Tabela 54</b> - Porcentagens de recuperação de quantidades de ácido micofenólico incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. ....	152

<b>Tabela 55</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic <sup>®</sup> , expresso em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, para avaliação da precisão do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.....	153
<b>Tabela 56</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic <sup>®</sup> , expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, em equipamentos distintos, para verificação da robustez do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta. ....	154
<b>Tabela 57</b> - Porcentagens de recuperação de quantidades de ácido micofenólico incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	155
<b>Tabela 58</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic <sup>®</sup> , expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, para avaliação da precisão do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	156
<b>Tabela 59</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic <sup>®</sup> , expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, para verificação da robustez do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	157
<b>Tabela 60</b> - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio, expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos de Myfortic <sup>®</sup> utilizando o método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.....	158
<b>Tabela 61</b> - Quantificação de ácido micofenólico em comprimidos de micofenolato de mofetila por comparação da resposta obtida com solução de ácido micofenólico padrão. ....	160
<b>Tabela 62</b> - Quantificação de ácido micofenólico em comprimidos de micofenolato de mofetila por comparação da resposta obtida com solução de micofenolato de mofetila SQR.....	161
<b>Tabela 63</b> - Valor médio das áreas e desvio padrão relativo das injeções em quintuplicata das soluções padrão de ácido micofenólico e micofenolato de mofetila SQR utilizadas na quantificação de impurezas em comprimidos de micofenolato de mofetila.....	161

<b>Tabela 64</b> - Porcentagens de recuperação das quantidades de ácido micofenólico incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de quantificação da impureza em comprimidos de micofenolato de mofetila.....	163
<b>Tabela 65</b> - Valores de área de ácido micofenólico nas soluções amostra de CellCept <sup>®</sup> , injetadas após diferentes condições de armazenamento. ....	165
<b>Tabela 66</b> - Comparação das velocidades de agitação das pás na dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de HCl 0,1 mol/l. ....	168
<b>Tabela 67</b> - Comparação das velocidades de agitação das pás na dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de HCl 0,01 mol/l. ....	169
<b>Tabela 68</b> - Comparação das velocidades de agitação das pás na dissolução de comprimidos de CellCept <sup>®</sup> em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.....	169
<b>Tabela 69</b> - Valores de F experimentais entre as médias dos valores de porcentagem de MMF dissolvidas em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, em 900 ml dos meios: HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0. ....	170
<b>Tabela 70</b> - Teste de <i>Duncan</i> ( $\alpha = 0,05$ ) entre os valores de porcentagem de MMF dissolvidas em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, em 900 ml dos meios: HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.....	172
<b>Tabela 71</b> - Comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,1 mol/l a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás 50 rpm. ....	175
<b>Tabela 72</b> - Comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,01 mol/l a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás 50 rpm. ....	176
<b>Tabela 73</b> - Comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 a $(37 \pm 0,5)$ °C e sistema de agitação pás 50 rpm.....	176
<b>Tabela 74</b> - Comparação entre os perfis de dissolução de comprimidos de Myfortic <sup>®</sup> obtidos em diferentes meios de dissolução.....	179
<b>Tabela 75</b> - Comparação entre as velocidades de agitação na dissolução de comprimidos de Myfortic <sup>®</sup> .....	180

**Tabela 76** - Valores de F calculados entre as médias dos valores de porcentagem de MPA dissolvidos em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, nos meios de tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8 , 6,0 e 5,5. .... 180

**Tabela 77** - Teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ) entre os valores de porcentagem de MPA dissolvidos em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, nos meios de tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8 , 6,0 e 5,5. .... 181

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcMPAG	MPA-acil-glucuronídio
ACN	Acetonitrila
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Anova	Análise de variância
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMDE	Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional da Assistência Farmacêutica
CV	Coeficiente de variação
C <sub>8</sub>	Octilsilano
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMS	Diferença mínima significativa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio padrão relativo
DTA	Análise térmica diferencial derivada
DTG	Termogravimetria derivada
EMIT	<i>Enzyme Multiplied Immunoassay Technique</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlations</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlations</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IMPDH	Monofosfato de inosina desidrogenase
LD <sub>50</sub>	Dose letal
MMF	Micofenolato de mofetila
MPA	Ácido micofenólico
MPAG	7-o-glucuronídio
MSD	Micofenolato de sódio
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	- log Ka
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

Rename	Reação Nacional de Medicamentos Essenciais
RNA	Ácido ribonucleico
SES-MG	Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais
SIA/SUS	Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
SQR	Substância química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde
SV	Solução volumétrica
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Termogravimetria
TMS	Tetrametilsilano
trr	Tempo de retenção relativo
UGT	UDP-glucuronosil-transferase
UV/DAD	Detector ultravioleta com arranjo de diodos
$\alpha$	Nível de significância
$\lambda$	Comprimento de onda
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	34
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38
2.1	Terapia de imunossupressão.....	38
2.2	Ácido micofenólico e derivados.....	39
2.2.1	<i>Farmacodinâmica</i> .....	39
2.2.2	<i>Farmacocinética</i> .....	40
2.2.3	<i>Reações adversas</i> .....	42
2.2.4	<i>Distribuição e custo de comprimidos de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio</i> .....	43
2.2.5	<i>Monitoração terapêutica</i> .....	49
2.2.6	<i>Características físico-químicas</i> .....	49
2.2.7	<i>Impurezas</i> .....	51
2.2.8	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	55
3	OBJETIVOS .....	59
3.1	Objetivo geral.....	59
3.2	Objetivos específicos .....	59
4	MATERIAL .....	60
4.1	Padrões.....	60
4.2	Amostras.....	60
4.3	Reagentes e vidrarias .....	60
4.4	Equipamentos .....	61
5	MÉTODOS .....	63
5.1	Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matéria-prima.....	63
5.1.1	<i>Descrição</i> .....	63
5.1.1.1	<i>Características físicas</i> .....	63
5.1.1.2	<i>Solubilidade</i> .....	63
5.1.2	<i>Identificação</i> .....	64
5.1.2.1	<i>Espectrofotometria no infravermelho</i> .....	64
5.1.2.2	<i>Espectrofotometria no ultravioleta</i> .....	64
5.1.2.3	<i>Íon sódio</i> .....	64
5.1.3	<i>Ensaio de pureza</i> .....	65

5.1.3.1	<i>Temperatura de fusão</i> .....	65
5.1.3.2	<i>Análise térmica</i> .....	65
5.1.3.3	<i>Substâncias relacionadas de micofenolato de mofetila matéria-prima</i> .....	65
5.1.3.4	<i>Perda por dessecação</i> .....	67
5.1.3.5	<i>Cinzas sulfatadas</i> .....	67
5.1.3.6	<i>Ensaio-limite para metais pesados</i> .....	67
5.1.4	<i>Determinação do teor de micofenolato de mofetila por volumetria de neutralização em meio não aquoso (THE EUROPEAN..., 2007)</i> .....	68
5.1.4.1	<i>Precisão</i> .....	68
5.1.5	<i>Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	69
5.1.5.1	<i>Determinação das condições cromatográficas</i> .....	69
5.1.5.2	<i>Seletividade</i> .....	70
5.1.5.3	<i>Linearidade</i> .....	71
5.1.5.4	<i>Exatidão</i> .....	71
5.1.5.5	<i>Precisão</i> .....	73
5.1.5.6	<i>Robustez</i> .....	74
5.1.5.7	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	74
5.2	<i>Obtenção, identificação e caracterização de micofenolato de mofetila a partir da matriz de comprimido</i> .....	75
5.2.1	<i>Obtenção de micofenolato de mofetila</i> .....	75
5.2.2	<i>Identificação e caracterização do resíduo</i> .....	75
5.2.2.1	<i>Temperatura de fusão</i> .....	76
5.2.2.2	<i>Espectrofotometria no infravermelho</i> .....	76
5.2.2.3	<i>Espectrofotometria no ultravioleta</i> .....	76
5.2.2.4	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C)</i> .....	76
5.2.2.5	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	76
5.3	<i>Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio comprimidos</i> .....	77
5.3.1	<i>Identificação</i> .....	77
5.3.2	<i>Determinação de peso</i> .....	77
5.3.3	<i>Determinação de resistência mecânica</i> .....	77

5.3.3.1	<i>Dureza</i> .....	77
5.3.3.2	<i>Friabilidade</i> .....	78
5.3.4	<i>Teste de desintegração</i> .....	78
5.3.5	<i>Determinação do teor de micofenolato de mofetila por espectrofotometria no ultravioleta</i> .....	79
5.3.5.1	<i>Seletividade</i> .....	79
5.3.5.2	<i>Linearidade</i> .....	80
5.3.5.3	<i>Exatidão</i> .....	80
5.3.5.4	<i>Precisão</i> .....	81
5.3.5.5	<i>Robustez</i> .....	82
5.3.5.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	83
5.3.6	<i>Determinação do teor de micofenolato de mofetila por cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	83
5.3.6.1	<i>Determinação das condições cromatográficas</i> .....	83
5.3.6.2	<i>Seletividade</i> .....	84
5.3.6.3	<i>Linearidade</i> .....	85
5.3.6.4	<i>Exatidão</i> .....	85
5.3.6.5	<i>Precisão</i> .....	86
5.3.6.6	<i>Robustez</i> .....	87
5.3.6.7	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	87
5.3.6.8	<i>Estabilidade em solução</i> .....	87
5.3.7	<i>Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de mofetila em comprimidos</i> .....	88
5.3.8	<i>Doseamento de micofenolato de mofetila no medicamento genérico</i> ..	88
5.3.9	<i>Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de mofetila</i> .....	88
5.3.10	<i>Determinação do teor de micofenolato de sódio por espectrofotometria no ultravioleta</i> .....	88
5.3.10.1	<i>Seletividade</i> .....	88
5.3.10.2	<i>Linearidade</i> .....	89
5.3.10.3	<i>Exatidão</i> .....	90
5.3.10.4	<i>Precisão</i> .....	91
5.3.10.5	<i>Robustez</i> .....	92
5.3.10.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	92

5.3.11	<i>Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	92
5.3.11.1	<i>Seletividade</i> .....	92
5.3.11.2	<i>Linearidade</i> .....	93
5.3.11.3	<i>Exatidão</i> .....	93
5.3.11.4	<i>Precisão</i> .....	93
5.3.11.5	<i>Robustez</i> .....	94
5.3.11.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	94
5.3.12	<i>Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de sódio em comprimidos</i> .....	94
5.3.13	<i>Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de sódio</i> .....	95
5.4	<i>Determinação de impurezas em micofenolato de mofetila comprimidos</i> ....	95
5.4.1	<i>Perfil cromatográfico</i> .....	95
5.4.2	<i>Quantificação de ácido micofenólico</i> .....	95
5.4.2.1	<i>Precisão</i> .....	96
5.4.2.2	<i>Exatidão</i> .....	96
5.4.2.3	<i>Linearidade</i> .....	97
5.4.2.4	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	97
5.4.2.5	<i>Estabilidade em solução</i> .....	97
5.5	<i>Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de mofetila</i> .....	97
5.5.1	<i>Ensaio preliminares</i> .....	97
5.5.2	<i>Perfis de dissolução</i> .....	98
5.5.3	<i>Validação</i> .....	99
5.5.4	<i>Estabilidade nos meios de dissolução</i> .....	99
5.5.5	<i>Comparação entre os perfis de dissolução do medicamento genérico e referência</i> .....	100
5.6	<i>Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de sódio</i> .....	100
5.6.1	<i>Determinação das condições de esgotamento</i> .....	100
5.6.2	<i>Perfil de dissolução</i> .....	100
5.6.3	<i>Validação</i> .....	101
5.6.4	<i>Estabilidade nos meios de dissolução</i> .....	102
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	103

6.1	Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matéria-prima.....	103
6.1.1	<i>Descrição.....</i>	103
6.1.1.1	<i>Características físicas .....</i>	103
6.1.1.2	<i>Solubilidade.....</i>	103
6.1.2	<i>Identificação.....</i>	103
6.1.2.1	<i>Espectrofotometria no infravermelho.....</i>	103
6.1.2.2	<i>Espectrofotometria no ultravioleta .....</i>	106
6.1.2.3	<i>Íon sódio.....</i>	107
6.1.3	<i>Ensaio de pureza .....</i>	107
6.1.3.1	<i>Temperatura de fusão.....</i>	107
6.1.3.2	<i>Análise térmica.....</i>	108
6.1.3.3	<i>Substâncias relacionadas de micofenolato de mofetila matéria- prima .....</i>	110
6.1.3.4	<i>Perda por dessecação .....</i>	113
6.1.3.5	<i>Cinzas sulfatadas.....</i>	114
6.1.3.6	<i>Ensaio limite para metais pesados.....</i>	115
6.1.4	<i>Determinação do teor de micofenolato de mofetila por volumetria de neutralização em meio não aquoso (THE EUROPEAN..., 2007).....</i>	115
6.1.4.1	<i>Precisão .....</i>	115
6.1.5	<i>Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência.....</i>	117
6.1.5.1	<i>Determinação das condições cromatográficas.....</i>	117
6.1.5.2	<i>Seletividade.....</i>	119
6.1.5.3	<i>Linearidade.....</i>	121
6.1.5.4	<i>Exatidão .....</i>	122
6.1.5.5	<i>Precisão .....</i>	123
6.1.5.6	<i>Robustez.....</i>	124
6.1.5.7	<i>Limites de detecção e quantificação .....</i>	125
6.2	Obtenção, identificação e caracterização de micofenolato de mofetila a partir da matriz de comprimido .....	126
6.2.1	<i>Obtenção de micofenolato de mofetila.....</i>	126
6.2.2	<i>Identificação e caracterização do resíduo.....</i>	127
6.2.2.1	<i>Temperatura de fusão.....</i>	127

6.2.2.2	<i>Espectrofotometria no infravermelho</i> .....	127
6.2.2.3	<i>Espectrofotometria no ultravioleta</i> .....	128
6.2.2.4	<i>Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C)</i> .....	128
6.2.2.5	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	131
6.3	<i>Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio comprimidos</i> .....	132
6.3.1	<i>Identificação</i> .....	132
6.3.2	<i>Determinação de peso</i> .....	133
6.3.3	<i>Determinação de resistência mecânica</i> .....	133
6.3.3.1	<i>Dureza</i> .....	133
6.3.3.2	<i>Friabilidade</i> .....	134
6.3.4	<i>Teste de desintegração</i> .....	134
6.3.5	<i>Determinação do teor de micofenolato de mofetila por espectrofotometria no ultravioleta</i> .....	134
6.3.5.1	<i>Seletividade</i> .....	134
6.3.5.2	<i>Linearidade</i> .....	135
6.3.5.3	<i>Exatidão</i> .....	136
6.3.5.4	<i>Precisão</i> .....	136
6.3.5.5	<i>Robustez</i> .....	137
6.3.5.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	138
6.3.6	<i>Determinação do teor de micofenolato de mofetila por cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	138
6.3.6.1	<i>Determinação das condições cromatográficas</i> .....	138
6.3.6.2	<i>Seletividade</i> .....	141
6.3.6.3	<i>Linearidade</i> .....	144
6.3.6.4	<i>Exatidão</i> .....	145
6.3.6.5	<i>Precisão</i> .....	145
6.3.6.6	<i>Robustez</i> .....	146
6.3.6.7	<i>Limites de detecção e quantificação</i> .....	147
6.3.6.8	<i>Estabilidade em solução</i> .....	148
6.3.7	<i>Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de mofetila em comprimidos</i> .....	149
6.3.8	<i>Doseamento de micofenolato de mofetila no medicamento genérico</i>	149

6.3.9	<i>Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de mofetila</i>	150
6.3.10	<i>Determinação do teor de micofenolato de sódio por espectrofotometria no ultravioleta</i>	151
6.3.10.1	<i>Seletividade</i>	151
6.3.10.2	<i>Linearidade</i>	151
6.3.10.3	<i>Exatidão</i>	152
6.3.10.4	<i>Precisão</i>	153
6.3.10.5	<i>Robustez</i>	153
6.3.10.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	154
6.3.11	<i>Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência</i>	154
6.3.11.1	<i>Seletividade</i>	154
6.3.11.2	<i>Linearidade</i>	155
6.3.11.3	<i>Exatidão</i>	155
6.3.11.4	<i>Precisão</i>	156
6.3.11.5	<i>Robustez</i>	156
6.3.11.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	157
6.3.12	<i>Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de sódio em comprimidos</i>	157
6.3.13	<i>Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de sódio</i>	158
6.4	<i>Determinação de impurezas em micofenolato de mofetila comprimidos</i>	159
6.4.1	<i>Perfil cromatográfico</i>	159
6.4.2	<i>Quantificação de ácido micofenólico</i>	160
6.4.2.1	<i>Precisão</i>	162
6.4.2.2	<i>Exatidão</i>	162
6.4.2.3	<i>Linearidade</i>	163
6.4.2.4	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	164
6.4.2.5	<i>Estabilidade em solução</i>	164
6.5	<i>Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de mofetila</i>	165
6.5.1	<i>Ensaio preliminares</i>	165
6.5.2	<i>Perfis de dissolução</i>	167
6.5.3	<i>Validação</i>	172

6.5.4	<i>Estabilidade nos meios de dissolução</i> .....	173
6.5.5	<i>Comparação entre os perfis de dissolução do medicamento genérico e referência</i> .....	174
6.6	Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de sódio .....	177
6.6.1	<i>Determinação das condições de esgotamento</i> .....	177
6.6.2	<i>Perfil de dissolução</i> .....	178
6.6.3	<i>Validação</i> .....	182
6.6.4	<i>Estabilidade nos meios de dissolução</i> .....	183
7	CONCLUSÕES .....	184
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186
	APÊNDICES.....	194

## 1 INTRODUÇÃO

As questões sobre medicamentos e assistência farmacêutica vêm ganhando espaço na agenda governamental e na sociedade. Algumas razões, como o desenvolvimento tecnológico, podem justificar o incremento dessa visibilidade. A ampliação da abrangência do medicamento garante a existência de produtos para quase todas as enfermidades. Além disso, os medicamentos são cada vez mais seguros e eficazes, contribuindo para aumentar a expectativa e a qualidade de vida da população (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Um produto farmacêutico inovador é o primeiro autorizado para comercialização, normalmente como medicamento patenteado, com base em documentação de eficácia, segurança e qualidade. O produto inovador é reconhecido como referência por autoridade sanitária nacional (BRASIL, 1999; WORLD..., 2005b).

O medicamento genérico é aquele intercambiável ao referência, produzido após expiração ou renúncia da proteção patentária e de outros direitos de exclusividade. Considera-se intercambiável os produtos terapêuticamente equivalentes. Existem ainda, os produtos considerados alternativas farmacêuticas. Nesse caso, eles possuem a mesma molécula terapêuticamente ativa, mas diferem na forma farmacêutica ou química, incluindo diferentes sais ou ésteres (BRASIL, 1999; WORLD..., 2005b).

A comprovação da equivalência terapêutica entre medicamento genérico e referência é avaliada por meio de estudos de equivalência farmacêutica e de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro*. Para o registro de contraceptivos, hormônios endógenos e imunossuppressores, é exigido que o protocolo de estudo de bioequivalência seja elaborado por Centro certificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), e em conformidade com o Guia para Elaboração de Protocolo de Biodisponibilidade Relativa e Bioequivalência. Para os demais medicamentos, é facultada à empresa a apresentação do protocolo de estudo de bioequivalência (BRASIL, 2007a).

Para estudo de equivalência farmacêutica, os medicamentos devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira. Na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso (BRASIL, 2007a).

Um dos grandes desafios impostos ao poder público brasileiro tem sido ampliar o acesso da população a medicamentos. Desde 1998, com a elaboração da Política Nacional de Medicamentos, as ações foram articuladas envolvendo a reestruturação e a expansão da assistência farmacêutica, a regulação econômica e a regulação sanitária (BRASIL, 2002).

Os medicamentos genéricos têm assumido grande importância como mecanismo de acesso da população a medicamentos eficazes e seguros a preços mais baixos. De acordo com dados estatísticos da Anvisa, o número de registros de medicamentos genéricos foi crescente desde o estabelecimento desses produtos no país pela Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999. Dos 2.084 registros totais, 1.697 (81%) são de origem nacional e 397 (19%) importados, sendo que deste último dado 52% são provenientes da Índia (BRASIL, 2006a, 2006b; ROMANO & BERNARDO, 2001).

Em 10 de fevereiro de 2004, com a Resolução RE nº 212 da Diretoria Colegiada da Anvisa, determinou-se como medida de interesse sanitário, a apreensão em todo território nacional de lotes de produtos genéricos de micofenolato de mofetila (MMF) comprimidos. Em 11 de novembro de 2004, pela Resolução RE nº 1.796, a mesma Diretoria determinou a apreensão de outros lotes dos produtos por não atender às exigências regulamentares. Em 14 de novembro de 2007, a Anvisa, por meio da RE nº 3.575, cancelou o registro de um medicamento genérico de MMF por não ser bioequivalente ao medicamento referência (BRASIL, 2004a, 2004b e 2007b).

O MMF é um pró-fármaco do ácido micofenólico (MPA), agente imunossupressor indicado na profilaxia da rejeição de órgãos em tratamentos pós-transplantes. O MPA também é comercializado na forma de sal sódico (micofenolato de sódio - MSD).

O produto referência para MMF é o CellCept<sup>®</sup>, fabricado por Roche. As apresentações farmacêuticas de CellCept<sup>®</sup> disponíveis são: comprimidos revestidos de 500 mg, cápsulas de 250 mg, pó para suspensão oral de 1 g/5 ml e pó para solução injetável 500 mg de MMF. O produto referência para MSD é o Myfortic<sup>®</sup>, fabricado pelo Laboratório Novartis. As apresentações farmacêuticas de Myfortic<sup>®</sup> disponíveis são comprimidos com revestimento entérico nas doses de 180 e 360 mg de MPA na forma de sal sódico.

Os derivados do MPA não constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) (BRASIL, 2008), não estão na lista de medicamentos essenciais estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WORLD..., 2005a) e não apresentam monografias de produtos acabados em farmacopéias. Mesmo assim, devido à eficácia terapêutica e demanda clínica, tornaram-se medicamentos de uso habitual em tratamento pós-transplantes, fazendo parte da lista de fármacos imunossupressores do Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional da Assistência Farmacêutica (CMDE) (BRASIL, 2006c).

O CMDE caracteriza-se como uma estratégia da política de assistência farmacêutica. O objetivo é disponibilizar medicamentos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento de agravos por doença prevalente, rara ou de baixa prevalência, com indicação de uso de medicamento de alto valor unitário ou que, pela cronicidade do tratamento, seja de custo elevado (BRASIL, 2006c). Algumas das condições de utilização destes medicamentos englobam: Doença de Gaucher, Doença de Parkinson, Alzheimer, Hepatites B e C, pacientes renais crônicos, transplantados, portadores de asma grave e anemia.

Os medicamentos disponibilizados pelo CMDE compõem o Grupo 36 - Medicamentos, da tabela descritiva do Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SIA/SUS). O financiamento para aquisição desses medicamentos é da responsabilidade do Ministério da Saúde (MS) e dos Estados, conforme pactuação na Comissão Intergestores Tripartite. A prescrição e dispensação seguem as normas elaboradas nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (BRASIL, 2002 e 2006c).

A contribuição dos laboratórios oficiais da rede pública no fornecimento de medicamentos excepcionais às Secretarias de Saúde é restrita. Entretanto cabe ressaltar que o Brasil é um dos poucos países a possuir um parque público estatal de produção de medicamentos, responsável por aproximadamente 75% das unidades dispensadas pelo SUS no Programa de Assistência Farmacêutica Básica (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Atualmente, não há monografias farmacopéicas ou parâmetros de qualidade, estabelecidos por órgão oficial, para MSD matéria-prima e para produtos acabados de MMF e MSD. Considerando a existência de registros de medicamento genérico para MMF na Anvisa, as peculiaridades que envolvem a classe de imunossuppressores e a dependência internacional da produção da matéria-prima desses produtos, tornam-se necessários o estudo e a determinação de parâmetros de controle de qualidade para os fármacos.

Assim sendo, o resultado deste estudo poderá servir como critério para o controle de qualidade dos derivados do MPA. Além disso, poderá viabilizar ações de fiscalização sanitária e favorecer medidas de implementação da produção de comprimidos de MMF e MSD nos laboratórios oficiais da rede pública, de maneira a criar independência tecnológica e reduzir os gastos das Secretarias de Saúde nas aquisições dos medicamentos.

---

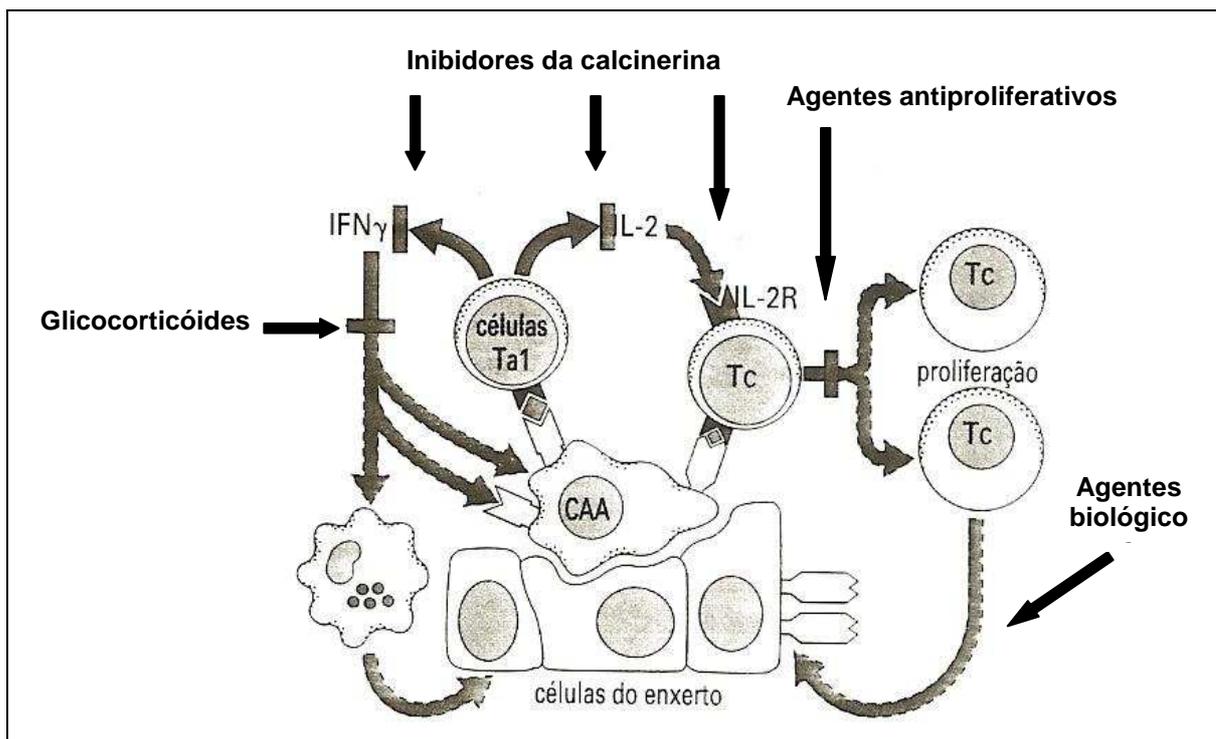
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Terapia de imunossupressão

Os agentes imunossupressores são utilizados para atenuar a resposta imune dos pacientes que receberam transplantes de órgãos e dos pacientes com doenças auto-imunes.

Existem duas categorias principais de terapia imunossupressora para o antígeno: a imunossupressão inespecífica e a específica. A imunossupressão inespecífica abranda ou elimina a atividade do sistema imune independentemente do antígeno, o que resulta em uma vulnerabilidade muito grande a processos infecciosos. O melhor tratamento é aquele que elimina apenas os clones de linfócitos específicos para os antígenos, deixando outros clones intactos, de maneira que o paciente não adquira infecções ou apresente outros efeitos colaterais (ROITT *et al.*, 2003).

No transplante, os grupos principais de agentes imunossupressores utilizados são os glicocorticóides, os inibidores da calcineurina, os agentes antiproliferativos (antimetabólicos) e os biológicos. A maioria dos centros de transplante utiliza alguma combinação de agentes imunossupressores com terapia de indução antilinfocitária com anticorpos monoclonais ou policlonais. A manutenção da imunossupressão é conseguida com um inibidor da calcineurina (ciclosporina ou tacrolimo), glicocorticóide e um antimetabólito (azatioprina ou MMF) (GOODMAN *et al.*, 2006). A atuação dos principais agentes imunossupressores está ilustrada na Figura 1.



**Figura 1** - Atuação dos agentes imunossupressores nas etapas do ciclo de ação imunológica em transplantes (adaptado de ROITT *et al.*, 2003).

## 2.2 Ácido micofenólico e derivados

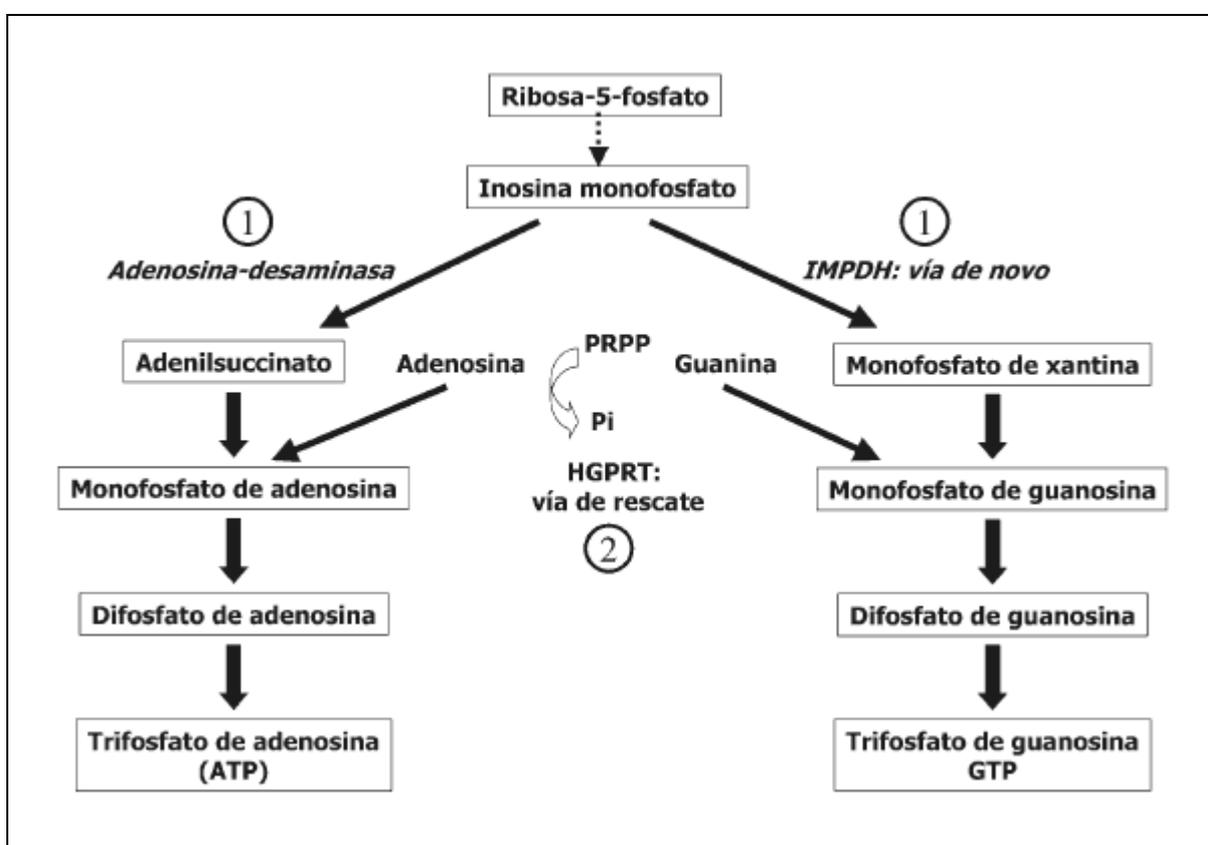
### 2.2.1 Farmacodinâmica

O MPA foi isolado pela primeira vez em 1898, a partir de cultura de *Penicillium glaucum*. O MPA foi estudado inicialmente como antibiótico e antifúngico. Posteriormente, foi empregado com sucesso, para o tratamento de formas graves de psoríase. No entanto, o uso prolongado da droga foi responsável por um aumento das infecções virais, confirmando a atividade imunossupressora. Nos anos setenta demonstrou-se que o composto inibia a resposta dos anticorpos e prolongava a vida de enxertos cutâneos em ratos (NORONHA *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005).

O MPA é um inibidor seletivo, não-competitivo e reversível da enzima monofosfato de inosina desidrogenase (IMPDH). Essa enzima atua na via de novo da biossíntese das purinas (Figura 2), especificamente na síntese de nucleosídeos de guanosina (GTP e dGTP), que são substratos para a síntese de DNA e RNA. Os linfócitos B e T são extremamente dependentes dessa via para sua proliferação celular, enquanto outros tipos de células podem utilizar vias alternativas. Por esta razão, o MPA inibe

seletivamente a proliferação e as funções linfocitárias, inclusive a produção de anticorpos, a aderência celular e a migração (NORONHA *et al.*, 2005; GOODMAN *et al.*, 2006).

A inibição seletiva da enzima IMPDH pelo MPA resulta em menor toxicidade sobre as células hematológicas e neutrófilos em comparação com os análogos de nucleosídeos, metotrexato e azatioprina. Outra vantagem é que o grau de inibição não depende da quantidade de substrato, mas sim da quantidade do inibidor (SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005).



**Figura 2** - Inibição da proliferação linfocitária induzida pelo ácido micofenólico (SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005). Legenda: 1) Via de novo: por meio de precursores básicos em um processo que depende da IMPDH e da adenosina desaminase; 2) Via de salvamento: reciclado de bases purínicas geradas previamente; IMPDH = inosina monofosfato desidrogenase; PRPP = fosforibosil-pirofosfato; HGPRT = hipoxantina-guanina-fosfo-ribosiltransferase.

### 2.2.2 Farmacocinética

Um número considerável de barreiras pode limitar a utilização clínica de fármacos. Entre as principais estão as questões relacionadas à farmacocinética e farmacodinâmica como: absorção incompleta através das membranas biológicas;

biodisponibilidade sistêmica incompleta devido ao metabolismo pré-sistêmico; absorção ou excreção muito rápidas quando são desejáveis longos períodos de ação; toxicidade relacionada à irritação local ou à distribuição em outros tecidos; falta de solubilidade adequada; falta de estabilidade das formulações; e propriedades organolépticas indesejáveis (CHIN & FERREIRA, 1999).

O estudo do MPA em distintos modelos animais de transplantes impulsionou o desenvolvimento de novos derivados com o objetivo de melhorar a absorção do fármaco. Lee *et al.* (1990) estudaram a farmacocinética do MPA e ésteres derivados em macacos cinomolgos. Eles observaram que a concentração máxima de MPA após a administração oral em dose única de 20 mg/kg era  $(6,9 \pm 2,5)$  mg/l em aproximadamente 13 horas. O composto mais promissor foi o MMF, para o qual foram obtidos valores de concentração máxima na ordem de  $(34 \pm 11)$  mg/l em 1,3 horas.

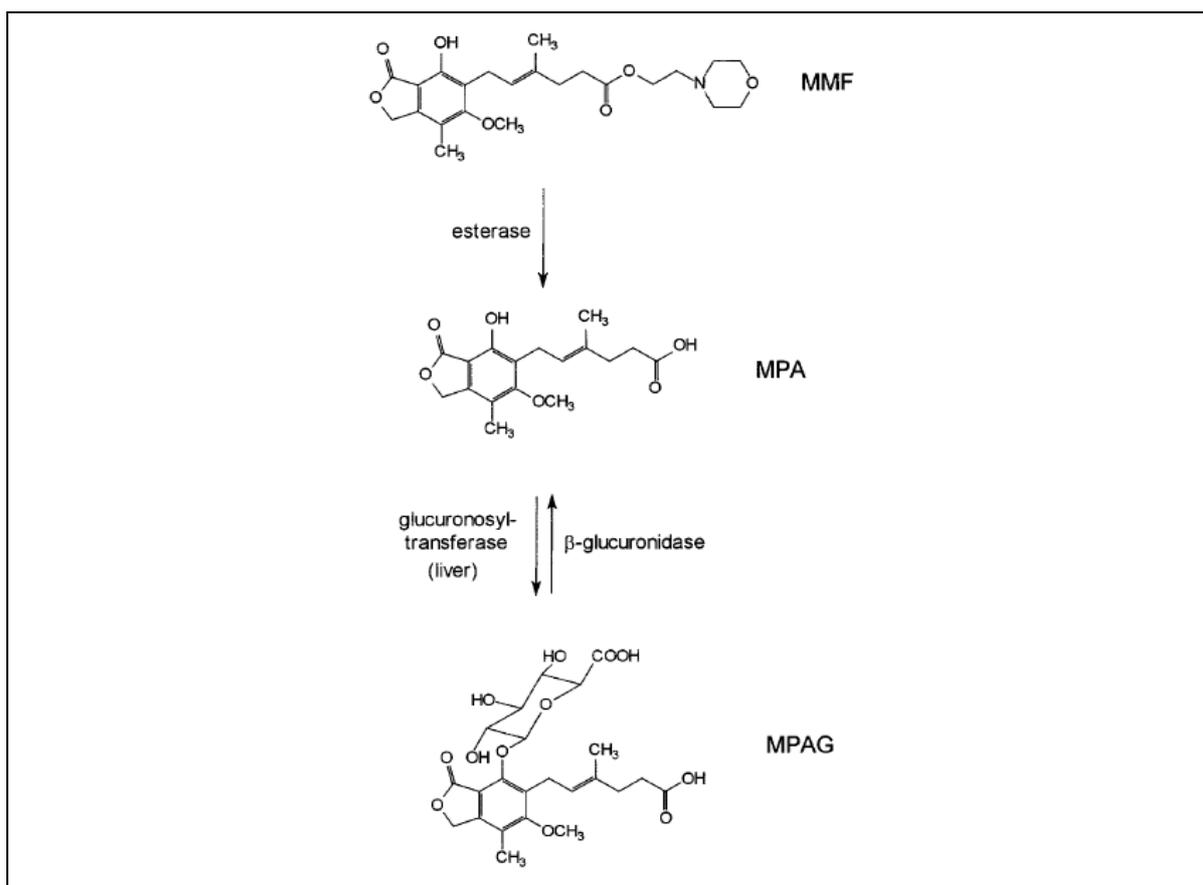
Após administração oral, o MMF é rapidamente absorvido e metabolizado em MPA. O metabólito ativo alcança concentração plasmática máxima após 1 hora. Um pico secundário é observado entre 6 a 12 horas, o qual é atribuído à circulação entero-hepática (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004).

A administração junto à alimentação pode diminuir a velocidade de absorção, mas não altera a extensão. Entretanto, a administração concomitante de antiácidos e colestiramina reduz a absorção do fármaco em aproximadamente 20 e 40%, respectivamente. O tempo de meia-vida do MPA na circulação sistêmica é de aproximadamente 17 horas (JEONG & KAPLAN, 2007).

O MPA é metabolizado no fígado e possivelmente em outros tecidos, incluindo intestino e rins, pela reação de fase II de glucuronidação mediado por UDP-glucuronosil-transferase (UGT). O principal metabólito é o 7-o-glucuronídeo (MPAG), farmacologicamente inativo, produzido pela isoforma UGT1A9, conforme ilustrado na Figura 3. Outros dois metabólitos foram isolados em plasmas de pacientes transplantados renais: MPA-acil-glucuronídeo (AcMPAG) e MPA-fenil-glucosídeo. AcMPAG, produzido principalmente pela isoforma UGT2B7, mostrou-se

farmacologicamente ativo e potencialmente responsável pela toxicidade de MPA em estudo *in vitro* (JEONG & KAPLAN, 2007).

Na circulação sistêmica, o MPA liga-se às proteínas plasmáticas em 97%. A maior parte da dose administrada é excretada na urina na forma de MPAG (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004).



**Figura 3** - Transformação de micofenolato de mofetila em seu principal metabólito via catálise enzimática (RENNER *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Reações adversas

Os efeitos tóxicos principais de MMF são gastrointestinais e hematológicos. Isso inclui leucopenia, diarreia e vômitos. Também há incidência mais alta de algumas infecções principalmente sepse associada ao citomegalovírus (GOODMAN *et al.*, 2006).

Na tentativa de reduzir os efeitos adversos gastrintestinais, o Laboratório Novartis apresentou uma formulação de MSD comprimidos com revestimento entérico. O

objetivo do desenvolvimento dessa formulação foi retardar a absorção do MPA, de maneira que a liberação do princípio ativo ocorra no intestino e diminua a incidência dos efeitos gastrointestinais. Este argumento é similar ao utilizado com os anti-inflamatórios não-esteroidais (SÁDABA *et al.*, 2005).

Após a administração oral de MSD, a molécula ativa é absorvida no intestino delgado. A biodisponibilidade absoluta é maior que 71% e a concentração plasmática máxima é alcançada entre 1,5 a 2 horas (SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005).

Ensaio clínico têm mostrado que MMF e MSD são fármacos equivalentes quanto à eficácia e à segurança (720 mg de Myfortic<sup>®</sup> e 1000 mg de CellCept<sup>®</sup> liberam quantidade equivalente de MPA, em relação à biodisponibilidade). Entretanto, não há um consenso sobre a diminuição dos efeitos adversos com a utilização de Myfortic<sup>®</sup> (BUDDE *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005).

Em revisão sobre o assunto, Arns (2007) identificou possíveis etiologias dos referidos efeitos adversos: efeito tóxico direto do éster mofetil, efeito antiproliferativo sistêmico ou local do MPA, combinação tóxica com inibidores da calcineurina, infecções oportunistas gastrointestinais, modulação da resposta imune local ou toxicidade local do metabólito AcMPAG. O autor sugere que estudos adicionais sejam realizados para testar as hipóteses.

O uso de derivados de MPA durante a gravidez está associado ao aumento de risco de aborto e anomalias congênitas. A terapia com MMF e MSD nesse caso, só é justificada mediante avaliação do benefício e quando não existe alternativa terapêutica (U.S. FOOD..., 2008a).

#### **2.2.4 Distribuição e custo de comprimidos de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio**

O quantitativo de distribuição mensal e os custos por unidade dos comprimidos de MMF e MSD foram obtidos junto à Gerência de Medicamentos de Alto Custo da Superintendência de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG).

---

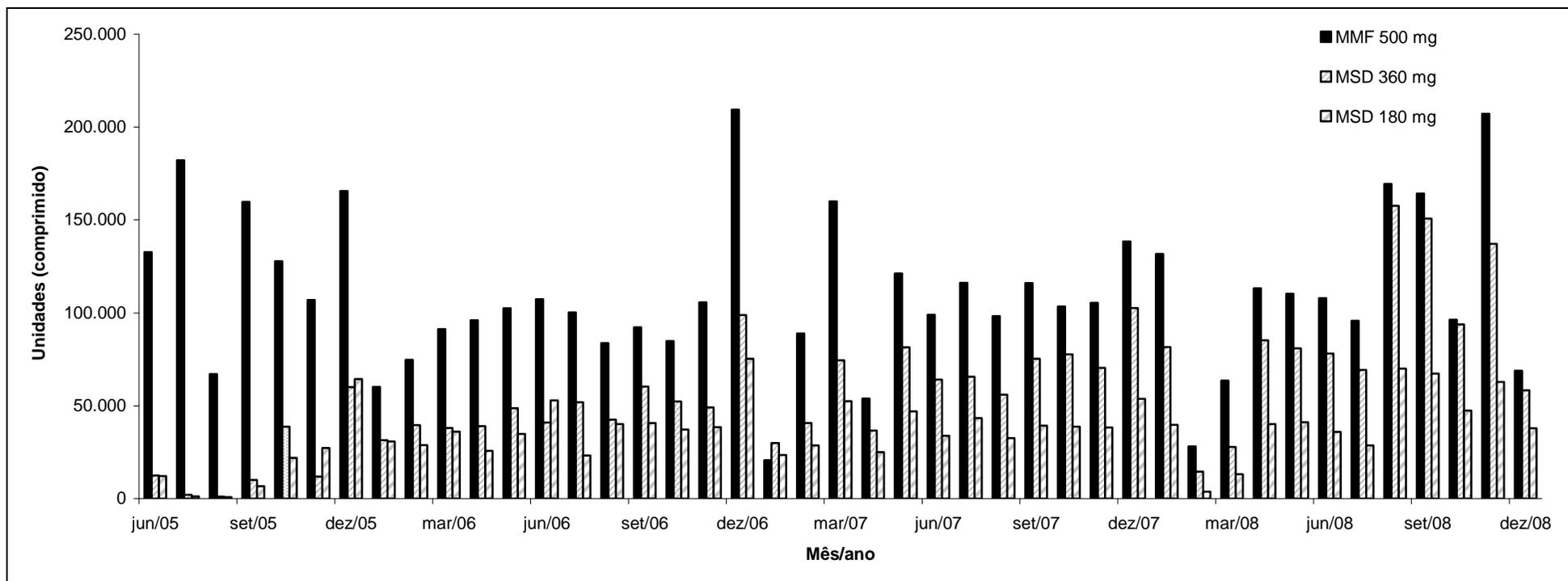
A distribuição mensal de comprimidos de MMF 500 mg, MSD 180 mg e MSD 360 mg pela SES-MG no período junho 2005 a dezembro 2008 está ilustrada na Figura 4 e os dados apresentados no Apêndice A.

A distribuição de MMF 500 mg apresentou elevada variação no período estudado. Ao contrário, as distribuições de MSD 180 mg e 360 mg apresentaram menor variação e tendência crescente desde o início da entrada dessas apresentações na lista do CMDE, após a publicação da Portaria MS nº 203 de 2005 (BRASIL, 2005).

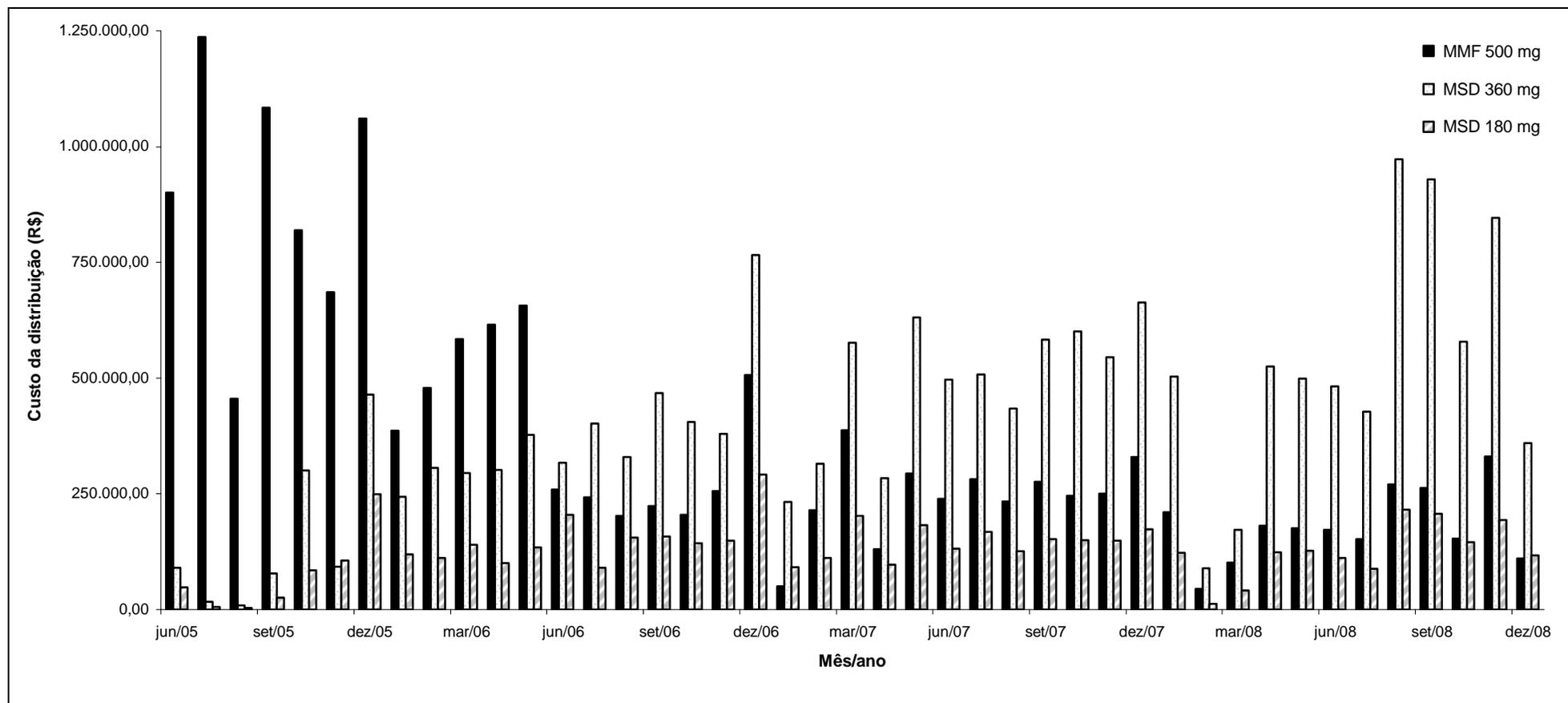
Os custos mensais da distribuição dos produtos estão ilustrados na Figura 5 e os dados apresentados no Apêndice A. Os valores do custo mensal da distribuição foram calculados pela multiplicação do número de unidades distribuídas por seus respectivos custos unitários.

Observa-se um declínio acentuado do custo mensal de distribuição de MMF no período em questão. Ao contrário, o custo mensal da distribuição de MSD na dose de 360 mg revelou uma tendência crescente. O custo para MSD na dose de 180 mg apresentou discreto aumento no início do período e manteve-se estacionário ao final, não apresentando valores mensais de distribuição superiores a R\$300.000,00.

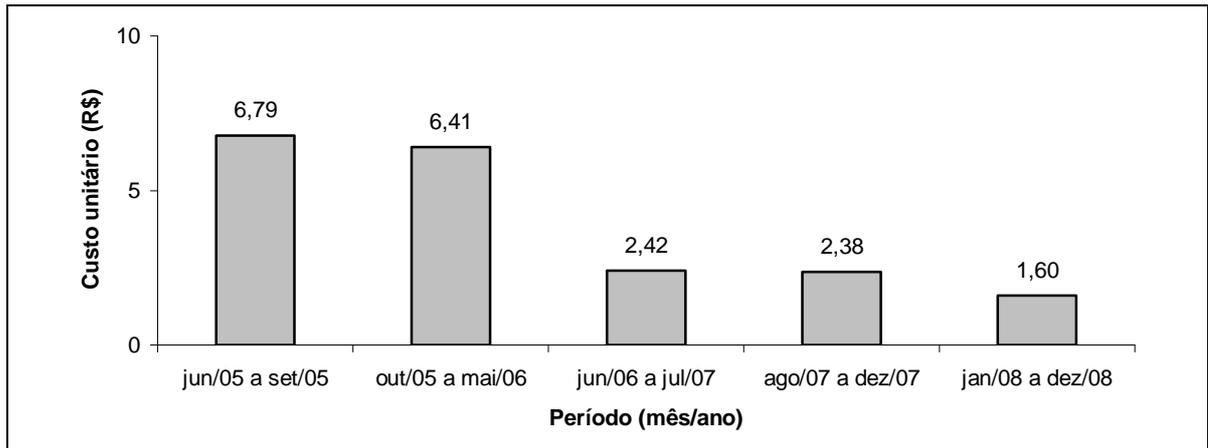
A diminuição do custo mensal de distribuição de MMF 500 mg não é proporcionalmente acompanhada pela redução da quantidade distribuída, podendo então ser justificada por variações no custo do produto. De fato, ao analisar os preços praticados nos contratos da SES-MG (Figura 6), verifica-se que ocorreu diminuição de 265% no custo unitário de comprimidos de MMF entre maio e junho 2006.



**Figura 4** - Distribuição mensal de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg, micofenolato de sódio 360 mg e micofenolato de sódio 180 mg pela SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008.



**Figura 5** - Custo da distribuição mensal de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg, micofenolato de sódio 360 mg e micofenolato de sódio 180 mg da SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008.



**Figura 6** - Custo unitário de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg de acordo com os preços praticados nos contratos da SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008.

A redução do custo unitário de comprimidos de MMF pode ser explicada pela entrada de MSD ao CMDE como uma nova opção terapêutica (TEIXEIRA, 2007). Outro fator contribuinte é a concorrência estabelecida com os medicamentos genéricos do mercado.

O Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional é financiado por contrapartida federal e co-financiado pelas Secretarias Estaduais de Saúde. O recurso federal é repassado no bloco de financiamento da Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2007c).

A quantidade máxima e o valor do procedimento financiado pela União no fornecimento de MMF e MSD no SUS, para cada usuário, estão representados na Tabela 1. Os valores correspondem a R\$8,40/g MMF e R\$16,57/g MSD. Para o cálculo de MSD, considerou-se R\$8,45 (soma do valor unitário das duas apresentações) por 540 mg do fármaco (360 mg + 180 mg = 540 mg).

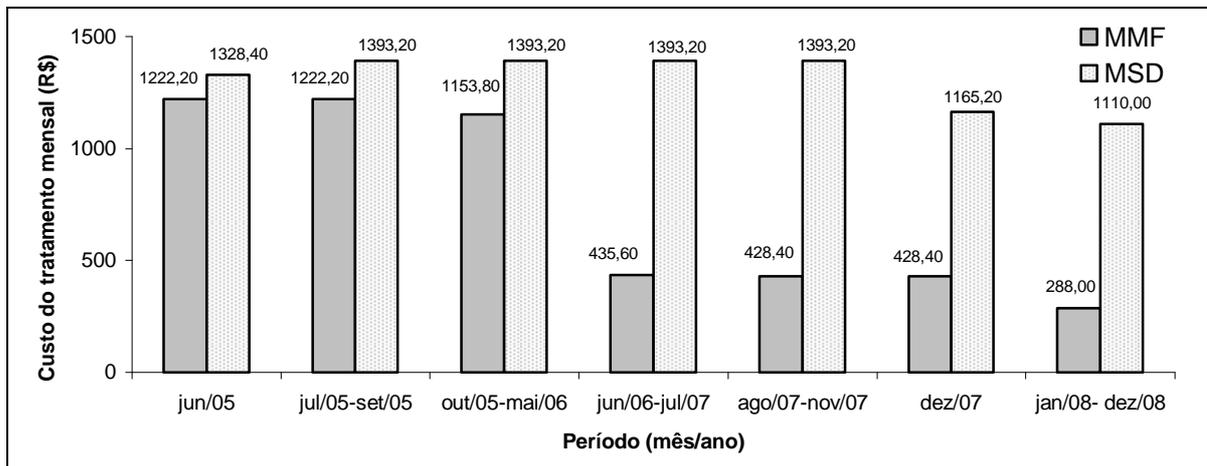
**Tabela 1** - Quantidade mensal máxima por tratamento individual e valor unitário financiado pela União no fornecimento de comprimidos de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio.

Medicamento	Quantidade máxima (comprimido)	Valor unitário (R\$)
MSD 180 mg/comprimido	120	3,49
MSD 360 mg/ comprimido	180	5,46
MMF 500 mg/ comprimido	180	4,20

Fonte: BRASIL, 2006c.

O tratamento padronizado para MMF é 0,5 a 1,5 g duas vezes ao dia (BRASIL, 2002). Considerando a dose máxima padronizada (1,5 g de MMF duas vezes ao dia), o financiamento federal do tratamento é R\$756,00/mês (3 g x R\$8,40/g x 30 dias = R\$756,00/mês). A terapia equivalente com MSD, em termos de biodisponibilidade de MPA (relação de 720 mg de Myfortic<sup>®</sup> por 1000 mg de CellCept<sup>®</sup>), apresenta um custo de R\$1073,74/mês (2,16 g x R\$16,57 x 30 dias = R\$1073,74) (BRASIL, 2006c).

As variações de custo da terapia mensal padronizada em 3,0 g de MMF/dia e o tratamento equivalente com MSD, de acordo com os preços praticados nos contratos da SES-MG no período estudado, estão ilustradas na Figura 7.



**Figura 7** - Variações do custo no tratamento individual pós-transplante com micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio, de acordo com os preços praticados nos contratos da SES-MG durante o período junho 2005 a dezembro 2008.

A introdução de MSD na lista do CMDE representou uma alternativa de tratamento com custo mensal próximo ao da terapia com MMF (diferença de R\$106,20 em junho 2005). Porém, com a redução do custo unitário de MMF, observada nos contratos da SES-MG no período junho 2006 a dezembro 2008, o tratamento com MSD tornou-se consideravelmente mais oneroso (diferença de R\$ 822,00 em dezembro 2008).

### **2.2.5 Monitoração terapêutica**

A determinação dos níveis plasmáticos de fármacos imunossupressores para condução de ajuste e estabelecimento da dose na terapia inicial e durante o tratamento tem sido aceita na prática clínica. As concentrações plasmáticas de MPA em terapia normal (1-3 mg/l) são relativamente mais altas em comparação com as de outros imunossupressores (HOLT *et al.*, 2002).

Dois métodos analíticos são comumente utilizados na determinação dos níveis plasmáticos de MPA: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detector ultravioleta e o imunoensaio enzimático baseado em técnica de multiplicação de enzima (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique* – EMIT). O método EMIT é menos específico na determinação de MPA do que a técnica por CLAE. Em EMIT ocorre reação cruzada entre MPA e o metabólito AcMPAG com o anticorpo utilizado. Em CLAE, ao contrário, é possível determinar MPA e todos seus metabólitos separadamente (JEONG & KAPLAN, 2007).

Outras técnicas de análise em plasma são descritas na literatura, como métodos por cromatografia eletrocínética micelar (TRIPODI *et al.*, 2001), CLAE acoplada à detector de fluorescência (RENNER *et al.*, 2001) e CLAE acoplada à espectrometria de massas (BÉNECH *et al.*, 2007).

### **2.2.6 Características físico-químicas**

O fármaco MPA é produzido por *Penicillium brevi-compactum*, *P.stoloniferum* e *P. ssp.* e conhecido quimicamente como 6-(4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-5-ftalanil)-4-metil-4-ácido hexanóico. A fórmula molecular é  $C_{17}H_{20}O_6$  e a massa molar equivale a 320,34 g.

A fusão ocorre em 141 °C e o pKa é 4,5. O coeficiente de partição (n-octanol/água) é de 570 em pH 2,0 e 1,6 em pH 7,4. O MPA é solúvel em álcool, quase insolúvel em água fria e forma cristais de agulha quando recristalizado em água quente. A LD<sub>50</sub> em ratos é maior que 1250 mg/kg via oral ou (972,9 ± 77) mg/kg intraperitoneal (O'NEIL, 2006).

O MMF é o éster 2-morfolinoetil do MPA, cuja fórmula molecular é  $C_{23}H_{31}NO_7$  e massa molar 433,49 g. Apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco com ponto de fusão entre 93 e 94 °C e pKa 5,6. O coeficiente de partição (n-octanol/água) é de 0,0085 em pH 2,0 e 238 em pH 7,4. O MMF é solúvel em acetona e metanol, ligeiramente solúvel em etanol e pouco solúvel em água (O'NEIL, 2006).

Lee *et al.* (1990) avaliaram as solubilidades aquosas do MPA e ésteres derivados em função do pH a 25 °C. As curvas teóricas de solubilidade, reproduzidas na Figura 8, foram determinadas pelas equações (1) e (2).

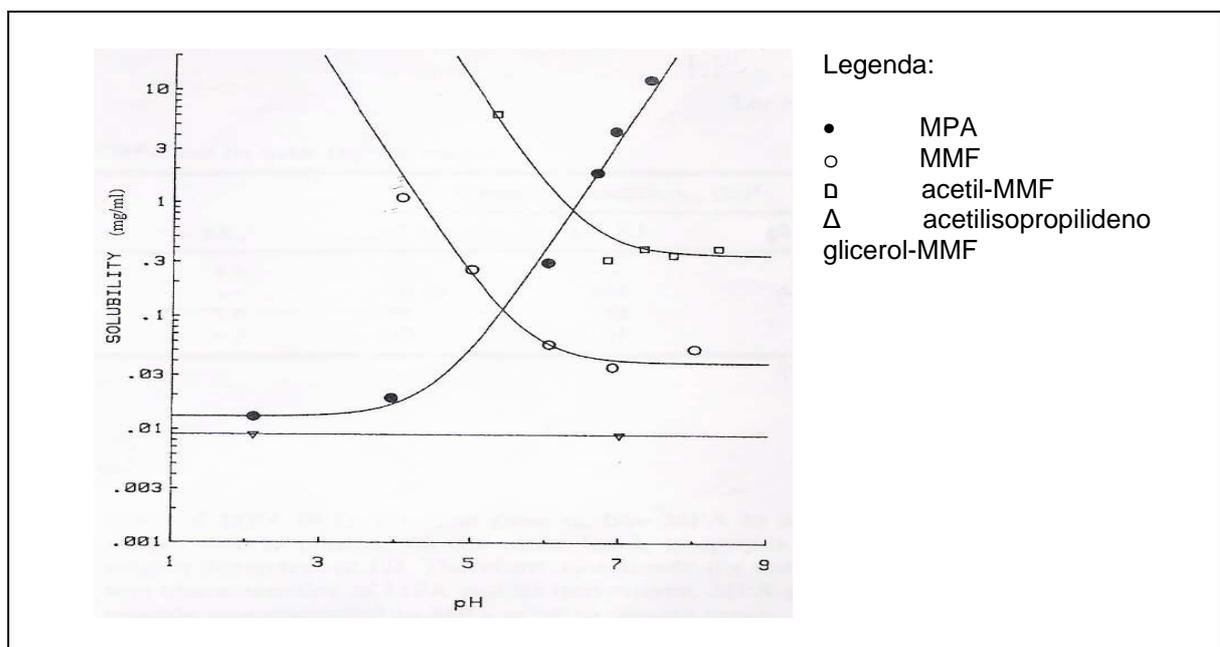
$$S = S_i (1 + K_a/[H^+],) \text{ para MPA} \quad (1)$$

$$S = S_i (1 + [H^+]/ K_a) \quad (2)$$

para os ésteres MMF, acetil-MMF e acetil-isopropilideno glicerol

em que:

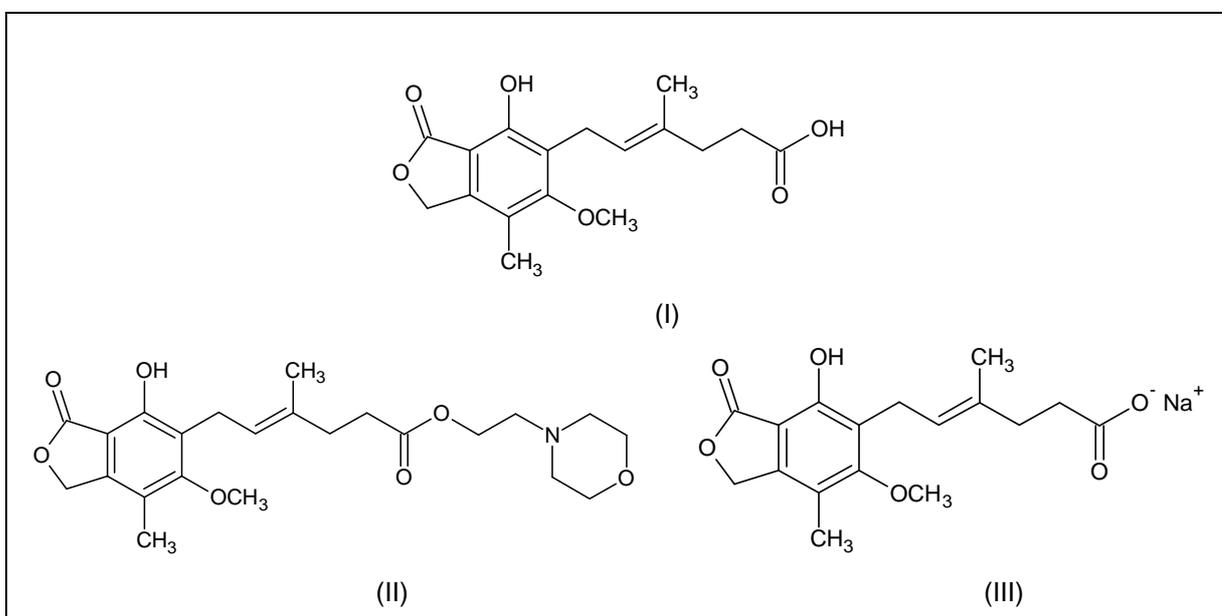
$S_i$  = solubilidade intrínseca (39 µg/ml para MMF e 13 µg/ml para MPA).



**Figura 8** - Solubilidades aquosas do ácido micofenólico, micofenolato de mofetila, acetil-micofenolato de mofetila e acetil-isopropilideno glicerol em função do pH a 25 °C (LEE *et al.*, 1990).

Os autores verificaram que MPA e seus ésteres derivados se comportam como ácidos ou bases fracas, com excessão do acetil-isopropilideno glicerol (composto não ionizável). O aumento das solubilidades dos ésteres está associada à redução do pH.

O MSD é o sal sódico de MPA. A fórmula molecular é  $C_{17}H_{19}NaO_6$  e a massa molar equivale a 342,32 g. Apresenta fusão entre 189 °C e 191 °C. A  $LD_{50}$  em ratos é  $(1176 \pm 151)$  mg/kg via oral ou  $(568 \pm 53)$  mg/kg intraperitoneal (O'NEIL, 2006; WONG, 2008). As estruturas moleculares de MSD, MPA e MMF encontram-se representadas na Figura 9.

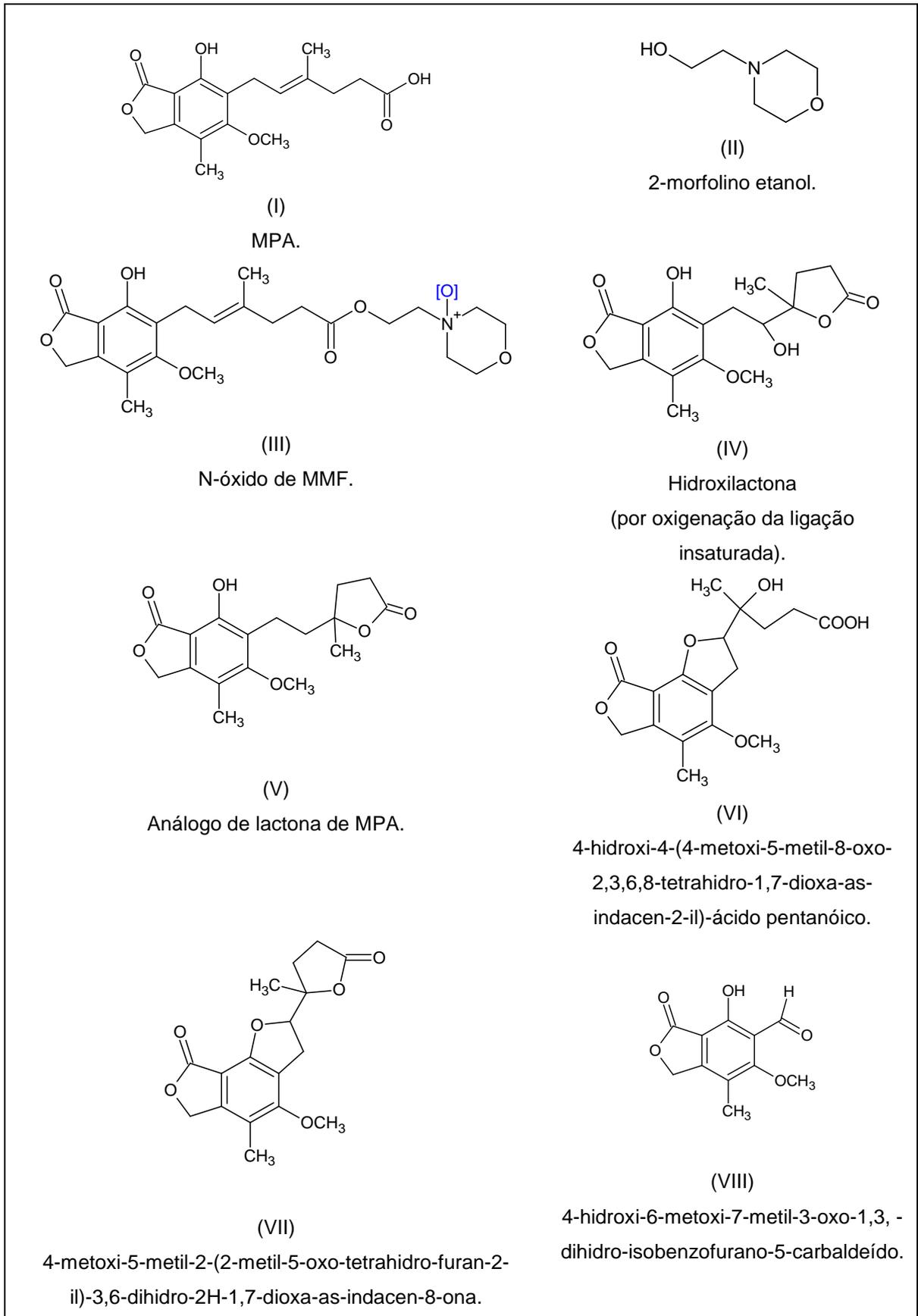


**Figura 9** - Estruturas moleculares do (I) ácido micofenólico, (II) micofenolato de mofetila e (III) micofenolato de sódio.

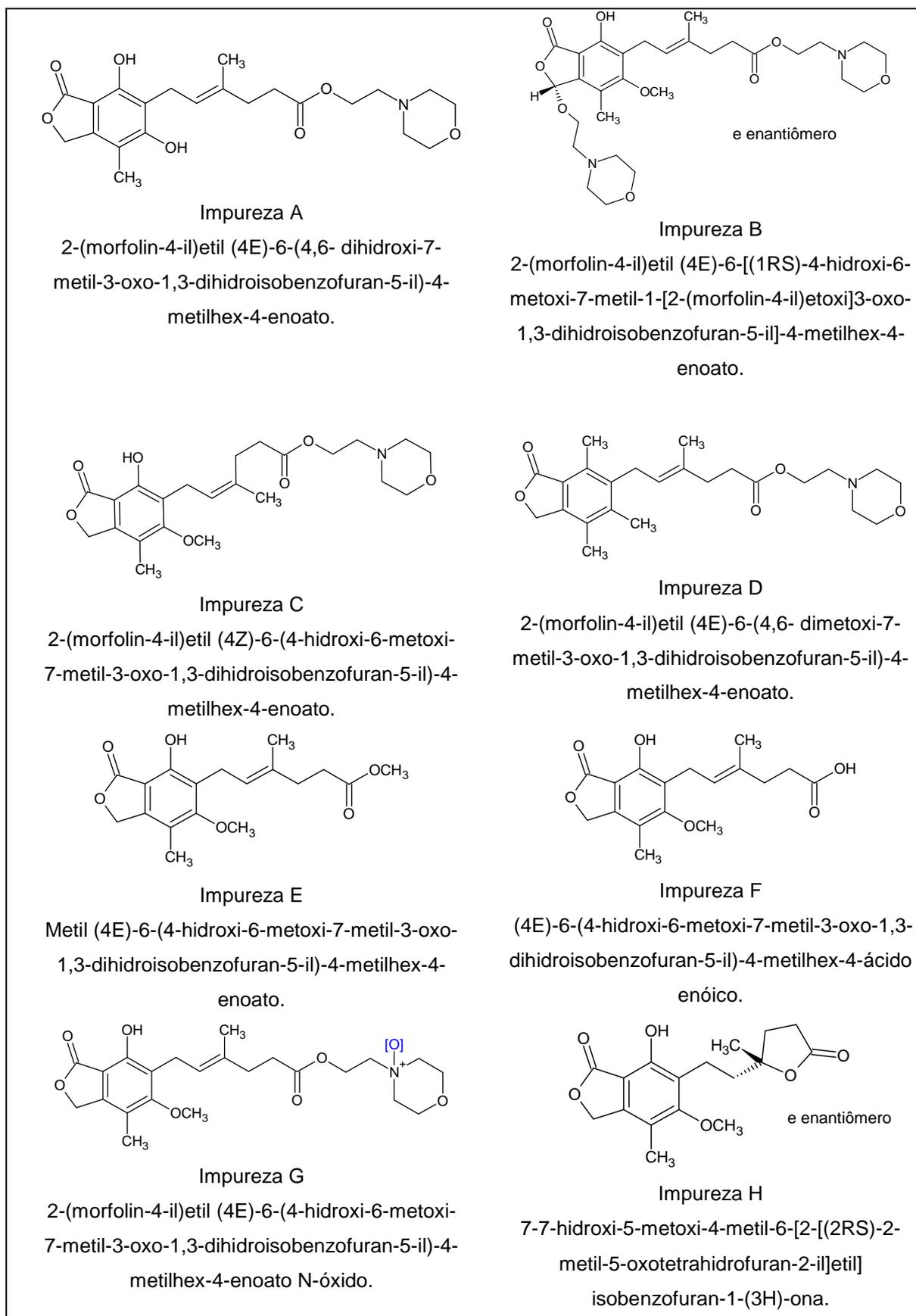
### 2.2.7 Impurezas

Hooijmaaijer *et al.* (1999) estudaram os produtos de degradação térmica e oxidativa de solução aquosa de MMF em meios com diferentes valores de pH. As substâncias relatadas no referido estudo e suas respectivas estruturas estão ilustradas na Figura 10.

Na Farmacopéia Européia (2007) estão descritas oito substâncias relacionadas à MMF matéria-prima (Figura 11). As impurezas F, G e H correspondem respectivamente às substâncias I, III e V apresentadas por Hooijmaaijer *et al.* (1999).



**Figura 10** - Estruturas moleculares dos produtos de degradação térmica e oxidativa de micofenolato de mofetila em solução aquosa com diferentes valores de pH (HOOIJMAAIJER *et al.*, 1999).



**Figura 11** - Estruturas moleculares das substâncias relacionadas descritas para micofenolato de mofetila matéria-prima (THE EUROPEAN..., 2007).

---

A identificação e o controle de impurezas de fármacos são importantes para assegurar a qualidade e segurança de produtos farmacêuticos. Por isso, é usual incluir o teste para substâncias relacionadas, identificadas ou não, nas monografias farmacopéicas. As substâncias relacionadas são estruturalmente semelhantes ao composto principal, sendo oriundas dos processos de síntese, como intermediários ou subprodutos, ou de degradação (BRITISH..., 2007).

Os níveis de impurezas podem ser determinados pela comparação da resposta obtida com um padrão de referência apropriado ou com a resposta de uma solução diluída do próprio fármaco. Nesse último caso, a concentração limite deve ser interpretada em termos de uma porcentagem nominal do fármaco sob análise, ao invés de uma porcentagem real da impureza (BRITISH..., 2007; INTERNATIONAL..., 2006a).

A utilização do fármaco como padrão para estimar o nível de impureza conhecida e identificada é apropriada quando a resposta entre o fármaco e a impureza possui diferença inferior a  $\pm 20\%$ . Caso contrário, recomenda-se utilizar um fator de correção para que a impureza não seja sobre ou subestimada (BRITISH..., 2007).

A definição dos limites deve considerar diversos fatores como o tipo, a farmacologia e a toxicologia da impureza, a via de administração, a dose diária, a duração do tratamento, as características da população alvo e as limitações de produção (THE UNITED STATES..., 2009).

Os guias ICH Q3A(R), Q3B(R) e Q3C(R) representam um consenso das impurezas que devem ser controladas bem como recomendações para pesquisa, relato, identificação e qualificação de impurezas individuais em fármacos e produtos de degradação em medicamentos. Geralmente, o teste de impureza realizado em uma matéria-prima não é repetido nas preparações farmacêuticas ao menos que as impurezas sejam também produtos de degradação (INTERNATIONAL..., 2006a, 2006b, 2009; JACOBSON-KRAM & MCGOVERN, 2006).

O registro de um novo medicamento deve incluir uma lista de produtos de degradação potenciais de ocorrência durante o processo produtivo e nas condições de armazenagem do produto. Estudos de estabilidade, conhecimentos dos mecanismos de degradação e estudos laboratoriais devem ser usados para caracterizar o perfil de degradação do fármaco (INTERNATIONAL..., 2006b).

Os níveis para relato, identificação e qualificação dos produtos de degradação de um novo medicamento estão representados na Tabela 2. Nota-se que os níveis são estratificados em função da dose máxima diária.

**Tabela 2** - Limiar para produtos de degradação em novos medicamentos.

<b>Caracterização</b>	<b>Dose máxima diária</b>	<b>Limiar</b>
<b>Relato</b>	≤ 1 g	0,1%
	> 1 g	0,05%
<b>Identificação</b>	< 1 mg	1,0% ou 5 µg/dia, o que for menor.
	1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 µg/dia, o que for menor.
	> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg/dia, o que for menor.
	> 2 g	0,10%
<b>Qualificação</b>	< 10 mg	1,0% ou 50 µg/dia, o que for menor.
	10 mg – 100 mg	0,5% ou 200 µg/dia, o que for menor.
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg/dia, o que for menor.
	> 2 g	0,15%

Fonte: INTERNATIONAL..., 2006b.

Entende-se por limiar de relato o limite de concentração acima do qual a presença de uma impureza deve ser relatada. As impurezas presentes acima do limiar de identificação devem ser caracterizadas estruturalmente. Quando encontradas em nível superior ao estabelecido na qualificação, devem ser estudadas quanto à segurança biológica nas quantidades típicas ou reduzidas a um nível inferior ao limiar de qualificação (INTERNATIONAL..., 2006b).

### **2.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência**

A CLAE é a técnica analítica mais utilizada para análises de medicamentos e impurezas. Além da capacidade de separação de múltiplos compostos, os métodos por CLAE são vantajosos pois apresentam exatidão e sensibilidade para pequenas

quantidades de impurezas. Todavia, quando a impureza não é conhecida, a identificação é facilitada por técnicas complementares como a espectrometria de massas e a ressonância nuclear magnética (RMN) (BAKSHI & SINGH, 2002; LEE *et al.*, 2008).

Os principais trabalhos descritos para a determinação de MMF, MPA, impurezas e metabólitos pelo método de CLAE encontram-se resumidamente na Tabela 3.

Os principais métodos para quantificação de MPA e MMF utilizam colunas cromatográficas empacotadas com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (C<sub>8</sub>) ou octadecilsilano (C<sub>18</sub>) como fase estacionária. Para a maioria deles, utiliza-se acetonitrila (ACN) como solvente orgânico e valores reduzidos de pH na fase móvel.

A estrutura de MMF apresenta grupo funcional amino, responsável pela maior basicidade em comparação ao MPA. Digno de nota que os métodos por CLAE para quantificação de MMF utilizam mecanismos de pareamento de íons (LEE *et al.*, 1990; TSINA *et al.*, 1996; HOOIJMAAIJER *et al.*, 1999) ou eluição em fase reversa com adição de trietilamina (TEA) (THE EUROPEAN..., 2007).

Na cromatografia em fase reversa, a ionização da amostra e o tempo de retenção variam em função do pH da fase móvel. Os ácidos na forma não dissociada e as bases não ionizadas demonstram maior caráter hidrofóbico e, por isso, são retidos mais facilmente na fase estacionária. Ao contrário, quando apresentam-se, respectivamente, na forma dissociada e ionizada, diminuem a hidrofobicidade e, conseqüentemente, são menos retidos na fase estacionária.

As mudanças no tempo de retenção para a maioria dos compostos ocorrem em variações de pH em  $\pm 1,5$  unidades do valor de pKa. A supressão da ionização ou a ionização completa, obtida em valores de pH fora da referida faixa, é recomendada quando se deseja minimizar o efeito do pH sobre o tempo de retenção e melhorar a robustez do método (SNYDER *et al.*, 1997).

**Tabela 3** - Condições cromatográficas para determinação de micofenolato de mofetila, ácido micofenólico, impurezas e metabólitos.

Descrição	LEE <i>et al.</i> , 1990	HOOIJMAIJER <i>et al.</i> , 1999	WIWATTANAWONGSA <i>et al.</i> , 2001	BARZOKI <i>et al.</i> , 2005	TSINA <i>et al.</i> , 1996	THE EUROPEAN..., 2007
<b>Analito</b>	MPA e ésteres derivados	MMF e produtos de degradação	MPA e metabólitos	MPA	MMF	MMF e substâncias relacionadas
<b>Matriz</b>	Solução aquosa	Solução aquosa	Plasma e urina	Plasma	Plasma	Matéria-prima
<b>Coluna</b>	C <sub>8</sub> 250 x 4,6 mm; 5 µm	C <sub>8</sub> 250 x 9,4 mm	C <sub>18</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm	C <sub>18</sub> 250 x 4,6 mm; 10 µm	C <sub>18</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm	C <sub>8</sub> 250 x 4,6 mm; 5 µm
<b>Fase móvel</b>	MeOH, THF, fosfato de amônio monobásico 10 mmol/l com butanosulfonato sódico 10 mmol/l (25:15:60)	ACN, TFA 0,1% (35:65)	MeOH, TFA 0,1% (48:52)	ACN, fosfato de potássio monobásico 20 mmol/l (51:49)	ACN, tampão fosfato-citrato 50 mM com ácido heptanosulfônico 20 mmol/l (41:59)	ACN, Trietilamina 0,3% (35:65)
<b>pH</b>	3,0	-	-	3,0	3,6	5,3
<b>Fluxo (ml/min)</b>	1,0	2,5	1,5	1,0	0,4	1,5
<b>Volume de Injeção (µl)</b>	50	-	25	50	20	10
<b>Temperatura do forno (°C)</b>	-	45	-	-	-	45
<b>Detector UV (nm)</b>	248	250	250	215	254	250

ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetraidrofurano;

A interação do analito com os grupos silanóis da fase estacionária constitui outro aspecto importante na cromatografia em fase reversa de compostos ionizáveis. O efeito silanol, observado principalmente na análise de compostos básicos, pode aumentar a retenção, resultar em picos com cauda e tornar o método irreprodutível na mudança de coluna (SNYDER *et al.*, 1997).

As interações silanóis podem ser reduzidas utilizando colunas próprias para análise de compostos básicos e fase móvel com pH reduzido ( $2,0 < \text{pH} < 3,5$ ) de maneira a minimizar a concentração de silanóis na forma ionizada. Outras alternativas são: o uso de soluções tampão em alta concentração (maior que 10 mmol/l) com cátions capazes de interagir fortemente com os silanóis ionizados ou a adição de TEA, ou análogos, quando observada cauda persistente (SNYDER *et al.*, 1997).

A adição de um agente par-iônico na fase móvel deve ser considerada quando a separação por fase reversa é inadequada. O pareamento iônico é estabelecido entre a interação dinâmica do analito com o contra-íon adsorvido na fase estacionária. Neste caso, a retenção é dependente da concentração e hidrofobicidade do contra-íon (SNYDER *et al.*, 1997).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar parâmetros de qualidade para MMF e MSD matéria-prima e comprimidos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar métodos para o controle de qualidade de MMF e MSD em matéria-prima e comprimidos;
- realizar análise comparativa de métodos para doseamento;
- avaliar perfil de dissolução para comprimidos de MMF e MSD;
- comparar perfil de dissolução de medicamento genérico e referência de MMF;
- elaborar propostas de monografias farmacopéicas para o controle de qualidade de MMF e MSD matéria-prima e comprimidos.

## 4 MATERIAL

### 4.1 Padrões

- Biftalato de potássio Aldrich;
- MMF SQR, Farmacopéia Européia, lote 2.0;
- MMF para identificação dos picos SQR (micofenolato de mofetila contendo as impurezas A, B, D, E, F, G e H), Farmacopéia Européia, lote 3.0;
- MPA padrão, Sigma<sup>®</sup>, lote 097K4005, teor 99,5%.

### 4.2 Amostras

- MMF matéria-prima, cedida pelo Laboratório Sanval;
- MMF 500 mg comprimidos, CellCept<sup>®</sup> (medicamento referência), fabricado por Roche, lote M1712, fabricação 01/2007 e validade 01/2010;
- MMF 500 mg comprimidos, Laboratório Cellofarm (medicamento genérico), lote 7200688, fabricação 05/2005 e validade 06/2008;
- MSD matéria-prima, cedida pelo Laboratório Sanval;
- MSD 360 mg comprimidos gastrorresistentes, Myfortic<sup>®</sup> (medicamento referência), fabricado pelo Laboratório Novartis, lote S0136, fabricação 11/2006 e validade 11/2009.

### 4.3 Reagentes e vidrarias

- Água destilada e água ultra-pura;
- coluna cromatográfica de fase reversa Merck LiChrosper 100, C<sub>8</sub> 250 x 4,0 mm (5 µm) em LiChroCart 125-4;
- coluna cromatográfica de fase-reversa Ace C<sub>8</sub> 250 x 4,6 mm (5 µm);
- coluna cromatográfica de fase-reversa Ace C<sub>8</sub> 150 x 4,6 mm (5 µm);
- coluna cromatográfica de fase-reversa Ace C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm (5 µm);
- excipientes: amido de milho Cargill Agrícola, celulose microcristalina Blanver Farmoquímica, croscarmelose sódica Blanver Farmoquímica, crospovidona ISP Technologies, dióxido de silício coloidal Cabot, estearato de magnésio Faci, indigotina Sensient, povidona K-90 Biesterfeld, hidroxipropilmetilcelulose

Colorcon, dióxido de titânio Kemira, laca de indigo carmim Sensient, lactose DMV-Fonterra Excipients, óxido de ferro amarelo Makeni e óxido de ferro vermelho Basf;

- membrana de celulose regenerada Sartorius com porosidade de 0,45 µm;
- reagentes de grau analítico: acetato de sódio Synth, ácido acético Isofar, ácido clorídrico Isofar, ácido nítrico Tedia, ácido perclórico Quimibrás, ácido sulfúrico F. Maia, anidrido acético F. Maia, clorofórmio J.T. Baker, etanol Synth, éter de petróleo Isofar, fosfato de amônio monobásico Vetec, fosfato de sódio monobásico F. Maia, fosfato de sódio tribásico Synth, glicerina Quimibrás, hidróxido de sódio Synth, nitrato de chumbo J.T. Baker e tiocetamida Vetec;
- reagentes de grau cromatográfico: acetonitrila J.T. Baker, ácido trifluoroacético Tedia, metanol J.T. Baker e trietilamina Merck;
- vidraria de laboratório classe A.

#### **4.4 Equipamentos**

- Aparelho de ponto de fusão Microquímica MQAPF-301;
- aparelho de ultrassom Unique 1400;
- balança analítica Sartorius, com precisão de 0,01 mg, BP210D;
- calorímetro DSC Shimadzu DTG60;
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP 1100, com bomba quaternária, desgaseificador, forno, injeção automática e detector UV/DAD;
- desintegrador Erweka ZT3;
- dissolutor Erweka DT80;
- durômetro Erweka TBH 30 MD;
- espectrofotômetro infravermelho Perkin Elmer Spectrum One B;
- espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível marca Shimadzu UV-160A;
- espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível marca HP 8453;
- espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Advance DPX 200;
- estufa de secagem Fanem 306/1;
- estufa a vácuo Fanem retilínea;
- forno mufla Lavoisier Engro 400;
- friabilômetro Erweka TAR3R;

- pipeta automática calibrada Brand Transferpette;
- potenciômetro Metrohm 827 pH Lab.;
- sistema de purificação de água Milipore Milli-Q-Plus;
- titulador automático Mettler Toledo DL53.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matéria-prima

#### 5.1.1 Descrição

##### 5.1.1.1 Características físicas

As matérias-primas MMF e MSD foram avaliadas quanto ao aspecto, cor e odor. Os fármacos são designados como pó cristalino branco a quase branco (THE EUROPEAN..., 2007; U.S. FOOD..., 2008b).

##### 5.1.1.2 Solubilidade

Avaliaram-se as solubilidades de MMF e MSD em água, ácido clorídrico 0,1 mol/l, hidróxido de sódio 0,1 mol/l, metanol, acetonitrila e etanol. Cerca de 10 mg da matéria-prima foram transferidas para tubos de ensaios e acrescentaram-se alíquotas do solvente até a solubilização. Deixou-se em ultrassom durante 1 minuto a cada alíquota adicionada. O procedimento foi realizado em temperatura de aproximadamente 25 °C. Os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira (Tabela 4) foram utilizados para expressar a solubilidade dos fármacos. O termo parte refere-se ao número de mililitros de solvente necessário para solubilizar 1 g da substância.

**Tabela 4** - Termos descritivos de solubilidade de acordo com a Farmacopéia Brasileira.

Termo descritivo	Solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: FARMACOPÉIA..., 1988.

## 5.1.2 Identificação

### 5.1.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos por reflectância atenuada na faixa 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  para MMF e MSD matérias-primas dessecadas, MPA padrão e MMF SQR. Identificaram-se as principais bandas observadas.

### 5.1.2.2 Espectrofotometria no ultravioleta

Os espectros no ultravioleta foram obtidos na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm para MMF, MSD e MPA. Determinaram-se os comprimentos de onda em que ocorrem os máximos de absorção. As soluções foram preparadas como descrito a seguir.

*Solução de MMF:* transferiram-se, exatamente, cerca de 12,5 mg de MMF matéria-prima para balão volumétrico de 50 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com HCl 0,1 mol/l. Transferiram-se 5,0 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

*Solução de MSD:* transferiram-se, exatamente, cerca de 11,25 mg de MSD matéria-prima para balão volumétrico de 50 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8. Transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

*Solução de MPA:* transferiram-se, exatamente, cerca de 11,25 mg do padrão de MPA para balão volumétrico de 50 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com metanol. Transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8.

### 5.1.2.3 Íon sódio

Prepararam-se soluções a 1% p/V de MMF em HCl 0,1 mol/l e MSD em água. As soluções foram colocadas na zona redutora da chama. A presença de íon sódio deve ser evidenciada por coloração amarela intensa (FARMACOPÉIA..., 1988).

### 5.1.3 Ensaios de pureza

#### 5.1.3.1 Temperatura de fusão

As faixas de fusão de MMF e MSD foram determinadas em medidor de ponto de fusão visual, registrando-se o início e o término da fusão. O procedimento foi realizado em triplicata.

#### 5.1.3.2 Análise térmica

As curvas de análise térmica diferencial derivada (DTA), termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) para MMF, MSD e MPA foram obtidas pela técnica TG/DTG-DTA simultâneas. Utilizaram-se cerca de 5,0 mg de cada amostra em cadinho de alumina, fluxo de nitrogênio 50 ml/min e razão de aquecimento 10 °C/min.

#### 5.1.3.3 Substâncias relacionadas de micofenolato de mofetila matéria-prima

A análise de substâncias relacionadas para MMF matéria-prima foi realizada por CLAE, com detector ultravioleta em  $\lambda$  250 nm e coluna Ace C<sub>8</sub> 250 x 4,6 mm 5  $\mu$ m. Utilizou-se como fase móvel a mistura de 350 ml de acetonitrila com 650 ml de água acrescida de 2,0 ml de trietilamina e previamente ajustada para pH 5,3 com ácido fosfórico diluído. A temperatura do forno foi mantida a 45 °C e o fluxo 1,5 ml/min. Injetaram-se 10  $\mu$ l de cada solução imediatamente após o preparo. O procedimento foi realizado em triplicata (THE EUROPEAN..., 2007).

*Solução teste:* dissolveram-se 20 mg de MMF matéria-prima em acetonitrila e diluiu-se para 10 ml com o mesmo solvente (2,0 mg/ml).

*Solução (a):* diluiu-se 1 ml da *solução teste* para 100 ml de acetonitrila. Em seguida, diluiu-se 1 ml para 10 ml de acetonitrila (2,0  $\mu$ g/ml).

*Solução (b):* dissolveram-se 5 mg de MMF para identificação dos picos SQR (micofenolato de mofetila contendo as impurezas A, B, D, E, F, G e H) em 2,5 ml de acetonitrila.

Como parâmetro de adequação do sistema, utilizou-se o critério de, no mínimo, 2,0 para resolução entre os picos das impurezas A e H obtidos no cromatograma da *solução (b)*.

A quantidade de impurezas foi calculada comparando-se as áreas dos picos das impurezas obtidas na *solução teste* com a área do pico principal obtido na *solução (a)*.

A área da impureza F não deverá ser maior que cinco vezes a área do principal pico obtido no cromatograma da *solução (a)*.

A área da impureza B não deverá ser maior que duas vezes a área do principal pico obtido no cromatograma da *solução (a)*. Para o cálculo da impureza B utilizar o fator de correção multiplicando a área da impureza por 2,1.

As áreas individuais das impurezas A, D, E, G e H não deverão ser superiores à área do principal pico obtido no cromatograma da *solução (a)*.

Para outras impurezas, as áreas encontradas não deverão ser superiores à área do principal pico obtido no cromatograma da *solução (a)*.

A quantidade total de impurezas (área total) não deverá ser maior que sete vezes a área do principal pico obtido no cromatograma da *solução (a)*. Não serão considerados os picos de área 0,5 vezes a área do principal pico obtido no cromatograma da *solução (a)*.

Os tempos de retenção relativos para as impurezas e seus respectivos limites máximos permitidos estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Tempos de retenção relativos e limites para impurezas em micofenolato de mofetila matéria-prima.

Impureza	A	B	D	E	F	G	H	Outras	Total
Trr	0,4	0,8	1,2	1,6	0,3	0,6	0,5	-	-
Limite (%)	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	0,7

Fonte: THE EUROPEAN..., 2007.

#### 5.1.3.4 *Perda por dessecação*

Transferiu-se, exatamente, cerca de 1,0 g de cada matéria-prima, em triplicata, para pesa-filtro previamente dessecado. Procedeu-se à dessecação durante 5 horas e calcularam-se as porcentagens de perda por dessecação a cada hora. O ensaio para MMF foi realizado sob vácuo a temperatura de 60 °C. As determinações para MSD foram realizadas a 105 °C.

Paralelamente ao ensaio, verificou-se a estabilidade de MMF no processo de dessecação. Determinou-se a quantidade de substâncias relacionadas na amostra quando submetida aos crescentes tempos de dessecação. Aplicou-se o método de determinação de substâncias relacionadas descrito na seção 5.1.3.3.

#### 5.1.3.5 *Cinzas sulfatadas*

Cerca de 1,0 g de MMF matéria-prima foi transferida para cadinho de porcelana previamente calcinado. Adicionaram-se 2,0 ml de ácido sulfúrico e aqueceu-se sob chama até carbonização. Em seguida, a amostra foi incinerada a  $(800 \pm 50)$  °C durante 1 hora e resfriada à temperatura ambiente em dessecador. Adicionou-se 1,0 ml de ácido sulfúrico ao resíduo, aqueceu-se sob chama e incinerou-se novamente durante 1 hora. Determinou-se a porcentagem de cinzas sulfatadas em relação à massa inicial da amostra (FARMACOPÉIA..., 1988).

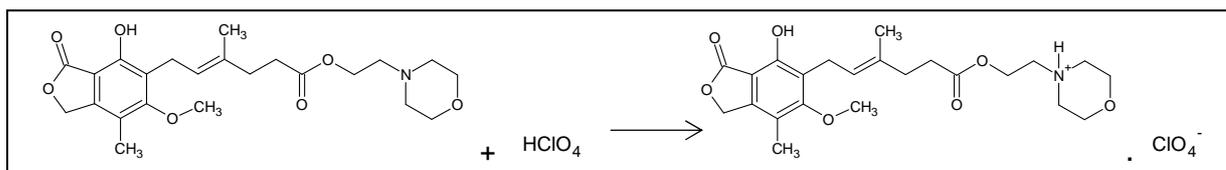
#### 5.1.3.6 *Ensaio-limite para metais pesados*

O ensaio-limite para metais pesados foi realizado de acordo com o Método II descrito no Método Geral <231> da Farmacopéia Americana (2009). O Método II apresenta digestão prévia da amostra e reação com tiocetamida.

Utilizou-se cerca 1,0 g de MMF e MSD matérias-primas para a realização do ensaio. As colorações das preparações amostra foram comparadas com as colorações de preparações padrão a 10, 20 e 30 ppm de chumbo.

#### 5.1.4 Determinação do teor de micofenolato de mofetila por volumetria de neutralização em meio não aquoso (THE EUROPEAN..., 2007)

Dissolveram-se, exatamente, cerca de 220,0 mg de MMF em 50 ml de ácido acético glacial. Realizou-se a titulação com solução de ácido perclórico 0,1 mol/l SV com determinação potenciométrica do ponto final. Cada ml de ácido perclórico 0,1 mol/l corresponde a 43,35 mg de MMF. A equação da reação entre MMF e o titulante está representada na Figura 12.



**Figura 12** - Equação da reação entre MMF e o titulante ácido perclórico 0,1 mol/l SV em meio não aquoso.

A verificação da concentração do titulante foi realizada com padrão primário de biftalato de potássio previamente dessecado a 120 °C durante 3 horas. Cerca de 150 mg de biftalato de potássio foram dissolvidos em 50 ml de ácido acético glacial. Titulou-se com a solução de ácido perclórico preparada e determinou-se o ponto final potenciometricamente. O procedimento foi realizado em triplicata.

##### 5.1.4.1 Precisão

Realizaram-se seis determinações em três dias de análises com analistas diferentes (n = 18). A repetitividade (n = 6) foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) em cada dia de análise. A precisão intermediária foi avaliada pela comparação dos resultados entre os três dias de análises por Anova ( $\alpha = 0,05$ ) (INTERNATIONAL..., 2005; PETERS *et al.*, 2007; RIBANI *et al.*, 2004).

Valores de DPR inferiores a 2,0% são recomendados para consideração da precisão de métodos analíticos quando o analito é o componente principal da amostra (RIBANI *et al.*, 2004; SNYDER *et al.*, 1997).

### 5.1.5 Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação do teor de MSD em matéria-prima estão relacionadas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Condições cromatográficas estabelecidas para a determinação do teor de micofenolato de sódio matéria-prima.

Parâmetro	Especificação
Coluna	C <sub>8</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm
Fase móvel	metanol: ácido fosfórico 0,05% (55:45)
Fluxo	1,5 ml/min
Temperatura do forno	30 °C
Detecção	UV 250 nm
Volume de injeção	25 µl
Concentração de trabalho	36 µg/ml MSD

#### 5.1.5.1 Determinação das condições cromatográficas

A seleção das condições cromatográficas para o doseamento de MSD matéria-prima foi realizada por adaptação e ajuste das condições descritas por Wiwattanawongsa (2001). Injetaram-se 25 µl de uma solução de MSD 36 µg/ml em mistura de metanol e TFA 0,05% (55:45) nas condições cromatográficas descritas na Tabela 7 e avaliaram-se os parâmetros de conformidade do sistema expressos na Tabela 8.

**Tabela 7** - Condições cromatográficas testadas para determinação do teor de micofenolato de sódio matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.

Condição	A	B	C
Coluna	Ace C <sub>18</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm	Ace C <sub>18</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm	Ace C <sub>8</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm
Fase móvel	MeOH, TFA 0,05% (55:45)	MeOH, TFA 0,05% (60:40)	MeOH, TFA 0,05% (60:40)
Fluxo (ml/min)	1,5	1,5	1,5
Volume de injeção (µl)	25	25	25
Temperatura do forno (° C)	30	30	30
Detecção (nm)	250	250	250

MeOH: metanol; TFA: ácido trifluoroacético;

**Tabela 8** - Parâmetros e especificações de conformidade do sistema para métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (BRUCE *et al.*, 1998; SNYDER *et al.*, 1997).

Parâmetro	Cálculo	Especificação
Fator de capacidade (k)	$\frac{t_r - t_0}{t_0}$	$k \geq 2$
Resolução (Rs)	$\frac{1,18 (t_2 - t_1)}{W_{1;0,5} - W_{2;0,5}}$	$R_s \geq 2$ entre o pico de interesse e o interferente mais próximo
Fator de cauda (T)	$\frac{W_{0,0,5}}{2f}$	$0,8 \leq T \leq 1,2$
Número de pratos (N)	$5,54(t_r / W_{0,5})^2$	$N \geq 2000$

$t_r$  = tempo de retenção do pico de interesse, em minutos

$t_0$  = tempo morto (estimado a partir do primeiro distúrbio significativo da linha de base), em minutos.

$t_1$  e  $t_2$  = tempos de retenção do primeiro e segundo picos adjacentes

$W_{0,05}$  = largura do pico medida a 5% da altura

$W_{0,5}$  = largura do pico à meia altura

$W_{1;0,5}$  e  $W_{2;0,5}$  = largura à meia altura do primeiro e segundo picos adjacentes

$f$  = medida entre a linha perpendicular que une o máximo do pico com a linha de base e o extremo anterior do pico a 5% da altura.

Em seguida, modificou-se o componente aquoso da fase móvel para ácido fosfórico 0,05% e avaliou-se a estabilidade do fármaco na fase móvel e no diluente metanol e água (55:45), em período de 24 horas. Paralelamente à definição das condições cromatográficas, determinou-se a seletividade em relação aos produtos de degradação forçada.

#### 5.1.5.2 Seletividade

A seletividade foi demonstrada frente aos produtos de degradação de MSD obtidos pela hidrólise em meio ácido, neutro e alcalino e pela exposição da matéria-prima à luz e umidade do ambiente durante um período de 120 dias. Verificou-se a capacidade do método em separar o fármaco dos produtos de degradação. Determinou-se a pureza cromatográfica do pico de MSD com o auxílio do detector ultravioleta com de arranjo de diodos (UV/DAD).

Preparou-se uma solução estoque a 1 mg/ml de MSD matéria-prima em água. Em seguida, diluiu-se a solução estoque em cada um dos seguintes solventes: HCl 0,1 mol/l, água e NaOH 0,1 mol/l, de maneira a obter soluções de concentração a 0,1 mg/ml. As soluções foram submetidas à hidrólise sob refluxo durante um período de 60 minutos. Posteriormente, diluiu-se cada solução 10 vezes na fase móvel antes de serem injetadas no cromatógrafo.

Deixou-se o fármaco exposto à temperatura, luz e umidade do laboratório. Após 120 dias, avaliou-se o aspecto e preparou-se uma solução a 360 µg/ml na fase móvel para realização da análise cromatográfica.

#### 5.1.5.3 Linearidade

Preparou-se uma solução estoque a 360 µg/ml de MSD matéria-prima no diluente. Transferiram-se alíquotas adequadas da solução estoque para balões volumétricos de 10 ml de modo a obter concentrações de 40% a 160% da concentração de trabalho (36 µg/ml), conforme apresentado na Tabela 9. O procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

**Tabela 9** - Preparo das soluções de micofenolato de sódio matéria-prima para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Volume da solução estoque (ml)	Diluente q.s.p. (ml)	Concentração (µg/ml)
40	0,4	10	14,4
60	0,6	10	21,6
80	0,8	10	28,8
100	1,0	10	36,0
120	1,2	10	43,2
140	1,4	10	50,4
160	1,6	10	57,6

Utilizou-se o método dos mínimos quadrados ordinários para verificação da linearidade. Avaliaram-se os parâmetros de normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos, o coeficiente de correlação, o intercepto da curva e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear com o auxílio dos *softwares Minitab 12<sup>®</sup>* e *Microsoft Excel 2003<sup>®</sup>*. Valores de coeficiente de correlação superiores a 0,999 são recomendados para métodos de doseamento de componentes principais da amostra (GREEN, 1996; SNYDER *et al.*, 1997; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

#### 5.1.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por adição de padrão à matéria-prima em um dia de análise e determinada em triplicata em três níveis de concentração

(INTERNATIONAL..., 2005; ASOCIACIÓN..., 2001). Quantidades conhecidas de padrão foram incorporadas à matéria-prima de modo a obter soluções com concentrações equivalentes a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho (36 µg/ml). As soluções utilizadas foram preparadas como descrito a seguir.

*Solução amostra estoque:* transferiram-se 11,25 mg de MSD matéria-prima para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente, obtendo solução de MSD 450 µg/ml.

*Solução padrão estoque:* transferiram-se 10,53 mg de MPA padrão (equivalente a 11,25 mg MSD) para balão volumétrico de 25 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com metanol, obtendo solução equivalente a 450 µg/ml de MSD.

*Solução amostra:* transferiram-se 2,0 ml da *solução amostra estoque* para balão volumétrico de 25 ml. Completou-se o volume com o diluente, obtendo uma solução de MSD 36 µg/ml.

*Solução padrão:* transferiram-se 2,0 ml da *solução padrão estoque* para balão volumétrico de 25 ml. Completou-se o volume com o diluente, obtendo uma solução equivalente a 36 µg/ml de MSD.

As *soluções fortificadas* foram preparadas pela transferência de volumes adequados das soluções estoques para balão volumétrico de 25 ml (Tabela 10) e completando o volume com o diluente.

**Tabela 10** - Preparo das soluções fortificadas para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.

Solução fortificada	Solução amostra estoque		Solução padrão estoque		Conc. final (µg/ml)	%
	Volume (ml)	Conc. (µg/ml)	Volume (ml)	Conc. (µg/ml)		
1	1,0	18,0	0,4	7,2	25,2	70
2	1,0	18,0	1,0	18,0	36,0	100
3	1,0	18,0	1,6	28,8	46,8	130

A porcentagem de recuperação foi determinada de acordo com a equação (3).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{amostra}}}{C_{\text{padrão teórica}}} \times 100 \quad (3)$$

em que:

$C_{\text{total}}$  = concentração determinada na *Solução fortificada*;

$C_{\text{amostra}}$  = concentração determinada na *Solução amostra*;

$C_{\text{padrão teórica}}$  = concentração teórica do padrão adicionado à *Solução fortificada*.

Aplicou-se a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ) com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa entre a recuperação média e o valor teórico de 100% (ASOCIACIÓN..., 2001). O valor de t experimental foi calculado de acordo com a equação (4).

$$t_{\text{experimental}} = \frac{|100 - r| \sqrt{n}}{\text{DPR}} \quad (4)$$

em que:

r = recuperação média (%);

n = número de determinações;

DPR = desvio padrão relativo (%).

#### 5.1.5.5 Precisão

Realizaram-se seis determinações a 100% da concentração de trabalho (36  $\mu\text{g/ml}$ ) em três dias de análises com analistas diferentes ( $n = 18$ ). A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas conforme 5.1.4.1. O preparo das soluções amostra e padrão estão descritos a seguir.

*Solução amostra*: transferiram-se, exatamente, cerca de 22,5 mg da matéria-prima para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml do diluente. Deixou-se em ultrassom durante 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o diluente.

*Solução padrão:* dissolveram-se, exatamente, cerca de 10,53 mg do padrão de MPA (equivalente a 11,25 mg de MSD) em 25 ml de metanol. Transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o diluente.

A solução padrão foi injetada cinco vezes para verificar a adequação do sistema. Recomenda-se que o desvio padrão relativo entre as cinco injeções não seja superior a 1,0% (U.S. FOOD..., 1994).

#### 5.1.5.6 Robustez

A robustez foi verificada mediante as variações dos seguintes parâmetros: temperatura do forno, fluxo da fase móvel e proporção de metanol na fase móvel. Realizaram-se seis determinações a 100% da concentração de trabalho em cada condição apresentada na Tabela 11. As soluções amostra e padrão foram preparadas conforme descrito em 5.1.5.5. Os resultados foram comparados por Anova ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 11** - Condições cromatográficas utilizadas para verificação da robustez do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetros	Nominal	1	2	3	4	5	6
Temperatura (°C)	30	25	35	30	30	30	30
Fluxo (ml/min)	1,5	1,5	1,5	1,7	1,3	1,5	1,5
Metanol (%)	55	55	55	55	55	57	53

#### 5.1.5.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados baseados na inclinação e no desvio padrão do intercepto obtido na curva analítica, de acordo com as equações (5) e (6), respectivamente. Em seguida, realizaram-se diluições sucessivas a partir dos valores estimados até a obtenção de uma relação entre sinal e ruído próxima de 3 para o limite de detecção e próxima de 10 para o limite de quantificação (INTERNATIONAL..., 2005; SNYDER *et al.*, 1997).

$$LD = \frac{3,3 S}{a} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{10 S}{a} \quad (6)$$

em que:

S = desvio padrão do intercepto;

a = inclinação da curva analítica.

## **5.2 Obtenção, identificação e caracterização de micofenolato de mofetila a partir da matriz de comprimido**

### **5.2.1 Obtenção de micofenolato de mofetila**

A obtenção de micofenolato de mofetila a partir da matriz de comprimidos foi necessária para experimentos preliminares à pesquisa. Pulverizaram-se dois comprimidos de 500 mg de MMF (CellCept<sup>®</sup>) e realizou-se a extração do princípio ativo com 80 ml de clorofórmio. Procedeu-se à filtração em papel de filtro quantitativo, com poros de 28 µm, e o filtrado foi recolhido para balão de fundo redondo.

O balão de fundo redondo com o filtrado foi adaptado ao rotavapor a 50 °C e sob pressão reduzida até eliminação do solvente e obtenção de um extrato concentrado. Em seguida, realizou-se precipitação forçada com 2 porções de 60 ml de éter de petróleo sob agitação. Os precipitados em suspensão foram transferidos cuidadosamente para um recipiente previamente pesado. Deixou-se à temperatura ambiente até a completa evaporação do éter de petróleo. Pesou-se o recipiente com o precipitado e determinou-se o rendimento da extração.

### **5.2.2 Identificação e caracterização do resíduo**

Os cristais obtidos foram dessecados a 60 °C sob vácuo por 3 horas. Procedeu-se à identificação e caracterização pelas seguintes técnicas: determinação da temperatura de fusão, espectrofotometria no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta, CLAE e ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) e de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H).

#### 5.2.2.1 *Temperatura de fusão*

A temperatura de fusão foi determinada em triplicata conforme 5.1.3.1.

#### 5.2.2.2 *Espectrofotometria no infravermelho*

Realizou-se a identificação de MMF por espectrofotometria no infravermelho por reflectância atenuada na faixa 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Comparou-se o espectro com aquele obtido para MMF SQR (seção 6.1.2.1).

#### 5.2.2.3 *Espectrofotometria no ultravioleta*

O espectro no ultravioleta foi obtido na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm a partir da solução a 25  $\mu\text{g/ml}$  do resíduo em HCl 0,1 mol/l. Compararam-se os máximos de absorvância com aqueles obtidos para MMF matéria-prima (seção 6.1.2.2).

#### 5.2.2.4 *Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )*

Alíquotas do resíduo foram dissolvidas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e submetidas à análise em espectrômetro de ressonância magnética nuclear em frequência de 400 e 100 MHz para RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno de tetrametilsilano (TMS).

As atribuições dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram realizadas com base nos valores de deslocamento químico, multiplicidade dos sinais, integral dos sinais e valores das constantes de acoplamento. Para as atribuições do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  observaram-se os valores de deslocamento químico e o espectro DEPT. Informações complementares para atribuição dos carbonos e hidrogênios foram obtidas com o auxílio dos espectros bidimensionais HMQC e HMBC.

#### 5.2.2.5 *Cromatografia líquida de alta eficiência*

As impurezas no resíduo foram determinadas de acordo com o procedimento descrito em 5.1.3.3.

### **5.3 Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio comprimidos**

Os comprimidos de MMF (CellCept<sup>®</sup> e medicamento genérico) e MSD (Myfortic<sup>®</sup>) foram avaliados quanto à identificação, determinação de peso, resistência mecânica, teste de desintegração, doseamento do princípio ativo e uniformidade de conteúdo.

#### **5.3.1 Identificação**

A identificação de MMF em comprimidos foi realizada por CLAE. Procedeu-se conforme 5.3.6. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da solução amostra corresponde àquele do pico principal da solução de MMF SQR.

A identificação de MSD em comprimidos também foi realizada por CLAE, como descrito na seção 5.1.5. Adicionalmente, procedeu-se à identificação de íon sódio, conforme 5.1.2.3, utilizando solução amostra a 1% p/V de MSD e solução placebo preparada nas mesmas condições.

#### **5.3.2 Determinação de peso**

Pesaram-se, individualmente, 20 comprimidos e calcularam-se o peso médio e os desvios individuais em relação ao peso médio. Podem ser toleradas não mais que duas unidades fora do limite de  $\pm 5,0\%$  em relação ao peso médio, porém nenhuma unidade pode estar acima ou abaixo de  $10,0\%$  (FARMACOPÉIA..., 1988).

#### **5.3.3 Determinação de resistência mecânica**

##### **5.3.3.1 Dureza**

O teste consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho que meça a força, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. O mínimo aceitável é 30 N para comprimidos (FARMACOPÉIA..., 1988). Utilizaram-se 10 unidades no teste.

### 5.3.3.2 Friabilidade

O teste de friabilidade foi realizado com 20 unidades. Os comprimidos foram submetidos à rotação de 20 rpm durante 5 minutos. Determinou-se a friabilidade em função da porcentagem de perda de pó a partir da diferença entre o peso inicial e final dos comprimidos. Consideraram-se aceitáveis as perdas inferiores a 1,5% do peso (FARMACOPÉIA..., 1988).

### 5.3.4 Teste de desintegração

O teste de desintegração dos comprimidos de MMF foi realizado conforme o procedimento geral para comprimidos. A análise para os comprimidos de MSD foi realizada de acordo com procedimento específico de comprimidos com revestimento entérico. Ambos descritos no Método V.1.4.1 da Farmacopéia Brasileira (1988).

O tempo de desintegração dos comprimidos de MMF foi determinado com seis unidades, utilizando um disco em cada tubo e água a  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  como líquido de imersão. O limite máximo especificado para a desintegração é de 30 minutos (FARMACOPÉIA..., 1988).

O tempo de desintegração dos comprimidos de MSD foi determinado com seis unidades em dois estágios. No primeiro estágio, utilizou-se HCl 0,1 mol/l a  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  como líquido de imersão e tubos isentos de discos. O movimento da cesta foi interrompido após 60 minutos e os comprimidos foram observados. Em seguida, realizou-se o segundo estágio, com as mesmas unidades, colocando um disco em cada tubo e utilizando solução tampão fosfato pH 6,8 a  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  como líquido de imersão. Ao final do primeiro estágio, nenhuma unidade pode apresentar qualquer sinal de desintegração, rachadura ou amolecimento que possibilite o extravasamento do conteúdo. Após 45 minutos decorridos no segundo estágio, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados, podendo restar apenas fragmentos de revestimento insolúvel (FARMACOPÉIA..., 1988).

### 5.3.5 Determinação do teor de micofenolato de mofetila por espectrofotometria no ultravioleta

A determinação do teor de MMF em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta foi realizada conforme o método proposto por Verma *et al.* (2008). Utilizou-se HCl 0,1 mol/l como solvente e  $\lambda$  250 nm.

#### 5.3.5.1 Seletividade

A seletividade do método de doseamento de MMF em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta foi avaliada em relação aos principais excipientes. Preparou-se o placebo a partir da mistura homogênea dos componentes da formulação simulada (Tabela 12), na ausência do princípio ativo. As quantidades de excipiente presentes na formulação simulada foram definidas com base nas especificações percentuais descritas por Kibbe (2000).

**Tabela 12** - Formulação simulada para comprimidos de micofenolato de mofetila.

Componente	%
MMF	60,0
Celulose microcristalina	30,0
Croscarmelose sódica	4,0
Estearato de magnésio	1,0
Povidona K-90	1,5
Hidroxipropilmetilcelulose	2,3
Dióxido de titânio	1,0
Laca de indigo carmim	0,1
Óxido de ferro amarelo	0,1

Cerca de 12,5 mg do placebo foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml com auxílio de 15 ml de HCl 0,1 mol/l. Deixou-se em ultrassom durante 5 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 5,0 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol/l.

Preparou-se uma solução de MMF padrão de trabalho a 25  $\mu$ g/ml nas mesmas condições. O espectro da solução do placebo na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm foi sobreposto

ao espectro da solução de MMF. A presença de interferentes não deve alterar o resultado final em mais de 0,5% (GREEN, 1996).

### 5.3.5.2 Linearidade

Preparou-se uma solução estoque a 1,0 mg/ml de MMF padrão de trabalho em HCl 0,1 mol/l. Transferiram-se alíquotas adequadas da solução estoque para balões volumétricos de 50 ml, de modo a obter concentrações de 20% a 200% da concentração de trabalho (25 µg/ml), conforme apresentado na Tabela 13. O procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

Traçou-se a curva analítica e calculou-se a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Avaliaram-se os parâmetros de normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos, o coeficiente de correlação, o intercepto da curva e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear, conforme seção 5.1.5.3.

**Tabela 13** - Preparo das soluções de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	Volume da solução estoque (ml)	HCl 0,1 mol/l q.s.p. (ml)	Concentração (µg/ml)
20	0,25	50	5
40	0,50	50	10
60	0,75	50	15
80	1,00	50	20
100	1,25	50	25
120	1,50	50	30
140	1,75	50	35
160	2,00	50	40
180	2,25	50	45
200	2,50	50	50

### 5.3.5.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo método de contaminação do placebo em um dia de análise e determinada em triplicata em três níveis de concentração (INTERNATIONAL..., 2005; ASOCIACIÓN..., 2001). Quantidades conhecidas de

MMF foram incorporadas ao placebo de modo a obter soluções com concentrações equivalentes a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho.

Preparou-se uma solução estoque de MMF padrão de trabalho 2,5 mg/ml em HCl 0,1 mol/l. Transferiram-se alíquotas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml contendo cerca de 12,5 mg do placebo, conforme apresentado na Tabela 14. Adicionaram-se 15 ml de HCl 0,1 mol/l e deixou-se em ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol/l. Preparou-se solução padrão de MMF a 25 µg/ml nas mesmas condições.

**Tabela 14** - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	Quantidade do placebo (mg)	Volume da solução estoque (ml)	Concentração após diluição (µg/ml)
70	12,5	1,75	17,5
100	12,5	2,50	25,0
130	12,5	3,25	32,5

A porcentagem de recuperação foi calculada pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, utilizando a equação (7).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (7)$$

Aplicou-se a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ) para verificar a existência de diferença significativa entre a recuperação média e o valor teórico de 100%, conforme Equação (4) (seção 5.1.5.4).

#### 5.3.5.4 Precisão

Realizaram-se seis determinações do teor de MMF em CellCept® em três dias de análises com analistas diferentes (n = 18). A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas como descrito na seção 5.1.4.1.

*Solução amostra:* os comprimidos utilizados na determinação de peso foram pulverizados até a obtenção de pó fino e homogêneo. Transferiram-se quantidade do pó equivalente a 50 mg de MMF para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 50 ml de HCl 0,1 mol/l. Deixou-se em ultrassom durante 5 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se utilizando papel de filtro. Transferiram-se 5 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol/l.

*Solução padrão:* transferiram-se, exatamente, cerca de 12,5 mg de MMF padrão de trabalho para balão volumétrico de 50 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com HCl 0,1 mol/l. Transferiram-se 5 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

#### 5.3.5.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada pelo doseamento de CellCept<sup>®</sup> utilizando equipamentos distintos. Realizaram-se seis determinações a 100% da concentração de trabalho, conforme descrito em 5.3.5.4. As leituras de absorvância foram medidas nos espectrofotômetros HP 8453 e Shimadzu UV-1800.

Os resultados obtidos nas duas condições foram comparados utilizando a estatística t para dados pareados ( $\alpha = 0,05$ ). O valor de t experimental foi calculado de acordo com a equação (8).

$$t_{\text{experimental}} = \frac{d \sqrt{n}}{S_d} \quad (8)$$

em que:

d = diferença das médias entre os pares de valores;

n = número de pares;

$S_d$  = desvio padrão da diferença entre os pares.

### 5.3.5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados com base na inclinação e no desvio padrão do intercepto obtido na curva analítica, de acordo com as equações (5) e (6), respectivamente (seção 5.1.5.7).

### 5.3.6 Determinação do teor de micofenolato de mofetila por cromatografia líquida de alta eficiência

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação do teor de MMF em comprimidos estão relacionadas na Tabela 15.

**Tabela 15** - Condições cromatográficas estabelecidas para a determinação do teor de micofenolato de mofetila em comprimidos.

Parâmetro	Especificação
Coluna	C <sub>8</sub> 250 x 4,0 mm; 5 µm
Fase móvel	Acetonitrila: TEA 1% (30:70)
Fluxo	1,5 ml/min
Temperatura do forno	45 °C
Detecção	UV/DAD 250 nm
Volume de injeção	25 µl
Concentração de trabalho	50 µg/ml MMF

#### 5.3.6.1 Determinação das condições cromatográficas

A seleção das condições cromatográficas para doseamento de MMF em comprimidos foi realizada com base na revisão bibliográfica, nos parâmetros de conformidade do sistema descritos na Tabela 8 e na seletividade em relação ao placebo e produtos de degradação (seção 5.3.6.2). Utilizou-se coluna LiChrosper 100 (C<sub>8</sub> 250 x 4,0 mm; 5 µm) e detector ultravioleta λ 250 nm.

Inicialmente, determinou-se o comportamento da eluição de MMF e MPA frente às variações de pH da fase móvel. O estudo foi realizado conforme método cromatográfico descrito na Farmacopéia Européia (2007): fase móvel constituída por acetonitrila e TEA 0,3% V/V na proporção 35:65, fluxo 1,5 ml/min e temperatura do forno controlada em 45 °C. O pH da solução de TEA foi ajustado com ácido fosfórico em intervalos de 0,5 compreendendo a faixa de 2,5 a 6,0. Injetaram-se, em cada

condição, 25 µl de uma solução de MMF 50 µg/ml e MPA 25 µg/ml em acetonitrila. Avaliou-se o efeito da variação do pH sobre o tempo de retenção dos compostos.

Posteriormente, verificaram-se os parâmetros cromatográficos do pico de MMF em função da presença de TEA em diferentes concentrações na fase móvel. A composição da fase móvel foi 30% de acetonitrila com 70% de componente aquoso. Os componentes aquosos utilizados foram: tampão fosfato de amônio monobásico 25 mmol/l, TEA 0,3%, TEA 0,5%, TEA 0,7% e TEA 1,0%. Em todas as condições, o pH foi ajustado para 3,0 com ácido fosfórico.

#### 5.3.6.2 *Seletividade*

A seletividade do método de doseamento de MMF em comprimidos por CLAE foi avaliada em relação ao placebo, conforme composição descrita na Tabela 12. Verificou-se também a capacidade do método em separar os produtos de degradação obtidos por exposição à temperatura, luz e umidade do ambiente e, também, hidrólise ácida.

A solução placebo foi obtida pela transferência de 12,5 mg do placebo para balão volumétrico de 25 ml com auxílio de 15 ml da fase móvel. Deixou-se em ultrassom durante 5 minutos e completou-se o volume com a fase móvel. Após filtração, transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com a fase móvel. Preparou-se solução de MMF padrão de trabalho 50 µg/ml nas mesmas condições. O cromatograma do placebo foi comparado ao do padrão para verificar a existência de interferência dos excipientes.

Deixou-se o fármaco exposto à temperatura, luz e umidade do laboratório. Após 120 dias, avaliou-se o aspecto e preparou-se uma solução a 500 µg/ml na fase móvel para análise cromatográfica.

A hidrólise ácida foi realizada a partir de uma solução de MMF 500 µg/ml em HCl 0,1 mol/l sob refluxo durante 2 horas. Alíquotas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de refluxo foram retiradas e diluídas 10 vezes na fase móvel antes de serem

injetadas no cromatógrafo. Avaliaram-se a resolução do pico de MMF em relação ao pico adjacente e a pureza cromatográfica com o auxílio do detector UV/DAD.

Procedeu-se também à hidrólise ácida de MPA. Preparou-se solução de MSD equivalente a 1 mg/ml de MPA em água. Transferiram-se 5 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol/l. A solução ácida foi submetida ao refluxo durante 60 minutos. Em seguida, retirou-se alíquota e diluiu-se 10 vezes na fase móvel antes de injetar no cromatógrafo.

### 5.3.6.3 Linearidade

A curva analítica foi obtida na faixa 40% a 160% da concentração de trabalho e a linearidade avaliada conforme descrito na seção 5.1.5.3. As soluções foram preparadas como apresentado a seguir.

Preparou-se solução estoque de MMF padrão de trabalho 1,0 mg/ml em acetonitrila. Transferiram-se alíquotas adequadas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml e completou-se o volume com fase móvel, de modo a obter concentrações de 20 a 80 µg/ml (Tabela 16). O procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

**Tabela 16** - Preparo das soluções de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Volume da solução estoque (ml)	Fase móvel q.s.p. (ml)	Concentração (µg/ml)
40	0,50	25	20
60	0,75	25	30
80	1,00	25	40
100	1,25	25	50
120	1,50	25	60
140	1,75	25	70
160	2,00	25	80

### 5.3.6.4 Exatidão

Procedeu-se a exatidão pelo método do placebo contaminado nos níveis de 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho, como especificado na seção 5.3.5.3. A

solução estoque e as soluções contaminadas foram preparadas como descrito a seguir.

Preparou-se solução estoque de MMF padrão de trabalho 2,5 mg/ml em acetonitrila. Transferiram-se alíquotas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml contendo cerca de 12,5 mg de placebo, conforme apresentado na Tabela 17. Adicionaram-se 15 ml da fase móvel e deixou-se em ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com a fase móvel. Após filtração, transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com a fase móvel. Preparou-se solução padrão de MMF 50 µg/ml nas mesmas condições.

**Tabela 17** - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Quantidade de placebo (mg)	Volume da solução estoque (ml)	Concentração após diluição (µg/ml)
70	12,5	1,75	35,0
100	12,5	2,50	50,0
130	12,5	3,25	65,0

#### 5.3.6.5 Precisão

Realizaram-se seis determinações em três dias de análises com analistas diferentes (n = 18). A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas conforme seção 5.1.4.1. O preparo das soluções amostra e padrão estão descritos a seguir.

*Solução amostra:* os comprimidos utilizados na determinação de peso foram pulverizados até a obtenção de pó fino e homogêneo. Transferiram-se quantidade do pó equivalente a 25 mg de MMF para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de fase móvel. Deixou-se em ultrassom durante 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com a fase móvel.

*Solução padrão:* transferiram-se, exatamente, cerca de 12,5 mg de MMF SQR para balão de 25 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com fase móvel. Transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com fase móvel.

A solução padrão foi injetada cinco vezes no cromatógrafo. O desvio padrão relativo entre as cinco injeções não deve ser superior a 1,0% (U.S. FOOD..., 1994).

#### 5.3.6.6 Robustez

A robustez foi verificada mediante as variações dos seguintes parâmetros: pH da solução de TEA, temperatura do forno, fluxo da fase móvel e proporção de acetonitrila na fase móvel. Realizaram-se seis determinações a 100% da concentração de trabalho em cada condição apresentada na Tabela 18. As soluções amostra e padrão foram preparadas como descrito em 5.3.6.5. Os resultados foram comparados por Anova ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 18** - Condições cromatográficas utilizadas para verificação da robustez do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetros	Nominal	1	2	3	4	5	6	7	8
pH TEA	3,0	3,2	2,8	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Fluxo (ml/min)	1,5	1,5	1,5	1,3	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5
Temperatura (°C)	45	45	45	45	45	50	40	45	45
% ACN	30	30	30	30	30	30	30	32	28

#### 5.3.6.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados pela curva analítica e determinados pela relação entre sinal e ruído, de acordo com o especificado em 5.1.5.7.

#### 5.3.6.8 Estabilidade em solução

Preparou-se uma solução de MMF padrão de trabalho 50 µg/ml em fase móvel. Injetou-se no cromatógrafo nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas após o preparo. As variações das áreas não deverão ser superiores a  $\pm 2\%$  em relação à resposta inicial (GREEN, 1996).

### **5.3.7 Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de mofetila em comprimidos**

O método de determinação do teor de MMF em comprimidos por CLAE foi comparado com o método por espectrofotometria no ultravioleta. As variâncias dos resultados obtidos na precisão (n = 18 para cada método) foram avaliadas estatisticamente pelo teste F. Em seguida, aplicou-se o teste t para comparação entre as médias (ASOCIACIÓN..., 2001).

### **5.3.8 Doseamento de micofenolato de mofetila no medicamento genérico**

O teor de micofenolato de mofetila no medicamento genérico foi determinado pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico. Realizaram-se seis determinações utilizando os procedimentos descritos em 5.3.5.4 para espectrofotometria no ultravioleta e 5.3.6.5 para CLAE.

### **5.3.9 Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de mofetila**

A uniformidade de doses unitárias foi realizada pelo método de uniformidade de conteúdo. Determinou-se o teor individual de 10 unidades de CellCept® e do medicamento genérico, utilizando o método por espectrofotometria no ultravioleta (seção 5.3.5). A quantidade de fármaco de cada unidade deve estar situada entre 85,0% e 115,0% da quantidade declarada e o DPR entre as determinações deve ser menor ou igual a 6,0% (FARMACOPÉIA..., 1996).

### **5.3.10 Determinação do teor de micofenolato de sódio por espectrofotometria no ultravioleta**

Utilizou-se tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8 como solvente e selecionou-se  $\lambda$  250 nm para a análise espectrofotométrica. O teor do princípio ativo foi expresso em relação à quantidade declarada de MPA.

#### **5.3.10.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada de maneira análoga ao descrito na seção 5.3.5.1, utilizando a formulação simulada apresentada na Tabela 19.

**Tabela 19** - Formulação simulada para comprimidos de micofenolato de sódio.

Componente	%
Micofenolato de sódio	55,0
Amido de milho	3,0
Povidona K-90	2,0
Crospovidona	2,2
Lactose	20,0
Dióxido de silício coloidal	0,5
Estearato de magnésio	1,0
Hidroxiopropilmetilcelulose	15,0
Dióxido de titânio	1,0
Indigotina	0,1
Óxido de ferro vermelho	0,1
Óxido de ferro amarelo	0,1

Cerca de 18 mg do placebo foram transferidos para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8. Deixou-se em ultrassom durante 5 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com o tampão.

Preparou-se solução de MSD padrão de trabalho equivalente a 18 µg/ml de MPA nas mesmas condições. O espectro da solução do placebo na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm foi sobreposto ao espectro obtido para solução de MSD.

### 5.3.10.2 Linearidade

Preparou-se uma solução estoque de MSD padrão de trabalho equivalente a 1 mg/ml de MPA em água. Transferiram-se alíquotas adequadas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml, de modo a obter concentrações de 33% a 189% da concentração de trabalho (MPA 18 µg/ml), conforme apresentado na Tabela 20. O procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

**Tabela 20** - Preparo das soluções de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	Volume da SPE (ml)	Tampão q.s.p. (ml)	Concentração (µg/ml)
33	0,15	25	6
56	0,25	25	10
78	0,35	25	14
100	0,45	25	18
122	0,55	25	22
144	0,65	25	26
167	0,75	25	30
189	0,85	25	34

Os resultados foram avaliados utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários. Verificaram-se os parâmetros de normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos, o coeficiente de correlação, o intercepto da curva e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear, conforme seção 5.1.5.3.

#### 5.3.10.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de contaminação do placebo em um dia de análise e determinada em triplicata em três níveis de concentração, conforme 5.3.5.3. Quantidades conhecidas de MPA foram incorporadas ao placebo, de modo a obter soluções com concentrações equivalentes a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho.

Preparou-se uma solução estoque de MSD em água equivalente a 2,25 mg/ml de MPA. Transferiram-se alíquotas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml contendo cerca de 15 mg de placebo, conforme apresentado na Tabela 21. Adicionaram-se 15 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8 e deixou-se em ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o tampão. Preparou-se solução padrão de MSD equivalente a 18 µg/ml de MPA nas mesmas condições.

**Tabela 21** - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	Quantidade de placebo (mg)	Volume da solução estoque (ml)	Concentração MPA após diluição (µg/ml)
70	15	1,75	12,6
100	15	2,50	18,0
130	15	3,25	23,4

#### 5.3.10.4 Precisão

Realizaram-se seis determinações do teor de MSD em Myfortic<sup>®</sup> a 100% da concentração de trabalho (18 µg/ml de MPA) em três dias de análises com analistas diferentes (n = 18). A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas de acordo com 5.1.4.1.

Não foi possível obter uma amostra homogênea a partir da pulverização dos comprimidos de Myfortic<sup>®</sup>, uma vez que eles apresentam revestimento gastrorresistente polimérico não triturável. Sendo assim, as réplicas da precisão foram preparadas a partir de uma solução estoque contendo cinco unidades do produto, conforme descrito a seguir.

*Solução amostra estoque:* transferiram-se cinco comprimidos para balão volumétrico de 500 ml. Adicionaram-se 250 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8 e agitou-se mecanicamente durante 15 minutos para a solubilização do revestimento. Posteriormente, deixou-se em ultrassom por 15 minutos para a desintegração de todos os núcleos. Completou-se o volume com o tampão e filtrou-se.

*Solução amostra:* transferiram-se 2,5 ml da solução estoque para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8. Em seguida, transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o tampão.

*Solução padrão:* transferiram-se, exatamente, cerca de 11,25 mg do padrão de MPA para balão volumétrico de 50 ml e dissolveu-se em metanol. Em seguida, transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8.

#### 5.3.10.5 Robustez

A robustez foi avaliada pelo doseamento de Myfortic<sup>®</sup> em equipamentos distintos. Realizaram-se seis determinações a 100% da concentração de trabalho, conforme descrito na seção 5.3.10.4. Os resultados foram comparados utilizando a estatística *t* para dados pareados ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 5.3.10.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados com base na inclinação e no desvio padrão do intercepto da curva analítica, de acordo com as equações (5) e (6), respectivamente (seção 5.1.5.7).

#### **5.3.11 Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência**

O doseamento de micofenolato de sódio em Myfortic<sup>®</sup> foi realizado utilizando o método cromatográfico desenvolvido para matéria-prima (seção 5.1.5). O teor do princípio ativo foi expresso em relação à quantidade declarada de MPA.

##### 5.3.11.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada frente aos produtos de degradação de MSD obtidos pela hidrólise em meio ácido, neutro e alcalino e pela exposição da matéria-prima à temperatura, luz e umidade do ambiente durante um período de 120 dias (seção 6.1.5.2). Adicionalmente, verificou-se a interferência dos componentes da formulação simulada (Tabela 19).

A solução placebo foi obtida pela transferência de 18,0 mg do placebo para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml do diluente (metanol e água, 55:45). Deixou-se em ultrassom durante 5 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com o diluente. Preparou-se uma solução de MSD padrão de trabalho equivalente a 36 µg/ml de MPA nas mesmas condições. O cromatograma do placebo foi sobreposto ao da solução de MSD para verificar a existência de interferência dos excipientes.

### 5.3.11.2 Linearidade

Procedeu-se conforme descrito na seção 5.1.5.3. A curva analítica foi construída em função da concentração de MPA.

### 5.3.11.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo método de contaminação do placebo em um dia de análise e determinada em triplicata em três níveis de concentração. Quantidades conhecidas de MPA foram incorporadas ao placebo, de modo a obter soluções com concentrações equivalentes a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho. As porcentagens de recuperação foram determinadas de acordo com o especificado em 5.3.5.3.

Preparou-se uma solução estoque de MSD em água equivalente a 2,25 mg/ml de MPA. Transferiram-se alíquotas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml contendo cerca de 25 mg do placebo, conforme apresentado na Tabela 22. Adicionaram-se 15 ml do diluente e deixou-se em ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o diluente. Preparou-se solução padrão de MPA 36 µg/ml nas mesmas condições.

**Tabela 22** - Preparo das soluções de placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Quantidade de placebo (mg)	Volume da solução estoque (ml)	Concentração MPA após diluição (µg/ml)
70	25	3,5	25,2
100	25	5,0	36,0
130	25	6,5	46,8

### 5.3.11.4 Precisão

A precisão foi avaliada por seis determinações a 100% da concentração de trabalho (36 µg/ml de MPA) em três dias de análises com analistas diferentes (n = 18). A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas conforme seção 5.1.4.1. O preparo das soluções amostra e padrão estão descritos a seguir.

*Solução amostra estoque:* transferiram-se cinco comprimidos para balão volumétrico de 500 ml. Adicionaram-se 275 ml de metanol e deixou-se em ultrassom durante 15 minutos. Completou-se o volume com água e filtrou-se.

*Solução amostra:* transferiram-se 2,5 ml da solução estoque para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o diluente. Em seguida, transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente.

*Solução padrão:* transferiram-se, exatamente, cerca de 11,25 mg do padrão de MPA para balão volumétrico de 50 ml e dissolveu-se em metanol. Em seguida, transferiram-se 4,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o diluente.

#### 5.3.11.5 Robustez

A robustez foi verificada de acordo com o procedimento da seção 5.1.5.6. As soluções amostra e padrão foram preparadas conforme descrito em 5.3.11.4.

#### 5.3.11.6 Limites de detecção e quantificação

Procedeu-se conforme descrito na seção 5.1.5.7. Os limites obtidos foram expressos em relação à concentração de MPA.

#### **5.3.12 Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de sódio em comprimidos**

Os métodos cromatográfico e espectrofotométrico para determinação do teor de MSD em comprimidos foram comparados utilizando os resultados obtidos na precisão (n = 18 para cada método). As variâncias foram avaliadas estatisticamente pelo teste F. Em seguida, aplicou-se o teste t para comparação entre as médias (ASOCIACIÓN..., 2001).

### **5.3.13 Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de sódio**

A uniformidade de doses unitárias foi realizada por uniformidade de conteúdo. Determinou-se o teor individual de 10 unidades de Myfortic<sup>®</sup> utilizando o método cromatográfico (seção 5.3.11). A quantidade de fármaco de cada unidade deve estar situada entre 85,0% e 115,0% da quantidade declarada e o DPR entre as determinações deve ser menor ou igual a 6,0% (FARMACOPÉIA..., 1996).

## **5.4 Determinação de impurezas em micofenolato de mofetila comprimidos**

### **5.4.1 Perfil cromatográfico**

Os perfis cromatográficos para verificação da presença de impurezas em CellCept<sup>®</sup> e no medicamento genérico de MMF foram obtidos a partir de soluções amostras a 500 µg/ml de MMF em fase móvel. Injetaram-se 25 µl das soluções nas condições descritas na Tabela 15 (seção 5.3.6).

### **5.4.2 Quantificação de ácido micofenólico**

A quantificação de MPA em comprimidos de MMF foi realizada utilizando o método cromatográfico desenvolvido (seção 5.3.6). O teor da impureza em CellCept<sup>®</sup> e no medicamento genérico foi determinado por comparação da resposta obtida com MPA padrão e com MMF SQR, ambos a 2,5 µg/ml na fase móvel. As soluções amostras foram preparadas a 500 µg/ml de MMF.

*Solução amostra:* os comprimidos utilizados na determinação de peso foram pulverizados até a obtenção de pó fino e homogêneo. Transferiram-se quantidade do pó equivalente a 25 mg de MMF para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de fase móvel. Deixou-se em ultrassom durante 10 minutos e completou-se o volume com a fase móvel.

*Solução padrão de MMF:* transferiram-se, exatamente, cerca de 12,5 mg de MMF SQR para balão de 25 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com a fase móvel. Transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com a fase móvel. Em seguida, diluíram-se 2,5 ml para 50 ml com a fase móvel.

*Solução padrão de MPA:* transferiram-se, exatamente, cerca de 12,5 mg de MPA padrão para balão de 25 ml. Dissolveu-se e completou-se o volume com acetonitrila. Transferiram-se 2,5 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com a fase móvel. Em seguida, diluíram-se 2,5 ml para 50 ml com a fase móvel.

#### 5.4.2.1 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos valores de DPR entre as determinações. Verificou-se a conformidade do sistema pela injeção em quintuplicata das soluções padrão. Para a quantificação de impurezas, recomenda-se que o DPR entre as determinações seja menor ou igual a 10%. O DPR entre as injeções dos padrões deverá ser menor ou igual a 5% (SHABIR, 2003).

#### 5.4.2.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de contaminação do placebo em um dia de análise e determinada em triplicata em três níveis de concentração. Quantidades conhecidas de MPA foram incorporadas ao placebo de MMF de modo a obter soluções com concentrações equivalentes a 50%, 100% e 150% do limite estabelecido (2,5 µg/ml). O cálculo de recuperação e a avaliação da exatidão foram realizados conforme 5.3.5.3.

Preparou-se uma solução estoque de MSD padrão de trabalho equivalente a 12,5 µg/ml de MPA em água. Transferiram-se alíquotas da solução estoque para balões volumétricos de 25 ml contendo cerca de 12,5 mg do placebo, conforme apresentado na Tabela 23. Adicionaram-se 15 ml de fase móvel e deixou-se em ultrassom por 10 minutos. Completou-se o volume com a fase móvel. Preparou-se uma solução padrão 2,5 µg/ml nas mesmas condições.

**Tabela 23** - Preparo das soluções do placebo contaminado para avaliação da exatidão do método de quantificação de ácido micofenólico em comprimidos de micofenolato de mofetila.

Nível (%)	Quantidade de placebo (mg)	Volume da solução estoque (ml)	Concentração MPA ( $\mu\text{g/ml}$ )
50	12,5	2,5	1,25
100	12,5	5,0	2,50
150	12,5	7,5	3,75

#### 5.4.2.3 Linearidade

As curvas analíticas foram construídas em função das massas de MPA e MMF injetadas no cromatógrafo. Prepararam-se soluções de MPA padrão e MMF SQR a 2,5  $\mu\text{g/ml}$  na fase móvel (5.4.2.1) e injetaram-se, em triplicata, volumes de 5 a 50  $\mu\text{l}$ . As análises de regressão foram realizadas conforme 5.1.5.3.

#### 5.4.2.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação de MPA foram determinados com base na relação entre sinal e ruído. A concentração do analito que fornece relação 3:1 é recomendada como limite de detecção. Para limite de quantificação, a relação estabelecida é de 10:1 (INTERNATIONAL..., 2005).

#### 5.4.2.5 Estabilidade em solução

A estabilidade das amostras em solução foi avaliada comparando-se as áreas de MPA em seis soluções amostra de CellCept<sup>®</sup> quando injetadas nas seguintes condições: imediatamente após o preparo, 24 horas armazenadas em temperatura ambiente e 24 horas armazenadas entre 4 a 8 °C. As soluções foram preparadas como descrito em 5.4.2.1.

### 5.5 Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de mofetila

#### 5.5.1 Ensaios preliminares

Testes preliminares para o perfil de dissolução de MMF comprimidos foram realizados com duas unidades de Cellcept<sup>®</sup> em diferentes meios de dissolução: HCl

0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l, tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0, tampão acetato de sódio 0,05 mol/l pH 4,5 e tampão acetato de sódio 0,05 mol/l pH 5,5. Utilizaram-se 900 ml de meio a  $(37 \pm 0,5)$  °C e agitação com pás 50 rpm.

Retiraram-se alíquotas de 5 ml após 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos de dissolução. Filtrou-se em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e transferiu-se 1,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 25 ml. Completou-se o volume com meio de dissolução e determinou-se a quantidade de MMF dissolvida por espectrofotometria no ultravioleta em  $\lambda$  250 nm. Soluções de MMF padrão de trabalho 25  $\mu\text{g/ml}$  foram preparadas em cada meio de dissolução.

### **5.5.2 Perfis de dissolução**

Os perfis de dissolução de MMF comprimidos foram obtidos utilizando o medicamento referência CellCept<sup>®</sup> 500 mg. Determinaram-se a dissolução de seis unidades em três diferentes meios (HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0) a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação com pás em duas velocidades (50 e 75 rpm).

Alíquotas de 5 ml foram retiradas após 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos de dissolução e filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Transferiu-se 1,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o meio de dissolução. A quantidade de MMF dissolvida foi determinada por espectrofotometria no ultravioleta em  $\lambda$  250 nm, utilizando soluções MMF padrão de trabalho 25  $\mu\text{g/ml}$  preparadas em cada meio de dissolução.

Vários métodos são propostos para avaliação comparativa entre perfis de dissolução. Os métodos podem ser baseados na análise de variância, modelo independente ou modelo dependente.

O uso do modelo independente utilizando os cálculos dos fatores de diferença ( $f_1$ ) e similaridade ( $f_2$ ) é recomendado em U.S. FOOD... (1997). Entretanto não é aplicado quando a dissolução dos produtos teste e referência é superior a 85% em 15 minutos. O método estatístico baseado na análise de variância ou *t-Student* é

indicado para dissolução em único ponto de formas farmacêuticas de liberação imediata. Por sua vez, os modelos dependentes são aqueles baseados em funções matemáticas distintas, que após seleção da função adequada, permitem a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados (O'HARA *et al.*, 1998; SERRA & STORPIRTIS, 2007; U.S. FOOD..., 1997).

Neste trabalho, o estudo comparativo entre as velocidades de agitação em cada meio de dissolução foi realizado utilizando a estatística *t* para variâncias homogêneas. Determinou-se o intervalo de 95% de confiança para a diferença entre as médias em cada tempo. A diferença é significativa se o intervalo de confiança não incluir o zero (O'HARA *et al.*, 1998).

O estudo comparativo dos meios de dissolução foi realizado fixando o sistema de agitação com pás 50 rpm. Os resultados foram avaliados por Anova e teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ).

### **5.5.3 Validação**

O método espectrofotométrico foi validado utilizando HCl 0,1 mol/l como solvente (seção 5.3.5). Adicionalmente, demonstraram-se a seletividade e a linearidade do método com os meios HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0, conforme procedimentos descritos nas seções 5.3.5.1 e 5.3.5.2.

### **5.5.4 Estabilidade nos meios de dissolução**

Preparou-se solução de MMF padrão de trabalho 560 µg/ml em cada meio de dissolução (HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0). As soluções foram submetidas à agitação magnética em banho a  $(37 \pm 0,5)$  °C durante 60 minutos. Alíquotas de 1,0 ml foram retiradas nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos e diluídas para 25 ml com o meio de dissolução. Realizaram-se as leituras de absorvância em  $\lambda$  250 nm. O DPR entre as leituras deverá ser inferior a 2,0%.

### **5.5.5 Comparação entre os perfis de dissolução do medicamento genérico e referência**

Os perfis de dissolução do medicamento referência (CellCept®) e do medicamento genérico de MMF foram obtidos com doze unidades em 900 ml de três diferentes meios de dissolução: HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0. Utilizou-se o sistema de agitação com pás 50 rpm em todas as condições. Os tempos de coleta e as diluições foram realizados conforme descrito na seção 5.5.2. Compararam-se as curvas obtidas para os medicamentos referência e genérico, em cada condição, utilizando a estatística t.

## **5.6 Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de sódio**

### **5.6.1 Determinação das condições de esgotamento**

Para realização do teste, quantidades do fármaco em excesso foram transferidas para 10 ml dos meios HCl 0,1 mol/l, tampão fosfato 0,05 mol/l pH 5,5, 6,0 e 6,8. As suspensões foram deixadas em agitação a 25 °C. Alíquotas foram retiradas após 24 horas, filtradas em membrana de 0,45 µm e diluídas nos respectivos meios até concentração adequada para análise espectrofotométrica em  $\lambda$  250 nm. As soluções padrões em cada meio de dissolução foram preparadas de modo a obter concentração a 18 µg/ml de MPA, conforme descrito a seguir.

*Solução padrão estoque:* transferiram-se, exatamente, cerca de 24,0 mg de MSD padrão de trabalho para balão volumétrico de 25 ml com o auxílio de 15 ml de água. Deixou-se em ultrassom durante 10 minutos e completou-se o volume com água.

*Solução padrão:* transferiu-se 1,0 ml da solução padrão estoque para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com o meio de dissolução.

### **5.6.2 Perfil de dissolução**

O perfil de dissolução de Myfortic® 360 mg comprimidos foi obtido com seis unidades e de acordo com o procedimento geral de dissolução para comprimidos com

revestimento entérico (Método A) proposto na Farmacopéia Americana (2009). Iniciou-se a dissolução com 750 ml de HCl 0,1 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação com pás 50 rpm. Após 120 minutos, coletou-se alíquota de 10 ml e, interruptamente, adicionaram-se 250 ml de tampão fosfato de sódio tribásico 0,20 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C, ajustando o pH em cada cuba para  $(6,8 \pm 0,05)$  com solução de HCl 2 mol/l. Retiraram-se novas alíquotas de 10 ml nos tempos 130, 140, 150, 165, 180, 210 e 240 minutos. Todas as alíquotas foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

A determinação da quantidade de fármaco dissolvida foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta em  $\lambda$  250 nm. Realizaram-se leitura direta para as alíquotas dos tempos 120 e 130 minutos. Para as demais, transferiram-se 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com o meio de dissolução.

Preparou-se uma solução estoque de MSD padrão de trabalho em água, equivalente a 450  $\mu\text{g/ml}$  de MPA. A solução padrão utilizada no primeiro estágio foi preparada transferindo-se 2,0 ml da solução estoque para balão volumétrico de 50 ml e completando o volume com HCl 0,1 mol/l. A solução padrão utilizada no segundo estágio foi preparada de maneira semelhante, diluindo-se no meio de dissolução.

Alternativamente, obtiveram-se os perfis de dissolução utilizando velocidade de rotação 75 rpm e ajustando o pH das cubas para 6,0 e 5,5. O estudo comparativo da velocidade de rotação foi realizado com a estatística t para variâncias homogêneas. A comparação entre os meios de dissolução foi realizada por Anova e teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ).

### **5.6.3 Validação**

O método espectrofotométrico foi validado utilizando tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8 como solvente (seção 5.3.10). Adicionalmente, demonstraram-se a seletividade e a linearidade do método quando utilizado tampão em valores de pH 6,0 e 5,5, conforme procedimentos descritos nas seções 5.3.10.1 e 5.3.10.2.

#### **5.6.4 Estabilidade nos meios de dissolução**

A estabilidade do fármaco foi avaliada nos meios tampão fosfato 0,05 mol/l pH 5,5, 6,0 e 6,8. Prepararam-se soluções de MSD padrão de trabalho equivalentes a 360 µg/ml de MPA em cada meio de dissolução. As soluções foram submetidas à agitação magnética em banho a  $(37 \pm 0,5)$  °C durante 120 minutos. Alíquotas de 1,25 ml foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos e transferidas para balões volumétricos de 25 ml. Completaram-se os volumes com o meio de dissolução e realizaram-se as leituras de absorvância em  $\lambda$  250 nm. O DPR entre as leituras deverá ser inferior a 2,0%.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matéria-prima

#### 6.1.1 Descrição

##### 6.1.1.1 Características físicas

Os fármaco MMF e MSD são designados como pó cristalino branco a quase branco (THE EUROPEAN..., 2007; U.S. FOOD..., 2008b). Ambas as amostras apresentaram-se como pó cristalino branco, inodoro e isentas de partículas estranhas visíveis a olho nu.

##### 6.1.1.2 Solubilidade

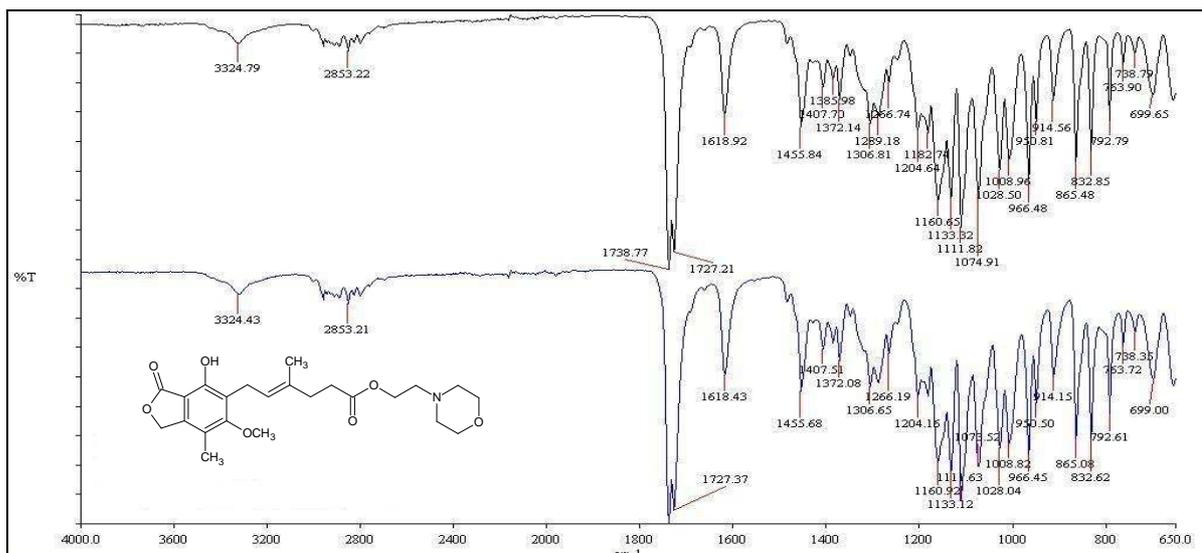
Os dois fármacos apresentaram diferentes solubilidades em relação aos solventes utilizados. O fármaco MMF foi praticamente insolúvel em água; ligeiramente solúvel em etanol e NaOH 0,1 mol/l; solúvel em HCl 0,1 mol/l e metanol; e facilmente solúvel em acetonitrila. Os resultados obtidos para os solventes metanol, etanol e água foram semelhantes aos descritos por O'Neil (2006).

O fármaco MSD demonstrou-se praticamente insolúvel em HCl 0,1 mol/l e acetonitrila, pouco solúvel em etanol, solúvel em metanol e facilmente solúvel em água e NaOH 0,1 mol/l.

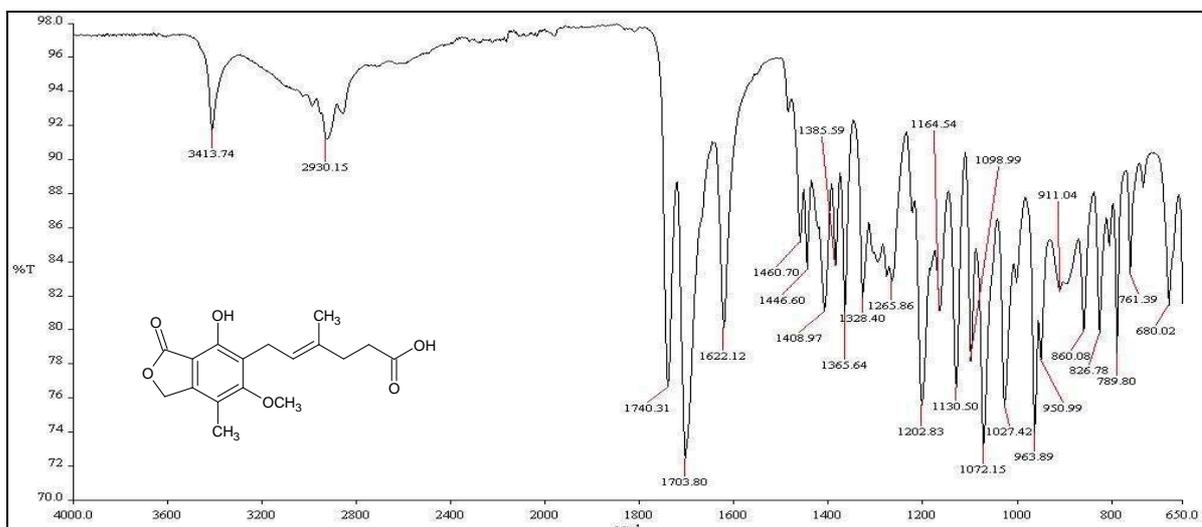
#### 6.1.2 Identificação

##### 6.1.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

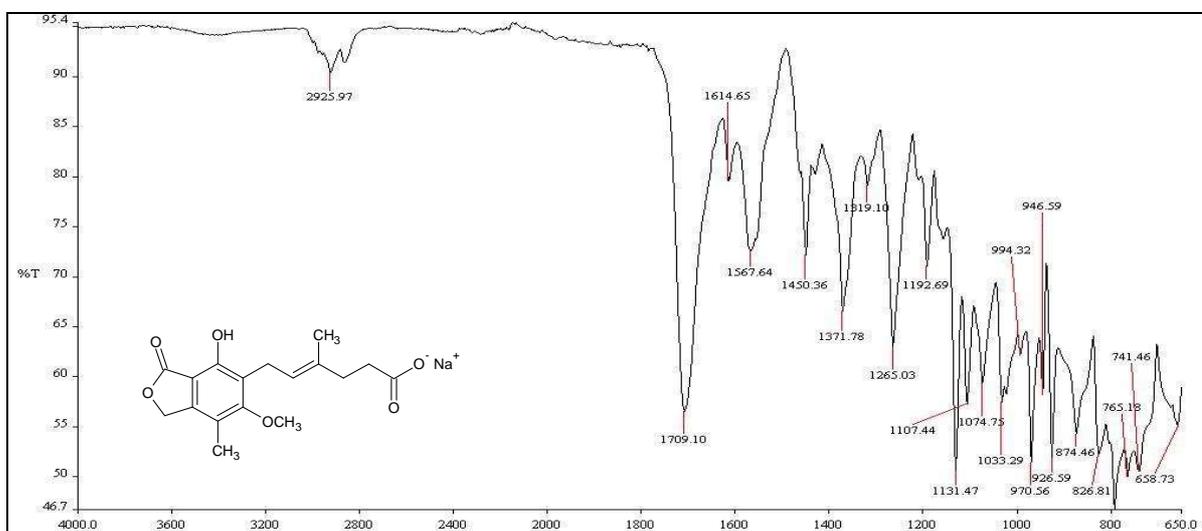
Os espectros infravermelhos para MMF, MPA e MSD obtidos por reflectância atenuada nos números de onda 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  estão representados nas Figuras 13 a 15 e as atribuições das principais bandas nas Tabelas 24 a 26.



**Figura 13** - Espectro infravermelho de micofenolato de mofetila matéria-prima (superior) e substância química de referência (inferior).



**Figura 14** - Espectro infravermelho do padrão de ácido micofenólico.



**Figura 15** - Espectro infravermelho de micofenolato de sódio matéria-prima.

**Tabela 24** - Atribuições das principais bandas de absorção de micofenolato de mofetila no infravermelho

Banda	Intensidade	Identificação
3325	f	Deformação axial O-H do fenol
2853	f	Deformação axial C-H de alcano
1739	F	Deformação axial C=O de $\gamma$ -lactona insaturada
1727	F	Deformação axial C=O de éster alifático
1619	m	Deformação axial C=C
1112	F	Deformação axial C-O-C

F: forte; f: fraca; m: média.

**Tabela 25** - Atribuições das principais bandas de absorção de ácido micofenólico no infravermelho

Banda	Intensidade	Identificação
3414	f	Deformação axial O-H do fenol
3300 a 2400	f	Deformação axial O-H do ácido carboxílico
2930	f	Deformação axial C-H de alcano
1740	F	Deformação axial C=O de $\gamma$ -lactona insaturada
1704	F	Deformação axial C=O de ácido carboxílico
1622	m	Deformação axial C=C
1072	F	Deformação axial C-O-C

F: forte; f: fraca; m: média.

**Tabela 26** - Atribuições das principais bandas de absorção de micofenolato de sódio no infravermelho

Banda	Intensidade	Identificação
2926	f	Deformação axial C-H de alcano
1709	F	Deformação axial C=O
1615	m	Deformação axial C=C
1568	F	Deformação axial do íon carboxilato
1131	F	Deformação axial C-O-C

F: forte; f: fraca; m: média.

Todos os espectros possuem bandas acentuadas típicas da presença de deformação axial C=O. A presença de insaturação na molécula, bem como ressonância e formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares alteram a frequência de absorção de C=O (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Para MSD verificou-se banda única em 1709  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro de MMF o sinal forte nesta região apresentou pequeno desdobramento em duas bandas: 1739  $\text{cm}^{-1}$  e

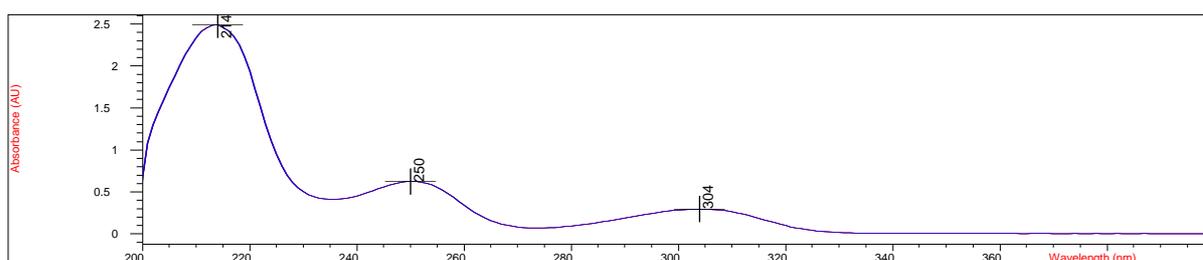
1727  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas, respectivamente, à presença de  $\gamma$ -lactona insaturada e éster alifático. Observou-se um desdobramento mais intenso para a molécula de MPA, resultando nas bandas 1740  $\text{cm}^{-1}$  e 1704  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas, respectivamente, à presença de  $\gamma$ -lactona insaturada e ao ácido carboxílico.

O espectro obtido para MMF matéria-prima apresenta bandas nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades ao obtido para MMF SQR.

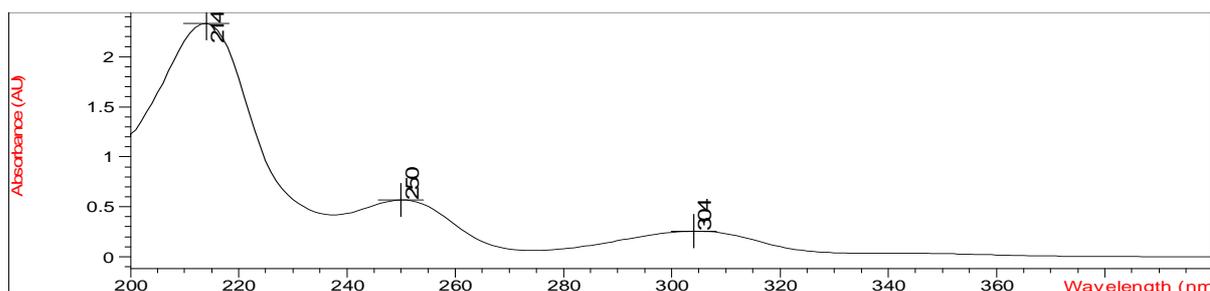
O espectro de MSD apresenta absorção característica de deformação assimétrica do íon carboxilato (1568  $\text{cm}^{-1}$ ), cuja banda não está presente no espectro de MPA. A comparação entre os dois espectros também permite a visualização da banda de deformação axial O-H do ácido carboxílico (3300 a 2400  $\text{cm}^{-1}$ ) apenas no espectro de MPA. A referida banda é fraca, larga e está presente na mesma região da deformação axial C-H.

#### 6.1.2.2 Espectrofotometria no ultravioleta

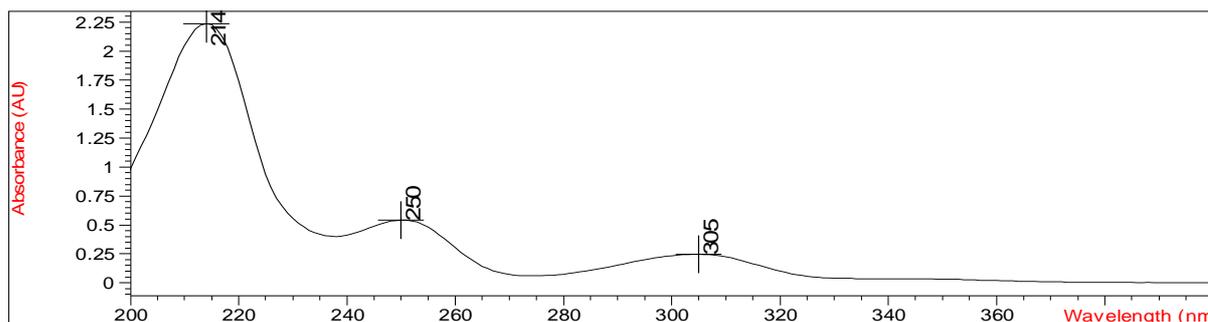
O espectro ultravioleta na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm para MMF 25  $\mu\text{g/ml}$  em HCl 0,1 mol/l (Figura 16), MSD e MPA 18  $\mu\text{g/ml}$  em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8 (Figuras 17 e 18) foram semelhantes.



**Figura 16** - Espectro ultravioleta de micofenolato de mofetila matéria-prima 25  $\mu\text{g/ml}$  em HCl 0,1 mol/l.



**Figura 17** - Espectro ultravioleta de micofenolato de sódio matéria-prima 18  $\mu\text{g/ml}$  em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8.



**Figura 18** - Espectro ultravioleta do padrão de ácido micofenólico 18 µg/ml em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8.

Apesar de estruturalmente diferentes, os três compostos apresentam o mesmo grupo cromóforo. Os máximos de absorvância ocorreram em  $\lambda$  214, 250 e 304 nm para MMF e MSD. Os valores obtidos para MPA foram  $\lambda$  214, 250 e 305 nm.

### 6.1.2.3 Íon sódio

Apenas a solução de MSD adquiriu coloração amarela intensa quando colocada na zona redutora da chama. O teste de identificação de íon sódio foi positivo para MSD e negativo para MMF.

## 6.1.3 Ensaios de pureza

### 6.1.3.1 Temperatura de fusão

Realizaram-se 3 determinações da faixa de fusão para MMF e MSD registrando o início e o término da fusão (Tabela 27). Os valores encontrados para MMF são consistentes ao relatado por O'Neil (2006) (entre 93 °C e 94 °C). Para MSD, os valores obtidos foram inferiores à faixa de 189 °C a 191 °C relatada por Wong (2008).

**Tabela 27** - Determinação da temperatura de fusão de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matérias-primas.

Determinação	Micofenolato de mofetila		Micofenolato de sódio	
	Faixa fusão (°C)	Ponto médio (°C)	Faixa fusão (°C)	Ponto médio (°C)
1	93,5 - 94,1	93,8	184,9 – 186,5	185,7
2	93,5 – 93,8	93,6	184,4 – 184,9	184,6
3	93,5 – 94,2	93,8	185,7 – 187,3	186,5
<b>Média</b>	<b>93,5 – 94,0</b>	<b>93,7</b>	<b>185,0 – 186,2</b>	<b>185,6</b>

### 6.1.3.2 *Análise térmica*

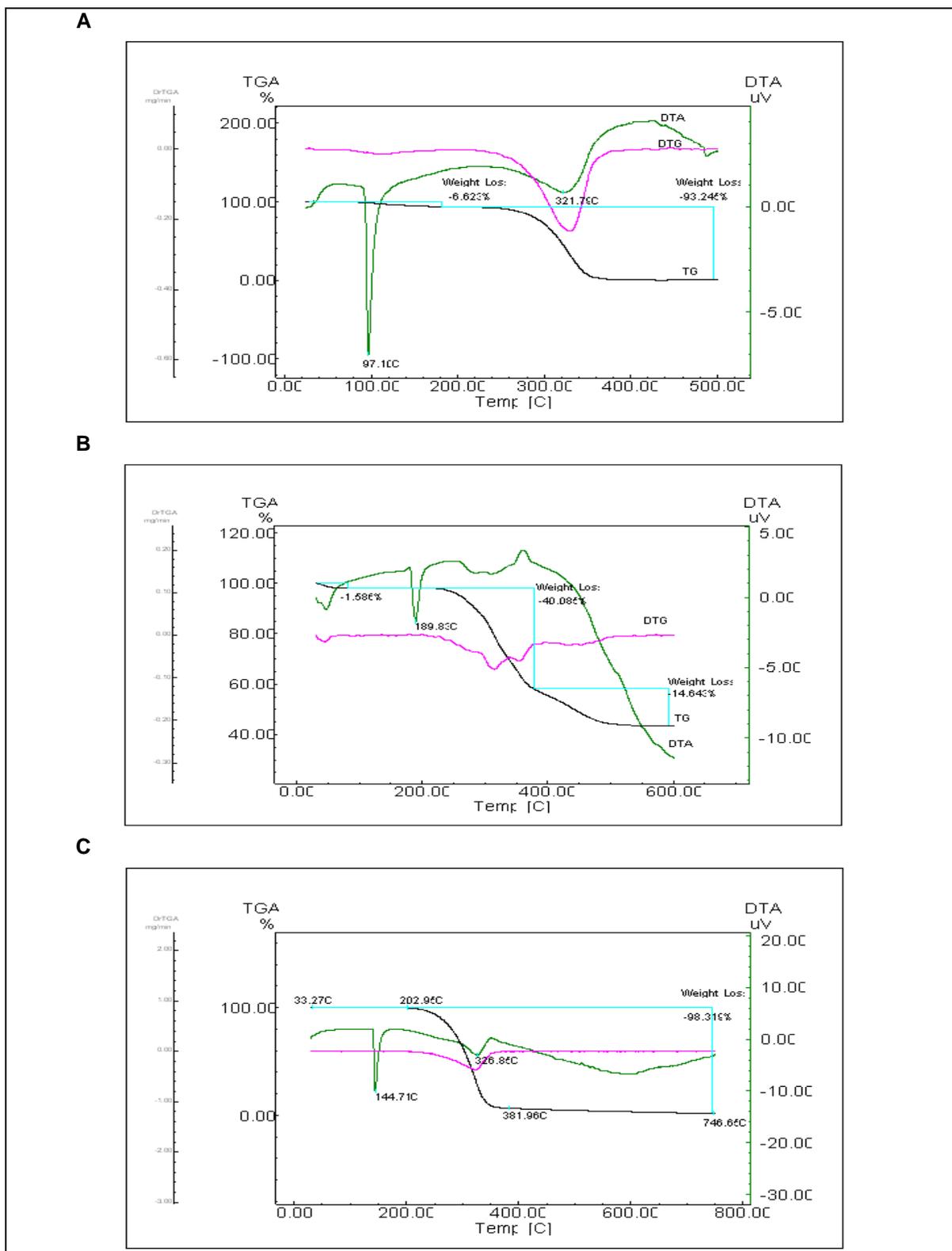
As determinações dos efeitos termodinâmicos são indicativas de identidade e pureza de fármacos. Os eventos endotérmicos e exotérmicos podem ser caracterizados pela análise térmica diferencial enquanto os eventos de perda de massa são visualizados pela análise termogravimétrica. As perdas de massa observadas nas curvas TG normalmente ocorrem pela liberação de solventes adsorvidos, solventes cristalizados ou decomposição da amostra (THE UNITED STATES..., 2009).

As curvas DTA, TG e DTG para MMF, MSD e MPA obtidas por técnica simultânea encontram-se ilustradas na Figura 19.

Para MMF observaram-se dois efeitos endotérmicos, sendo o primeiro em 97,1 °C e o segundo em 321,8 °C. O primeiro representa a fusão do fármaco. A temperatura de fusão é próxima ao valor especificado (em torno de 96 °C) na Farmacopéia Européia (2007). O segundo evento foi acompanhado por perda elevada de massa, evidenciando a decomposição da amostra.

Na análise térmica de MSD observou-se a fusão do fármaco em 189,8 °C seguida por múltiplos estágios de decomposição. A temperatura de fusão é coerente à faixa de 189 °C a 191 °C relatada por Wong (2008). Nota-se também um evento endotérmico com perda de 1,6% de massa em temperatura inferior a 100 °C, típico de perda de umidade e outras substâncias voláteis.

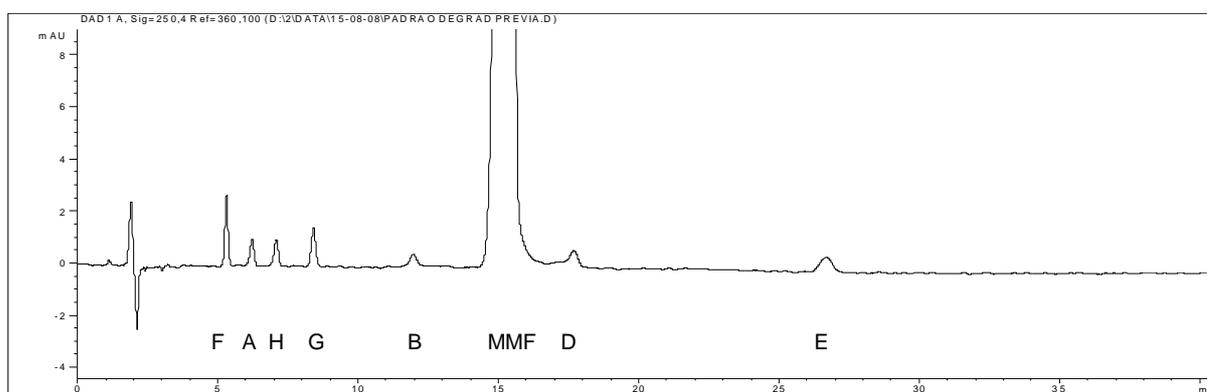
Nos resultados referentes ao MPA verificaram-se a fusão do fármaco em 144,7 °C e a decomposição a partir de 202,9 °C. Ambos os eventos foram acompanhados por um pico endotérmico na curva DTA. A temperatura de fusão nas condições analisadas foi superior àquela relatada por O'Neil (2006) (141 °C).



**Figura 19** - Curvas de análise térmica diferencial derivada, termogravimetria e termogravimetria derivada de (A) micofenolato de mofetil matéria-prima, (B) micofenolato de sódio matéria-prima e (C) ácido micofenólico padrão, obtidas por técnica simultânea em fluxo de nitrogênio 50 ml/min e razão de aquecimento 10 °C/min.

### 6.1.3.3 Substâncias relacionadas de micofenolato de mofetila matéria-prima

O cromatograma obtido com a solução de identificação de impurezas (*solução b*) está ilustrado na Figura 20. A identificação dos picos, os tempos de retenção relativos, os espectros UV/DAD na faixa  $\lambda$  190 a 400 nm e os parâmetros cromatográficos estão apresentados na Tabela 28. A resolução entre os picos das impurezas A e H foi de 3,12, atendendo ao critério de adequação do sistema (mínimo de 2,0).

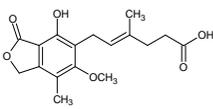
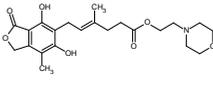
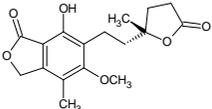
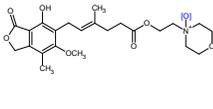
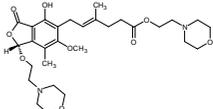
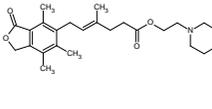
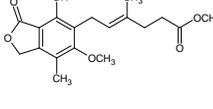
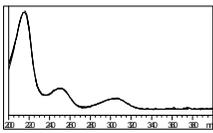
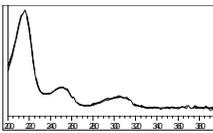
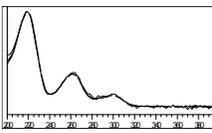
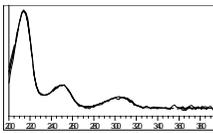
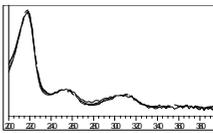
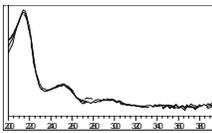
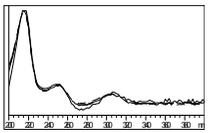


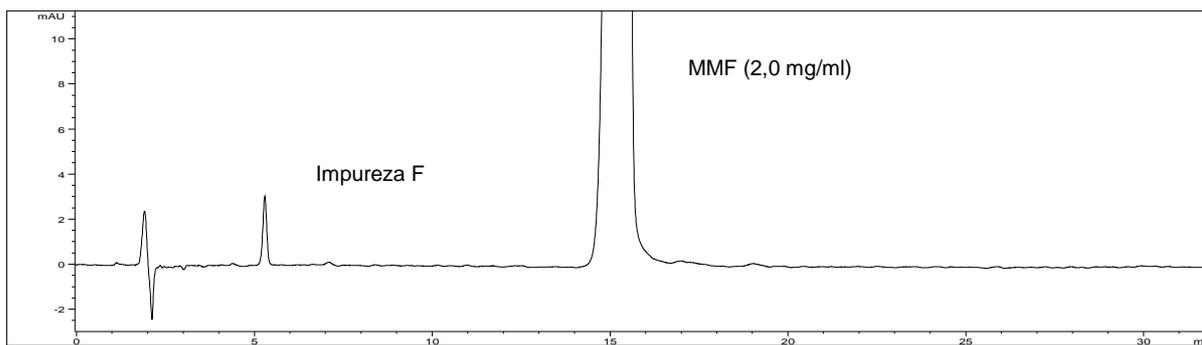
**Figura 20** - Cromatograma da substância química de referência de micofenolato de mofetila para identificação de impurezas no ensaio de substâncias relacionadas.

A determinação de substâncias relacionadas na matéria-prima foi realizada de acordo com o procedimento proposto na Farmacopéia Européia (2007). As áreas das impurezas encontradas foram comparadas à área obtida com solução diluída do próprio fármaco (*solução a*).

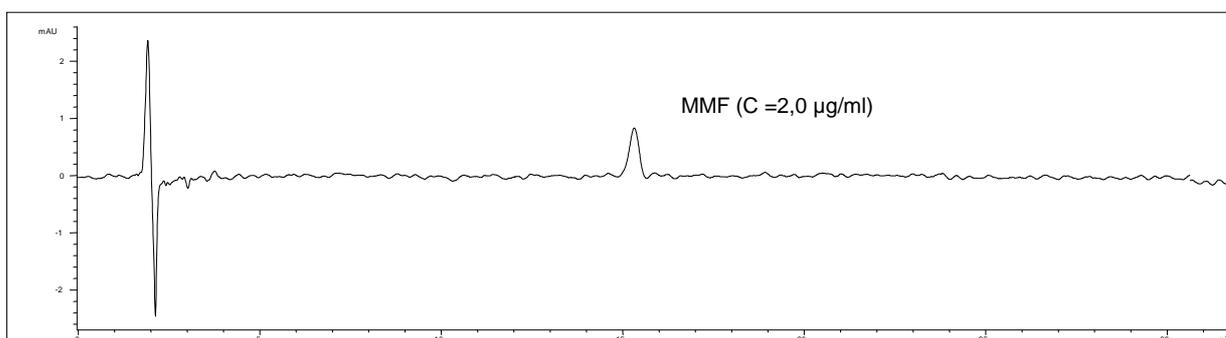
Os cromatogramas obtidos para *solução teste* da matéria-prima (2,0 mg/ml) e para *solução (a)* estão ilustrados respectivamente na Figura 21 e Figura 22. Observa-se a presença de apenas uma substância relacionada na matéria-prima (impureza F), correspondente ao ácido micofenólico.

**Tabela 28** - Atribuições e parâmetros cromatográficos dos picos das impurezas de micofenolato de mofetila obtidos no cromatograma da *solução (b)* do método de substâncias relacionadas.

Impureza	F	A	H	G	B	D	E
<b>Estrutura molecular</b>							
<b>trr (min)</b>	0,35	0,41	0,46	0,55	0,78	1,15	1,74
<b>Espectro UV/DAD <math>\lambda</math> 190-400 nm</b>							
<b>Resolução</b>	-	3,92	3,12	4,58	9,87	4,51	13,07
<b>Fator de cauda</b>	0,96	0,79	0,86	0,92	0,85	0,75	0,90
<b>Número de pratos</b>	10411	9052	9895	13155	12320	18772	15569



**Figura 21** - Cromatograma obtido para *solução teste* de MMF matéria-prima no ensaio de substâncias relacionadas.



**Figura 22** - Cromatograma obtido para *solução (a)* de MMF matéria-prima no ensaio de substâncias relacionadas.

A quantificação da impureza F nas três determinações estão apresentadas na Tabela 29.

**Tabela 29** - Quantificação da impureza F na amostra de micofenolato de mofetila matéria-prima.

Determinação	Área Impureza F na <i>solução teste</i>	Área MMF na <i>solução a</i>	Razão entre as áreas (Impureza/MMF)	Quantificação (%)
1	22,90	15,53	1,47	0,15
2	25,57	16,60	1,54	0,15
3	23,47	17,70	1,33	0,13

A área da impureza F foi inferior a cinco vezes a área da solução diluída de MMF. Sendo assim, a amostra cumpre com os requisitos propostos na Farmacopéia Européia (2007) tanto em relação ao limite individual da impureza (máximo de 0,5%) quanto ao limite total (máximo de 0,7%).

#### 6.1.3.4 Perda por dessecação

O ensaio de perda por dessecação tem por objetivo determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições estabelecidas. (FARMACOPÉIA..., 1988).

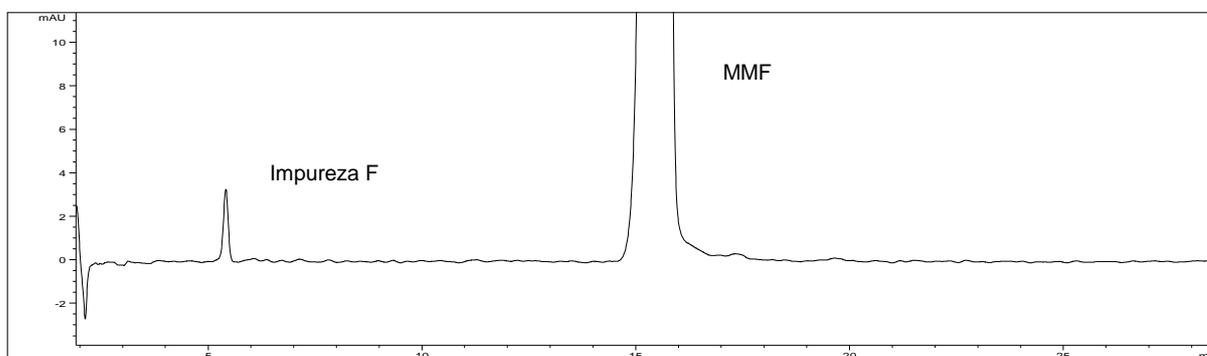
A perda por dessecação de MMF matéria-prima foi realizada a 60 °C sob vácuo durante 5 horas e determinada a cada intervalo de hora. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 30.

**Tabela 30** - Porcentagens da perda por dessecação de micofenolato de mofetila matéria-prima, a 60 °C sob vácuo.

Tempo (h)	1	2	3	Média
1	0,00	0,04	0,00	0,01
2	0,02	0,04	0,00	0,02
3	0,02	0,04	0,00	0,02
4	0,04	0,04	0,05	0,04
5	0,05	0,05	0,05	0,05

A perda por dessecação de MMF matéria-prima foi inferior ao limite máximo de 0,5% estabelecido na Farmacopéia Européia (2007).

Durante o processo de dessecação, acompanhou-se a estabilidade da amostra por CLAE. O cromatograma da amostra dessecada durante 5 horas está ilustrado na Figura 23.



**Figura 23** - Cromatograma representativo de micofenolato de mofetila matéria-prima dessecado durante 5 horas a 60 °C sob vácuo, obtido nas condições descritas em 5.1.3.3.

A amostra não apresentou evidência de degradação durante o processo de dessecação. Observou-se a presença de apenas um pico de substância relacionada (impureza F), que se manteve constante e inferior ao limite de 0,5% (THE EUROPEAN..., 2007) desde o início do procedimento.

A perda por dessecação de MSD matéria-prima foi realizada a 105 °C durante 5 horas e determinada a cada intervalo de hora. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 31.

**Tabela 31** - Porcentagens de perda por dessecação de micofenolato de sódio matéria-prima a 105 °C.

Tempo (h)	1	2	3	Média
1	1,86	1,52	1,85	1,74
2	1,87	1,57	1,86	1,77
3	1,88	1,61	1,86	1,78
4	1,87	1,68	1,85	1,80
5	1,88	1,71	1,87	1,82

O peso constante na dessecação é alcançado quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não for superior a 0,5 mg/g da quantidade amostrada, ou seja, variação máxima de 0,05% (THE UNITED STATES..., 2009). A amostra atende ao critério quando dessecada por duas horas a 105 °C.

A porcentagem de perda por dessecação obtida para MSD matéria-prima é próxima à porcentagem de perda de massa, em temperatura inferior a 100 °C, observada na curva de TG para o fármaco (Figura 19 (B), seção 6.1.3.2). Isso comprova que o evento endotérmico verificado na curva DTA anteriormente à fusão do fármaco refere-se à perda de substâncias voláteis presentes na amostra.

#### 6.1.3.5 Cinzas sulfatadas

O ensaio de cinzas sulfatadas destina-se à determinação de impurezas inorgânicas contidas em substâncias orgânicas (FARMACOPÉIA..., 1988).

O limite máximo estabelecido de resíduos por incineração em MMF matéria-prima é 0,1% (THE EUROPEAN..., 2007). O resíduo obtido na amostra foi desprezível (0,00%), indicando ausência de impurezas inorgânicas detectáveis.

#### *6.1.3.6 Ensaio limite para metais pesados*

O Método II foi selecionado devido à limitação da solubilidade dos fármacos em valores de pH entre 3,0 e 4,0, o que impede a obtenção de uma solução límpida pelo Método I.

As preparações amostra de MMF e MSD apresentaram coloração de intensidade próxima à coloração da preparação padrão a 10 ppm de chumbo. O limite máximo para metais pesados em MMF matéria-prima é 20 ppm (THE EUROPEAN..., 2007). Sugere-se o limite de 20 ppm para ser aplicado ao controle de qualidade de MSD matéria-prima.

#### **6.1.4 Determinação do teor de micofenolato de mofetila por volumetria de neutralização em meio não aquoso (THE EUROPEAN..., 2007)**

##### *6.1.4.1 Precisão*

Realizaram-se seis determinações do teor em três dias de análises com analistas diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 32.

A precisão de um procedimento analítico indica o grau de concordância entre séries de determinações obtidas a partir de amostragens na mesma amostra homogênea e em condições previamente estabelecidas. Utiliza-se como medida o coeficiente de variação (CV) ou o DPR. A precisão também pode ser expressa por meio do intervalo de confiança da média (INTERNATIONAL... 2005; RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade foi avaliada pelo DPR entre seis determinações. Os valores de DPR entre as determinações nos três dias de análises foram inferiores ao recomendado na literatura consultada (2,0%).

**Tabela 32** - Resultados da precisão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em matéria-prima por volumetria de neutralização em meio não aquoso.

Determ.	DIA 1			DIA 2			DIA 3		
	<i>Massa MMF (mg)</i>	<i>Volume gasto (ml)</i>	%	<i>Massa MMF (mg)</i>	<i>Volume gasto (ml)</i>	%	<i>Massa MMF (mg)</i>	<i>Volume gasto (ml)</i>	%
<b>1</b>	219,85	5,51	100,14	234,50	5,77	100,21	221,24	5,18	99,24
<b>2</b>	220,11	5,49	99,66	220,95	5,42	99,91	219,16	5,17	99,99
<b>3</b>	221,70	5,52	99,48	224,65	5,53	100,25	220,64	5,15	98,94
<b>4</b>	221,18	5,55	100,26	220,29	5,42	100,21	221,24	5,18	99,24
<b>5</b>	219,45	5,46	99,41	224,61	5,52	100,09	221,06	5,17	99,13
<b>6</b>	219,60	5,40	98,25	220,48	5,41	99,93	221,90	5,23	99,90
<b>Fc</b>	0,9217			0,9395			0,9778		
<b>Média (%)</b>	<b>99,53</b>			<b>100,10</b>			<b>99,41</b>		
<b>DPR (%)</b>	<b>0,72</b>			<b>0,15</b>			<b>0,43</b>		

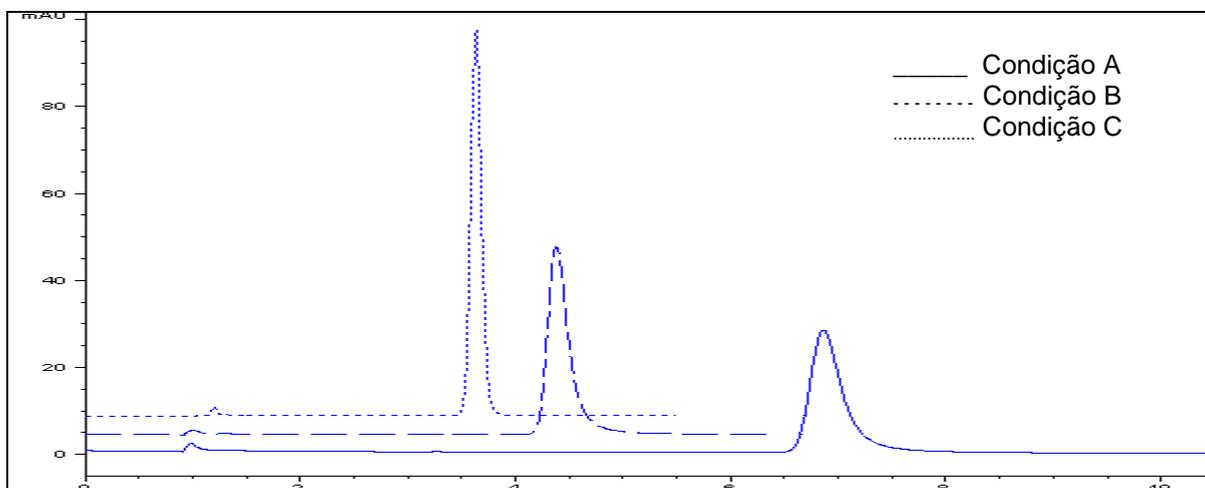
A precisão intermediária foi verificada comparando-se os resultados obtidos nos três dias de análises utilizando Anova. Os resultados nas séries de determinações não foram diferentes ( $p > 0,05$ ).

O método por volumetria de neutralização em meio não aquoso foi preciso diante das condições avaliadas. Considerando a média das determinações ( $n = 18$ ), a amostra apresentou teor de MMF igual a  $(99,68 \pm 0,28)\%$ . A matéria-prima foi utilizada como padrão de trabalho de MMF nos experimentos subseqüentes.

### 6.1.5 Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência

#### 6.1.5.1 Determinação das condições cromatográficas

Os cromatogramas obtidos nas análises prévias de MSD utilizando as condições cromatográficas A, B e C (Tabela 7), estão ilustrados na Figura 24. Os respectivos parâmetros de conformidade do sistema encontram-se descritos na Tabela 33.



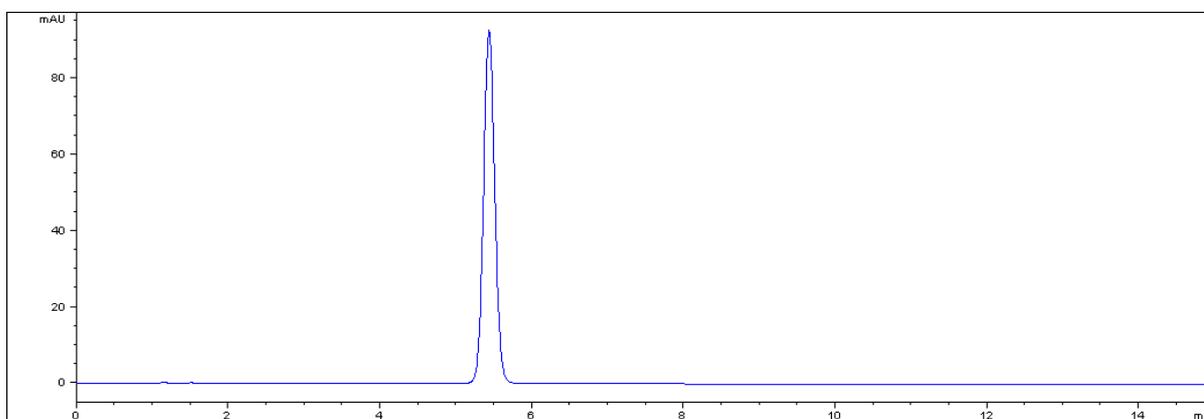
**Figura 24** - Cromatogramas de micofenolato de sódio matéria-prima obtidos em diferentes condições de análise (seção 5.1.5.1, Tabela 7).

**Tabela 33** - Parâmetros de conformidade do sistema resultantes dos cromatogramas de micofenolato de sódio matéria-prima em diferentes condições de análise (seção 5.1.5.1, Tabela 7).

Condição	tr (min)	k	T	N
A	6.82	6,26	1.56	2736
B	4.33	3,51	1.56	2594
C	3.58	2,11	1.09	6089

Observou-se a presença de cauda nos picos de MSD obtidos nas condições A e B. A troca da fase estacionária  $C_{18}$  para  $C_8$  (Condição C) foi eficaz para a obtenção de um pico simétrico.

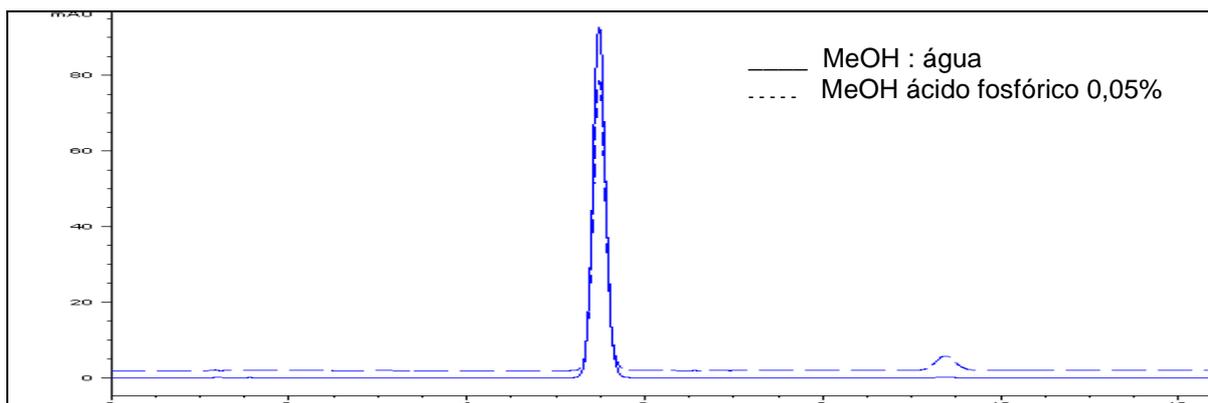
Substituiu-se o TFA da fase móvel por ácido fosfórico. A mudança não alterou o perfil cromatográfico do fármaco. Sendo assim, optou-se pela fase móvel com ácido fosfórico devido ao menor custo do reagente. Adicionalmente à substituição, diminuiu-se a porcentagem de solvente orgânico com o objetivo de melhorar o fator de capacidade. O cromatograma resultante dessas alterações está ilustrado na Figura 25.



**Figura 25** - Cromatograma representativo da solução de micofenolato de sódio matéria-prima 36  $\mu\text{g/ml}$  em fase móvel. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna  $C_8$  a 30 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

O pico de MSD apresentou tempo de retenção de 5,42 minutos,  $k = 3,58$ ,  $T = 1,06$  e  $N = 6823$ . Os parâmetros de conformidade obtidos atenderam às especificações adotadas (Tabela 8).

A solução de MSD 36  $\mu\text{g/ml}$  em mistura de metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45) foi reinjetada após 24 horas do preparo. Observou-se o surgimento de um pico em 9,3 minutos resultante da degradação do fármaco. A solução na mesma concentração utilizando metanol e água (55:45) como diluente não apresentou evidência de degradação, conforme demonstrado na Figura 26.



**Figura 26** - Cromatogramas representativos das soluções de micofenolato de sódio matéria-prima 36 µg/ml em mistura de metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45) e no diluente metanol e água (55:45), injetadas 24 horas após o preparo. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm.

O método descrito por Wiwattanawongsa (2001) adaptado para coluna octilsilano, fase móvel constituída por metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), temperatura do forno mantida a 30 °C e uso de metanol e água (55:45) como diluente da amostra foi adequado para a análise de MSD em matéria-prima neste estudo.

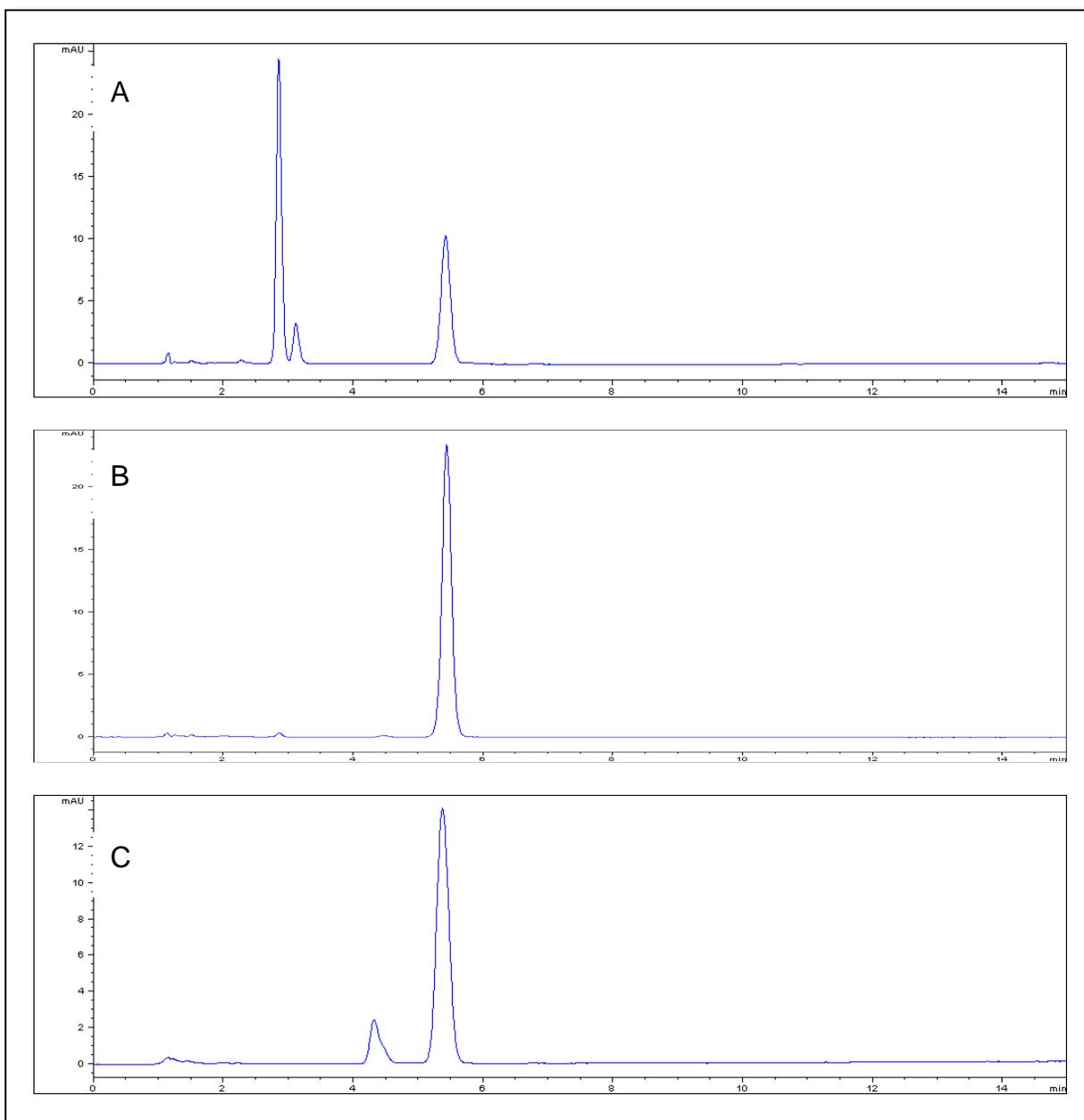
#### 6.1.5.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada frente às impurezas de degradação de MSD provenientes da hidrólise ácida, neutra e alcalina e exposição do fármaco à temperatura, luz e umidade do ambiente durante um período de 120 dias.

Os cromatogramas resultantes da hidrólise de MSD em HCl 0,1 mol/l, água e NaOH 0,1 mol/l sob refluxo por 60 minutos estão ilustrados na Figura 27

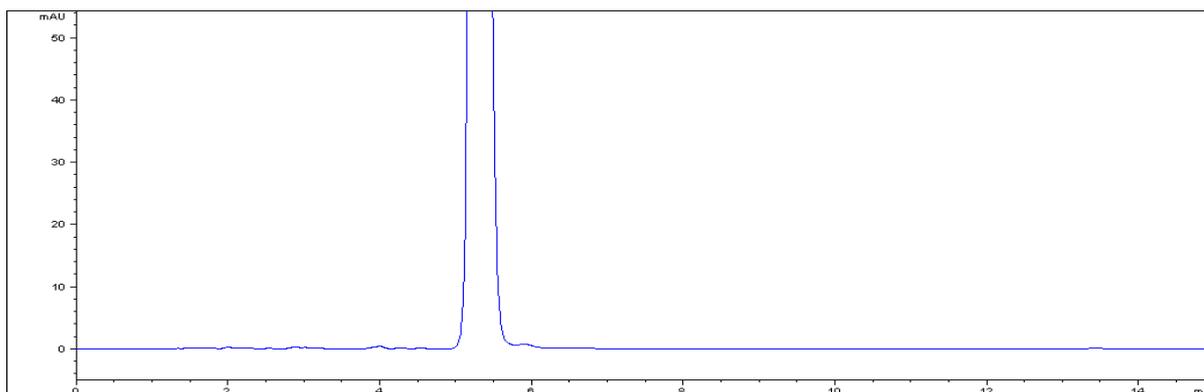
A estabilidade do fármaco em água foi superior quando comparada aos solventes HCl 0,1 mol/l e NaOH 0,1 mol/l. Em todos os casos, as condições cromatográficas propostas foram capazes de separar adequadamente o fármaco das impurezas de degradação por hidrólise.

A pureza do pico foi obtida com o auxílio do detector UV/DAD. Os valores encontrados foram 99,97%, 99,99% e 99,95% para as condições A, B e C, respectivamente.



**Figura 27** - Cromatogramas das soluções de micfenolato de sódio matéria-prima após hidrólise em (A) HCl 0,1 mol/l, (B) água e (C) NaOH 0,1 mol/l sob refluxo durante 60 minutos. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 30 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

Verificou-se que a matéria-prima adquiriu coloração levemente amarelada após 120 dias de exposição à temperatura, luz e umidade do ambiente. Entretanto, não foi evidenciado nenhum pico de impureza detectável nas condições analisadas, conforme cromatograma ilustrado na Figura 28.



**Figura 28** - Cromatograma da solução de micofenolato de sódio 360  $\mu\text{g/ml}$  preparada após 120 dias de exposição da matéria-prima à temperatura, luz e umidade do ambiente. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna  $\text{C}_8$  a 30 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

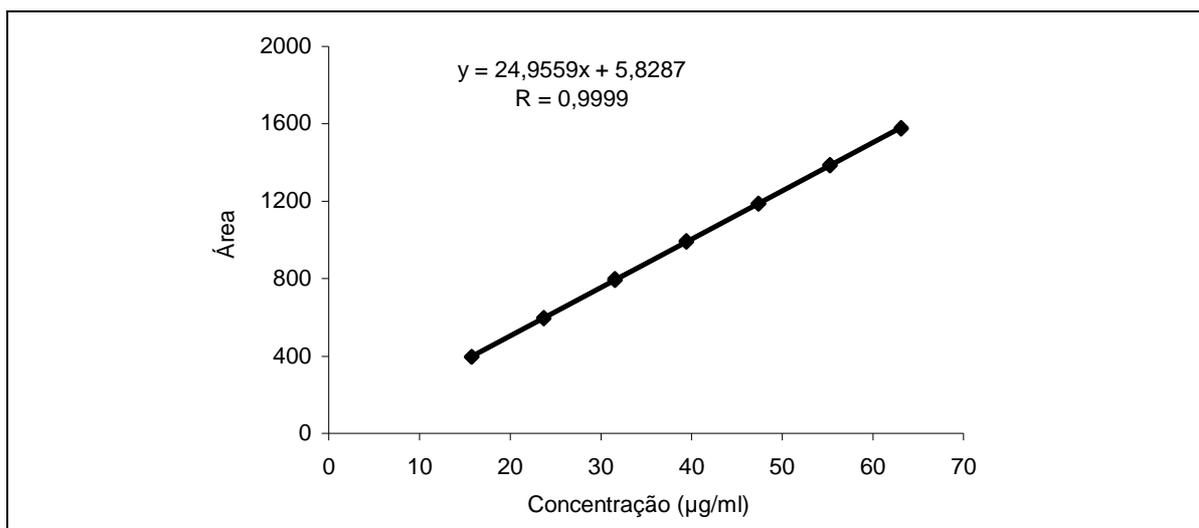
### 6.1.5.3 Linearidade

A curva analítica foi construída na faixa concentração de 15,78 a 63,14  $\mu\text{g/ml}$  de MSD, correspondente à faixa de 43,8 a 175,4% da concentração de trabalho. Avaliaram-se a normalidade, a independência e a homoscedasticidade dos resíduos, o intercepto da curva, o coeficiente de correlação e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear.

A regressão foi significativa e o valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9999, superior ao recomendado na literatura consultada (0,999). O intercepto foi diferente de zero ( $p < 0,05$ ). Embora significativamente diferente de zero, o valor do intercepto foi inferior a 2% da resposta obtida a 100% da concentração de trabalho, conforme recomendado por Green (1996).

Os resíduos apresentaram distribuição normal e homoscedasticidade. O teste de *Durbin Watson* não foi conclusivo para independência dos resíduos. Entretanto, os dados ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão linear.

A curva analítica está representada na Figura 29 e a análise estatística demonstrada no Apêndice B.



**Figura 29** - Curva analítica de micofenolato de sódio para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 6.1.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir dos resultados de recuperação de quantidades de padrão incorporadas à matéria-prima nos níveis de 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho. Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 34.

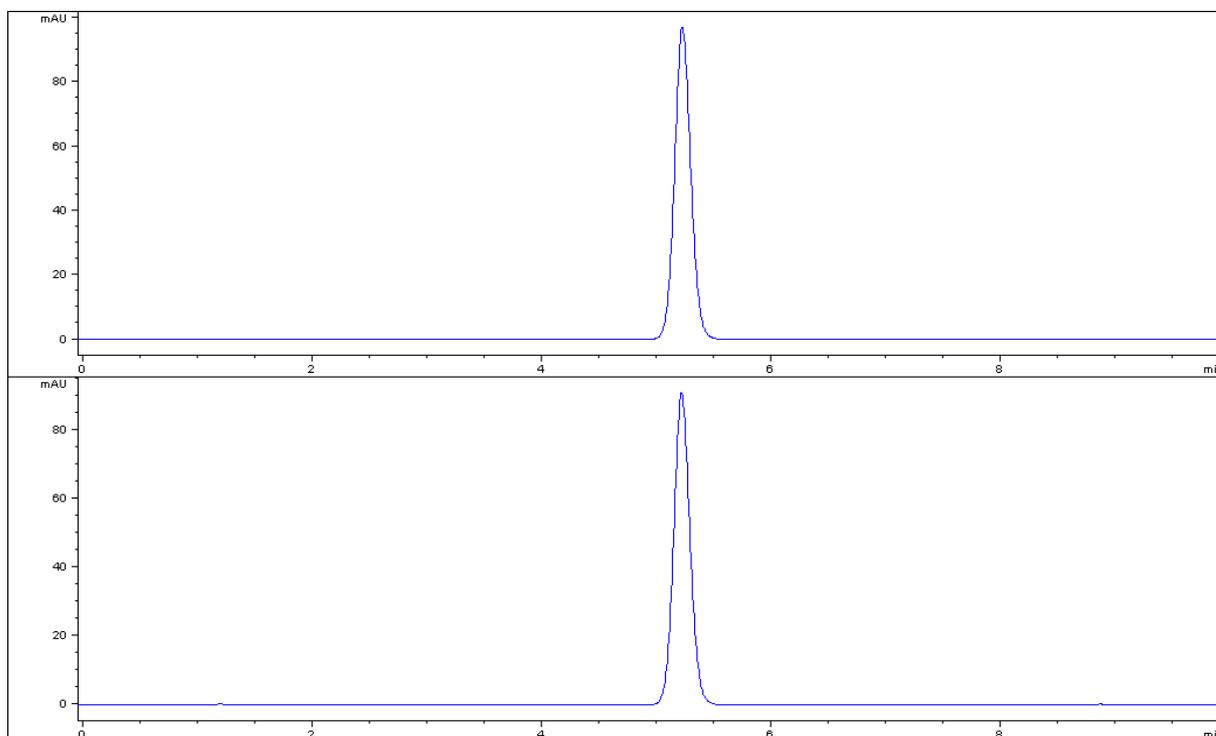
**Tabela 34** - Porcentagens de recuperação das quantidades do padrão de ácido micofenólico incorporadas à matéria-prima de micofenolato de sódio para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Concentração (µg/ml)	Recuperação (µg/ml)	Recuperação (%)
70	25,2	25,34	100,56
		25,61	101,63
		25,38	100,71
100	36,0	35,68	99,11
		35,65	99,03
		36,08	100,22
130	46,8	46,47	99,29
		46,80	100,00
		46,78	99,96
		<b>Média (%)</b>	<b>100,06</b>
		<b>DPR (%)</b>	<b>0,85</b>

A recuperação média obtida na faixa 70% a 130% da concentração de trabalho foi de 100,06%. O resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando estatística  $t$  ( $\alpha = 0,05$ ). O valor  $t$  experimental (0,20) foi inferior ao valor tabelado (2,31). Portanto, não houve diferença significativa entre a recuperação média e 100%.

#### 6.1.5.5 Precisão

Realizaram-se seis determinações do teor de MSD em três dias de análises. Os cromatogramas representativos das soluções amostra e padrão estão ilustrados na Figura 30. Os resultados de teor de MSD obtidos estão apresentados na Tabela 35.



**Figura 30** - Cromatogramas das soluções de ácido micofenólico padrão (superior) e micofenolato de sódio matéria-prima (inferior). Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna  $C_8$  a 30 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

A repetitividade foi avaliada pelo DPR entre as seis repetições diárias e a precisão intermediária verificada pela comparação dos resultados obtidos entre os três dias de análises. Os valores de DPR nas determinações dos três dias de análises foram inferiores a 2,0%. Os resultados das séries de determinações não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 35** - Resultados da precisão do método de doseamento de micofenolato de sódio em matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Teor de micofenolato de sódio (%)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	99,26	100,42	100,34
2	99,05	100,34	99,24
3	98,78	100,66	99,80
4	99,39	99,60	99,43
5	100,08	100,73	99,75
6	99,98	99,50	100,48
<b>Média (%)</b>	<b>99,42</b>	<b>100,21</b>	<b>99,84</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,52</b>	<b>0,53</b>	<b>0,49</b>

O método foi preciso nas condições analisadas. Considerando a média das determinações ( $n = 18$ ), a amostra apresentou teor de MSD igual a  $(99,82 \pm 0,29)\%$ . A matéria-prima foi utilizada como padrão de trabalho nos experimentos subsequentes.

Injetou-se em quintuplicata a solução padrão para verificar a adequação do sistema. O DPR dos valores de área foi inferior a 1,0%, conforme recomendado em U.S. FOOD... (1994).

**Tabela 36** - Resultado da injeção, em quintuplicata, da solução padrão de ácido micofenólico para avaliação da adequação do sistema.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	tr (min)	Área ( $n = 5$ )	DPR (%)
36,0	5,42	930,55	0,08

#### 6.1.5.6 Robustez

A robustez do método foi verificada modificando-se os parâmetros: temperatura do forno, fluxo da fase móvel e porcentagem de metanol na fase móvel. Os resultados das seis determinações do teor de MSD em cada condição encontram-se na Tabela 37.

A comparação estatística dos valores foi realizada por Anova. Verificou-se que não houve diferença significativa entre os valores obtidos nas condições testadas ( $p > 0,05$ ).

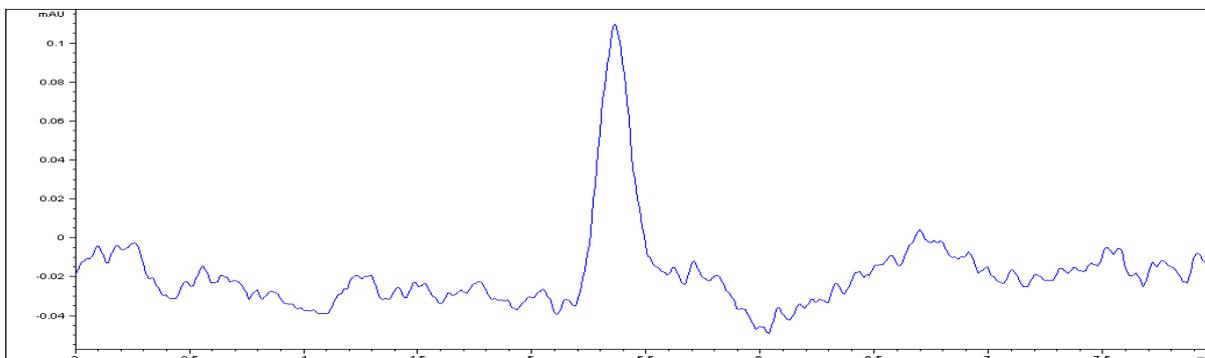
**Tabela 37** – Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em matéria-prima para verificação da robustez do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostras	Teor de micofenolato de sódio (%)						
	Nominal	1	2	3	4	5	6
1	100,34	99,63	99,59	99,31	101,39	99,67	102,04
2	99,24	99,09	98,69	99,28	100,02	99,86	97,98
3	99,80	99,32	99,45	101,47	99,69	99,67	98,88
4	99,43	98,97	98,79	98,70	98,69	100,38	98,51
5	99,75	99,08	98,92	98,92	98,78	99,03	98,38
6	100,48	100,29	99,72	100,40	99,76	102,49	99,29
<b>Média (%)</b>	<b>99,84</b>	<b>99,40</b>	<b>99,19</b>	<b>99,68</b>	<b>99,72</b>	<b>100,18</b>	<b>99,18</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,49</b>	<b>0,50</b>	<b>0,45</b>	<b>1,06</b>	<b>0,98</b>	<b>1,21</b>	<b>1,48</b>

#### 6.1.5.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação estimados a partir da curva analítica foram 0,30 µg/ml e 0,91 µg/ml, respectivamente. Os cromatogramas de MSD nestas concentrações apresentaram relações entre sinal e ruído superiores ao preconizado por INTERNATIONAL... (2005).

As soluções foram diluídas sucessivamente e injetadas no cromatógrafo até a obtenção da relação entre sinal e ruído próxima a 3 para o limite de detecção e próxima a 10 para o limite de quantificação. O limite de detecção encontrado para MSD foi de 0,015 µg/ml (Figura 31) e o limite de quantificação igual a 0,038 µg/ml (Figura 32).



**Figura 31** - Cromatograma da solução de micofenolato de sódio matéria-prima 0,015 µg/ml.

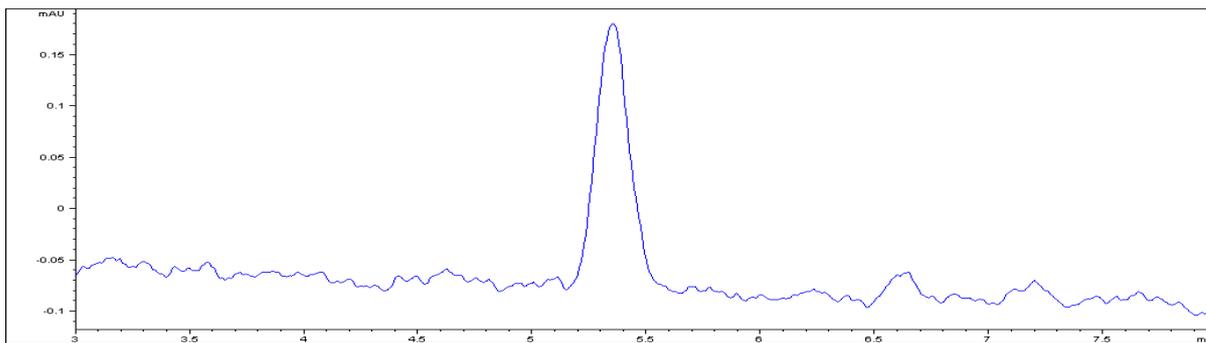


Figura 32 - Cromatograma da solução de micofenolato de sódio matéria-prima 0,038 µg/ml.

## 6.2 Obtenção, identificação e caracterização de micofenolato de mofetila a partir da matriz de comprimido

### 6.2.1 Obtenção de micofenolato de mofetila

Obteve-se um extrato clorofórmico concentrado, viscoso, de coloração alaranjada e com poucos cristais na parede interna do balão de fundo redondo. Ao adicionar éter de petróleo e promover agitação da mistura, formaram-se precipitados brancos que se dispersaram no solvente e um aglomerado alaranjado que se concentrou no fundo do balão.

As diferentes propriedades dos solventes são exploradas em estudos de cristalização de substâncias. A alteração da interação entre soluto e solvente é capaz de influenciar um processo de cristalização (GU *et al.*, 2004).

O éter de petróleo é um solvente constituído de mistura de hidrocarbonetos cuja polaridade do solvente é mais baixa, (momento dipolo = 0,00 e constante dielétrica = 1,88) em comparação ao clorofórmio (momento dipolo = 1,04 e constante dielétrica = 4,71). Essa diferença foi suficiente para promover a cristalização de MMF quando o éter de petróleo foi adicionado ao concentrado clorofórmico (GU *et al.*, 2004).

Os cristais brancos em suspensão orgânica foram transferidos cuidadosamente para um recipiente previamente pesado e deixados à temperatura ambiente até a evaporação do solvente. A massa do resíduo obtida foi 341,3 mg, correspondente ao rendimento de 34,13% em relação à quantidade teórica de 1000 mg MMF presente nos dois comprimidos submetidos ao processo de extração.

## 6.2.2 Identificação e caracterização do resíduo

### 6.2.2.1 Temperatura de fusão

Realizaram-se três determinações da temperatura de fusão do resíduo, considerando a faixa do início e término da fusão. Os resultados estão apresentados na Tabela 38.

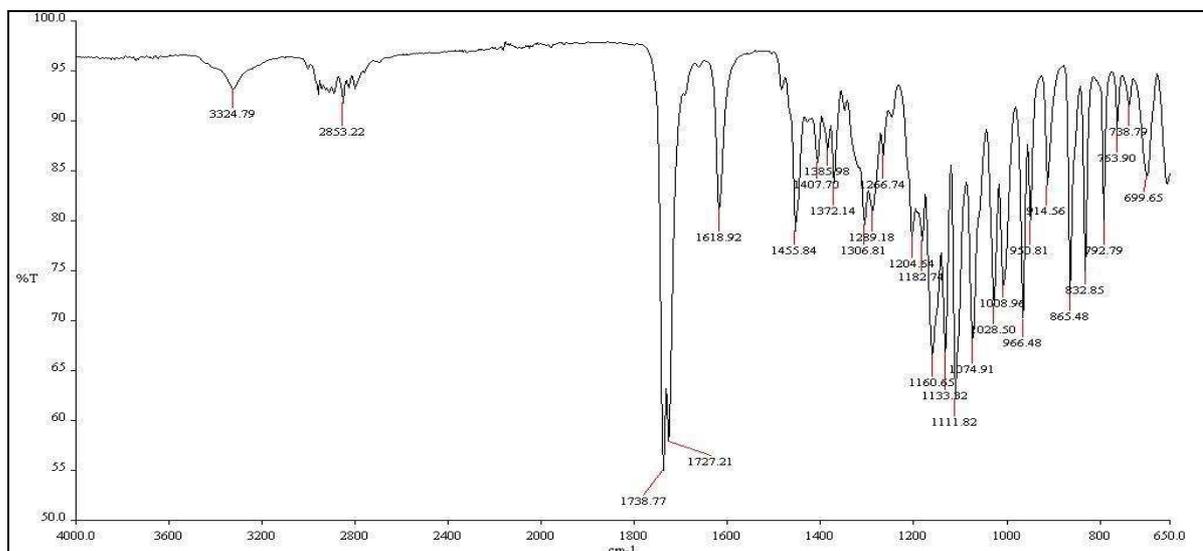
**Tabela 38** - Determinação da temperatura de fusão do resíduo de micofenolato de mofetila.

Determinação	Faixa fusão (°C)	Ponto médio (°C)
1	93,5 - 94,9	94,2
2	93,4 - 94,3	93,8
3	93,4 - 93,9	93,6
<b>Média</b>	<b>93,4 - 94,4</b>	<b>93,9</b>

Os valores encontrados são consistentes com aqueles obtidos para MMF matéria-prima e o relatado na literatura (seção 6.1.3.1).

### 6.2.2.2 Espectrofotometria no infravermelho

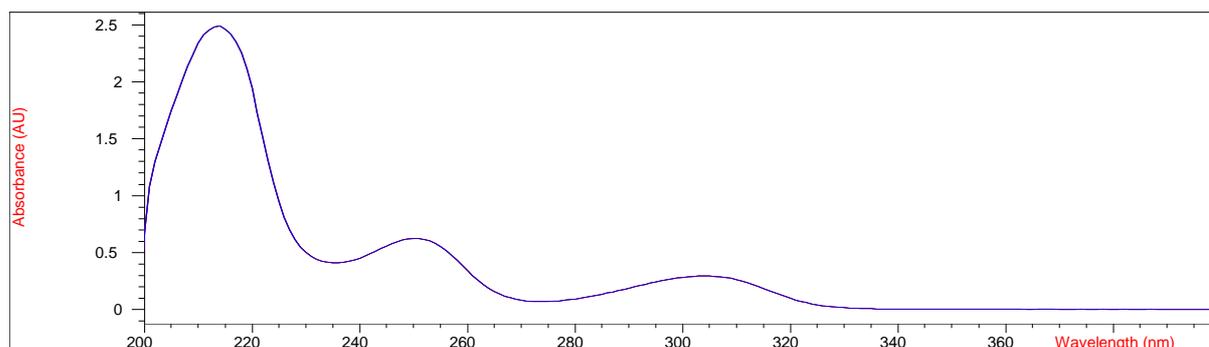
O espectro infravermelho (Figura 33) apresentou bandas nos mesmos números de onda e com as mesmas intensidades ao obtido para MMF SQR. As atribuições das principais bandas estão relacionadas na Tabela 24 (seção 6.1.2.1).



**Figura 33** - Espectro infravermelho do resíduo de micofenolato de mofetila.

### 6.2.2.3 Espectrofotometria no ultravioleta

O espectro ultravioleta do resíduo 25 µg/ml em HCl 0,1 mol/l foi obtido na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm. Os máximos de absorvância ocorreram em  $\lambda$  214 nm, 250 nm e 304 nm, idênticos aos obtidos para matéria-prima (seção 6.1.2.2).

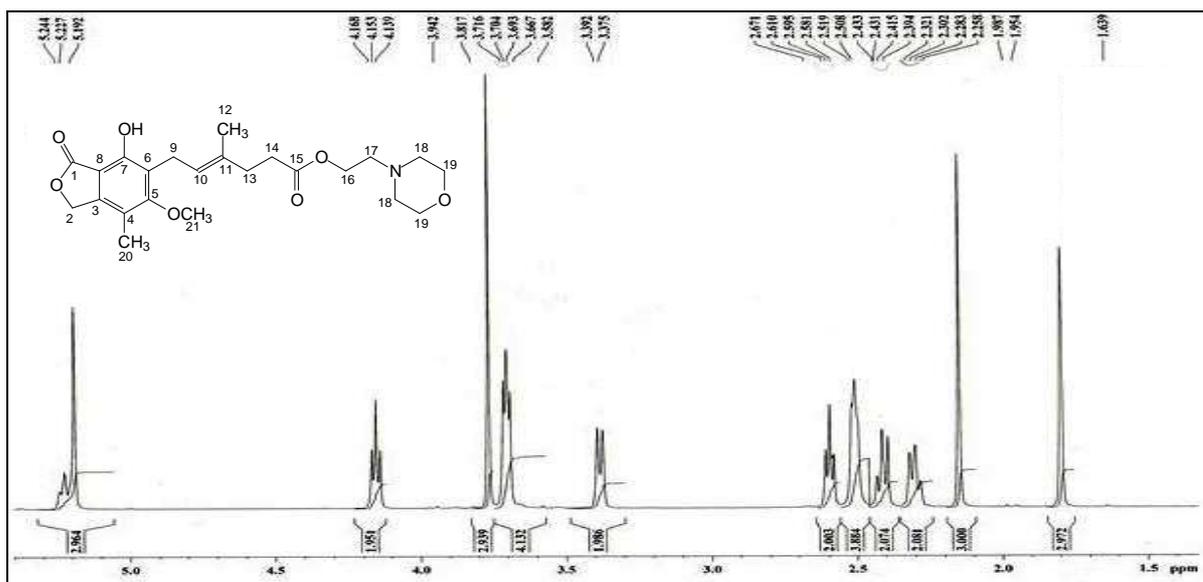


**Figura 34** - Espectro ultravioleta do resíduo de micofenolato de mofetila 25 µg/ml em HCl 0,1 mol/l.

### 6.2.2.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1H$ ) e carbono 13 (RMN $^{13}C$ )

Os sinais obtidos para o resíduo são coerentes com a estrutura de MMF. O espectro RMN  $^1H$  encontra-se ilustrado na Figura 35 e as respectivas atribuições dos sinais na Tabela 39. O espectro RMN  $^{13}C$  está representado na Figura 36 e as atribuições dos sinais na Tabela 40.

Os espectros auxiliares de DEPT, HMQC e HMBC estão representados nos Apêndices C a E. Com o espectro de DEPT é possível distinguir os grupos  $CH_2$  (picos para baixo) dos grupos  $CH$  e  $CH_3$  (picos para cima). No espectro de HMQC observam-se os acoplamentos entre hidrogênio e carbono que participam da mesma ligação, enquanto no espectro de HMBC visualizam-se os acoplamentos de duas ou mais ligações (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

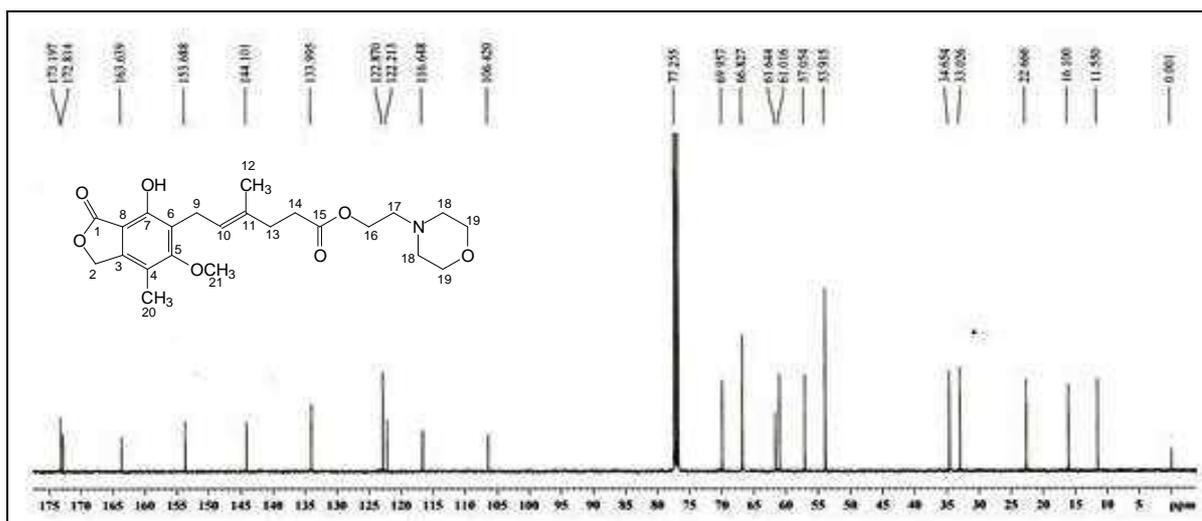


**Figura 35** - Espectro RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.

**Tabela 39** - Atribuição dos sinais do espectro RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.

$\delta$	Multiplicidade	Número de hidrogênios	Atribuição	$J$ (Hz)
5,24-5,19	m	3	H-2 e H-10	-
4,15	t	2	H-16	$J_{16,17} = 5,8$
3,78	s	3	H-21	-
3,70	t	4	H-19	-
3,38	d	2	H-9	$J_{9,10} = 6,8$
2,59	t	2	H-17	$J_{17,16} = 5,8$
2,52-2,51	m	4	H-18	-
2,43-2,42	m	2	H-13	-
2,30	t	2	H-14	$J_{14,13} = 7,6$
2,15	s	3	H-20	-
1,80	s	3	H-12	-

d: duplete, m: multiplete, s: simpleto, t: tripleto;  $J$ : constante de acoplamento.



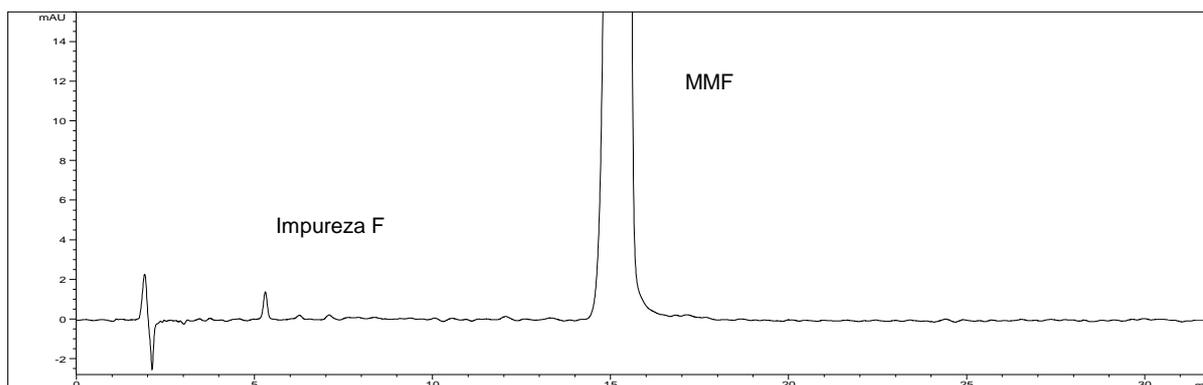
**Figura 36** - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.

**Tabela 40** - Atribuição dos sinais do espectro RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do resíduo de micofenolato de mofetila.

$\delta$	Atribuição
173,20	C-15
172,81	C-1
163,64	C-5
153,69	C-7
133,99	C-aromático
122,87	C-10
122,21	C-aromático
116,65	C-aromático
106,42	C-aromático
69,96	C-2
66,83	C-19
61,64	C-16
61,02	C-21
57,05	C-17
53,91	C-18
34,65	C-13
33,03	C-14
22,67	C-9
16,10	C-12
11,55	C-20

### 6.2.2.5 Cromatografia Líquida de alta eficiência

Para verificar a pureza do resíduo, realizou-se o ensaio de substâncias relacionadas proposto na Farmacopéia Européia (2007). O cromatograma representativo da solução teste do resíduo está ilustrado na Figura 37.



**Figura 37** - Cromatograma da solução teste do resíduo de micofenolato de mofetila obtido no ensaio de substâncias relacionadas.

Detectou-se a presença de apenas uma substância relacionada (impureza F). Determinou-se a porcentagem da impureza F presente no resíduo pela comparação entre a resposta analítica da impureza, em solução a 2 mg/ml do resíduo, e a resposta do principal pico obtido com a solução diluída do resíduo (2 µg/ml).

**Tabela 41** - Quantificação da impureza F no resíduo de micofenolato de mofetila.

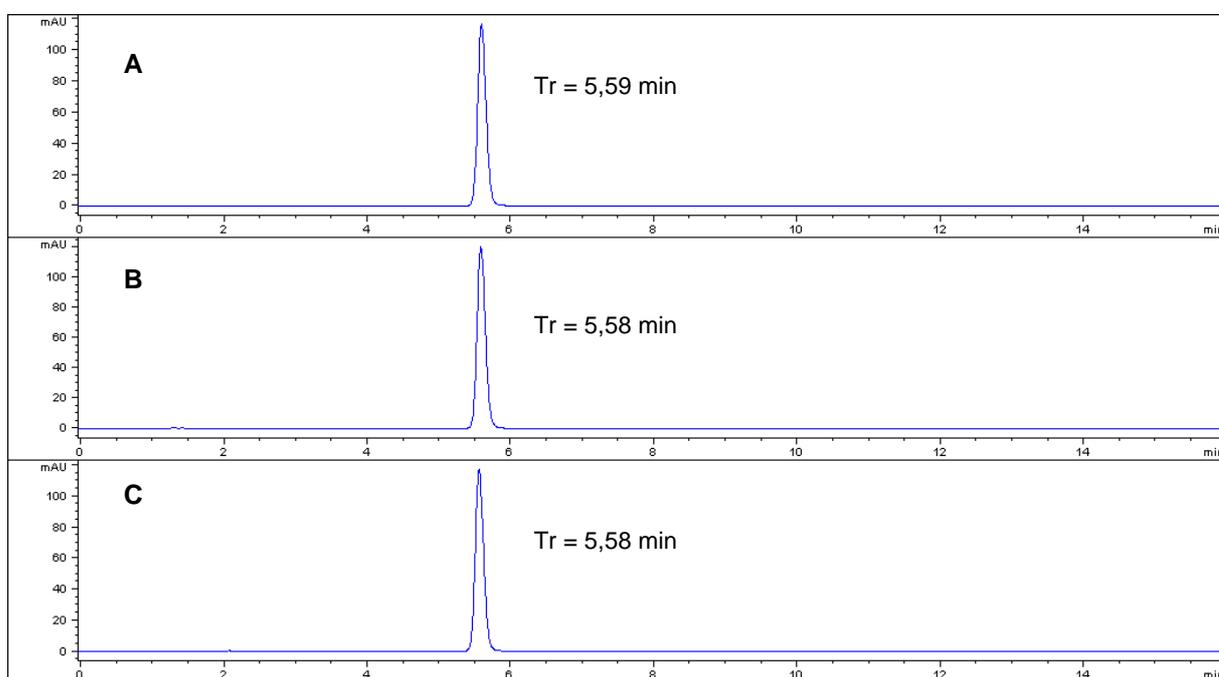
Determinação	Área Impureza F na solução teste	Área MMF na solução a	Razão entre as áreas (Impureza/MMF)	Quantificação (%)
1	11,07	18,00	0,62	0,06
2	10,50	18,33	0,57	0,06
3	11,00	21,07	0,52	0,05

A área da impureza F foi inferior a cinco vezes a área da solução diluída de MMF. Apesar do baixo rendimento da extração, o resíduo apresentou nível da impureza inferior ao limite de 0,5%, conforme preconizado para MMF matéria-prima na Farmacopéia Européia (2007).

### 6.3 Controle de qualidade de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio comprimidos

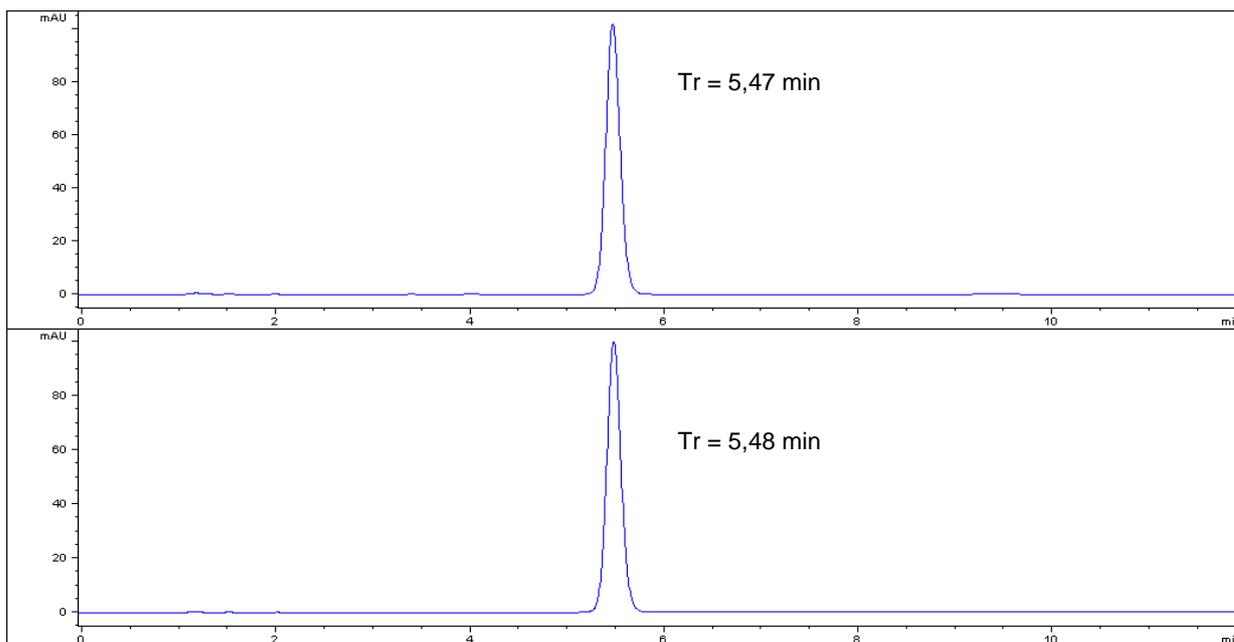
#### 6.3.1 Identificação

Os cromatogramas obtidos para soluções de MMF SQR, CellCept<sup>®</sup> e medicamento genérico estão ilustrados na Figura 38. O pico principal obtido nos cromatogramas das amostras possui o mesmo tempo de retenção daquele observado para a solução padrão.



**Figura 38** - Cromatograma da solução de (A) micofenolato de mofetila SQR e das soluções amostra de (B) CellCept<sup>®</sup> e (C) medicamento genérico nas condições cromatográficas descritas em 5.3.6.

O tempo de retenção do pico obtido no cromatograma da solução amostra de Myfortic<sup>®</sup> foi semelhante àquele obtido para solução padrão de MPA (Figura 39). A solução amostra respondeu positivamente à presença de íon sódio, evidenciada pela coloração amarela intensa sob a chama. O teste foi negativo para o placebo preparado nas mesmas condições.



**Figura 39** - Cromatograma das soluções de ácido micofenólico padrão (superior) e amostra de Myfortic® (inferior) nas condições cromatográficas descritas em 5.1.5.

### 6.3.2 Determinação de peso

Os resultados da determinação de peso para CellCept®, medicamento genérico de MMF e Myfortic® estão apresentados na Tabela 42. O limite de variação permitido para os produtos é  $\pm 5,0\%$  (FARMACOPÉIA..., 1988). As amostras cumpriram com os requisitos do teste.

**Tabela 42** - Resultados da determinação de peso para comprimidos de CellCept®, medicamento genérico de micofenolato de mofetila e Myfortic®.

Produto	Peso médio (mg) <i>n</i> = 20	Menor variação observada (%)	Maior variação observada (%)
CellCept®	847,53	- 1,38	1,67
Genérico MMF	843,89	-1,45	0,74
Myfortic®	698,31	-2,90	3,57

### 6.3.3 Determinação de resistência mecânica

#### 6.3.3.1 Dureza

Os valores obtidos no teste de dureza estão apresentados na Tabela 43. Os comprimidos apresentaram resistência superior a 30 N, de acordo com o recomendado pela Farmacopéia Brasileira (1988).

**Tabela 43** - Resultados do teste de dureza dos comprimidos de CellCept<sup>®</sup>, medicamento genérico de micofenolato de mofetila e Myfortic<sup>®</sup>.

Produto	Valor médio (N) <i>n</i> =10	Menor valor observado (N)	Maior valor observado (N)
CellCept <sup>®</sup>	228,6	213	246
MMF Genérico	309,1	267	336
Myfortic <sup>®</sup>	475,8	323	501

### 6.3.3.2 Friabilidade

A friabilidade dos produtos foram desprezíveis (0,00%) nas condições analisadas. Todas as amostras apresentaram resistência mecânica aceitável em relação ao preconizado na Farmacopéia Brasileira (1988).

### 6.3.4 Teste de desintegração

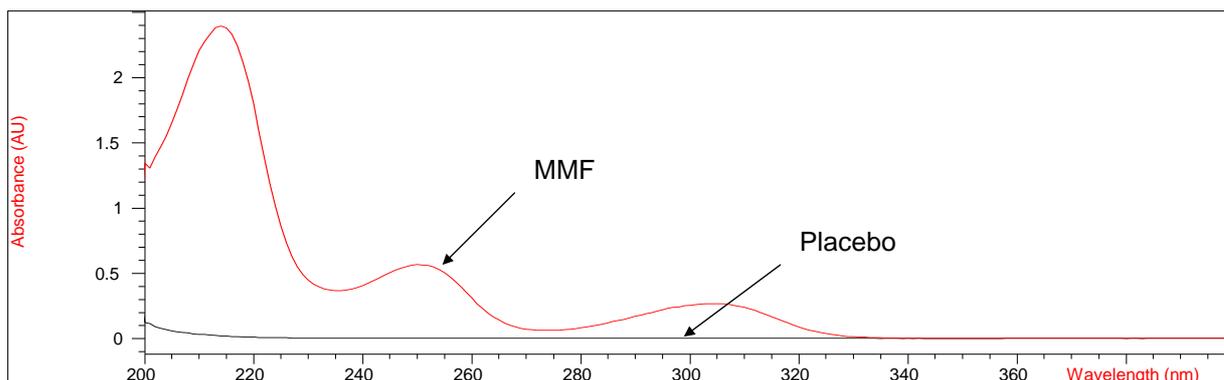
O teste de desintegração para comprimidos de MMF foi realizado utilizando água como líquido de imersão. Todas as unidades de CellCept<sup>®</sup> e do medicamento genérico de MMF apresentaram-se completamente desintegradas em 30 minutos.

A análise de Myfortic<sup>®</sup> foi realizada utilizando os meios HCl 0,1 mol/l e tampão fosfato pH 6,8. Após 60 minutos em HCl 0,1 mol/l, todas as unidades permaneceram íntegras e sem indícios de amolecimento ou rachadura na superfície. Entretanto, ocorreu a desintegração completa na imersão em tampão fosfato pH 6,8, atendendo às especificações farmacopéicas.

### 6.3.5 Determinação do teor de micofenolato de mofetila por espectrofotometria no ultravioleta

#### 6.3.5.1 Seletividade

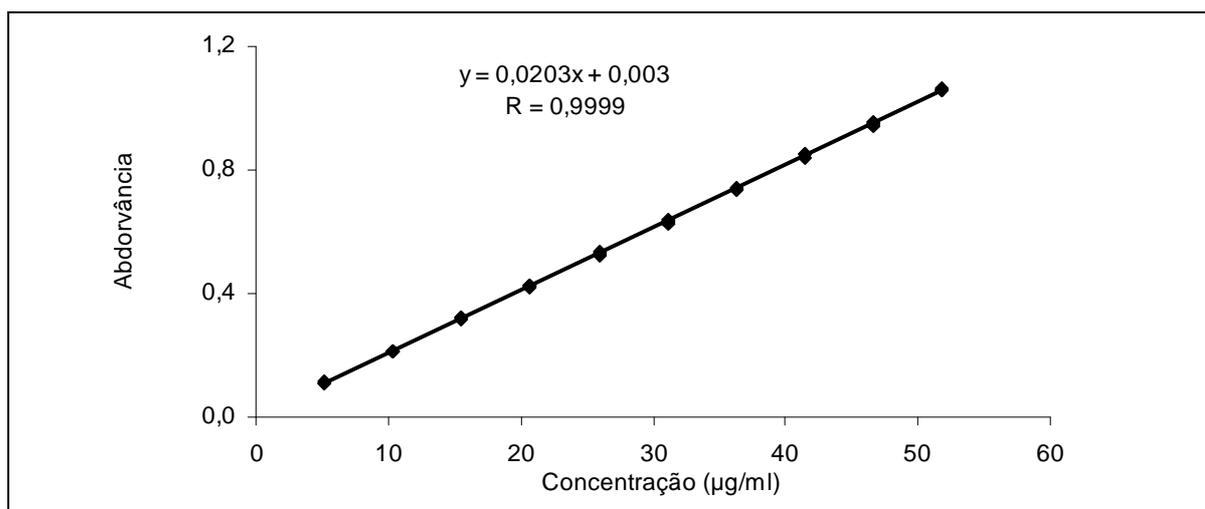
Os espectros das soluções placebo e padrão, obtidos na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm, estão ilustrados na Figura 40. A absorção do placebo em  $\lambda$  250 nm (0,0015) foi inferior a 0,5% da leitura obtida para MMF a 100% da concentração de trabalho (0,5300).



**Figura 40** - Sobreposição dos espectros de absorção na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm das soluções placebo e amostra de micofenolato de mofetila 25  $\mu\text{g/ml}$  em HCl 0,1 mol/l.

### 6.3.5.2 Linearidade

A curva analítica obtida na faixa 5,18 a 51,80  $\mu\text{g/ml}$  está representada na Figura 41 e a análise estatística demonstrada no Apêndice F.



**Figura 41** - Curva analítica de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

A regressão foi significativa e o intercepto não foi diferente de zero ( $p > 0,05$ ). O valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9999, superior ao recomendado na literatura consultada. Os resíduos apresentaram distribuição normal, independência e homoscedasticidade. Os dados ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão linear.

### 6.3.5.3 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir dos resultados de recuperação de quantidades de MMF incorporadas ao placebo nos níveis de 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho. Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 44.

A recuperação média obtida na faixa 70% a 130% da concentração de trabalho foi de 99,28%. O resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ). O valor t experimental (4,13) foi superior ao valor tabelado (2,31), evidenciando diferença significativa entre a recuperação média e 100%.

Entretanto, de acordo com Green (1996), o critério de aceitação normalmente utilizado para exatidão de um método de doseamento é a recuperação compreendida entre  $(100 \pm 2)\%$  em cada nível de concentração. Os valores experimentais nos três níveis de concentração estão compreendidos no intervalo especificado.

**Tabela 44** - Porcentagens de recuperação das quantidades de micofenolato de mofetila incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)
70	17,5	17,41	99,49
		17,46	99,77
		17,54	100,23
100	25,0	24,78	99,12
		24,77	99,08
		24,72	98,88
130	32,5	32,16	98,95
		32,06	98,65
		32,28	99,32
		<b>Média (%)</b>	<b>99,28</b>
		<b>DPR (%)</b>	<b>0,49</b>

### 6.3.5.4 Precisão

Realizaram-se seis determinações do teor em três dias de análises com analistas diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 45.

**Tabela 45** - Resultados da determinação do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® para avaliação da precisão do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	Teor de micofenolato de mofetila (%)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	99,13	101,38	98,88
2	99,02	100,35	99,62
3	98,57	99,95	99,34
4	99,08	99,41	98,96
5	99,30	99,30	98,02
6	99,54	98,87	100,66
<b>Média (%)</b>	<b>99,11</b>	<b>99,88</b>	<b>99,25</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,33</b>	<b>0,90</b>	<b>0,89</b>

Os valores de DPR nas determinações dos três dias de análises foram inferiores a 2,0% e os resultados nas séries de determinações não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Considerando a média das determinações ( $n = 18$ ), a amostra apresentou teor de MMF igual a  $(99,41 \pm 0,39)\%$ .

#### 6.3.5.5 Robustez

Os resultados referentes às determinações de MMF em CellCept® utilizando espectrofotômetros distintos estão apresentados na Tabela 46.

**Tabela 46** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® em equipamentos distintos para verificação da robustez do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	Teor de micofenolato de mofetila (%)	
	HP 8453	Shimadzu UV-1800
1	99,66	99,50
2	99,94	99,73
3	99,17	99,03
4	99,21	99,12
5	99,78	99,90
6	99,22	99,16
<b>Média (%)</b>	<b>99,50</b>	<b>99,41</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,34</b>	<b>0,36</b>

Os valores obtidos nas duas condições foram comparados utilizando a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ). O valor t experimental (1,91) foi inferior ao valor tabelado (2,57). Portanto, não houve diferença nos valores obtidos entre as duas condições.

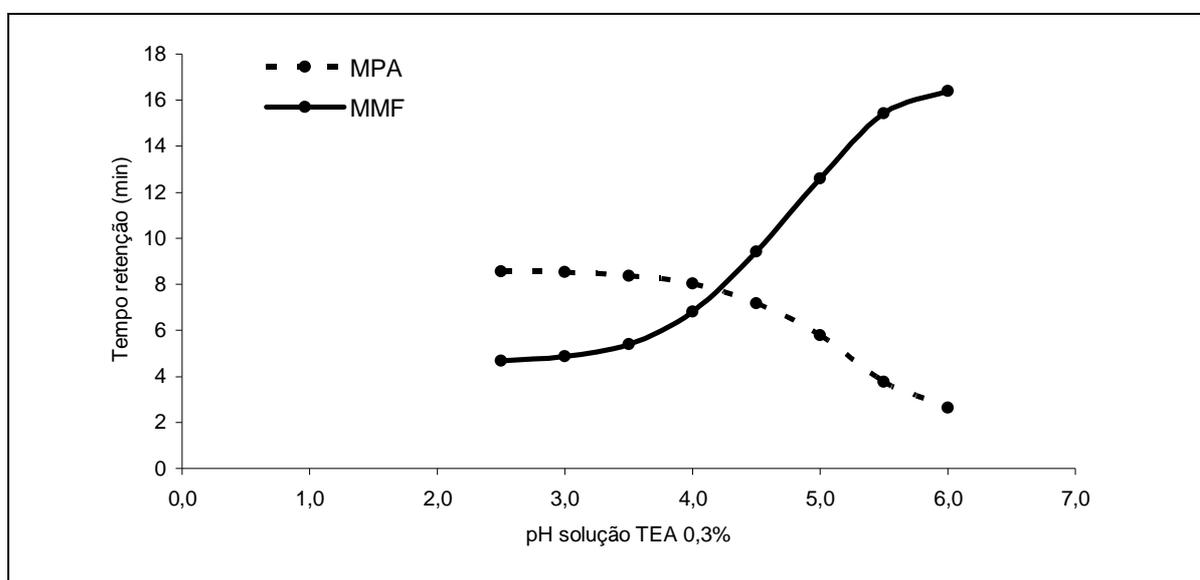
#### 6.3.5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da curva analítica. Os valores encontrados foram 0,32  $\mu\text{g/ml}$  para detecção e 0,97  $\mu\text{g/ml}$  para quantificação.

### 6.3.6 Determinação do teor de micofenolato de mofetila por cromatografia líquida de alta eficiência

#### 6.3.6.1 Determinação das condições cromatográficas

O comportamento da eluição de MMF e MPA foi estudado em diferentes valores de pH da fase móvel. Na Figura 42 estão representados graficamente os tempos de retenção dos compostos em função dos valores de pH da solução de TEA 0,3%.



**Figura 42** - Variações no tempo de retenção de micofenolato de mofetila e ácido micofenólico em função do pH da solução de trietilamina 0,3%. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 0,3% (35:65), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 45 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

O aumento da concentração hidrogeniônica na fase móvel resultou em diminuição no tempo de retenção de MMF, sendo que as maiores variações foram observadas

entre os valores de pH 4,0 e 5,5. Efeito contrário foi observado para MPA, sendo as maiores variações obtidas entre os valores de pH 3,5 e 6,0.

A redução do pH na fase móvel favoreceu a ionização do grupo amina de MMF e a forma não dissociada do grupo ácido carboxílico de MPA. A ionização do grupo amina diminuiu a hidrofobicidade de MMF, tornando-o menos retido na fase estacionária. A forma não dissociada do ácido carboxílico em MPA propiciou o aumento da hidrofobicidade da molécula, resultando em uma maior interação com a fase estacionária.

Em vista aos resultados, elegeu-se a fase móvel de pH 3,0 como ideal para a análise simultânea de MMF e MPA. A fase móvel com pH 3,0 permitiu a separação dos picos e as variações no tempo de retenção não foram intensas em valores próximos desse pH.

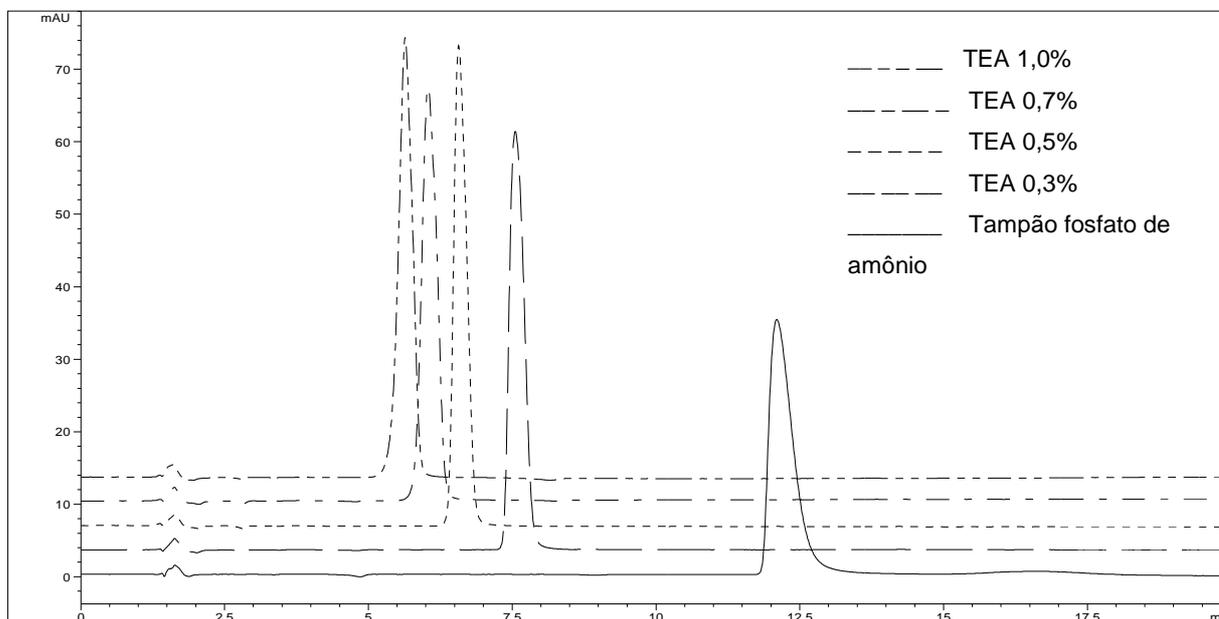
Para aumentar o fator de retenção de MMF ( $k = 1,4$ ) diminuiu-se 5% do componente orgânico da fase móvel. Com a nova mistura (ACN e TEA 0,3%, 30:70) obteve-se  $k = 3,75$  para o pico de MMF, atendendo à especificação descrita na Tabela 8.

Em seguida, avaliou-se a presença de TEA em diferentes concentrações na fase móvel. Utilizaram-se os seguintes componentes aquosos na fase móvel: tampão fosfato de amônio monobásico 25 mmol/l, TEA 0,3%, TEA 0,5%, TEA 0,7% e TEA 1,0%. Em todos os casos ajustou-se o pH para 3,0 com ácido fosfórico. Os cromatogramas obtidos para cada situação estão representados na Figura 43.

O uso de tampão fosfato de amônio na fase móvel resultou em um aumento no tempo de retenção de MMF e obtenção de um pico assimétrico e com cauda. Esses efeitos são típicos quando ocorre interação de compostos básicos com grupos silanóis da coluna.

A presença de TEA na fase móvel reduziu os efeitos dos grupos silanóis, resultando em picos mais estreitos e simétricos. Na Tabela 47 estão relacionados os valores de tempo de retenção, fator de capacidade, fator de cauda e número de pratos para o pico de MMF na eluição com os diversos componentes aquosos da fase móvel. O

uso de TEA 1% foi o mais indicado para a análise quantitativa de MMF nas condições adotadas, uma vez que forneceu um pico simétrico sem cauda.



**Figura 43** - Cromatogramas de micofenolato de mofetila obtidos em diferentes condições de análise (seção 5.3.6.1).

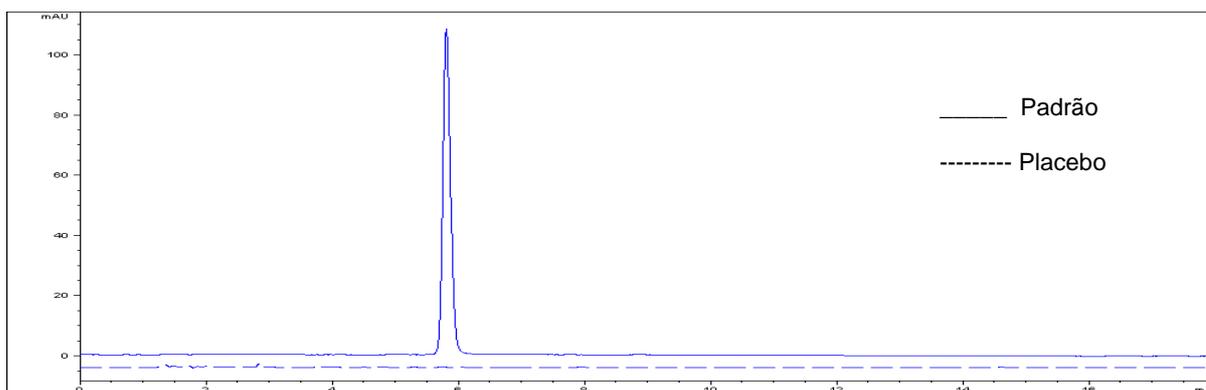
**Tabela 47** - Parâmetros de conformidade do sistema resultantes dos cromatogramas de micofenolato de sódio em diferentes condições de análise (seção 5.3.6.1).

Condição	tr (min)	k	T	N
Tampão fosfato de amônio	12,06	6,54	1,97	4224
TEA 0,3%	7,51	3,72	1,32	3718
TEA 0,5%	6,53	3,11	1,30	3682
TEA 0,7%	5,99	2,77	1,25	2261
TEA 1,0%	5,59	2,59	0,95	2444

Cabe ressaltar que a presença e a atividade dos grupos silanóis variam conforme a fase estacionária utilizada. As fases à base de sílica híbrida, as que possuem grupos polares embutidos e as quimicamente ligadas através da reação de capeamento oferecem melhor separação aos compostos básicos. Mesmo assim, a presença de grupos silanóis residuais é inevitável (SILVA *et al.*, 2004).

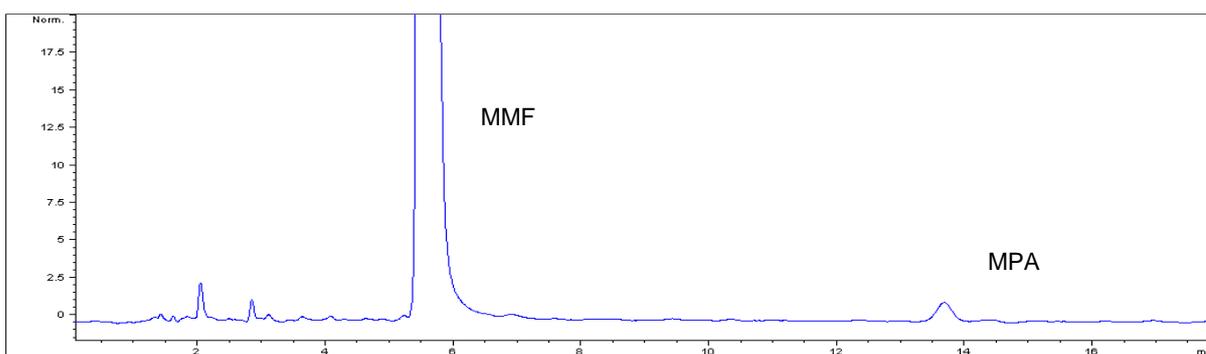
### 6.3.6.2 Seletividade

Os cromatogramas das soluções placebo e padrão encontram-se sobrepostos na Figura 44. Observa-se que os excipientes da formulação não apresentaram interferência no cromatograma do padrão.



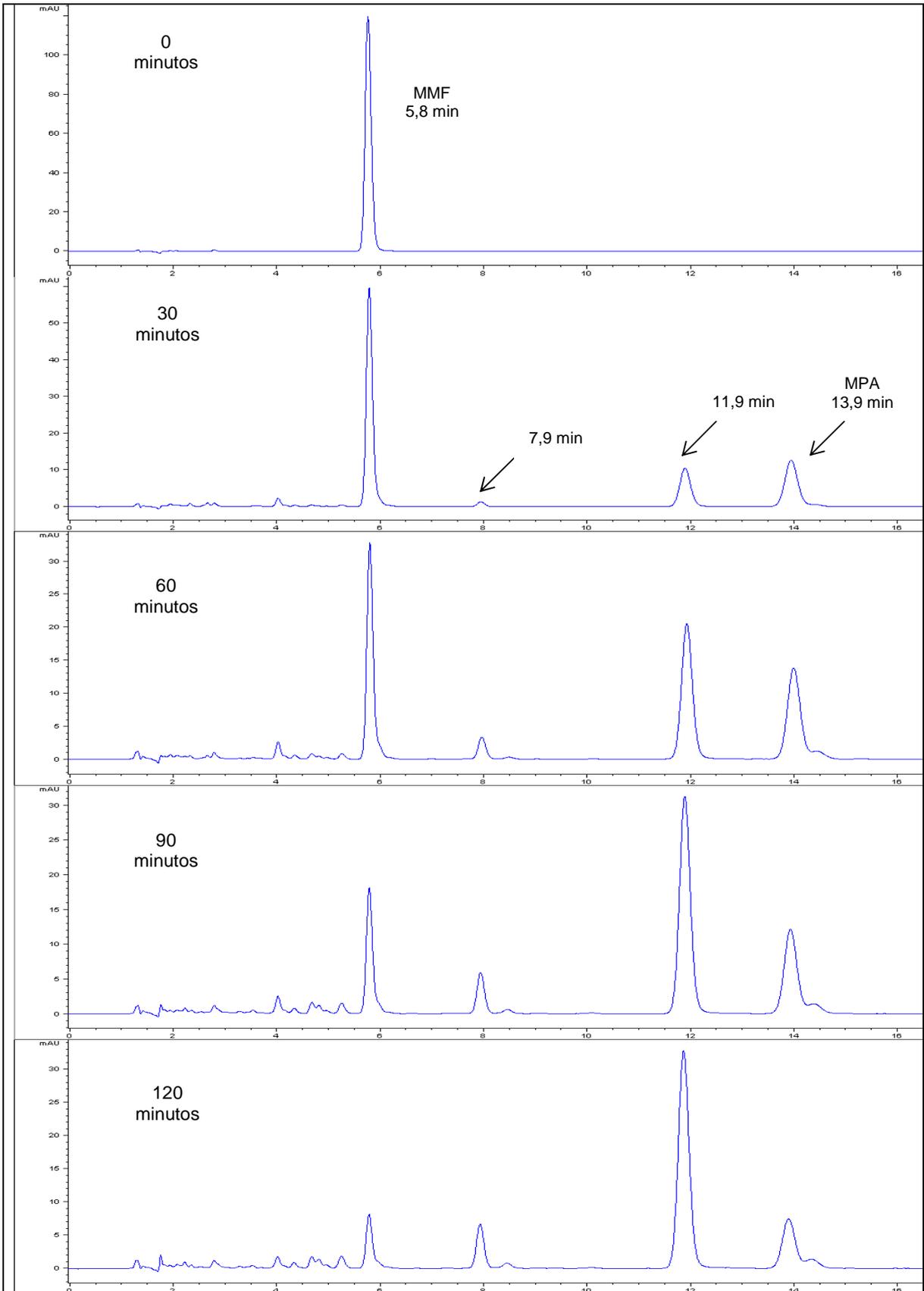
**Figura 44** - Cromatogramas das soluções placebo e padrão de micofenolato de mofetila. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 45 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

Não foi observada modificação no aspecto da matéria-prima após 120 dias de exposição à temperatura, luz e umidade do ambiente. Entretanto, verificou-se a presença de MPA pela análise cromatográfica (Figura 45).

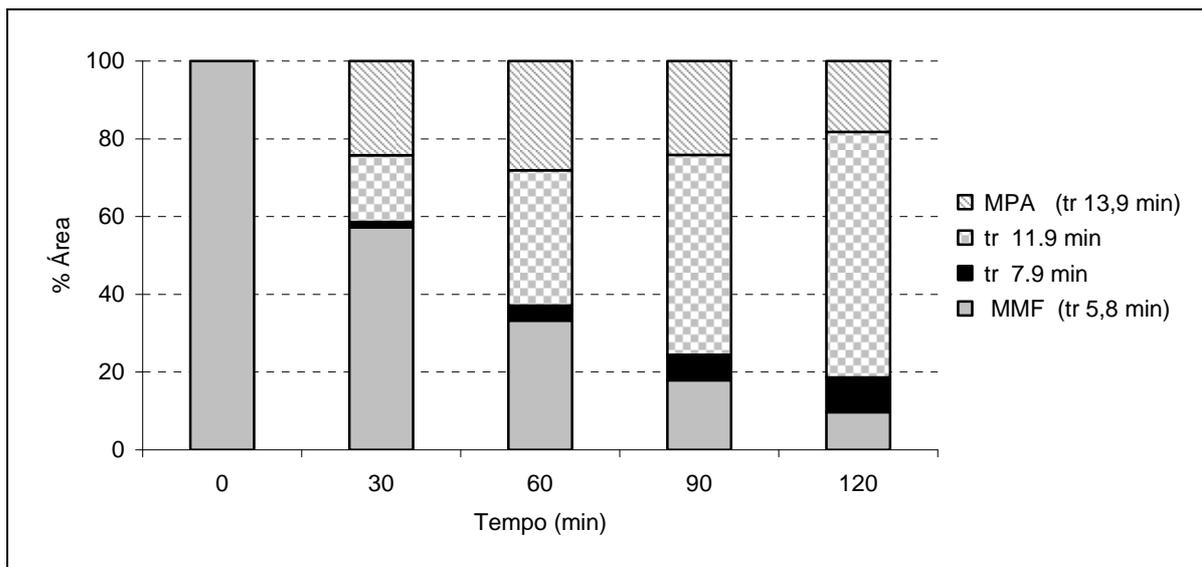


**Figura 45** - Cromatograma da solução de micofenolato de mofetila 500 µg/ml preparada após 120 dias de exposição do fármaco à temperatura, luz e umidade do ambiente. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 45 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

Procedeu-se à hidrólise do fármaco em HCl 0,1 mol/l sob refluxo. A degradação foi acompanhada com medições da área do pico de MMF e dos principais produtos detectáveis no intervalo de tempo de 0 a 120 minutos. Os cromatogramas representativos da hidrólise estão ilustrados na Figura 46 e as áreas dos picos representadas graficamente na Figura 47.



**Figura 46** - Cromatogramas representativos da hidrólise de micofenolato de mofetila em HCl 0,1 mol/l sob refluxo nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 45 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

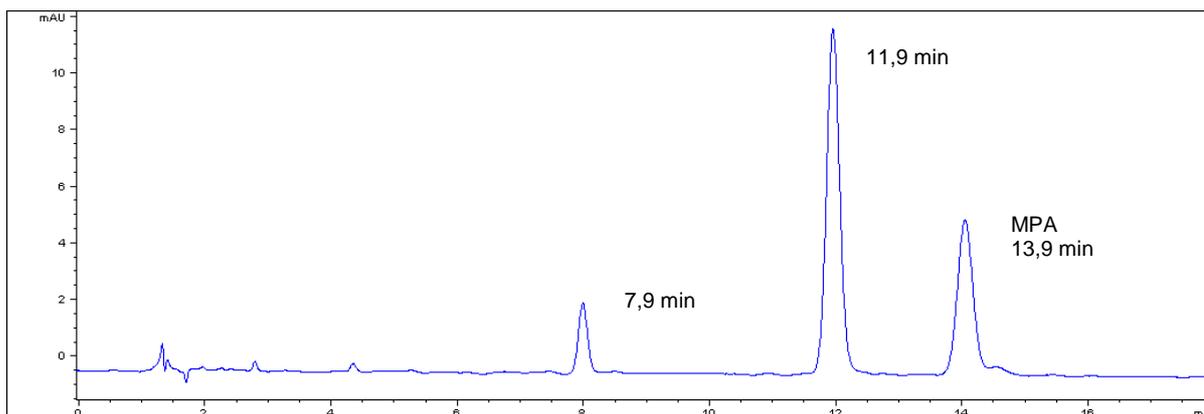


**Figura 47** - Porcentagens relativas das áreas do pico de micofenolato de mofetila e de seus produtos de degradação provenientes dos cromatogramas da hidrólise em HCl 0,1 mol/l sob refluxo durante 120 minutos.

Em 30 minutos observa-se a formação de três produtos de degradação: dois produtos não caracterizados nos tempos de retenção de 7,9 minutos e 11,9 minutos, e o MPA, em tempo de retenção de 13,9 minutos. A formação de MPA estabilizou-se em 60 minutos e apresentou redução após 90 minutos. Os outros produtos apresentaram formação contínua durante o procedimento.

O pico de MMF apresentou pureza de 99,89% e resolução de 2,5 em relação ao pico adjacente após 2 horas de refluxo. O método foi seletivo para MMF e capaz de separar os principais produtos de degradação por hidrólise ácida.

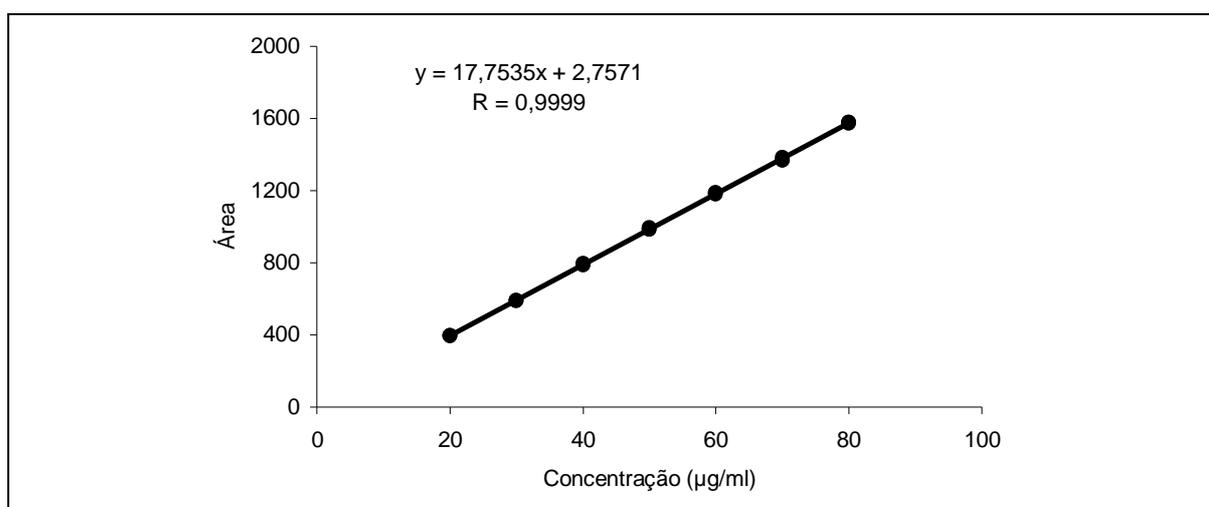
A hidrólise de MPA em HCl 0,1 mol/l, sob refluxo durante 60 minutos, resultou no cromatograma ilustrado na Figura 48. Percebe-se a formação dos dois produtos de degradação não identificados na hidrólise de MMF (7,9 min e 11,9 min). Em vista aos resultados, há evidência de que MMF degrada-se inicialmente em MPA e os produtos de degradação originados nos tempos de retenção de 7,9 minutos e 11,9 minutos são provenientes da reação de hidrólise ácida de MPA.



**Figura 48** - Cromatograma representativo da hidrólise do ácido micofenólico em HCl 0,1 mol/l sob refluxo durante 60 minutos. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 45 °C e detecção em  $\lambda$  250 nm.

### 6.3.6.3 Linearidade

A curva analítica obtida na faixa 22,14 a 88,58  $\mu\text{g/ml}$  está representada na Figura 49 e a análise estatística demonstrada no Apêndice G.



**Figura 49** - Curva analítica de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

A regressão foi significativa e o intercepto não foi diferente de zero ( $p > 0,05$ ). O valor do coeficiente de correlação encontrado foi próximo de 1, indicando a existência de correlação linear entre a concentração e os valores de área. Os resíduos apresentaram distribuição normal, independência e homoscedasticidade. Os dados ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão.

#### 6.3.6.4 Exatidão

Os valores de recuperação de MMF obtidos nos níveis de 70% a 130% da concentração de trabalho estão apresentados na Tabela 48.

**Tabela 48** - Porcentagens de recuperação das quantidades de micofenolato de mofetila incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de mofetila em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Concentração (µg/ml)	Recuperação (µg/ml)	Média (%)
70	35,0	35,08	100,23
		35,16	100,46
		34,85	99,57
100	50,0	49,28	98,56
		49,35	98,70
		49,67	99,34
130	65,0	65,85	101,31
		64,93	99,89
		64,64	99,45
		<b>Média (%)</b>	<b>99,72</b>
		<b>DPR (%)</b>	<b>0,87</b>

A recuperação média obtida na faixa 70% a 130% da concentração de trabalho foi de 99,72%. O resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ). O valor t experimental (0,96) foi inferior ao valor tabelado (2,31). Portanto, não houve diferença significativa entre a recuperação média e 100%.

#### 6.3.6.5 Precisão

Realizaram-se seis determinações de MMF em CellCept® em três dias de análises com analistas diferentes. Os resultados encontram-se na Tabela 49.

Os valores de DPR nas determinações dos três dias de análises foram inferiores ao 2,0% e as médias dos resultados obtidos nos três dias de análises não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Considerando a média das determinações ( $n = 18$ ), a amostra apresentou teor de MMF igual a  $(99,73 \pm 0,41)\%$ .

**Tabela 49** - Resultados da determinação do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® para avaliação da precisão do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Teor de micofenolato de mofetila (%)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	98,78	99,03	100,37
2	98,85	99,25	100,23
3	99,28	98,84	100,73
4	100,37	98,90	99,58
5	100,91	100,45	100,88
6	100,86	98,08	99,66
<b>Média (%)</b>	<b>99,84</b>	<b>99,09</b>	<b>100,24</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,99</b>	<b>0,78</b>	<b>0,53</b>

A injeção em quintuplicata da solução padrão apresentou valor de DPR inferior a 1,0%, estando de acordo com o recomendado em U.S. FOOD... (1994).

**Tabela 50** - Resultado da injeção, em quintuplicata, da solução padrão de micofenolato de mofetila para avaliação da adequação do sistema.

Concentração (µg/ml)	tr (min)	Área (n = 5)	DPR (%)
50,0	5,59	957,49	0,07

#### 6.3.6.6 Robustez

A robustez do método foi verificada modificando-se os parâmetros: pH da solução de TEA, temperatura do forno, fluxo da fase móvel e proporção de acetonitrila na fase móvel. Os resultados das seis determinações do teor de MMF em CellCept® em cada condição encontram-se na Tabela 51.

As médias nas diferentes condições foram próximas entre si. Verificou-se não haver diferença significativa entre os valores obtidos nas condições testadas ( $p > 0,05$ ).

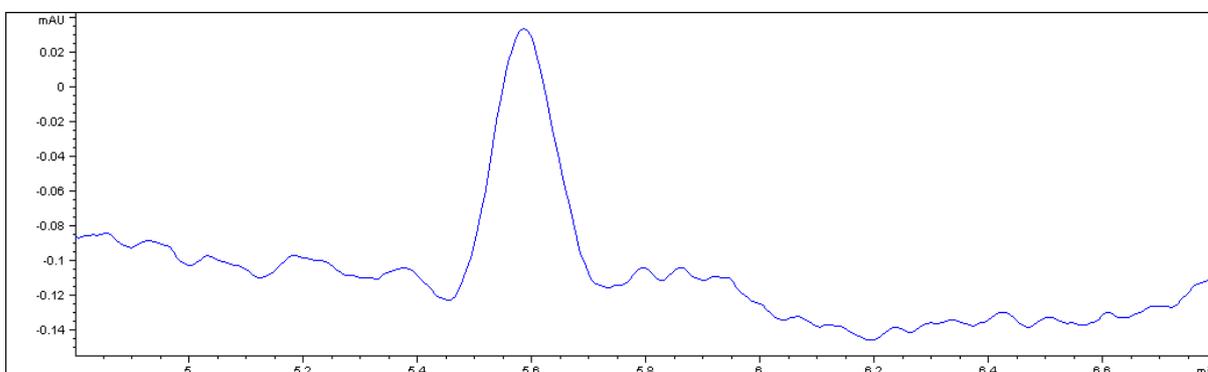
**Tabela 51** - Resultado das determinações do teor de micofenolato de mofetila em CellCept® para verificação da robustez do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Teor de micofenolato de mofetila (%)								
	Nominal	1	2	3	4	5	6	7	8
1	99,03	98,44	98,46	98,43	98,64	98,32	98,38	98,28	98,35
2	99,25	99,09	99,24	99,07	99,12	99,06	99,07	98,89	99,07
3	98,84	98,57	98,64	98,58	98,85	98,83	98,84	98,70	98,85
4	98,90	98,79	98,86	98,73	98,91	98,63	98,64	98,56	98,64
5	100,45	97,43	100,25	100,22	100,36	100,38	100,29	99,98	100,17
6	98,08	98,01	98,23	97,75	97,97	97,74	97,82	97,58	97,71
<b>Média (%)</b>	<b>99,09</b>	<b>98,39</b>	<b>98,95</b>	<b>98,80</b>	<b>98,97</b>	<b>98,83</b>	<b>98,84</b>	<b>98,67</b>	<b>98,80</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,78</b>	<b>0,60</b>	<b>0,73</b>	<b>0,83</b>	<b>0,80</b>	<b>0,90</b>	<b>0,84</b>	<b>0,80</b>	<b>0,83</b>

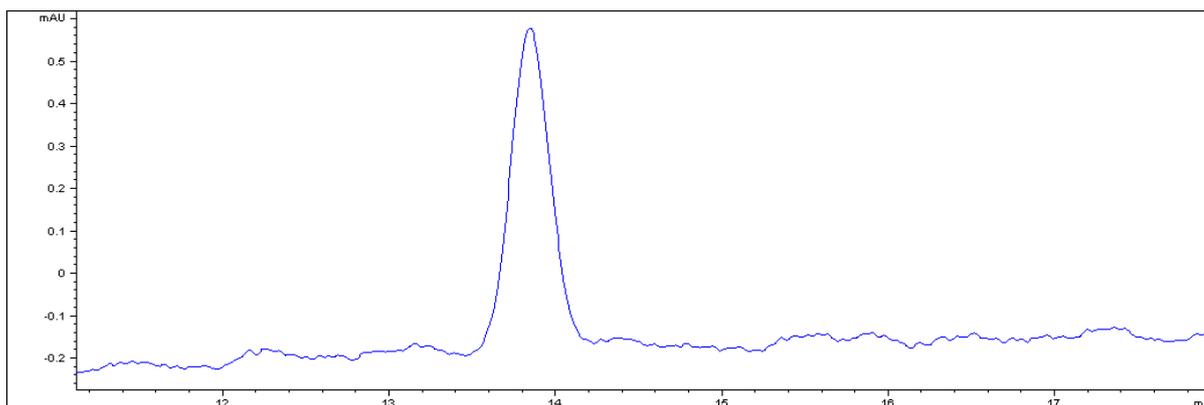
#### 6.3.6.7 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação estimados a partir da curva analítica foram 0,58 µg/ml e 1,77 µg/ml, respectivamente. Os cromatogramas de MMF nestas concentrações apresentaram relações entre sinal e ruído superiores ao preconizado em INTERNATIONAL... (2005).

As soluções foram diluídas e injetadas no cromatógrafo até a obtenção da relação entre sinal e ruído próxima a 3 para o limite de detecção e próxima a 10 para o limite de quantificação. O limite de detecção encontrado para MMF foi de 0,1 µg/ml (Figura 50) e o limite de quantificação igual a 0,3 µg/ml (Figura 51).



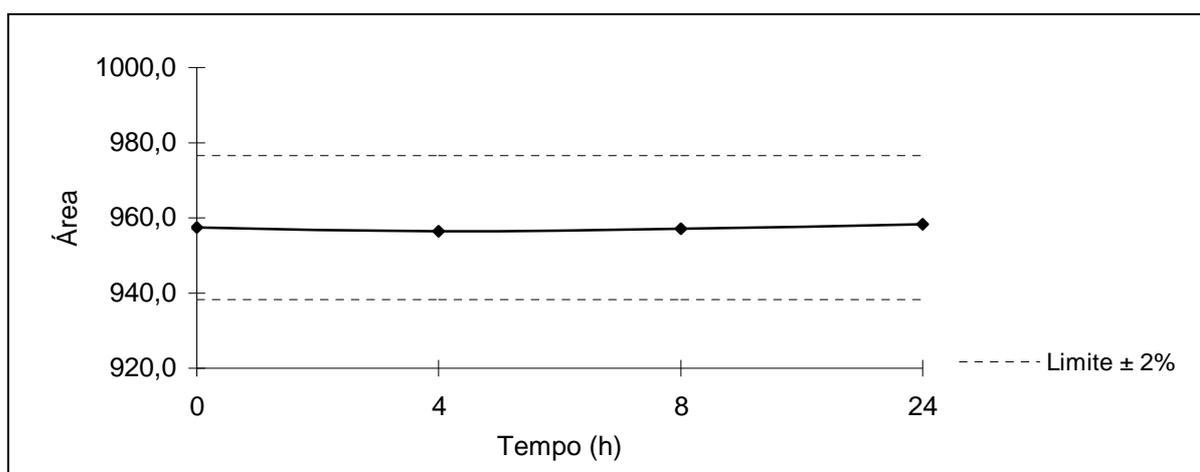
**Figura 50** - Cromatograma da solução de micofenolato de mofetila 0,1 µg/ml.



**Figura 51** - Cromatograma da solução de micofenolato de mofetila 0,3 µg/ml.

### 6.3.6.8 Estabilidade em solução

A estabilidade de MMF na fase móvel foi verificada injetando uma solução de MMF 50 µg/ml nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas após o preparo. Os valores das áreas dos picos referentes ao fármaco estão apresentados graficamente na Figura 52.



**Figura 52** - Valores das áreas do pico de MMF obtidos pela injeção de solução a 50 µg/ml em fase móvel nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas após o preparo.

Green (1996) sugere como critério de estabilidade o limite de variação de  $\pm 2\%$  em relação à resposta obtida em preparações recentes. As variações de área, em relação ao tempo inicial ( $t_0$ ), foram inferiores ao recomendado.

### **6.3.7 Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de mofetila em comprimidos**

A comparação entre o método por CLAE e por espectrofotometria no ultravioleta foi realizada utilizando os resultados da determinação do teor de MMF em CellCept<sup>®</sup> obtidos na precisão (Tabelas 45 e 49).

O valor de F experimental (1,28) foi inferior ao tabelado (2,67) em  $\alpha = 0,05$ . Portanto, não houve diferença significativa entre as variâncias obtidas nos métodos.

Para a comparação entre as médias, aplicou-se o teste t de dados independentes e variâncias homogêneas. O valor de t experimental (1,13) também foi inferior ao tabelado (2,03) em  $\alpha = 0,05$ , demonstrando não existir diferença significativa entre os valores médios obtidos nos métodos.

Os dois métodos apresentaram precisão e exatidão equivalentes para o doseamento de MMF em comprimidos. Ambos demonstraram linearidade e robustez nas condições avaliadas. O método por CLAE foi seletivo em relação à principal impureza (MPA) e demais produtos de degradação por hidrólise ácida. O método espectrofotométrico não é seletivo para MPA, pois a impureza apresenta o mesmo grupo cromóforo de MMF.

### **6.3.8 Doseamento de micofenolato de mofetila no medicamento genérico**

Os resultados do teor de MMF no medicamento genérico pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico estão apresentados na Tabela 52. Os teores encontrados foram próximos àqueles obtidos para o medicamento referência em ambos os métodos.

**Tabela 52** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de mofetila no medicamento genérico, utilizando os métodos de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	Teor de micofenolato de mofetila (%)	
	CLAE	UV
1	99,20	98,27
2	98,69	97,69
3	96,86	98,60
4	97,08	98,86
5	99,74	99,36
6	99,72	101,28
<b>Média (%)</b>	<b>98,55</b>	<b>99,01</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,30</b>	<b>1,26</b>

### 6.3.9 Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de mofetila

A uniformidade de doses unitárias foi realizada pelo método de uniformidade de conteúdo. Os valores individuais do teor de MMF em CellCept<sup>®</sup> e no medicamento genérico estão apresentados na Tabela 53. Todas as unidades apresentaram teor entre 85,0% e 115,0% e o DPR das determinações foi inferior a 6,0%. As amostras cumpriram com as especificações farmacopéicas (FARMACOPÉIA..., 1996).

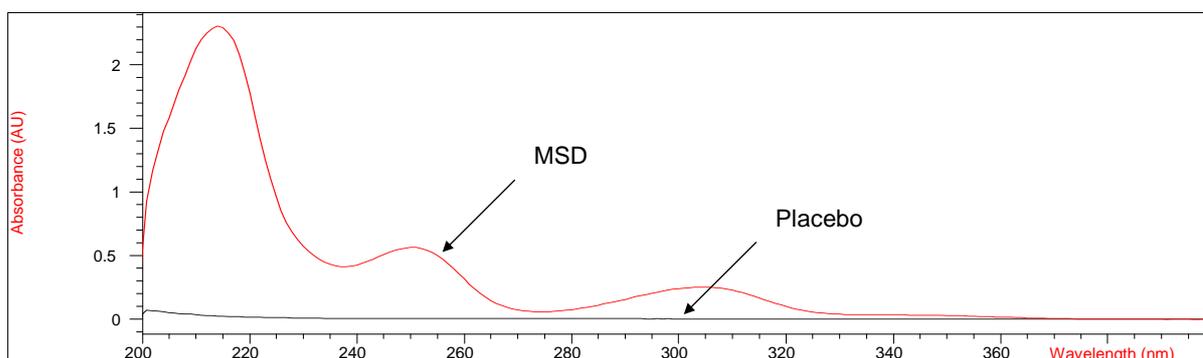
**Tabela 53** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de mofetila obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos de CellCept<sup>®</sup> e medicamento genérico, utilizando o método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Unidade	Teor de micofenolato de mofetila (%)	
	CellCept <sup>®</sup>	Genérico MMF
1	101,74	98,54
2	101,58	99,76
3	98,06	100,02
4	100,08	98,86
5	101,64	100,26
6	100,97	100,69
7	99,24	101,17
8	100,83	101,43
9	99,72	102,69
10	101,19	99,42
<b>Média (%)</b>	<b>100,50</b>	<b>100,28</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,20</b>	<b>1,25</b>

### 6.3.10 Determinação do teor de micofenolato de sódio por espectrofotometria no ultravioleta

#### 6.3.10.1 Seletividade

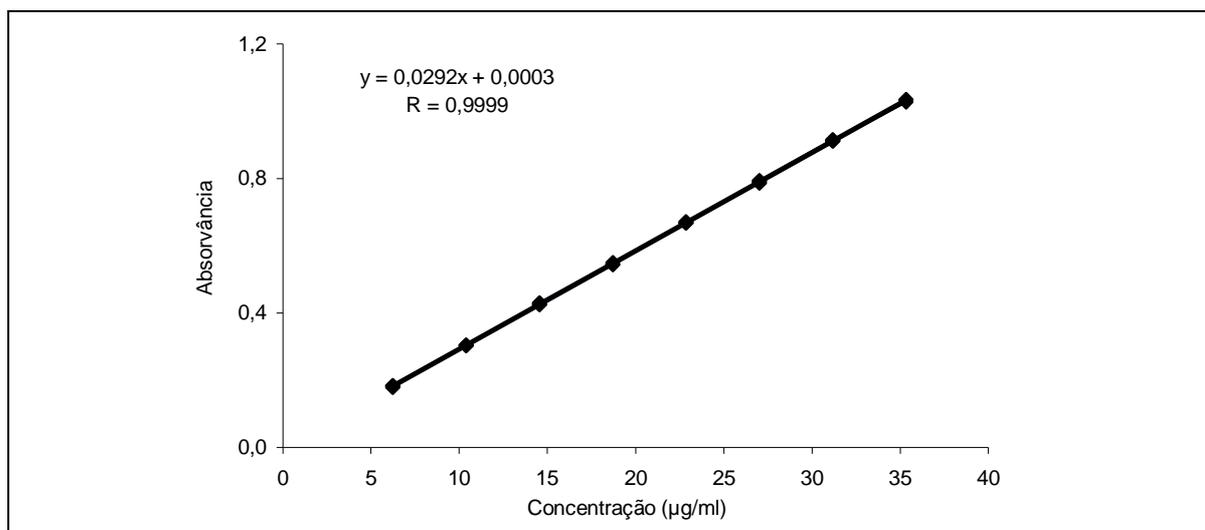
Os espectros das soluções placebo e MSD na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm estão ilustrados na Figura 53. A absorção do placebo em  $\lambda$  250 nm (0,0012) foi inferior a 0,5% da leitura obtida para MSD a 100% da concentração de trabalho (0,5624).



**Figura 53** - Sobreposição dos espectros de absorção na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm da solução placebo e da solução de MSD, equivalente a 18  $\mu\text{g/ml}$  de MPA, em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8.

#### 6.3.10.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de concentração 6,24 a 35,35  $\mu\text{g/ml}$  de MPA. A curva analítica está representada na Figura 54 e a análise estatística no Apêndice H.



**Figura 54** - Curva analítica de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

A regressão foi significativa e o intercepto não foi diferente de zero ( $p > 0,05$ ). O valor do coeficiente de correlação encontrado foi 0,9999. Os resíduos apresentaram distribuição normal, independência e homoscedasticidade. Os dados ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão linear.

### 6.3.10.3 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir dos resultados de recuperação das quantidades de MPA incorporadas ao placebo nos níveis de 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho. Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 54.

A recuperação média obtida na faixa 70% a 130% da concentração de trabalho foi de 99,84%. O resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ). O valor t experimental (0,55) foi inferior ao valor tabelado (2,31), demonstrando não haver diferença significativa entre a recuperação média e 100%.

**Tabela 54** - Porcentagens de recuperação de quantidades de ácido micofenólico incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)
70	12,6	12,70	100,79
		12,65	100,40
		12,75	101,19
100	18,0	17,82	99,00
		18,07	100,39
		17,73	98,50
130	23,4	23,24	99,32
		23,24	99,32
		23,31	99,62
		<b>Média (%)</b>	<b>99,84</b>
		<b>DPR (%)</b>	<b>0,90</b>

#### 6.3.10.4 Precisão

Os resultados da determinação do teor de MSD em Myfortic<sup>®</sup>, expressos em relação à quantidade declarada de MPA, nos três dias de análises com analistas diferentes estão apresentados na Tabela 55.

**Tabela 55** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic<sup>®</sup>, expresso em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, para avaliação da precisão do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	Teor de ácido micofenólico (%)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	100,77	98,98	100,12
2	100,37	99,18	99,98
3	98,99	98,46	100,55
4	99,57	101,78	101,52
5	99,47	100,12	99,82
6	99,53	101,09	100,18
<b>Média (%)</b>	<b>99,78</b>	<b>99,94</b>	<b>100,36</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,66</b>	<b>1,30</b>	<b>0,61</b>

Os valores de DPR foram inferiores a 2,0% nos três dias de análises e as determinações entre os dias não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Considerando a média das determinações ( $n = 18$ ), a amostra apresentou teor de MPA igual a  $(100,03 \pm 0,44)\%$ .

#### 6.3.10.5 Robustez

Os resultados do doseamento de MSD em Myfortic<sup>®</sup> utilizando espectrofotômetros distintos estão apresentados na Tabela 56.

A comparação entre as duas condições foi realizada utilizando a estatística t. O valor t experimental (1,60) foi inferior ao valor tabelado (2,57) em  $\alpha = 0,05$ . Portanto, não houve diferença nos valores obtidos entre as condições.

**Tabela 56** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic<sup>®</sup>, expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, em equipamentos distintos, para verificação da robustez do método de doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostra	Teor de ácido micofenólico (%)	
	HP 8453	Shimadzu UV-1800
1	100,12	100,08
2	99,98	99,94
3	100,55	100,45
4	101,52	101,43
5	99,82	99,91
6	100,18	99,94
Média (%)	100,36	100,29
DPR (%)	0,61	0,59

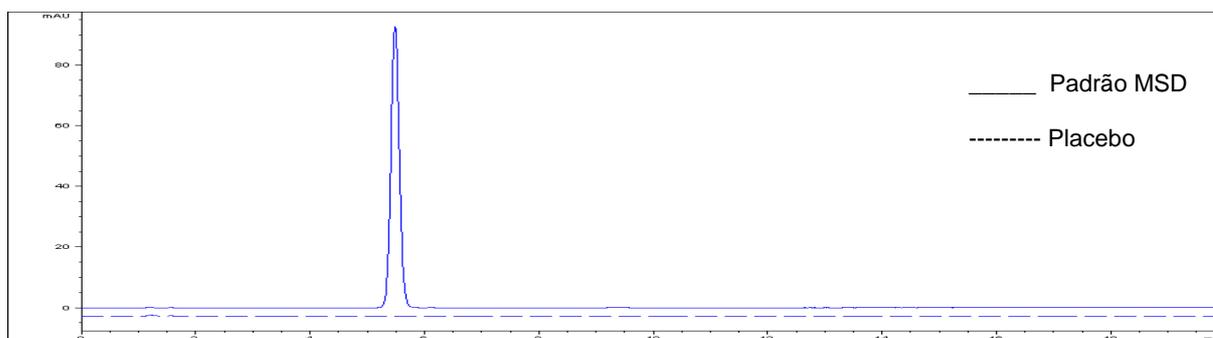
#### 6.3.10.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da curva analítica. Obtiveram-se os limites de 0,15 µg/ml para detecção e 0,45 µg/ml para quantificação de ácido micofenólico pelo método espectrofotométrico.

#### 6.3.11 Determinação do teor de micofenolato de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência

##### 6.3.11.1 Seletividade

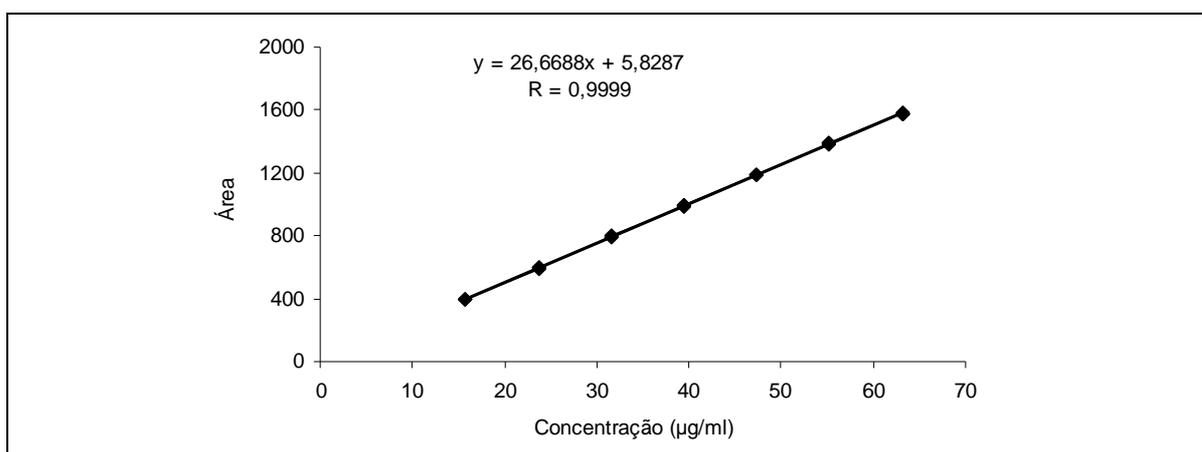
Por meio do método cromatográfico foi possível separar as impurezas de degradação (seção 6.1.5.2). Verificou-se também que os excipientes da formulação simulada não interferem no pico de MSD (Figura 55).



**Figura 55** - Cromatogramas das soluções placebo e micofenolato de sódio padrão de trabalho. Condições cromatográficas: metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 30 °C e detecção em λ 250 nm.

### 6.3.11.2 Linearidade

A curva analítica obtida para MSD matéria-prima (Figura 29, seção 6.1.5.3) foi expressa em função da concentração de MPA. O intervalo compreende a faixa de 14,77 a 59,08 µg/ml de MPA.



**Figura 56** - Curva analítica de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

### 6.3.11.3 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir dos resultados de recuperação de quantidades de MPA incorporadas ao placebo nos níveis de 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho. Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 57.

**Tabela 57** - Porcentagens de recuperação de quantidades de ácido micofenólico incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de doseamento de micofenolato de sódio em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	Concentração (µg/ml)	Recuperação (µg/ml)	Recuperação (%)
70	25,2	25,02	99,29
		25,26	100,24
		25,18	99,92
100	36,0	35,96	99,89
		36,22	100,61
		35,85	99,58
130	46,8	46,60	99,57
		46,59	99,55
		47,06	100,56
		<b>Média (%)</b>	<b>99,91</b>
		<b>DPR (%)</b>	<b>0,47</b>

A recuperação média obtida na faixa 70% a 130% da concentração de trabalho foi de 99,91%. O resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando a estatística t ( $\alpha = 0,05$ ). O valor t experimental (0,56) foi inferior ao valor tabelado (2,31). Portanto, não houve diferença significativa entre a recuperação média e 100%.

#### 6.3.11.4 Precisão

Realizaram-se seis determinações de MSD em Myfortic<sup>®</sup> em três dias de análises com analistas diferentes. Os resultados, expressos em relação à quantidade declarada de MPA, estão apresentados na Tabela 58.

**Tabela 58** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic<sup>®</sup>, expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, para avaliação da precisão do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Teor de ácido micofenólico (%)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	99,74	99,44	100,14
2	98,52	100,31	102,18
3	99,30	101,31	98,88
4	100,03	101,25	99,17
5	100,11	100,75	99,82
6	99,98	100,76	100,97
<b>Média (%)</b>	<b>99,61</b>	<b>100,64</b>	<b>100,19</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,61</b>	<b>0,69</b>	<b>1,22</b>

Os valores de DPR nas determinações dos três dias de análises foram inferiores ao recomendado na literatura consultada (2,0%) e as médias dos resultados obtidos nos três dias de análises não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Considerando a média das determinações ( $n = 18$ ), a amostra apresentou teor de MPA igual a  $(100,15 \pm 0,47)\%$ .

#### 6.3.11.5 Robustez

A robustez do método foi verificada modificando-se os parâmetros: temperatura do forno, fluxo da fase móvel e porcentagem de metanol na fase móvel. Os resultados

das seis determinações do teor de MPA em Myfortic® em cada condição encontram-se na Tabela 59.

**Tabela 59** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio em Myfortic®, expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, para verificação da robustez do método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostras	Teor de ácido micofenólico (%)						
	Nominal	1	2	3	4	5	6
1	100,14	99,93	99,95	98,91	101,04	99,61	100,36
2	102,18	102,11	101,99	100,42	103,02	102,73	101,32
3	98,88	98,98	98,95	98,02	99,76	100,81	98,31
4	99,17	99,02	98,96	98,51	100,28	99,82	98,19
5	99,82	100,09	99,75	99,59	100,54	100,75	98,94
6	100,97	101,17	100,70	100,01	101,07	101,93	99,90
<b>Média (%)</b>	<b>100,19</b>	<b>100,22</b>	<b>100,05</b>	<b>99,24</b>	<b>100,95</b>	<b>100,94</b>	<b>99,51</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,22</b>	<b>1,23</b>	<b>1,16</b>	<b>0,93</b>	<b>1,12</b>	<b>1,19</b>	<b>1,24</b>

A comparação dos valores foi realizada por Anova. Verificou-se que não houve diferença significativa entre os valores obtidos nas condições testadas ( $p > 0,05$ ).

#### 6.3.11.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação estimados a partir da curva analítica foram 0,28 µg/ml e 0,85 µg/ml de MPA, respectivamente. Os valores encontrados pela relação entre sinal e ruído (seção 6.1.5.7) equivalem a 0,014 µg/ml e 0,036 µg/ml de MPA.

#### 6.3.12 Comparação entre os métodos de determinação de micofenolato de sódio em comprimidos

A comparação entre o método por CLAE e por espectrofotometria no ultravioleta foi realizada utilizando os resultados da determinação do teor de MSD em Myfortic® obtidos na precisão (Tabelas 55 e 58).

O valor de F experimental (1,10) foi inferior ao tabelado (2,67) em  $\alpha = 0,05$ . Portanto, não houve diferença significativa entre as variâncias obtidas nos métodos.

A comparação entre as médias foi realizada com teste t para dados independentes e variâncias homogêneas. O valor de t experimental (0,40) também foi inferior ao tabelado (2,03) em  $\alpha = 0,05$ , demonstrando não existir diferença significativa entre os valores médios obtidos nos métodos.

Os dois métodos apresentaram precisão e exatidão equivalentes para o doseamento de MSD em comprimidos. Ambos foram seletivos, lineares, e robustos nas condições avaliadas.

### **6.3.13 Uniformidade de doses unitárias de comprimidos de micofenolato de sódio**

Os resultados individuais do teor de MSD em Myfortic<sup>®</sup> estão apresentados na Tabela 60. Nota-se que todas as unidades apresentaram teor entre 85,0% e 115,0% e o DPR das determinações foi inferior a 6,0%. A amostra cumpriu com as especificações farmacopéicas (FARMACOPÉIA..., 1996).

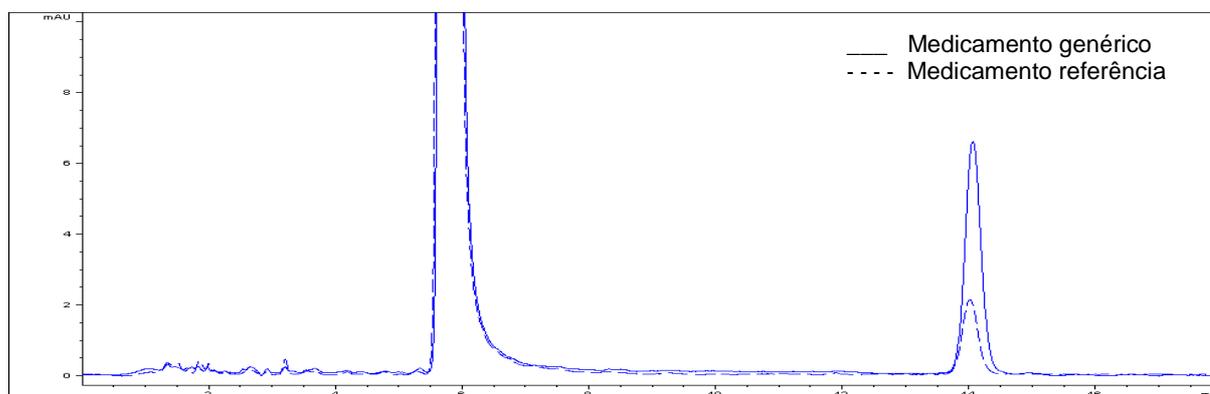
**Tabela 60** - Resultados das determinações do teor de micofenolato de sódio, expressos em relação à quantidade declarada de ácido micofenólico, obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos de Myfortic<sup>®</sup> utilizando o método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

<b>Unidade</b>	<b>Teor de ácido micofenólico (%)</b>
1	101,16
2	101,74
3	99,41
4	102,13
5	101,53
6	98,98
7	103,80
8	98,85
9	101,05
10	105,54
<b>Média (%)</b>	<b>101,42</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>2,08</b>

## 6.4 Determinação de impurezas em micofenolato de mofetila comprimidos

### 6.4.1 Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico das amostras de CellCept® e medicamento genérico a 500 µg/ml está ilustrado na Figura 57. Observa-se a presença de apenas uma impureza, correspondente ao MPA. A quantidade de MPA no medicamento genérico foi superior em comparação com CellCept®.



**Figura 57** - Sobreposição dos cromatogramas das amostras de CellCept® e medicamento genérico obtidos a partir da injeção de 25 µl de solução 500 µg/ml de micofenolato de mofetila. Condições cromatográficas: acetonitrila e trietilamina 1% pH 3,0 (30:70), fluxo 1,5 ml/min, coluna C<sub>8</sub> a 45 °C e detecção em λ 250 nm.

O composto MPA é o metabólito ativo e apresenta-se como principal impureza e produto de degradação de MMF. A absorção de MPA é dificultada e está associada aos efeitos adversos gastrointestinais (HOOIJMAAIJER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1990; SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, 2005).

A dose máxima de MMF em terapia padronizada é 3,0 g/dia (BRASIL, 2002). Nesse caso, os limiares para relato, identificação e qualificação propostos no guia ICH Q3B(R) dos produtos de degradação são, respectivamente, 0,05%, 0,10% e 0,15% (Tabela 2, seção 2.2.7).

As impurezas acima do limiar de qualificação (0,15%) devem ser estudadas quanto à segurança biológica nas quantidades típicas ou reduzidas a um nível inferior ao limiar de qualificação. Todavia, podem-se considerar qualificadas aquelas que são

metabólitos significativos e que estejam presentes nos estudos clínicos e toxicológicos (INTERNATIONAL..., 2006b; JACOBSON-KRAM & MCGOVERN, 2007).

Aplicou-se o limite de 0,5% de MPA, recomendado em MMF matéria-prima, como referência para o controle de qualidade dos comprimidos. Para as demais impurezas, não identificadas, estabeleceu-se o limite de 0,1%, correspondente ao limiar de identificação (THE EUROPEAN..., 2007; INTERNATIONAL..., 2006b).

#### 6.4.2 Quantificação de ácido micofenólico

Realizaram-se seis determinações de MPA em CellCept® e no medicamento genérico em dois dias de análises (n = 12). Os níveis da impureza foram estimados por comparação da resposta obtida com MPA padrão e com MMF SQR, ambos a 2,5 µg/ml. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 61 e 62.

**Tabela 61** - Quantificação de ácido micofenólico em comprimidos de micofenolato de mofetila por comparação da resposta obtida com solução de ácido micofenólico padrão.

Amostra	Teor de ácido micofenólico (%)			
	CellCept®		MMF Genérico	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,15	0,16	0,82	0,73
2	0,17	0,16	0,84	0,76
3	0,17	0,18	0,82	0,78
4	0,17	0,18	0,84	0,74
5	0,16	0,20	0,81	0,75
6	0,16	0,17	0,83	0,79
<b>Média (%)</b>	<b>0,17</b>	<b>0,18</b>	<b>0,83</b>	<b>0,76</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>4,30</b>	<b>9,09</b>	<b>1,48</b>	<b>2,96</b>

**Tabela 62** - Quantificação de ácido micofenólico em comprimidos de micofenolato de mofetila por comparação da resposta obtida com solução de micofenolato de mofetila SQR.

Amostra	Teor de ácido micofenólico (%)			
	CellCept®		MMF Genérico	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,21	0,22	1,10	0,97
2	0,23	0,21	1,13	1,02
3	0,22	0,24	1,10	1,04
4	0,23	0,24	1,13	0,99
5	0,22	0,27	1,09	1,01
6	0,21	0,22	1,11	1,06
<b>Média (%)</b>	<b>0,22</b>	<b>0,23</b>	<b>1,11</b>	<b>1,01</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>4,30</b>	<b>9,09</b>	<b>1,48</b>	<b>2,96</b>

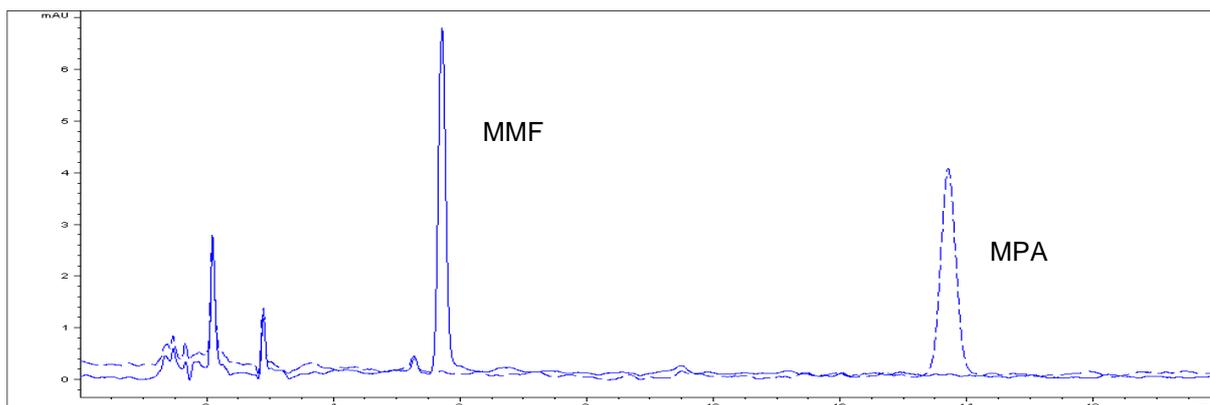
As quantidades de MPA nas amostras foram sobrestimadas quando quantificadas pela comparação da resposta obtida com a solução de MMF SQR. Apesar de apresentarem os mesmos grupos cromóforos, MMF possui massa molar (433,50 g) superior ao MPA (320,34 g) , de modo que as soluções de MMF e MPA, preparadas na mesma concentração, resultam em áreas diferentes (Tabela 63).

**Tabela 63** - Valor médio das áreas e desvio padrão relativo das injeções em quintuplicata das soluções padrão de ácido micofenólico e micofenolato de mofetila SQR utilizadas na quantificação de impurezas em comprimidos de micofenolato de mofetila.

Padrão	Concentração (µg/ml)	Área (n = 5)	Fator resposta	DPR (%)
MPA	2,47	66,36	0,0372	0,96
MMF SQR	2,66	53,52	0,0497	1,30

Os cromatogramas das soluções padrão de MPA e MMF SQR estão ilustrados na Figura 58. Nota-se que MMF apresenta pico mais estreito, de maior altura e de menor área em relação ao pico do MPA.

O fármaco pode ser apropriadamente utilizado como padrão para estimar os níveis de impurezas conhecidas e identificadas por meio da aplicação de fator de correção, correspondente à razão entre as respostas de iguais quantidades da impureza e do fármaco, obtidas nas condições descritas no teste. Entretanto, a utilização de fatores de correção para impurezas identificadas não é recomendada, ao menos que seja inevitável, como em situações em que o padrão de referência não pode ser obtido (BRITISH..., 2007).



**Figura 58** - Sobreposição dos cromatogramas das soluções padrão de ácido micofenólico (MPA) e micofenolato de mofetila SQR (MMF) utilizadas na quantificação de impurezas em comprimidos de micofenolato de mofetila.

#### 6.4.2.1 Precisão

Os valores de DPR obtidos entre as determinações foram inferiores a 10% (Tabela 61). A injeção em quintuplicata das soluções padrão de MPA e MMF SQR foram inferiores a 5% (Tabela 63), conforme recomendado por Shabir (2003).

Considerando a média das determinações ( $n = 12$ ), CellCept<sup>®</sup> apresentou quantidade de MPA igual a  $(0,17 \pm 0,01)\%$  e o medicamento genérico  $(0,79 \pm 0,03)\%$ .

O resultado encontrado para o medicamento genérico foi superior ao limite adotado como referência (0,5%). Destaca-se que as amostras do medicamento genérico foram analisadas após 330 dias do prazo de validade declarado no produto.

#### 6.4.2.2 Exatidão

Os valores de recuperação de MPA em 50%, 100% e 150% do limite estabelecido ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) estão relacionados na Tabela 64.

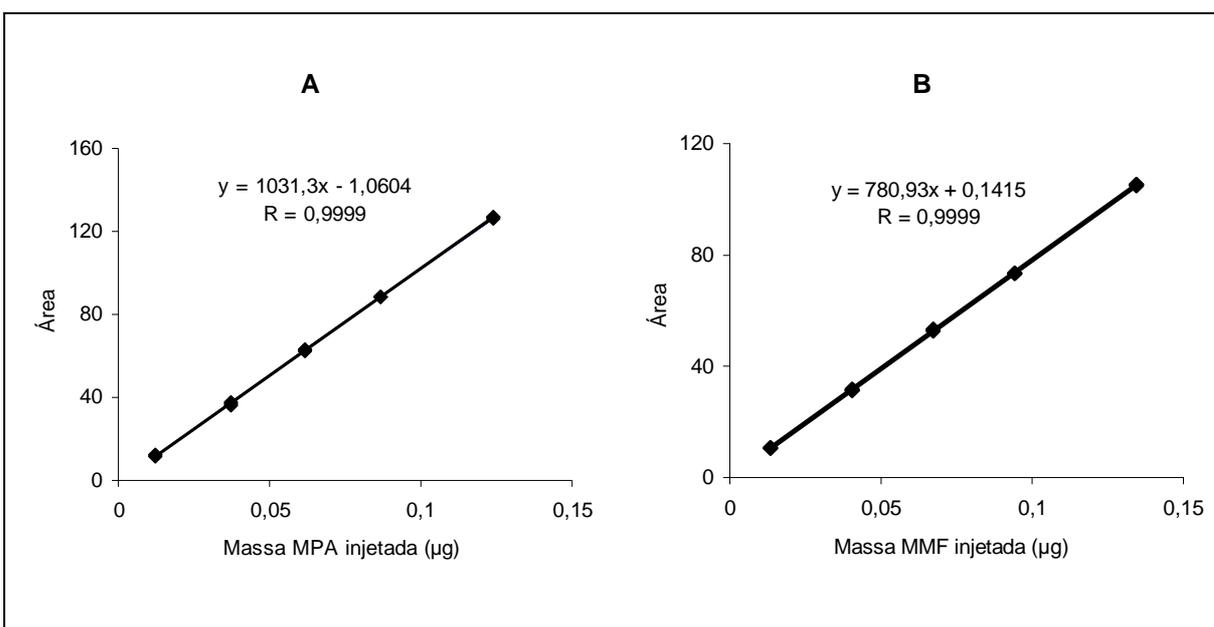
A recuperação média obtida na faixa 50% a 150% da concentração de trabalho foi de 99,88%. O resultado foi comparado ao valor teórico (100%) utilizando a estatística  $t$  em  $\alpha = 0,05$ . O valor  $t$  experimental (0,39) foi inferior ao valor tabelado (2,31), demonstrando não existir diferença significativa entre a recuperação média e 100%.

**Tabela 64** - Porcentagens de recuperação das quantidades de ácido micofenólico incorporadas ao placebo para avaliação da exatidão do método de quantificação da impureza em comprimidos de micofenolato de mofetila.

Nível (%)	Concentração (µg/ml)	Recuperação (µg/ml)	Recuperação (%)
50	1,25	1,227	98,16
		1,235	98,80
		1,254	100,32
100	2,50	2,485	99,40
		2,512	100,48
		2,508	100,32
150	3,75	3,777	100,72
		3,781	100,83
		3,746	99,89
		<b>Média (%)</b>	<b>99,88</b>
		<b>DPR (%)</b>	<b>0,92</b>

#### 6.4.2.3 Linearidade

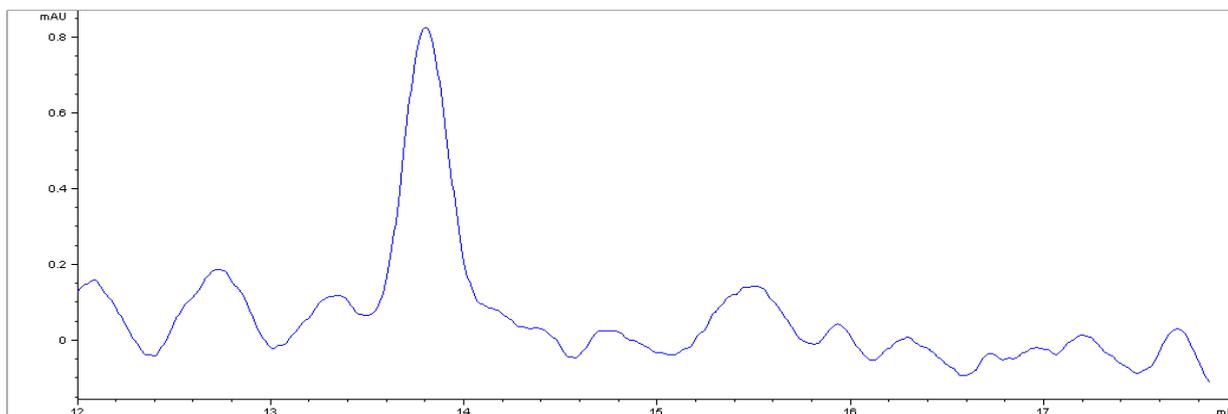
O método demonstrou-se linear de acordo com os parâmetros analisados. O intercepto da curva referente ao MPA foi diferente de zero ( $p < 0,05$ ), entretanto menor que 2% da resposta obtida a 100% da concentração de trabalho, conforme recomendado por Green (1996). As curvas analíticas estão representadas na Figura 59 e as análises estatísticas demonstradas nos Apêndices I e J.



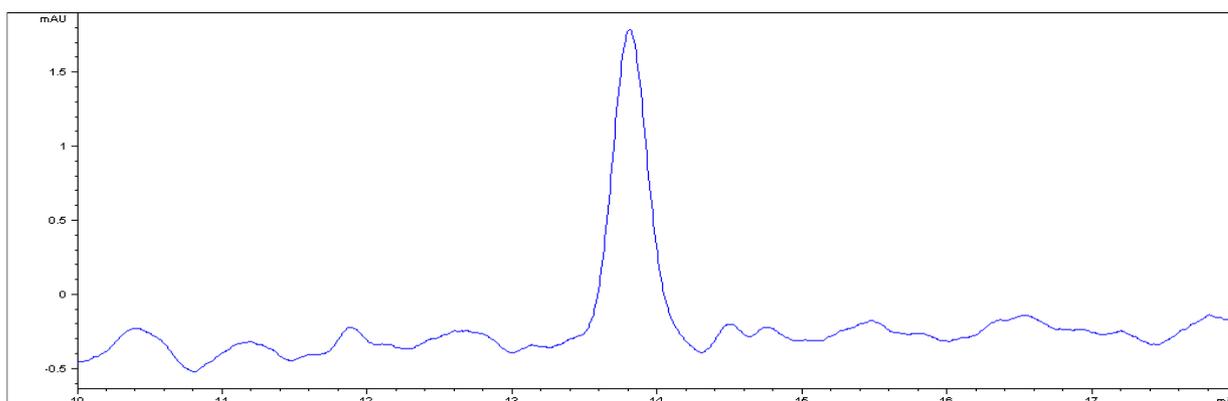
**Figura 59** - Curvas analíticas de (A) ácido micofenólico e (B) micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método de quantificação de impurezas por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 6.4.2.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites aproximados de detecção e quantificação de MPA foram, respectivamente, 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 60) e 0,50  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 61). O limite de quantificação de MPA corresponde a 20% limite estabelecido (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 60** - Cromatograma da solução padrão de ácido micofenólico 0,15  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 61** - Cromatograma da solução padrão de ácido micofenólico 0,50  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 6.4.2.5 Estabilidade em solução

Os valores das áreas de MPA obtidos a partir da injeção de seis amostras de CellCept<sup>®</sup> nas diferentes condições de armazenamento estão relacionados na Tabela 65.

As amostras apresentaram aumento na área de MPA quando reinjetadas após 24 horas do preparo e mantidas à temperatura ambiente. O armazenamento entre 4 a 8 °C também resultou no aumento de área da impureza, entretanto em menor proporção. Devido à tendência de hidrólise de MMF na fase móvel, as soluções da

amostra devem ser injetadas imediatamente após o preparo ou mantidas em baixa temperatura para reduzir a formação de MPA.

**Tabela 65** – Valores de área de ácido micofenólico nas soluções amostra de CellCept<sup>®</sup>, injetadas após diferentes condições de armazenamento.

Amostra	Áreas de MPA nas soluções amostra de CellCept <sup>®</sup>		
	Após preparo	24 horas em temperatura ambiente	24 horas entre 4 a 8 °C
1	22,5	49,3	28,7
2	22,1	49,8	29,9
3	24,4	49,2	29,6
4	25,4	51,9	30,3
5	28,6	51,9	30,7
6	22,5	48,3	30,5
<b>Média</b>	<b>24,25</b>	<b>50,01</b>	<b>29,95</b>

## 6.5 Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de mofetila

### 6.5.1 Ensaios preliminares

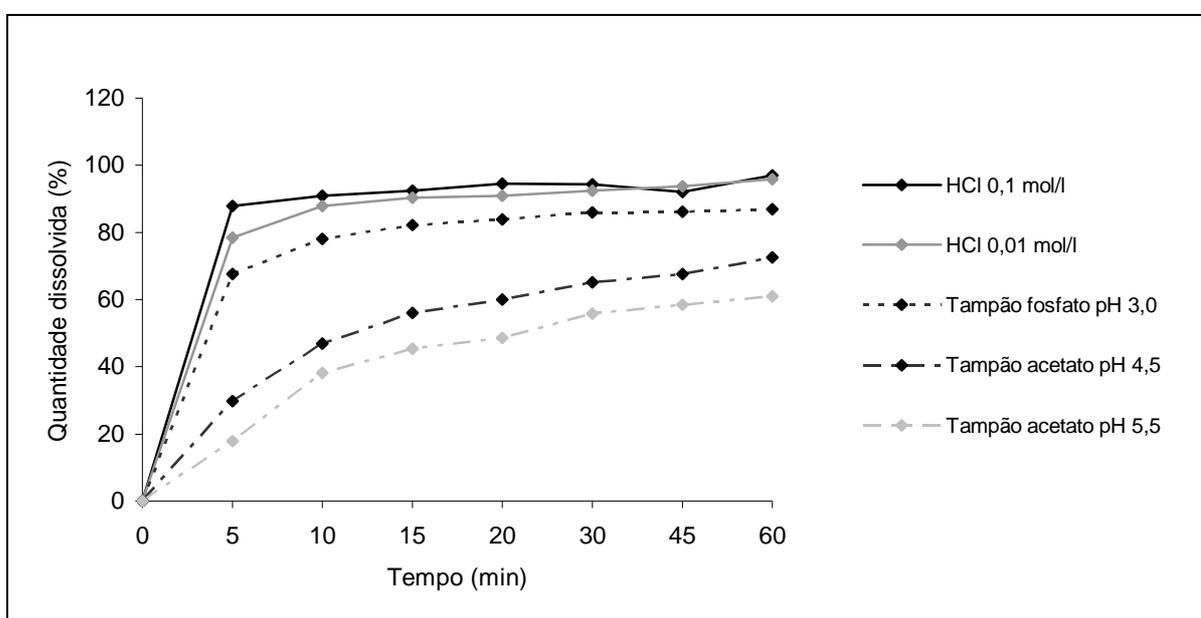
Os parâmetros para o teste de dissolução de medicamentos devem ser definidos com base nas considerações de solubilidade em função do pH e pKa do fármaco. A permeabilidade ou partição em octanol/água podem ser úteis na seleção da metodologia e determinação das especificações (U.S. FOOD..., 1997).

O processo de dissolução *in vivo* de fármacos pouco solúveis em água depende de parâmetros físico-químicos que podem ser afetados pelas condições intraluminais do trato gastrointestinal. *In vitro*, a dissolução depende do fármaco contido no produto e das condições do teste de dissolução, tais como a composição e o volume do meio de dissolução, o pH, o tipo de aparato e a velocidade de agitação (NOORY *et al.*, 2000).

O meio de dissolução, quando possível, deve ser fisiologicamente significativo e simples. A avaliação do efeito do pH deve ser considerada inicialmente no desenvolvimento de testes de dissolução para produtos contendo fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água (NOORY *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 1995).

O fármaco MMF apresenta baixa solubilidade em água e alta permeabilidade, características dos fármacos de Classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (VERMA *et al.*, 2008).

O efeito do pH na dissolução dos comprimidos de MMF foi avaliado utilizando os meios HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l, tampão fosfato pH 3,0, tampão acetato pH 4,5 e tampão acetato pH 5,5. Os testes preliminares para avaliação do perfil de dissolução nos diferentes meios estão apresentados na Figura 62. Os pontos correspondem à média de duas unidades.



**Figura 62** - Perfis de dissolução preliminares para comprimidos de CellCept® 500 mg em diferentes meios de dissolução, utilizando sistema de agitação com pás 50 rpm.

Apenas nos meios HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 as quantidades de fármaco foram superiores a 85% dissolvidos em 30 minutos. Nota-se também que somente nos meios HCl 0,1 mol/l e HCl 0,01 mol/l a dissolução foi próxima a 100% após 60 minutos.

No desenvolvimento de um procedimento de dissolução, é desejável alcançar condições de esgotamento (*sink conditions*) do fármaco no meio de dissolução. A condição de esgotamento é o volume de meio em quantidade mínima três vezes superiores à requerida para obter solução saturada do fármaco. Quando a condição de esgotamento é atingida, os resultados da dissolução refletem melhor as propriedades da formulação (THE UNITED STATES..., 2009).

Considerando a dose de 500 mg de MMF e o volume de 900 ml do meio de dissolução, a condição de esgotamento para o fármaco é alcançada em meios com capacidade de solubilizar, no mínimo, 1,7 mg/ml do fármaco ( $500 \text{ mg} \div 300 \text{ ml} = 1,7 \text{ mg/ml}$ ).

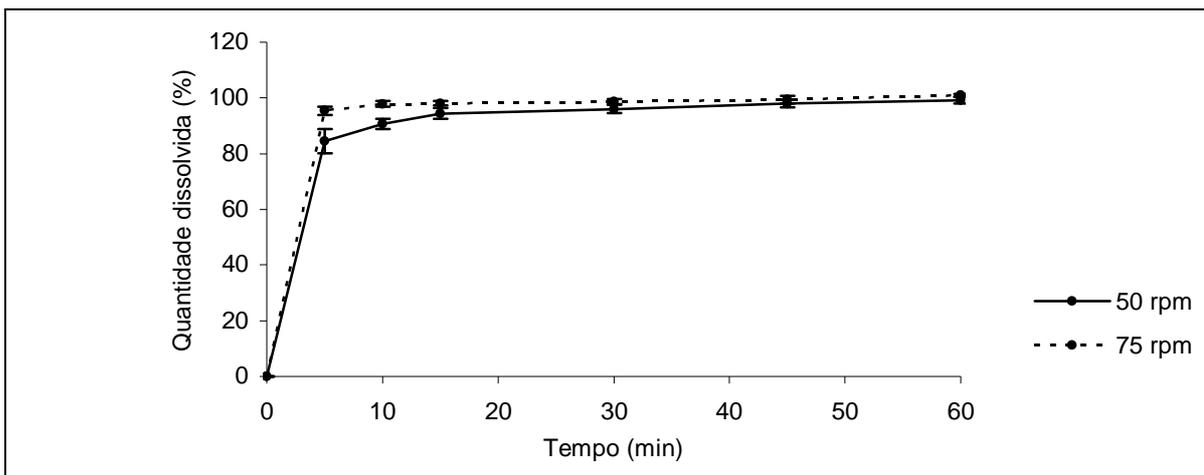
A solubilidade de MMF varia em função do pH. A redução de solubilidade está associada à diminuição da concentração hidrogeniônica da solução, conforme estudado por Lee *et al.* (1990). Observando a Figura 8 e utilizando a equação (2), descrita na seção 2.2.6, verifica-se que a solubilidade do fármaco é superior a 1,7 mg/ml em valores de pH inferiores a 4,0.

Um teste de dissolução para controle da uniformidade lote a lote deve assegurar um mínimo de 85% de dissolução. Na dissolução de fármacos altamente solúveis em formas farmacêuticas de liberação rápida, a especificação em único ponto, no tempo de 60 minutos ou menos, é suficiente. Para caracterizar a qualidade de produtos contendo fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, pode ser necessária a especificação em dois pontos: um a 15 minutos e outro a 30, 45 ou 60 para demonstrar 85% de dissolução (U.S. FOOD..., 1997).

Apesar de MMF ser praticamente insolúvel em água, a redução do pH do meio favorece a solubilidade do fármaco. Dentre os meios testados, HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio pH 3,0 foram os mais adequados para avaliar a dissolução de MMF em comprimidos, pois atende-se ao requisito de condição de esgotamento e demonstra-se dissolução mínima de 85% em 60 minutos.

### **6.5.2 Perfis de dissolução**

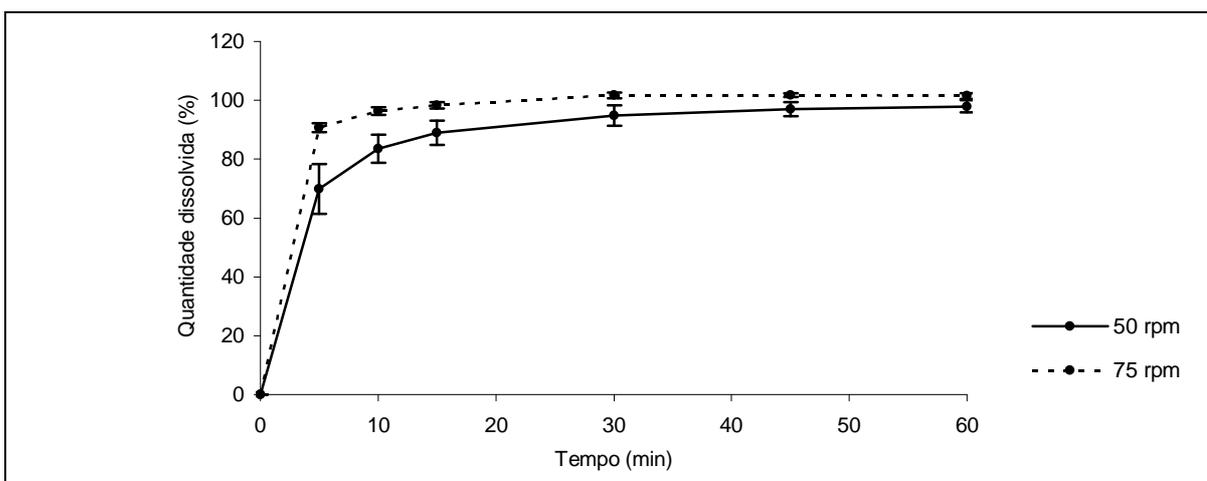
Os perfis de dissolução de comprimidos de CellCept<sup>®</sup> 500 mg em diferentes condições encontram-se ilustrados nas Figuras 63 a 65. Os pontos correspondem à média de seis determinações e as barras representam os desvios padrão. Os respectivos valores numéricos e as comparações entre as diferentes velocidades de rotação em cada meio de dissolução estão apresentados nas Tabelas 66 a 68.



**Figura 63** - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept® em 900 ml de HCl 0,1 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 e 75 rpm.

**Tabela 66** - Comparação das velocidades de agitação das pás na dissolução de comprimidos de CellCept® em 900 ml de HCl 0,1 mol/l.

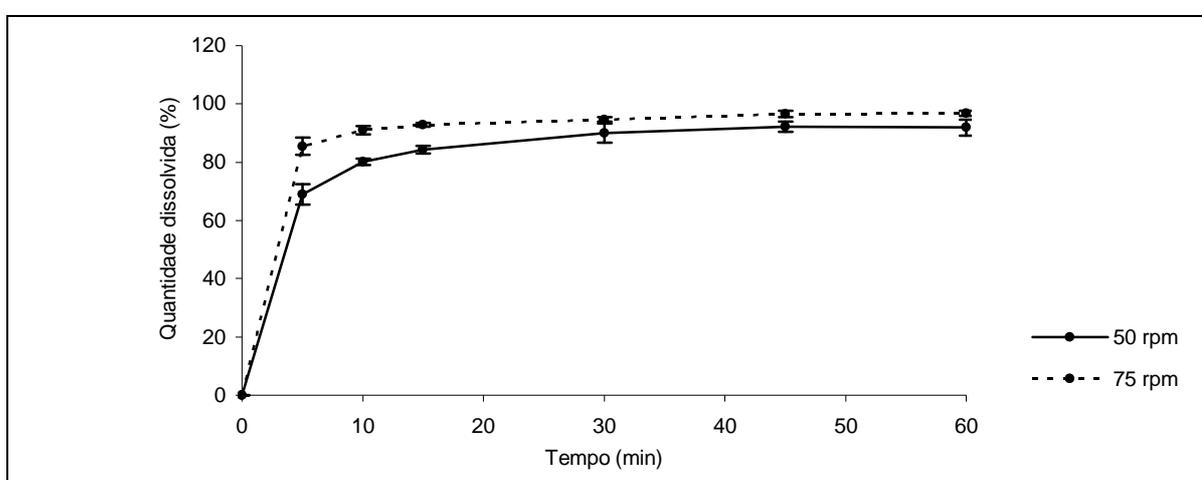
Tempo (min)	Média (%) 75 rpm ( $\pm$ desvio padrão)	Média (%) 50 rpm ( $\pm$ desvio padrão)	Diferença entre médias	Intervalo 95% de confiança
5	95,48 (1,48)	84,51 (4,39)	10,97	(6,75 ; 15,18)
10	97,84 (1,00)	90,67 (1,85)	7,17	(5,25 ; 9,09)
15	98,11 (0,86)	94,44 (1,88)	3,68	(1,79 ; 5,55)
30	98,71 (0,84)	96,04 (1,58)	2,68	(1,04 ; 4,30)
45	99,38 (1,45)	98,05 (1,31)	1,33	(-0,45 ; 3,11)
60	101,00 (0,52)	99,16 (1,15)	1,84	(0,70 ; 3,00)



**Figura 64** - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept® em 900 ml de HCl 0,01 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 e 75 rpm.

**Tabela 67** - Comparação das velocidades de agitação das pás na dissolução de comprimidos de CellCept<sup>®</sup> em 900 ml de HCl 0,01 mol/l.

Tempo (min)	Média (%) 75 rpm ( ± desvio padrão)	Média (%) 50 rpm ( ± desvio padrão)	Diferença entre médias	Intervalo a 95% de confiança
5	90,74 (1,48)	69,88 (8,44)	20,86	(13,06 ; 28,66)
10	96,43 (1,29)	83,55 (4,77)	12,88	(8,38 ; 17,37)
15	98,31 (1,12)	89,07 (4,13)	9,24	(5,35 ; 13,14)
30	101,69 (0,96)	94,78 (3,48)	6,91	(3,63 ; 10,20)
45	101,76 (0,75)	96,95 (2,33)	4,81	(2,58 ; 7,03)
60	101,48 (1,01)	97,93 (2,10)	3,55	(1,43 ; 5,67)



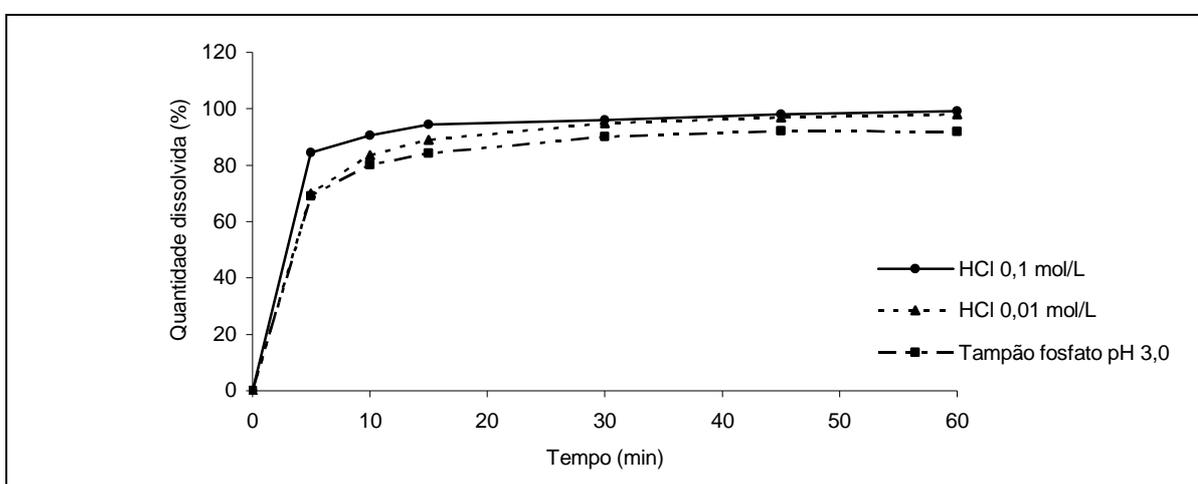
**Figura 65** - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept<sup>®</sup> em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 e 75 rpm.

**Tabela 68** - Comparação das velocidades de agitação das pás na dissolução de comprimidos de CellCept<sup>®</sup> em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.

Tempo (min)	Média (%) 75 rpm ( ± desvio padrão)	Média (%) 50 rpm ( ± desvio padrão)	Diferença entre médias	Intervalo 95% de confiança
5	85,46 (3,00)	69,06 (3,53)	16,40	(12,19 ; 20,62)
10	91,03 (1,47)	80,15 (1,19)	10,88	(9,16 ; 12,61)
15	92,76 (0,66)	84,33 (1,38)	8,43	(7,04 ; 9,81)
30	94,69 (0,75)	90,03 (3,27)	4,66	(1,61 ; 7,72)
45	96,60 (1,12)	92,10 (1,74)	4,50	(2,62 ; 6,38)
60	96,85 (0,88)	91,92 (2,76)	4,93	(2,29 ; 7,57)

As quantidades de MMF dissolvidas nas condições de agitação pás 75 rpm foram superiores quando comparadas às respectivas condições de 50 rpm. Apenas no tempo 45 minutos em HCl 0,1 mol/l, obteve-se diferença não significativa no intervalo de 95% de confiança.

Para melhor caracterização da influência dos meios utilizados sobre o perfil de dissolução do medicamento, fixou-se a velocidade de rotação em 50 rpm. Os perfis de dissolução nos diferentes meios estabelecidos estão ilustrados na Figura 66. As barras referentes aos desvios padrão foram retiradas para obter melhor visualização das curvas.



**Figura 66** - Perfis de dissolução de comprimidos de CellCept® em 900 ml de diferentes meios a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás em velocidades de 50 rpm.

A comparação entre as curvas foi realizada por Anova e teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ) com os valores de porcentagem de MMF dissolvida em cada tempo de coleta. Os valores de F experimentais encontram-se na Tabela 69 e as diferenças entre os tratamentos na Tabela 70.

**Tabela 69** - Valores de F experimentais entre as médias dos valores de porcentagem de MMF dissolvidas em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, em 900 ml dos meios: HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.

Tempo (min)	5	10	15	30	45	60
F	13,21	18,79	20,46	7,16	17,76	20,17

Os valores de F obtidos foram superiores ao valor de F tabelado (3,68). Isso evidencia que a média da dissolução entre os tratamentos foi diferente em todos os tempos de coleta.

Para discriminação das médias, utilizou-se o teste de *Duncan*. Calcularam-se as diferenças entre os tratamentos e a diferença mínima significativa (DMS) do teste. As médias dos tratamentos são consideradas distintas quando a diferença entre elas é superior à DMS.

As quantidades de MMF dissolvidas no meio tampão fosfato de sódio pH 3,0 foram significativamente diferentes quando comparadas ao meio HCl 0,1 mol/l. Para o perfil de dissolução no meio HCl 0,01 mol/l, observa-se, nos tempos iniciais, uma semelhança ao perfil do meio tampão fosfato de sódio pH 3,0. Entretanto, no decorrer da dissolução, a curva se aproxima daquela obtida para HCl 0,1 mol/l.

Os produtos que apresentam dissolução superior a 85% em 15 minutos no meio HCl 0,1 mol/l geralmente não apresentam problemas de biodisponibilidade. Isso porque o tempo médio de esvaziamento gástrico é de 15 a 20 minutos (U.S. FOOD..., 1997).

A utilização de HCl 0,1 mol/l como meio de dissolução para o controle de qualidade de comprimidos de liberação imediata de MMF é justificada, uma vez que favorece a solubilidade do fármaco. O critério de 85% (Q = 80%) da quantidade dissolvida em 15 minutos é suficiente para caracterizar a qualidade dos comprimidos de MMF nas análises de rotina.

**Tabela 70** - Teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ) entre os valores de porcentagem de MMF dissolvidas em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, em 900 ml dos meios: HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.

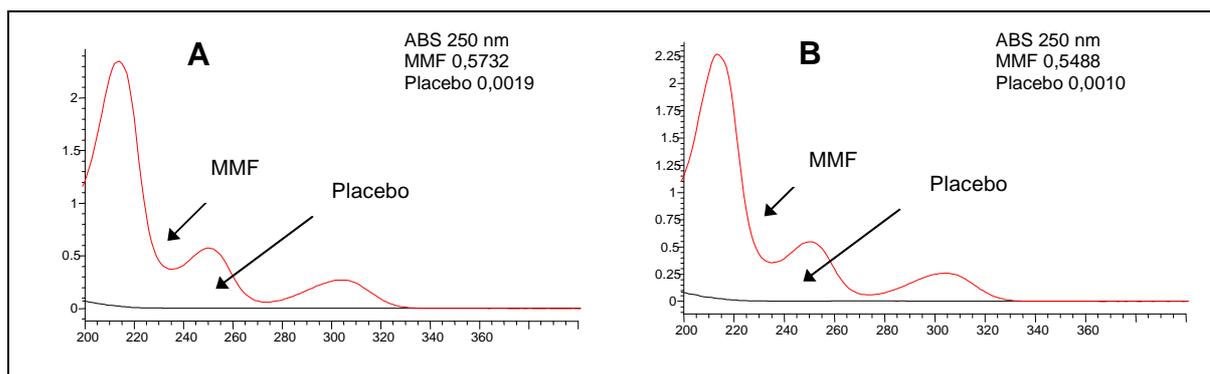
Tempo (min)	DMS	Tratamento	Média (%)	Diferença	
				HCl 0,1 mol/l	HCl 0,01 mol/l
5	7,56	HCl 0,1 mol/l	84,51	-	-
		HCl 0,01 mol/l	69,88	14,63	-
		Tampão pH 3,0	69,06	15,45	0,82*
10	3,91	HCl 0,1 mol/l	90,67	-	-
		HCl 0,01 mol/l	83,55	7,12	-
		Tampão pH 3,0	80,15	10,52	3,40*
15	3,53	HCl 0,1 mol/l	94,44	-	-
		HCl 0,01 mol/l	89,07	5,37	-
		Tampão pH 3,0	84,33	10,11	4,74
30	3,75	HCl 0,1 mol/l	96,04	-	-
		HCl 0,01 mol/l	94,78	1,26*	-
		Tampão pH 3,0	90,03	6,01	4,75
45	2,37	HCl 0,1 mol/l	98,05	-	-
		HCl 0,01 mol/l	96,95	1,10*	-
		Tampão pH 3,0	92,10	5,95	4,85
60	2,73	HCl 0,1 mol/l	99,16	-	-
		HCl 0,01 mol/l	97,93	1,23*	-
		Tampão pH 3,0	91,92	7,24	6,01

DMS = Diferença mínima significativa

\* Diferença não significativa

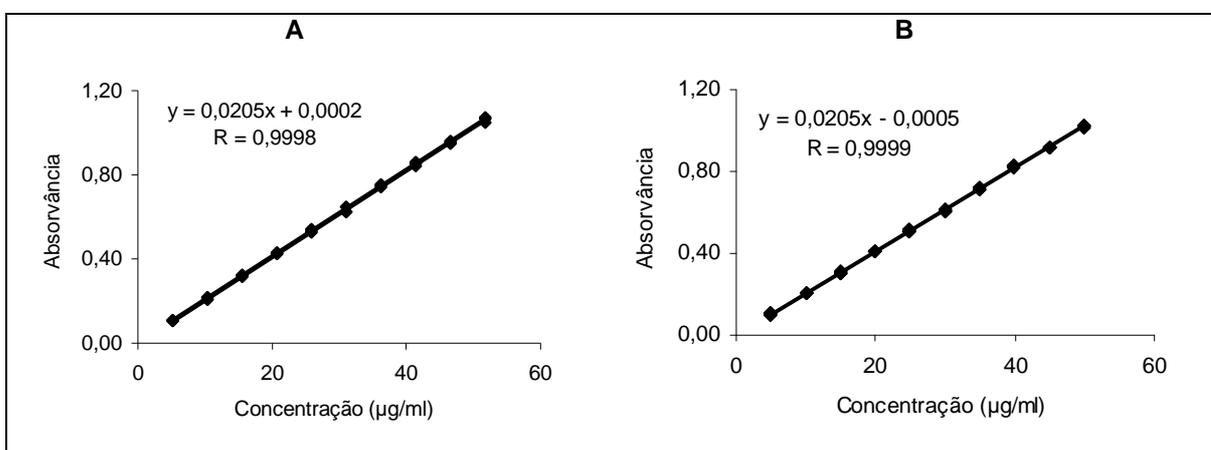
### 6.5.3 Validação

Os espectros das soluções placebo e padrão obtidos na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm nos solventes HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 estão ilustrados na Figura 67. A absorção do placebo em  $\lambda$  250 nm foi inferior a 0,5% da leitura obtida para MMF a 100% da concentração de trabalho em ambos os casos, indicando que os métodos foram seletivos em relação aos excipientes da formulação.



**Figura 67** - Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm da solução placebo e da solução de MMF padrão de trabalho 25  $\mu\text{g/ml}$  em (A) HCl 0,01 mol/l e (B) tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.

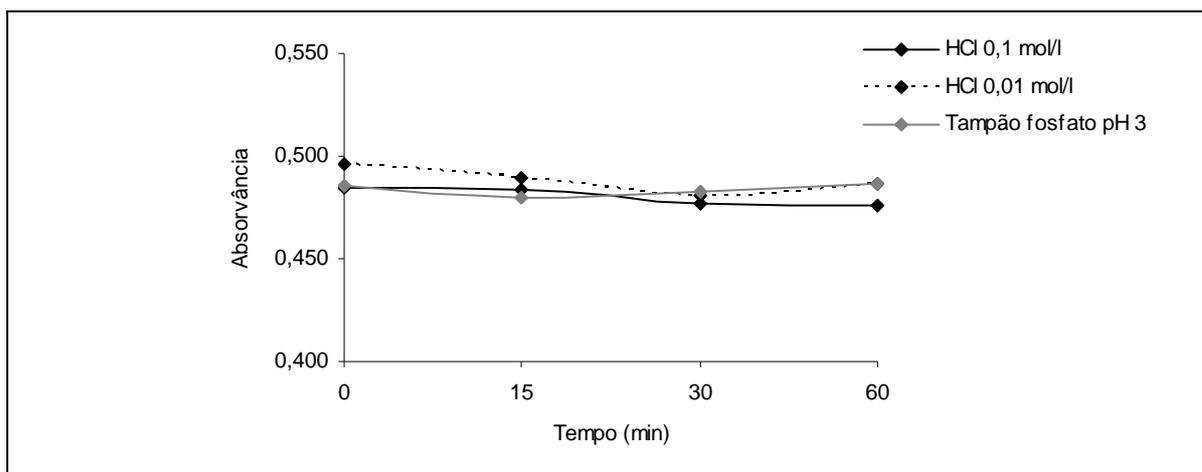
Os métodos também demonstraram-se lineares de acordo com o coeficiente de correlação. O teste de *Durbin-Watson* não foi conclusivo para a independência dos resíduos obtidos em HCl 0,01 mol/l. Entretanto, os resíduos apresentaram distribuição normal e homoscedasticidade. O intercepto em ambos os casos não foi diferente de zero e os dados ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão. As curvas analíticas estão representadas na Figura 68 e as análises estatísticas apresentadas nos Apêndices K e L.



**Figura 68** - Curvas analíticas de micofenolato de mofetila para avaliação da linearidade do método espectrofotométrico em (A) HCl 0,01 mol/l e (B) tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.

#### 6.5.4 Estabilidade nos meios de dissolução

Os valores de absorvância das soluções de MMF nos meios de dissolução, ao longo de 60 minutos, estão representados na Figura 69.



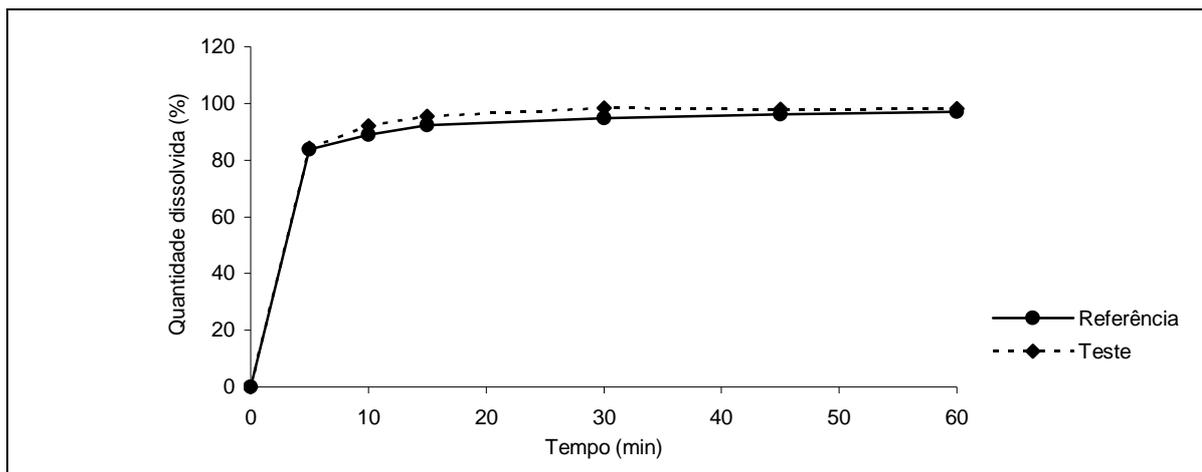
**Figura 69** - Valores de absorvâncias das soluções de micofenolato de mofetila nos meios HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0, para verificação da estabilidade durante 60 minutos a  $(37 \pm 0,5)$  °C.

As variações nas leituras ao longo de 60 minutos foram inferiores a 2,0% em todas as condições. O DPR entre as determinações foi de 0,96% para solução em HCl 0,1 mol/l, 1,26% para solução em HCl 0,01 mol/l e 0,61% para solução em tampão fosfato pH 3,0.

Lee *et al.* (1990) demonstraram que MMF é estável em soluções aquosas a 37 °C. O tempo de meia-vida relatado é de 98 horas em pH 2,0, 118 horas em pH 5,1 e 19 horas em pH 7,4.

### **6.5.5 Comparação entre os perfis de dissolução do medicamento genérico e referência**

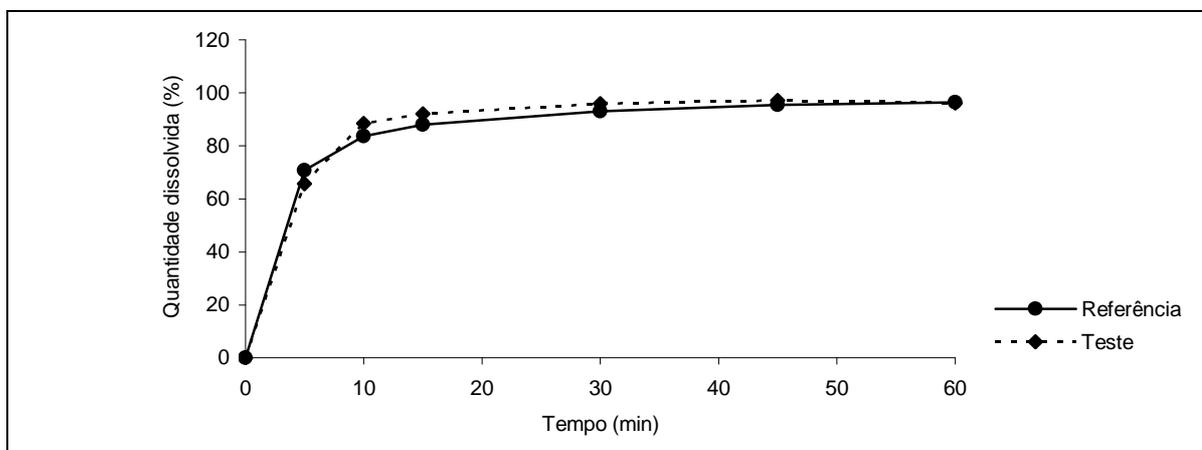
Os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico nos diferentes meios de dissolução estão ilustrados nas Figuras 70 a 72. Os valores numéricos e as comparações ponto a ponto pela estatística t ( $\alpha = 0,05$ ) encontram-se apresentados nas Tabelas 71 a 73.



**Figura 70** - Perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,1 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 rpm.

**Tabela 71** - Comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,1 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 rpm.

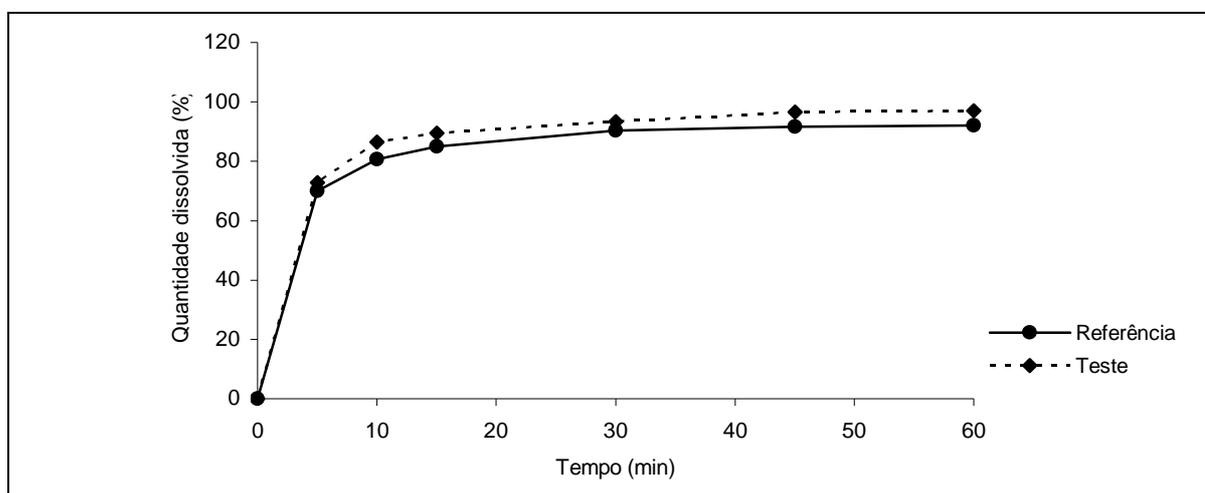
Tempo (min)	Média (%) ( ± desvio padrão)		Diferença entre médias	Intervalo 95% de confiança
	Referência	Genérico		
5	83,70 (5,28)	84,12 (7,21)	0,42	(-7,13 ; 7,98)
10	88,99 (4,08)	92,07 (3,57)	3,08	(-1,50 ; 7,66)
15	92,40 (4,19)	95,54 (2,89)	3,14	(-1,16 ; 7,44)
30	94,73 (3,53)	98,34 (2,88)	3,61	(-0,25 ; 7,46)
45	96,09 (3,85)	98,04 (2,61)	1,95	(-1,98 ; 5,87)
60	97,05 (3,93)	98,06 (2,15)	1,01	(-2,77 ; 4,80)



**Figura 71** - Perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,01 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 rpm.

**Tabela 72** - Comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de HCl 0,01 mol/l a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 rpm.

Tempo (min)	Média (%) ( ± desvio padrão)		Diferença entre médias	Intervalo 95% de confiança
	Referência	Genérico		
5	70,60 (8,70)	65,59 (11,50)	-5,01	(-17,19 ; 7,18)
10	83,71 (4,39)	88,42 (4,43)	4,71	(-0,57 ; 9,98)
15	88,00 (3,67)	92,11 (2,69)	4,11	(0,27 ; 7,96)
30	93,11 (3,34)	95,86 (2,79)	2,75	(-0,93 ; 6,42)
45	95,54 (2,33)	97,14 (2,20)	1,60	(-1,11 ; 4,30)
60	96,35 (2,50)	96,29 (1,75)	-0,06	(-2,64 ; 2,53)



**Figura 72** - Perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 rpm.

**Tabela 73** - Comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos referência e genérico de micofenolato de mofetila comprimidos em 900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 a  $(37 \pm 0,5)$  °C e sistema de agitação pás 50 rpm.

Tempo (min)	Média (%) ( ± desvio padrão)		Diferença entre médias	Intervalo 95% de confiança
	Referência	Genérico		
5	69,98 (2,88)	72,81 (6,50)	2,83	(-3,19 ; 8,83)
10	80,62 (2,19)	86,61 (4,30)	5,99	(1,92 ; 10,07)
15	85,07 (2,04)	89,46 (2,84)	4,39	(1,43 ; 7,35)
30	90,28 (2,40)	93,33 (2,14)	3,05	(0,33 ; 5,77)
45	91,67 (1,54)	96,70 (3,29)	5,03	(1,96 ; 8,10)
60	92,19 (2,20)	96,94 (3,24)	4,75	(1,44 ; 8,06)

Não houve diferença entre as quantidades de MMF liberadas pelos medicamentos referência e genérico quando os meios HCl 0,1 mol/l e HCl 0,01 mol/l foram utilizados, exceto em 15 minutos desse último. Entretanto, observa-se diferença significativa entre os perfis de liberação do fármaco a partir de 10 minutos de dissolução no meio tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0.

O método comparativo pelo intervalo de confiança pode resultar em dificuldade de conclusão definitiva sobre a similaridade das curvas. Isso ocorre principalmente quando alguns pontos sugerem semelhança e outros indicam diferença na dissolução entre as formulações (O'HARA *et al.*, 1998).

Apesar da diferença observada entre os medicamentos no meio tampão fosfato de sódio pH 3,0, percebe-se que ambos apresentaram média de dissolução superior a 85% em 15 minutos, conforme limite sugerido para o controle de qualidade (seção 6.5.2). Isso demonstra que o princípio ativo é liberado facilmente pelas formulações e não compromete a equivalência farmacêutica.

## **6.6 Teste de dissolução para comprimidos de micofenolato de sódio**

### **6.6.1 Determinação das condições de esgotamento**

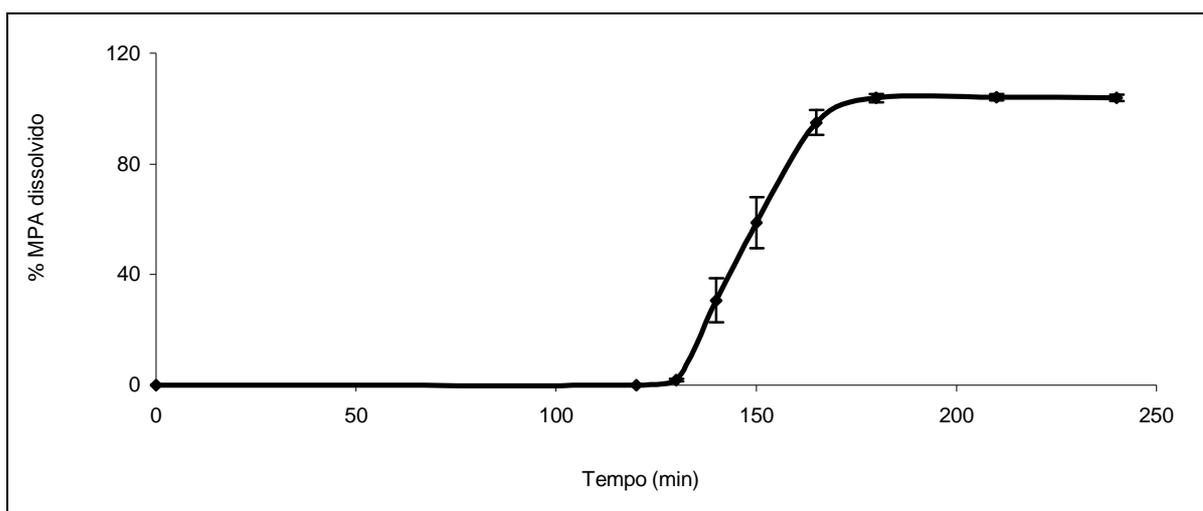
A condição de esgotamento para MPA em 1000 ml é alcançada em meios com capacidade de solubilizar, no mínimo, 1,1 mg/ml do fármaco ( $360 \text{ mg} \div 333 \text{ ml} = 1,1 \text{ mg/ml}$ ). As solubilidades determinadas em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 5,5, 6,0 e 6,8 foram, respectivamente, 10,32 mg/ml, 11,05 mg/ml e 14,42 mg/ml de MPA, atendendo à condição estabelecida.

A condição de esgotamento para MPA em 750 ml é alcançada em meios com capacidade de solubilizar, no mínimo, 1,4 mg/ml do fármaco ( $360 \text{ mg} \div 250 \text{ ml} = 1,4 \text{ mg/ml}$ ). A solubilidade determinada em HCl 0,1 mol/l foi 0,03 mg/ml. Nesse caso, devido à baixa solubilidade no meio, há uma limitação no método em quantificar adequadamente apenas 2% da quantidade total do fármaco (360 mg) presente na formulação ( $0,03 \text{ mg/ml} \times 250 \text{ ml} = 7,5 \text{ mg}$ ). Entretanto, a utilização de HCl 0,1 mol/l

como meio de dissolução tem por objetivo verificar, quantitativamente, a capacidade do revestimento entérico em resistir ao baixo pH dos fluidos gástricos. Essa análise é contemplada, qualitativamente, no teste de desintegração de comprimidos com revestimentos entéricos. No caso de liberação do princípio ativo em HCl 0,1 mol/l, espera-se que a quantidade seja a mínima possível.

### 6.6.2 Perfil de dissolução

O perfil de dissolução com seis comprimidos de Myfortic<sup>®</sup> está ilustrado na Figura 73. O gráfico representa a média da quantidade de MPA liberada no primeiro estágio (120 minutos) e no segundo estágio (130, 140, 150, 165, 180, 210 e 240 minutos). As barras verticais em cada ponto representam os desvios padrão das médias dos resultados das seis cubas.



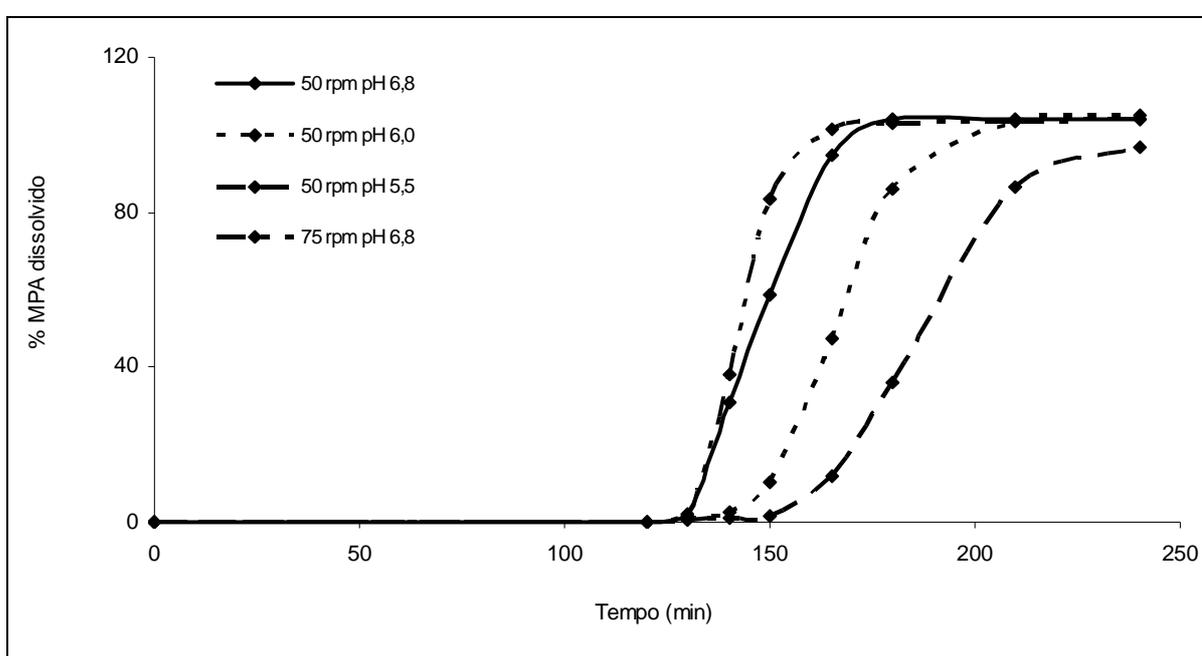
**Figura 73** - Perfil de dissolução de comprimidos de Myfortic<sup>®</sup> obtido a partir de seis unidades, sistema de agitação pás 50 rpm e de acordo com o procedimento do Método A para dissolução de comprimidos com revestimento entérico (THE UNITED STATES..., 2009).

O revestimento entérico é projetado para resistir ao baixo pH dos fluidos gástricos e para romper-se ou dissolver-se quando o comprimido entra em contato com o pH mais elevado do duodeno. Desse modo, revestimentos entéricos representam um meio de retardar a liberação do fármaco até o momento em que a forma farmacêutica atinja o intestino delgado (AULTON, 1996).

A quantidade de fármaco liberada em 120 minutos de dissolução em HCl 0,1 mol/l foi desprezível (0,00%). Os comprimidos permaneceram visualmente íntegros, confirmando o resultado obtido no teste de desintegração (seção 6.3.4). Ao

contrário, observou-se crescente liberação do fármaco quando o pH do meio foi alterado para 6,8. O patamar de dissolução é alcançado em 180 minutos, correspondente a 60 minutos no meio tamponado em pH 6,8.

O estudo comparativo do perfil de dissolução foi realizado alterando a velocidade de rotação das pás e o pH do meio de dissolução. Os perfis obtidos nas diferentes condições estão representados na Figura 74. Os valores médios de porcentagem de dissolução e os respectivos desvios padrão estão apresentados na Tabela 74.



**Figura 74** - Perfis de dissolução de comprimidos de Myfortic® obtidos em diferentes condições.

**Tabela 74** - Comparação entre os perfis de dissolução de comprimidos de Myfortic® obtidos em diferentes meios de dissolução.

Tempo (min)	Porcentagem de dissolução ( $\pm$ desvio padrão)							
	pH 6,8 75 rpm		pH 6,8 50 rpm		pH 6,0 50 rpm		pH 5,5 50 rpm	
120	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
130	1,66	(0,10)	1,84	(0,48)	0,83	(0,07)	0,65	(0,08)
140	37,96	(7,98)	30,72	(7,94)	2,40	(1,56)	0,89	(0,06)
150	83,30	(5,61)	58,74	(9,24)	10,39	(7,11)	1,42	(0,32)
165	101,64	(1,68)	95,01	(4,45)	47,33	(10,84)	11,93	(9,33)
180	102,90	(1,17)	103,83	(1,48)	86,04	(8,56)	36,28	(23,75)
210	103,66	(1,42)	104,13	(1,23)	103,69	(1,31)	86,55	(13,58)
240	103,95	(1,34)	103,93	(1,19)	104,88	(0,96)	96,90	(1,93)

O estudo comparativo da velocidade de rotação pela estatística t ( $\alpha = 0,05$ ) está representado na Tabela 75. Observaram-se diferenças significativas na porcentagem de dissolução apenas nos pontos 30 e 45 minutos do segundo estágio, correspondentes aos intervalos de 150 e 165 minutos de dissolução.

**Tabela 75** - Comparação entre as velocidades de agitação na dissolução de comprimidos de Myfortic®.

Tempo (min)	Média (%) ( ± desvio padrão)		Diferença entre médias	Intervalo a 95% de confiança
	75 rpm	50 rpm		
10	1,66 (0,10)	1,84 (0,48)	-0,18	(-0,63 ; 0,26)
20	37,96 (7,98)	30,72 (7,94)	7,24	(-3,00 ; 17,48)
30	83,30 (5,61)	58,74 (9,24)	24,56	(14,72 ; 34,39)
45	101,64 (1,68)	95,01 (4,45)	6,63	(2,31 ; 10,96)
60	102,90 (1,17)	103,83 (1,48)	-0,93	(-2,66 ; 0,79)
90	103,66 (1,42)	104,13 (1,23)	-0,47	(-2,18 ; 1,25)
120	103,95 (1,34)	103,93 (1,19)	0,02	(-1,61 ; 1,66)

Verificou-se que a redução do pH no segundo estágio dificultou a liberação do fármaco. A comparação entre os meios de dissolução foi realizada por Anova e Teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores de F calculados encontram-se na Tabela 76 e as diferenças entre os tratamentos na Tabela 77.

**Tabela 76** - Valores de F calculados entre as médias dos valores de porcentagem de MPA dissolvidos em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, nos meios de tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8 , 6,0 e 5,5.

Tempo (min)	10	20	30	45	60	90	120
F	30,59	77,64	125,82	139,41	34,51	9,63	56,13

Os valores de F obtidos foram superiores ao valor de F tabelado (3,68) para o nível de significância 0,05. Portanto, as médias da dissolução entre os tratamentos foram diferentes em todos os tempos de coleta.

Com os resultados do teste de *Duncan*, verificou-se que as quantidades de MPA dissolvidas no meio tampão pH 6,8 foram significativamente diferentes quando comparadas ao meio tampão pH 5,5. Observou-se semelhança do perfil de dissolução em tampão pH 6,0 com o meio de pH 5,5 nos tempos iniciais e aproximação com a curva referente ao meio de pH 6,8 no decorrer da dissolução.

**Tabela 77** - Teste de *Duncan* ( $\alpha = 0,05$ ) entre os valores de porcentagem de MPA dissolvidos em cada tempo de coleta dos perfis de dissolução, com pás 50 rpm, nos meios de tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,8 , 6,0 e 5,5.

Tempo (min)	DMS	Tratamento (pH)	Média (%)	Diferença	
				pH 6,8	pH 6,0
10	0,37	6,8	1,84	-	-
		6,0	0,83	1,01	-
		5,5	0,65	1,19	0,18*
20	6,03	6,8	30,72	-	-
		6,0	2,40	28,32	-
		5,5	0,89	29,83	1,51*
30	8,67	6,8	58,74	-	-
		6,0	10,39	48,35	-
		5,5	1,42	57,32	8,97
45	11,16	6,8	95,01	-	-
		6,0	47,33	47,68	-
		5,5	11,93	83,08	35,40
60	18,84	6,8	103,83	-	-
		6,0	86,04	17,79*	-
		5,5	36,28	67,55	49,76
90	10,20	6,8	104,13	-	-
		6,0	103,69	0,44*	-
		5,5	86,55	17,58	17,14
120	1,83	6,8	103,93	-	-
		6,0	104,88	-0,95*	-
		5,5	96,90	7,03	7,98

DMS = Diferença mínima significativa.

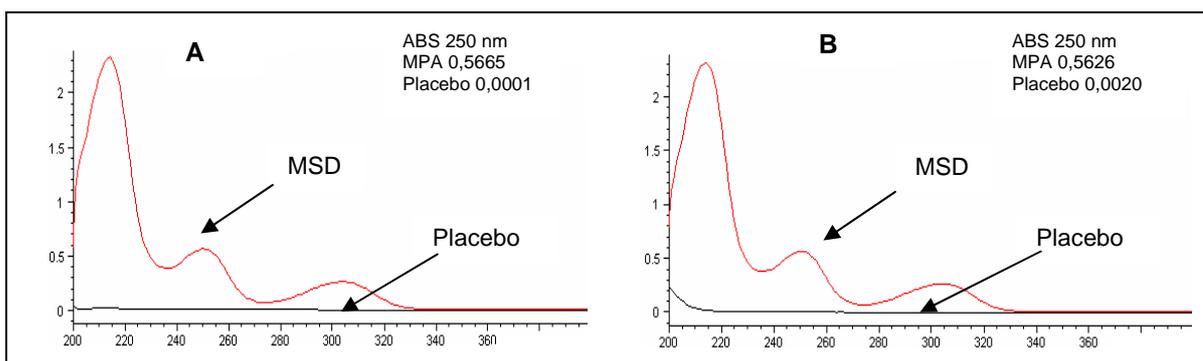
\* Diferença não significativa.

A menos que outro limite seja especificado na monografia individual, o critério geral de aceitação para o primeiro estágio constitui no limite máximo de 10% da quantidade de fármaco dissolvida, em cada unidade, após 120 minutos de dissolução em HCl 0,1 mol/l. No segundo estágio, recomenda-se um mínimo de 80% da quantidade dissolvida ( $Q = 75\%$ ), em cada unidade, após 45 minutos de dissolução em tampão fosfato pH 6,8 (THE UNITED STATES..., 2009).

Os comprimidos permaneceram íntegros e com ausência de dissolução no primeiro estágio. O limite de 10% não se aplica como critério específico para dissolução de comprimidos de MSD, devido à baixa solubilidade do fármaco no meio HCl 0,1 mol/l. A quantificação restringe-se até 2% da quantidade de fármaco presente na formulação. No segundo estágio, todas as unidades apresentaram dissolução superior a 80% após 45 minutos nas velocidades de rotação utilizadas (50 e 75 rpm).

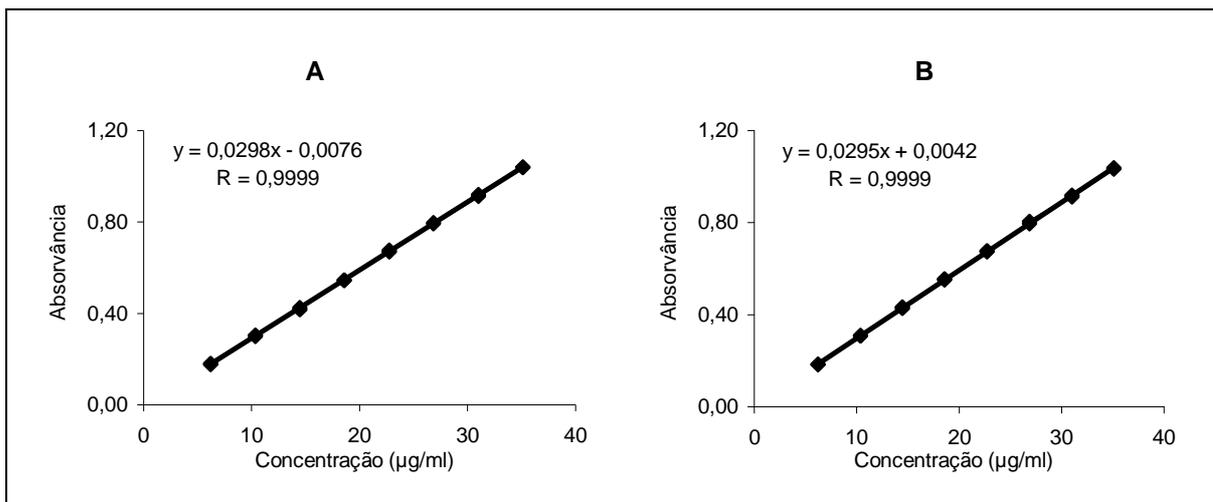
### 6.6.3 Validação

Os espectros das soluções placebo e padrão obtidos na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm nos meios tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,0 e 5,5 estão ilustrados na Figura 75. A absorção do placebo em  $\lambda$  250 nm foi inferior a 0,5% da medida obtida para MSD a 100% da concentração de trabalho em ambas as condições.



**Figura 75** -. Sobreposição dos espectros de absorção no ultravioleta na faixa  $\lambda$  200 a 400 nm da solução placebo e da solução de MSD, equivalente a 18  $\mu\text{g/ml}$  de MPA, em tampão fosfato 0,05 mol/l (A) pH 6,0 e (B) pH 5,5.

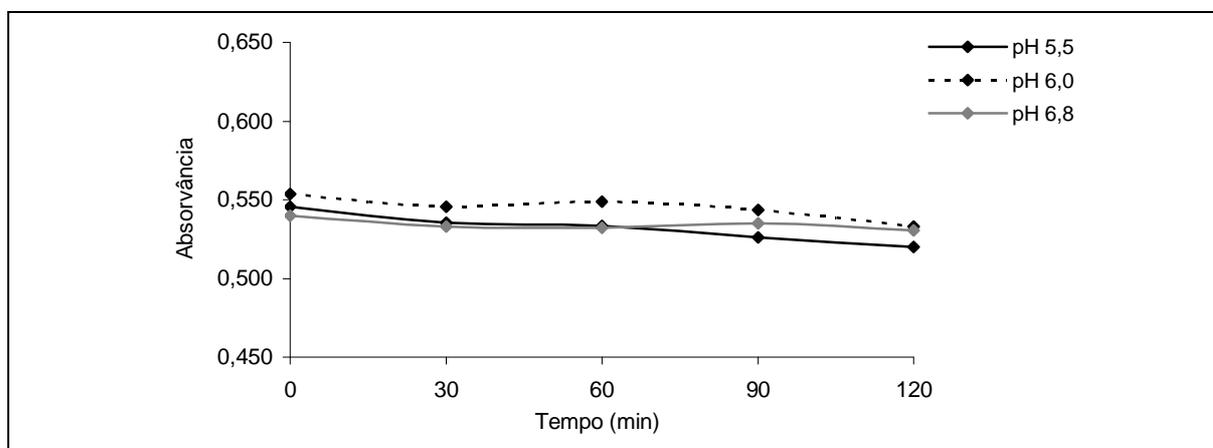
Os métodos demonstraram-se lineares de acordo com os parâmetros analisados. Os interceptos das curvas foram diferentes de zero ( $p < 0,05$ ), entretanto menor que 2% da resposta obtida a 100% da concentração de trabalho, conforme recomendado por Green (1996). As curvas analíticas estão representadas na Figura 76 e as análises estatísticas apresentadas nos Apêndices M e N.



**Figura 76** - Curvas analíticas de ácido micofenólico para avaliação da linearidade do método espectrofotométrico em tampão fosfato 0,05 mol/l (A) pH 6,0 e (B) pH 5,5.

#### 6.6.4 Estabilidade nos meios de dissolução

Os valores de absorvância das soluções de MSD nos meios de dissolução, ao longo de 120 minutos, estão representados na Figura 77.



**Figura 77** - Valores de absorvâncias das soluções de micofenolato de sódio nos meios tampão fosfato 0,05 mol/l pH 5,5, 6,0 e 6,8 para verificação da estabilidade durante 120 minutos a 37 °C.

As variações na medida ao longo de 120 minutos foram inferiores a 2,0% em todas as condições, sendo as maiores variações observadas em pH 5,5. Os valores de DPR entre as determinações foram 1,81% para solução em pH 5,5, 1,42% em pH 6,0 e 0,69% em pH 6,8.

## 7 CONCLUSÕES

Os procedimentos analíticos farmacopéicos propostos para avaliação da identificação, pureza e teor de MMF e MSD em matéria-prima permitiram definir um padrão de qualidade para os fármacos.

O método cromatográfico, desenvolvido para o doseamento de MMF e de sua principal impureza (MPA) em comprimidos, foi seletivo aos produtos de degradação por hidrólise ácida e cumpriu com os requisitos de linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A quantificação de MPA nos comprimidos de MMF foi adequadamente realizada por meio da comparação da resposta obtida com MPA padrão e com MMF SQR. Nesse último caso, o uso do fator de resposta deve ser aplicado para não ocorrer a sobrestimação da impureza.

O método por espectrofotometria no ultravioleta não é seletivo para as impurezas de MMF. Entretanto, pode ser utilizado como alternativa para o doseamento de MMF em comprimidos quando o nível de impurezas é controlado.

O método cromatográfico desenvolvido para o doseamento de MSD matéria-prima e comprimidos foi seletivo aos produtos de degradação por hidrólise e cumpriu com os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez. O método por espectrofotometria no ultravioleta, desenvolvido e validado para MSD comprimidos, não apresentou diferença, quanto à exatidão e precisão, em comparação ao método cromatográfico ( $p > 0,05$ ).

Os perfis de dissolução do medicamento genérico e referência de MMF comprimidos apresentaram dissolução ( $n=12$ ) superior a 85% em 15 minutos nos meios HCl 0,1 mol/l, HCl 0,01 mol/l e tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0, demonstrando que o princípio ativo é facilmente liberado pelas formulações.

A resistência do revestimento entérico dos comprimidos de MSD foi comprovada, qualitativamente, no teste de desintegração e, quantitativamente, no teste de

dissolução. Os comprimidos permaneceram íntegros em HCl 0,1 mol/l. Ao contrário, observou-se a liberação do fármaco com o aumento do pH do meio (Q > 75% após 45 minutos em tampão fosfato pH 6,8).

As propostas de monografias farmacopéicas para MMF e MSD matéria-prima e comprimidos encontram-se no Apêndice O. Os ensaios e limites estabelecidos foram baseados nos resultados experimentais obtidos e em recomendações científicas e regulatórias.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNS, W. Noninfectious gastrointestinal (GI) complications of mycophenolic acid therapy: a consequence of local GI toxicity? *Transplant. Proc.*, v. 39, p. 88-93, 2007.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (AEFI). *Validación de métodos analíticos*. Barcelona, 2001. 331 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 14724: *Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – Apresentação*. Rio de Janeiro, 2006, 9 p.

AULTON, M. E. *Pharmaceutics: the science of dosage form design*. New York, Church Livingstone, 1996, 734 p.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BARZOKI, M.A.; ROUINI, M.; GHOLAMI, K.; PEZESHKI, M.L.; REZAEI, S. Determination of mycophenolic acid in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Daru*, v.13, n. 3, p. 120-126, 2005.

BÉNECH, H.; HASCOËT, S.; FURLAN, V.; PRUVOST, A.; DURRBACH, A. Development and validation of an LC/MS/MS assay for mycophenolic acid in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 853, n. 1-2, p. 168-174, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 11 de fevereiro de 1999, Brasília, D.F. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 19 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Sistemas e Redes Assistenciais. *Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas, medicamentos excepcionais*. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 212 de 10 de fevereiro de 2004a. Determina a apreensão, em todo território nacional, do medicamento genérico Micofenolato Mofetil. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 11 de fevereiro de 2004, Brasília, D.F. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 19 abr. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1.796 de 11 de novembro de 2004b. Determina a apreensão, em todo território nacional, do produto Micofenolato Mofetil 500 mg. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 12 de novembro de 2004, Brasília, D.F. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 19 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Portaria nº 203 de 19 de abril de 2005. Inclui medicamentos na Tabela de Procedimentos Especiais do Sistema de Informações Hospitalar do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 14 de junho de 2005, Brasília, D.F. Disponível em <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/portarias>>. Acesso em: 25 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Número de registros de medicamentos genéricos: valores acumulados, 2006a. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos>> . Acesso em: 3 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Números de registros de medicamentos genéricos: por país de origem do produto, 2006b. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos>>. Acesso em: 3 abr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.577 de 27 de outubro de 2006c. Aprova o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 10 de novembro de 2006, Brasília, D.F. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em: 24 abr. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 16 de 2 de março de 2007a. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos, anexo I. Acompanha esse Regulamento o Anexo II, intitulado "Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 5 de março de 2007, Brasília, D.F. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em 19 de abril de 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 3.575 de 14 de novembro de 2007b. Determina a apreensão, em todo território nacional, do produto Micofenolato Mofetil 500 mg. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, 19 de novembro de 2007, Brasília, D.F. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde - CONASS. *Assistência farmacêutica*. Coleção progestores – para entender a gestão do SUS. 1. ed., Brasília, 2007c, v. 7, p. 90-116.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename*. 6. ed. Brasília, 2008, 144p.

BRITISH pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationary Office, 2007.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M-L.; Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochim. Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

BUDDE, K.; GLANDER, P.; DIEKMANN F.; DRAGUN, D; WAISER, J.; FRITSCH L.; NEUMAYER, H. H. Enteric-coated mycophenolate sodium: safe conversion from mycophenolate mofetila in maintenance renal transplant recipients. *Transplant. Proc.*, v. 36, n. 2S, p. 524S–527S, 2004.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Qui. Nova*, v. 22, n. 1, p. 75-84, 1999.

FARMACOPEIA brasileira 4.ed. São Paulo: Ateneu, 1988. Parte I.

FARMACOPEIA brasileira 4.ed. São Paulo: Ateneu, 1996. Parte I, p. V.1.6.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1265-1289.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, n. 68, p. 305A-309A, 1996.

GU, C-H.; LI, H.; GANDHI, R. B.; RAGHAVAN, K. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 283, p. 117-125, 2004.

HOLT, D.W.; ARMSTRONG, V.W.; GRIESMACHER, A.; MORRIS, R.G.; NAPOLI, K.L.; SHAW, L.M. International Federation of Clinical Chemistry; International Association of Therapeutic Drug Monitoring; Clinical Toxicology working group on immunosuppressive drug monitoring. International Federation of Clinical Chemistry/International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology working group on immunosuppressive drug monitoring. *Ther. Drug. Monit.*, v. 24, p. 59-67, 2002.

HOOIJMAAIJER, E.; BRANDL, M.; NELSON, J.; LUSTIG, D. Degradation products of mycophenolate mofetil in aqueous solution. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 25, p. 361-365, 1999.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – ICH. *Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2 R1)*. 2005, 13 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – ICH. *Impurities in new drugs substances (Q3A R2)*. 2006a, 15 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMAONISATION – ICH. *Impurities in new drug products (Q3B R2)*. 2006b, 12 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMAONISATION – ICH. *Guideline for residual solvents (Q3C R4)*. 2009, 21 p.

JACOBSON-KRAM, D.; MCGOVERN, T. Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Adv. Drugs Deliv. Rev.*, v. 59, p. 38-42, 2006.

JEONG, H.; KAPLAN, B. Therapeutic Monitoring of Mycophenolate Mofetil. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 2, p. 184-191, 2007.

KIBBE, A. H.; *Handbook of pharmaceutical excipients*. 3 ed. Washington: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2000, 665 p.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. *Dicionário terapêutico Guanabara*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 22.1-22.6.

LEE, W.A.; GU, L.; MIKSZTAL, A.R.; CHU, N.; LEUNG, K; NELSON, P.H. Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm. Research*, v. 7, n. 2, p. 161-166, 1990.

LEE, H.; SHEN, S.; GRINBERG, N. Identification and Control of Impurities for Drug Substance Development using LC/MS and GC/MS. *J. of Liquid Chromatogr. and related technol.*, v. 31, n. 15, p. 2235-2252, 2008.

NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L; SHAH, V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. *Dissolution technologies*, Hockessin, v. 7, n. 1, p. 16-18, 2000.

NORONHA, I. L.; OLIVIERA, A. C.; ARAÚJO, M. R. T.; ABENSUR, H.; QUINTAES, S. L.; GENZINI, T.; PEROSA, M.; CAMPAGNARI, M. M.; JÚNIOR, J. E. R. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos. *J. Bras. Nefrol.*, v. 19, n.4, p. 398-406, 2005.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharm. Sci. Technol. Today*. Cambridge, v. 1, n. 5, p. 214-223, 1998.

OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M.E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2379-2389, 2006.

O'NEIL, Maryadele J. *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14 ed. Whitehouse Station, NJ: Merck, 2006, p. 1094.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *For. Sci. Int.*, v. 165, p. 216-224, 2007.

RENNER, U.D.; THIEDE, C.; BORNHAUSER, M.; EHNINGER, G.; THIEDE, H. M. Determination of Mycophenolic Acid and Mycophenolate Mofetil by High-Performance Liquid Chromatography Using Postcolumn Derivatization. *Anal. Chem.*, v. 73, p. 41-46, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. *Imunologia*. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2003, p.385-400.

ROMANO, R.; BERNARDO, P. J. B. Padrões de regulação de preços do mercado de medicamentos: experiência brasileira dos anos 90 e novos arranjos institucionais. In: Negri, Barjas; Di Giovanni, Geraldo. *Brasil: radiografia da saúde*. Campinas, UNICAMP, 2001. p. 445-464.

SÁDABA, B.; AZANZA, J. R.; MUÑOZ, M. J.; GIL, I. Nuevas perspectivas del tratamiento inmunosupresor en el trasplante de órganos. *Nefrología*, v. 25, n. 5, 2005.

SÁNCHEZ-FRUCTUOSO, A. I. Revisión de un nuevo inmunosupresor: micofenolato sódico con cubierta entérica (Myfortic®). *Nefrología*, v. 25, p. 234-242, 2005.

SERRA, C. H. H.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, n. 43, v.1, p. 19-88, jan/mar 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P.; NOORY, A.; NOORY, C.; MCCULLOUGH, B.; CLARKE, S.; EVERETT, R.; NAVIASKY, H.; SRINIVASAN, B. N.; FORTMAN, D; SKELLY, J. P. In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 125, n. 1, p. 99-106, 1995.

SILVA, C. R. ; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*, v. 37, n. 2, p. 270-276, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6. ed. Rio de Janeiro, 2000, 460 p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, 765 p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

TEIXEIRA, K. C. *Análise do programa de medicamentos de dispensação em caráter excepcional em Minas Gerais: gastos, principais diagnósticos e evolução de novos pacientes*. 2007. 72 p. Monografia (Especialização de Economia da Saúde) - Escola de Governo Professor Paulo Neves de Carvalho, Fundação João Pinheiro, Belo Horizonte, 2007.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), p. 2458-2460, 2007.

THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

TRIPODI, V.P.; LUCANGIOLI, S.E.; BARBARA, C.L.; RODRIGUEZ, V.G.; CARDUCCI, C.N. Analysis of Immunosuppressive Drugs and Their Pharmaceuticals by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Chromatographia*, v. 54, p.93-98, 2001.

TSINA, I; KALOOSTIAN, M.; LEE, R.; TARNOWSKI, T.; WONG, B. High-performance liquid chromatographic method for the determination of mycophenolate mofetil in human plasma. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, v. 681, p. 347-353, 1996.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Validation of Chromatographic Methods*. Reviewer Guidance. 1994. 30 p.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for Industry, Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*. Rockville, 1997, 11 p.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Drug Safety and Availability. *Inosine Monophosphate Dehydrogenase Inhibitors (IMPDH) Immunosuppressants*. FDA alert, 2008a. Disponível em <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/ucm085272.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2009.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. New Drug Application (NDA). *Myfortic*®. NDA 50-791/S-002, p. 4-22, 2008b.

VERMA, S. P.; ALAM, O.; MULLICK P.; SIDDIQUI, N.; KHAN, S. A. Validated, ultraviolet spectroscopy method for the dissolution study of mycophenolate mofetila immediate release 500 mg tablets. *Nature Precedings*, hdl: 10101/npre.2008.2250.1, 2008. Disponível em: < <http://precedings.nature.com/documents/2250/version/1>>. Acesso em: 16 dez. 2008.

WIWATTANAWONGSA, K.; HEINZEN, E.L.; KEMP, D.C.; DUPUIS, R.E.; SMITH, P.C. Determination of mycophenolic acid and its phenol glucuronide metabolite in human plasma and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, v. 763, p. 35-45, 2001.

WONG, KIT YEE. Sandor Molnar, Csaba Szabo, Tivadar Tamas, Janos Hajko, Adrienne Kovacsne-Mezei, Judith Aronhime. *Processes for preparation of crystalline mycophenolate sodium*. EP20070023241, 9 abr. 2008. European Patent Application EP1908756. Disponível em < <http://www.freepatentsonline.com/EP1908756.html>>. Acesso em: 16 dez. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Model List of Essential Medicines*. 15.ed. Revised march 2005a. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications>>. Acesso em: 22 de abril de 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Multisource (Generic) Pharmaceutical Products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability*. Rev. 4, 2005b.

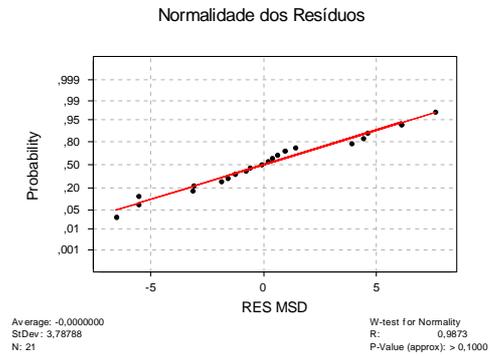
## APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Dados de distribuição mensal, preço unitário e custo mensal da distribuição de comprimidos de micofenolato de mofetila 500 mg (MMF), micofenolato de sódio 360 mg (MSD 360) e micofenolato de sódio 180 mg (MSD 180) pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais no período de junho 2005 a dezembro 2008.

Ano	Mês	Unidades distribuídas (comprimidos)			Preço unitário (R\$)			Custo da distribuição mensal (R\$)		
		MMF	MSD 360	MSD 180	MMF	MSD 360	MSD 180	MMF	MSD 360	MSD 180
2005	jun	132.700,00	12.480,00	12.240,00	6,79	7,20	3,87	901.033,00	89.856,00	47.368,80
	jul	182.150,00	2.160,00	1.320,00	6,79	7,74	3,87	1.236.798,50	16.718,40	5.108,40
	ago	67.050,00	1.080,00	840,00	6,79	7,74	3,87	455.269,50	8.359,20	3.250,80
	set	159.750,00	10.080,00	6.720,00	6,79	7,74	3,87	1.084.702,50	78.019,20	26.006,40
	out	127.750,00	38.760,00	21.960,00	6,41	7,74	3,87	818.877,50	300.002,40	84.985,20
	nov	106.900,00	11.880,00	27.240,00	6,41	7,74	3,87	685.229,00	91.951,20	105.418,80
2006	dez	165.550,00	60.000,00	64.440,00	6,41	7,74	3,87	1.061.175,50	464.400,00	249.382,80
	jan	60.250,00	31.560,00	30.840,00	6,41	7,74	3,87	386.202,50	244.274,40	119.350,80
	fev	74.700,00	39.600,00	28.800,00	6,41	7,74	3,87	478.827,00	306.504,00	111.456,00
	mar	91.200,00	38.040,00	36.120,00	6,41	7,74	3,87	584.592,00	294.429,60	139.784,40
	abr	96.050,00	39.000,00	25.800,00	6,41	7,74	3,87	615.680,50	301.860,00	99.846,00
	mai	102.500,00	48.720,00	34.800,00	6,41	7,74	3,87	657.025,00	377.092,80	134.676,00
	jun	107.300,00	41.040,00	52.920,00	2,42	7,74	3,87	259.666,00	317.649,60	204.800,40
	jul	100.200,00	51.960,00	23.280,00	2,42	7,74	3,87	242.484,00	402.170,40	90.093,60
	ago	83.650,00	42.600,00	40.200,00	2,42	7,74	3,87	202.433,00	329.724,00	155.574,00
	set	92.300,00	60.360,00	40.800,00	2,42	7,74	3,87	223.366,00	467.186,40	157.896,00
	out	84.850,00	52.320,00	37.200,00	2,42	7,74	3,87	205.337,00	404.956,80	143.964,00
	nov	105.650,00	49.080,00	38.520,00	2,42	7,74	3,87	255.673,00	379.879,20	149.072,40
2007	dez	209.350,00	98.880,00	75.360,00	2,42	7,74	3,87	506.627,00	765.331,20	291.643,20
	jan	20.750,00	30.000,00	23.520,00	2,42	7,74	3,87	50.215,00	232.200,00	91.022,40
	fev	88.950,00	40.680,00	28.680,00	2,42	7,74	3,87	215.259,00	314.863,20	110.991,60
	mar	160.000,00	74.520,00	52.440,00	2,42	7,74	3,87	387.200,00	576.784,80	202.942,80
	abr	53.900,00	36.720,00	25.080,00	2,42	7,74	3,87	130.438,00	284.212,80	97.059,60
	mai	121.200,00	81.480,00	47.040,00	2,42	7,74	3,87	293.304,00	630.655,20	182.044,80
	jun	98.900,00	64.080,00	33.840,00	2,42	7,74	3,87	239.338,00	495.979,20	130.960,80
	jul	116.250,00	65.640,00	43.440,00	2,42	7,74	3,87	281.325,00	508.053,60	168.112,80
	ago	98.200,00	56.040,00	32.640,00	2,38	7,74	3,87	233.716,00	433.749,60	126.316,80
	set	116.110,00	75.370,00	39.400,00	2,38	7,74	3,87	276.341,80	583.363,80	152.478,00
2008	out	103.510,00	77.710,00	38.760,00	2,38	7,74	3,87	246.353,80	601.475,40	150.001,20
	nov	105.350,00	70.460,00	38.420,00	2,38	7,74	3,87	250.733,00	545.360,40	148.685,40
	dez	138.500,00	102.600,00	53.760,00	2,38	6,47	3,24	329.630,00	663.822,00	174.182,40
	jan	131.750,00	81.600,00	39.720,00	1,60	6,17	3,08	210.536,50	503.472,00	122.337,60
	fev	28.150,00	14.520,00	3.840,00	1,60	6,17	3,08	44.983,70	89.588,40	11.827,20
	mar	63.550,00	27.873,00	13.203,00	1,60	6,17	3,08	101.552,90	171.976,41	40.665,24
	abr	113.200,00	85.200,00	40.200,00	1,60	6,17	3,08	180.893,60	525.684,00	123.816,00
	mai	110.250,00	80.880,00	41.160,00	1,60	6,17	3,08	176.179,50	499.029,60	126.772,80
	jun	107.900,00	78.120,00	36.000,00	1,60	6,17	3,08	172.424,20	482.000,40	110.880,00
	jul	95.750,00	69.240,00	28.680,00	1,60	6,17	3,08	153.008,50	427.210,80	88.334,40
ago	169.350,00	157.650,00	69.960,00	1,60	6,17	3,08	270.621,30	972.700,50	215.476,80	
set	164.150,00	150.720,00	67.320,00	1,60	6,17	3,08	262.311,70	929.942,40	207.345,60	
out	96.350,00	93.720,00	47.400,00	1,60	6,17	3,08	153.967,30	578.252,40	145.992,00	
nov	207.100,00	137.160,00	62.880,00	1,60	6,17	3,08	330.945,80	846.277,20	193.670,40	
dez	68.800,00	58.320,00	37.920,00	1,60	6,17	3,08	109.942,40	359.834,40	116.793,60	

**APÊNDICE B - Análise de regressão da curva analítica de micofenolato de sódio para doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.**

Nível (%)	C (µg/ml)	Area
43,8	15,78	399,0
		394,1
		396,5
65,8	23,68	593,7
		596,7
		601,2
87,7	31,57	792,4
		794,6
		799,8
109,6	39,46	989,8
		994,5
		995,2
131,5	47,35	1185,9
		1188,1
		1185,6
153,4	55,24	1384,6
		1385,8
		1392,0
175,4	63,14	1581,9
		1575,0
		1576,0



**Teste de Durbin-Watson**

DW = 1,35

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,22
Correlação negativa	> 2,78
Não correlacionados	{1,42-2,58}
Não conclusivo	{1,22-1,42} {2,58-2,78}

**Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe**

Estatística	RES 1	RES 2
n	12	9
mediana	-3,60E-01	2,05E-01
dm	4,51E-01	-6,01E-01
SQD	5,41E+01	7,02E+01
Var	6,54E+00	
t <sub>L</sub>	0,932	
t <sub>0,975</sub>	2,093	
p	0,3628	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

**ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE**

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	3258497,27763	3258497,27763	215749,05	5,40E-40
Resíduo	19	286,96047	15,10318		
Falta ajuste	5	137,24713	27,44943	2,566852	0,075368
Entre níveis	6	3258634,52476			
Erro puro	14	149,71333	10,69381		
Total	20	3258784,23810			

**ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA**

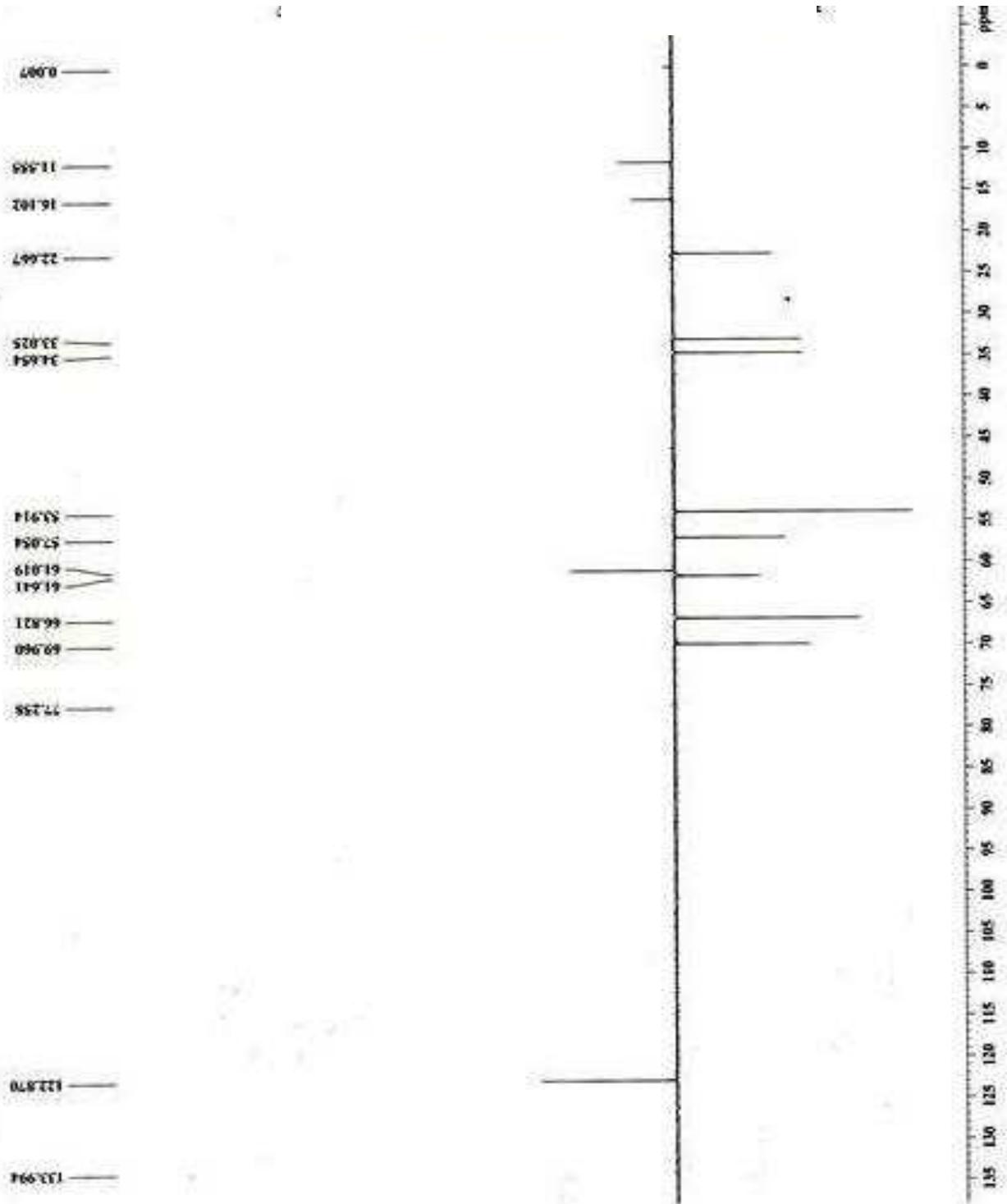
	Coefic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf.	LC 95% sup.
Linear	5,828724	2,283425	2,552623	0,019451	1,049460	10,607988
Angular	24,955949	5,37E-02	464,487944	5,40E-40	24,843495	25,068403

**DADOS AUXILIARES**

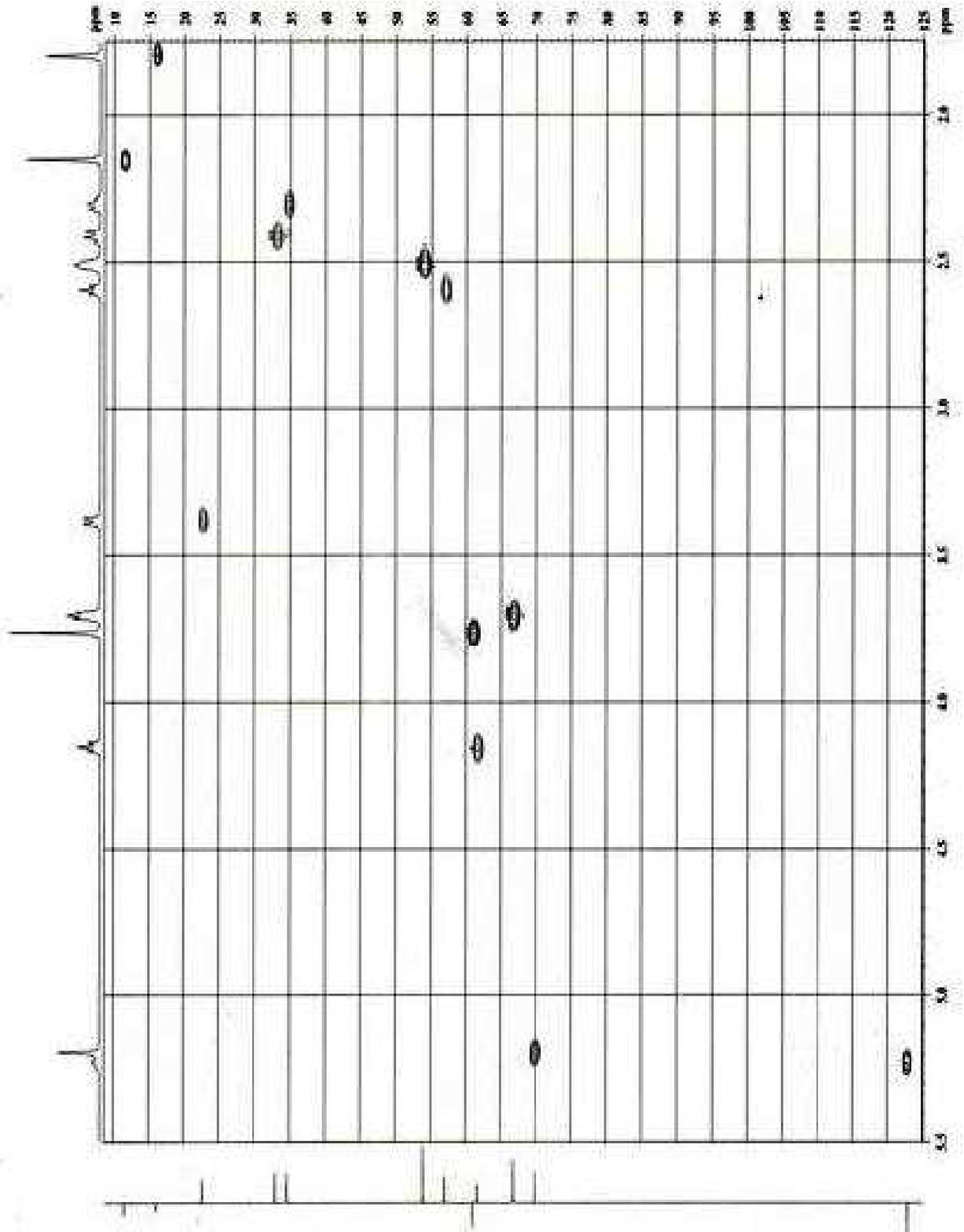
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999956
R <sup>2</sup>	0,999912
R <sup>2</sup> ajustado	0,999907
Erro padrão	3,886281
n	21

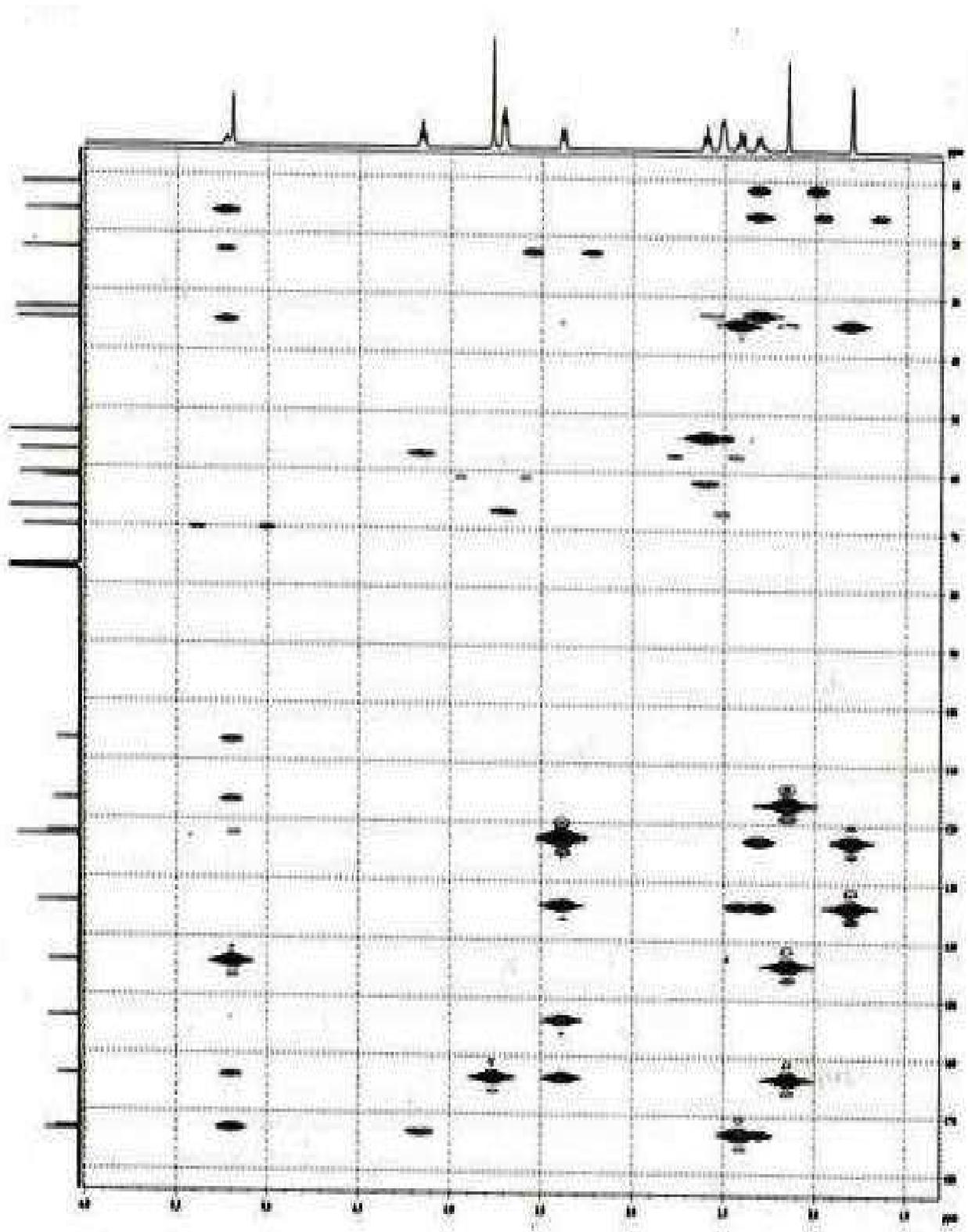
Nível	Som. Yk	nk
1	1189,6	3
2	1791,6	3
3	2386,8	3
4	2979,5	3
5	3559,6	3
6	4162,4	3
7	4732,9	3
Total	20802,4	21

## APÊNDICE C - Espectro DEPT do resíduo de micofenolato de mofetila.



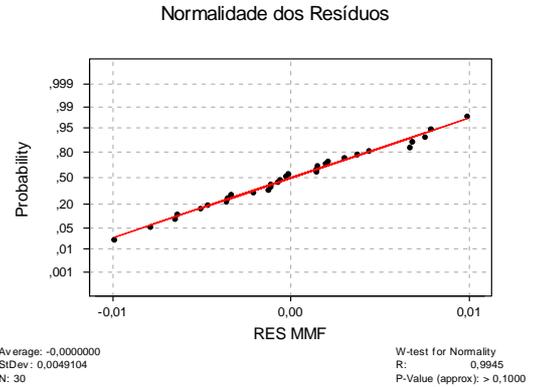
## APÊNDICE D - Espectro HMQC do resíduo de micofenolato de mofetila.



**APÊNDICE E - Espectro HMBC do resíduo de micofenolato de mofetila.**

**APÊNDICE F - Análise de regressão da curva analítica de micfenolato de mofetila em HCl 0,1 mol/l para doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.**

Nível (%)	C (µg/ml)	Abs.
20,7	5,18	0,11264
		0,11578
		0,10811
41,4	10,36	0,21287
		0,21224
		0,20994
62,2	15,54	0,32170
		0,32021
		0,31761
82,9	20,72	0,42322
		0,42280
		0,41745
103,6	25,90	0,53582
		0,52704
		0,52555
124,3	31,08	0,62447
		0,63647
		0,63409
145,0	36,26	0,73628
		0,74101
		0,73452
165,8	41,44	0,85266
		0,85470
		0,83693
186,5	46,62	0,94368
		0,94542
		0,95377
207,2	51,80	1,05720
		1,05670
		1,06210



**Teste de Durbin-Watson**

DW = 1,61

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,35
Correlação negativa	> 2,65
Não correlacionados	{1,49-2,51}
Não conclusivo	{1,35-1,49} {2,51-2,65}

**Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe**

Estadística	RES 1	RES 2
n	15	15
mediana	-7,11E-04	1,41E-03
dm	1,57E-04	-1,57E-04
SQD	1,04E-04	1,89E-04
Var	1,05E-05	
t <sub>L</sub>	0,266	
t <sub>0,975</sub>	2,048	
p	0,7923	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

**ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE**

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	2,740298	2,740298	109731,77	7,39E-52
Resíduo	28	0,000699	2,50E-05		
Falta ajuste	8	0,000205	2,5687E-05	1,040534	0,439800
Entre níveis	9	2,740504			
Erro puro	20	0,000494	2,4687E-05		
Total	29	2,740997			

**ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA**

	Coefic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	0,003039	0,001971	1,541727	0,134367	-0,000999	0,007076
Angular	0,020313	6,13E-05	331,257866	7,39E-52	0,020188	0,020439

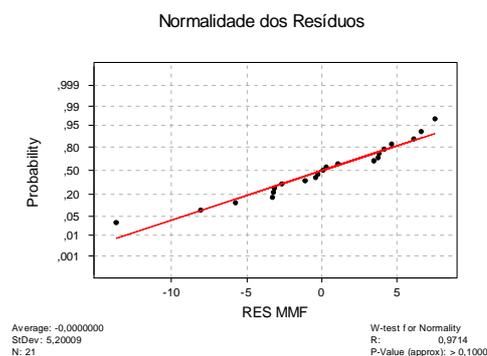
**DADOS AUXILIARES**

Estadística de regressão	
R múltiplo	0,999872
R <sup>2</sup>	0,999745
R <sup>2</sup> ajustado	0,999736
Erro padrão	0,004997
n	30

Nível	Som. Yk	nk
1	0,33653	3
2	0,63505	3
3	0,95952	3
4	1,26347	3
5	1,58841	3
6	1,89503	3
7	2,21181	3
8	2,54429	3
9	2,84287	3
10	3,17600	3
Total	17,45298	30

## APÊNDICE G - Análise de regressão da curva analítica de micofenolato de mofetila para doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Nível (%)	C (µg/ml)	Area
44,3	22,14	394,7
		392,6
		396,9
66,4	33,22	592,3
		592,8
		586,8
88,6	44,29	785,8
		793,2
		795,2
110,7	55,36	985,2
		993,1
		985,7
132,9	66,43	1185,9
		1179,5
		1188,7
155,0	77,50	1370,6
		1365,0
		1383,3
177,2	88,58	1572,2
		1579,1
		1578,8



### Teste de Durbin-Watson

DW = 2,06

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,22
Correlação negativa	> 2,78
Não correlacionados	{1,42-2,58}
Não conclusivo	{1,22-1,42} {2,58-2,78}

### Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe

Estatística	RES 1	RES 2
n	12	9
mediana	-6,18E-02	3,45E+00
dm	4,39E-01	-5,85E-01
SQD	7,66E+01	2,79E+02
Var	1,87E+01	
$t_L$	0,537	
$t_{0,975}$	2,093	
p	0,5977	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

### ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	3245630,173333	3245630,173333	113465,87	2,42E-37
Resíduo	19	543,484762	28,604461		
Falta ajuste	6	173,144762	28,85746032	1,246745	0,334802
Entre níveis	7	3245803,318095			
Erro puro	16	370,340000	23,14625		
Total	23	3246173,658095			

### ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA

	Coeff.	EP	Stat t	p	LC 95% inf.	LC 95% sup.
Linear	2,757143	3,142507	0,877370	0,391245	-3,820200	9,334485
Angular	17,753492	5,27E-02	336,846959	2,42E-37	17,643180	17,863805

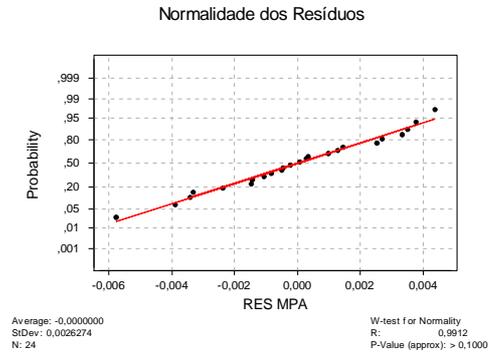
### DADOS AUXILIARES

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999916
R <sup>2</sup>	0,999833
R <sup>2</sup> ajustado	0,999824
Erro padrão	5,348314
n	21

Nível	Som. Yk	nk
1	1184,2	3
2	1771,9	3
3	2374,2	3
4	2964,0	3
5	3554,1	3
6	4118,9	3
7	4730,1	3
Total	20697,4	21

**APÊNDICE H - Análise de regressão da curva analítica de ácido micofenólico em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/l pH 6,8 para doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.**

Nível (%)	C (µg/ml)	Abs.
34,7	6,24	0,17867
		0,18211
		0,18402
57,8	10,40	0,30542
		0,30367
		0,30393
80,9	14,56	0,42428
		0,42671
		0,43011
104,0	18,71	0,55036
		0,54465
		0,54362
127,1	22,87	0,66777
		0,67133
		0,66717
150,2	27,03	0,79047
		0,78687
		0,79396
173,3	31,19	0,91530
		0,91186
		0,91215
196,4	35,35	1,02760
		1,03230
		1,03590



**Teste de Durbin-Watson**

DW = 1,64

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,27
Correlação negativa	> 2,73
Não correlacionados	{1,45-2,55}
Não conclusivo	{1,27-1,45} {2,55-2,73}

**Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe**

Estadística	RES 1	RES 2
n	12	12
mediana	-3,29E-04	1,75E-04
dm	-6,66E-05	6,66E-05
SQD	2,56E-05	3,46E-05
Var	2,74E-06	
t <sub>L</sub>	-0,197	
t <sub>0,975</sub>	2,074	
p	0,8454	

Conclusão: t<sub>L</sub> < t<sub>0,975</sub>, as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

**ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE**

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	1,861099	1,861099	256110,02	3,16E-46
Resíduo	22	0,000160	7,27E-06		
Falta ajuste	6	0,000023	3,7822E-06	0,441153	0,840656
Entre níveis	7	1,861122			
Erro puro	16	0,000137	8,5735E-06		
Total	23	1,861259			

**ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA**

	Coeffic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	0,000254	0,001321	0,192173	0,849369	-0,002485	0,002993
Angular	0,029224	5,77E-05	506,073140	3,16E-46	0,029105	0,029344

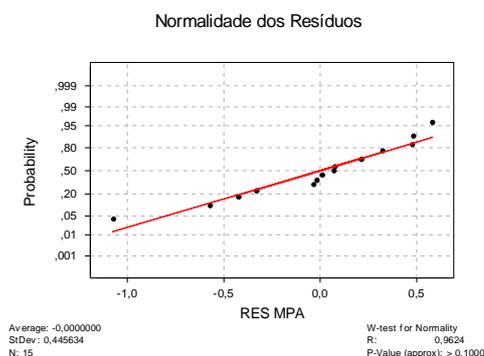
**DADOS AUXILIARES**

Estadística de regressão	
R múltiplo	0,999957
R <sup>2</sup>	0,999914
R <sup>2</sup> ajustado	0,999910
Erro padrão	0,002696
n	24

Nível	Som. Yk	nk
1	0,5448	3
2	0,91302	3
3	1,28110	3
4	1,63863	3
5	2,00627	3
6	2,37130	3
7	2,73931	3
8	3,09580	3
Total	14,59023	24

## APÊNDICE I - Análise de regressão da curva analítica de ácido micofenólico para quantificação de impureza em comprimidos de micofenolato de mofetila.

Nível (%)	Massa injetada (µg)	Área
19,8	0,01239	12,2
		12,3
		11,7
59,5	0,03717	37,6
		36,2
		36,7
99,1	0,06195	62,8
		62,5
		62,9
138,8	0,08673	88,6
		88,4
		88,6
198,2	0,1239	126,3
		126,8
		127,2



### Teste de Durbin-Watson

DW = 1,50

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,08
Correlação negativa	> 2,65
Não correlacionados	{1,36-2,92}
Não conclusivo	{1,08-1,36} {2,64-2,92}

### Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe

Estatística	RES 1	RES 2
n	9	6
mediana	-1,79E-02	1,45E-01
dm	-6,33E-02	9,50E-02
SQD	9,22E-01	2,10E-01
Var	8,71E-02	
t <sub>L</sub>	-1,018	
t <sub>0,975</sub>	2,160	
p	0,3271	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

### ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	2,3905E+04	2,3905E+04	111774,77	5,79E-27
Resíduo	22	2,780260	2,14E-01		
Falta ajuste	6	1,0469	0,1745	1,61	0,21
Entre níveis	7	23905,8840			
Erro puro	16	1,7333	0,1083		
Total	23	2,3908E+04			

### ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA

	Coefic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	-1,060383	0,231859	-4,573390	0,000522	-1,561284	-0,559481
Angular	1031,34	3,08E+00	334,327344	5,79E-27	1024,67	1038,00

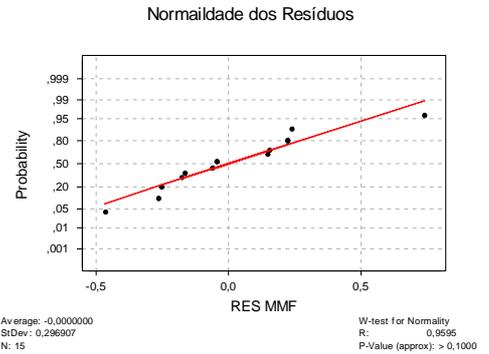
### DADOS AUXILIARES

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999942
R <sup>2</sup>	0,999884
R <sup>2</sup> ajustado	0,999875
Erro padrão	0,462457
n	5

Nível	Som. Yk	nk
1	36,2	3
2	110,50000	3
3	188,20000	3
4	265,60000	3
5	380,30000	3
Total	980,8	15

**APÊNDICE J - Análise de regressão da curva analítica de micofenolato de mofetila para quantificação de impureza em comprimidos.**

Nível (%)	Massa injetada (µg)	Área
21,5	0,01345	10,6
		10,6
		10,8
64,6	0,04035	31,4
		31,4
		31,8
107,6	0,06725	52,6
		53,4
		52,9
150,6	0,09415	73,5
		73,2
		73,4
215,2	0,1345	105,4
		105
		105,4



**Teste de Durbin-Watson**

DW = 1,75

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,08
Correlação negativa	> 2,65
Não correlacionados	{1,36-2,92}
Não conclusivo	{1,08-1,36} {2,64-2,92}

**Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe**

Estadística	RES 1	RES 2
n	9	6
mediana	-4,51E-02	-1,72E-01
dm	7,00E-02	-1,05E-01
SQD	4,64E-01	1,72E-01
Var	4,89E-02	
t <sub>L</sub>	1,502	
t <sub>0,975</sub>	2,160	
p	0,1570	

Conclusão: t<sub>L</sub> < t<sub>0,975</sub>, as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

**ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE**

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	1,6152E+04	1,6152E+04	170132,70	3,78E-28
Resíduo	22	1,234153	9,49E-02		
Falta ajuste	6	0,6208	0,1035	2,70	0,053
Entre níveis	7	16152,1427			
Erro puro	16	0,6133	0,0383		
Total	23	1,6153E+04			

**ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA**

	Coefic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	0,141530	0,154478	0,916184	0,376254	-0,192199	0,475259
Angular	780,93	1,89E+00	412,471455	3,78E-28	776,84	785,02

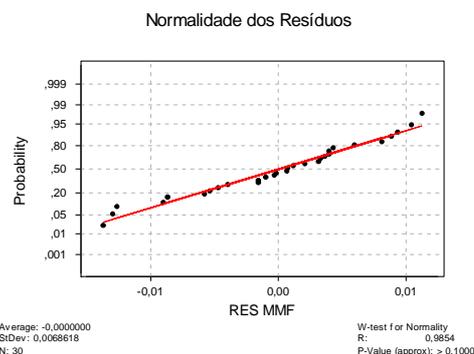
**DADOS AUXILIARES**

Estadística de regressão	
R múltiplo	0,999962
R <sup>2</sup>	0,999924
R <sup>2</sup> ajustado	0,999918
Erro padrão	0,308115
n	5

Nível	Som. Yk	nk
1	32	3
2	94,60000	3
3	158,90000	3
4	220,10000	3
5	315,80000	3
Total	821,4	15

## APÊNDICE K - Análise de regressão da curva analítica de micfenolato de mofetila em HCl 0,01 mol/l para doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	C (µg/ml)	Abs.
20,70	5,18	0,10722
		0,10499
		0,10861
41,41	10,35	0,21703
		0,20802
		0,20697
62,11	15,53	0,31987
		0,31383
		0,32310
82,82	20,70	0,43125
		0,42516
		0,42503
103,52	25,88	0,52781
		0,54105
		0,53288
124,22	31,06	0,62551
		0,64700
		0,62519
144,93	36,23	0,74274
		0,75471
		0,74799
165,63	41,41	0,86193
		0,84204
		0,85401
186,34	46,58	0,94795
		0,95595
		0,96091
207,04	51,76	1,07140
		1,04960
		1,06640



### Teste de Durbin-Watson

DW = 2,65

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,35
Correlação negativa	> 2,65
Não correlacionados	{1,49-2,51}
Não conclusivo	{1,35-1,49} {2,51-2,65}

### Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe

Estatística	RES 1	RES 2
n	15	15
mediana	6,76E-04	3,12E-03
dm	4,33E-04	-4,33E-04
SQD	1,01E-04	4,96E-04
Var	2,13E-05	
$t_L$	0,513	
$t_{0,975}$	2,048	
p	0,6118	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

### ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	2,797110	2,797110	57461,27	6,32E-48
Resíduo	28	0,001363	4,87E-05		
Falta ajuste	8	0,000205	2,5617E-05	0,442422	0,881191
Entre níveis	9	2,797315			
Erro puro	20	0,001158	5,7903E-05		
Total	29	2,798473			

### ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA

	Coefic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	0,000176	0,002752	0,063959	0,949457	-0,005461	0,005813
Angular	0,020539	8,57E-05	239,710801	6,32E-48	0,020363	0,020714

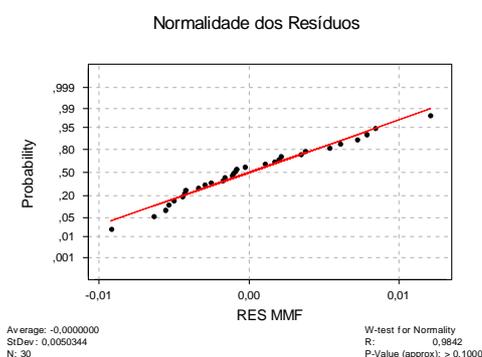
### DADOS AUXILIARES

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999756
R <sup>2</sup>	0,999513
R <sup>2</sup> ajustado	0,999496
Erro padrão	0,006977
n	30

Nível	Som. Yk	nk
1	0,32082	3
2	0,63202	3
3	0,95680	3
4	1,28144	3
5	1,60174	3
6	1,89770	3
7	2,24544	3
8	2,55798	3
9	2,86481	3
10	3,18740	3
Total	17,54615	30

**APÊNDICE L** - Análise de regressão da curva analítica de micfenolato de mofetila em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/l pH 3,0 para doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	C (µg/ml)	Abs.
19,9	4,99	0,10008
		0,10337
		0,10513
39,9	9,97	0,20255
		0,20281
		0,20116
59,8	14,96	0,31124
		0,30561
		0,30252
79,8	19,95	0,40512
		0,40915
		0,40635
99,7	24,94	0,50935
		0,51812
		0,50528
119,7	29,92	0,61423
		0,60782
		0,60796
139,6	34,91	0,70891
		0,70810
		0,72169
159,6	39,90	0,82876
		0,82507
		0,82273
179,5	44,88	0,91446
		0,91333
		0,92079
199,5	49,87	1,02460
		1,01170
		1,01980



### Teste de Durbin-Watson

DW = 1,53

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,35
Correlação negativa	> 2,65
Não correlacionados	{1,49-2,51}
Não conclusivo	{1,35-1,49} {2,51-2,65}

### Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe

Estatística	RES 1	RES 2
n	15	15
mediana	-9,31E-04	-1,09E-03
dm	-6,08E-05	6,08E-05
SQD	8,81E-05	1,51E-04
Var	8,56E-06	
$t_L$	-0,114	
$t_{0,975}$	2,048	
p	0,9102	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

### ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	2,582092	2,582092	97443,90	3,89E-51
Resíduo	28	0,000742	2,65E-05		
Falta ajuste	8	0,000315	3,9326E-05	1,840517	1,28E-01
Entre níveis	9	2,582406			
Erro puro	20	0,000427	2,1367E-05		
Total	29	2,582834			

### ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA

	Coefic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	-0,000514	0,002030	-0,252929	0,802171	-0,004672	0,003645
Angular	0,020481	6,56E-05	312,160048	3,89E-51	0,020347	0,020616

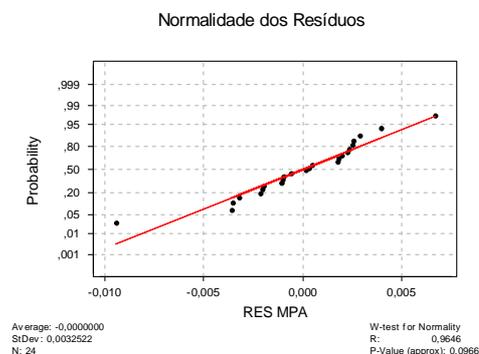
### DADOS AUXILIARES

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999856
R <sup>2</sup>	0,999713
R <sup>2</sup> ajustado	0,999702
Erro padrão	0,005148
n	30

Nível	Som. Yk	nk
1	0,308577	3
2	0,60652	3
3	0,91937	3
4	1,22062	3
5	1,53275	3
6	1,83001	3
7	2,13870	3
8	2,47656	3
9	2,74858	3
10	3,05610	3
Total	16,837787	30

**APÊNDICE M** - Análise de regressão da curva analítica de ácido micofenólico em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 6,0 para doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	C (µg/ml)	Abs.
34,4	6,20	0,18033
		0,17686
		0,17778
57,4	10,33	0,30293
		0,30305
		0,29969
80,4	14,46	0,42570
		0,41451
		0,42191
103,3	18,60	0,54651
		0,54639
		0,54425
126,3	22,73	0,67739
		0,66871
		0,67329
149,2	26,86	0,79788
		0,79593
		0,79180
172,2	30,99	0,91359
		0,91900
		0,91970
195,1	35,13	1,04120
		1,04090
		1,03720



### Teste de Durbin-Watson

DW = 2,01

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,27
Correlação negativa	> 2,73
Não correlacionados	{1,45-2,55}
Não conclusivo	{1,27-1,45} {2,55-2,73}

### Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe

Estatística	RES 1	RES 2
n	12	12
mediana	-7,82E-04	1,14E-03
dm	-7,33E-04	7,33E-04
SQD	6,31E-05	3,43E-05
Var	4,43E-06	
$t_L$	-1,706	
$t_{0,975}$	2,074	
p	0,1020	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

### ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	1,916121	1,916121	172911,00	2,38E-44
Resíduo	22	0,000244	1,11E-05		
Falta ajuste	6	0,000073	1,2129E-05	1,134760	0,386771
Entre níveis	7	1,916194			
Erro puro	16	0,000171	1,0689E-05		
Total	23	1,916365			

### ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA

	Coeffic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	-0,007569	0,001631	-4,640366	0,000126	-0,010952	-0,004186
Angular	0,029841	7,18E-05	415,825687	2,38E-44	0,029693	0,029990

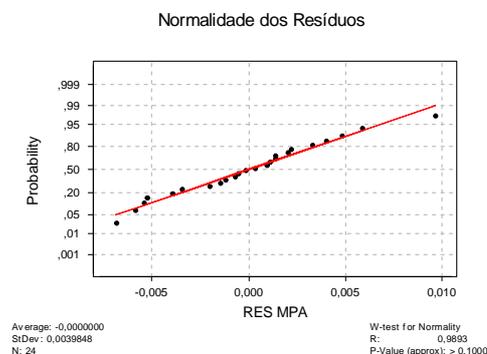
### DADOS AUXILIARES

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999936
R <sup>2</sup>	0,999873
R <sup>2</sup> ajustado	0,999867
Erro padrão	0,003329
n	24

Nível	Som. Yk	nk
1	0,53497	3
2	0,90567	3
3	1,26212	3
4	1,63715	3
5	2,01939	3
6	2,38561	3
7	2,75229	3
8	3,11930	3
Total	14,6165	24

**APÊNDICE N** - Análise de regressão da curva analítica de ácido micofenólico em tampão fosfato 0,05 mol/l pH 5,5 para doseamento por espectrofotometria no ultravioleta.

Nível (%)	C (µg/ml)	Abs.
34,4	6,20	0,18156
		0,18494
		0,18302
57,4	10,33	0,31083
		0,30809
		0,30715
80,4	14,46	0,42692
		0,43433
		0,43144
103,3	18,60	0,55562
		0,55715
		0,55216
126,3	22,73	0,67543
		0,67993
		0,67440
149,2	26,86	0,79779
		0,79506
		0,80538
172,2	30,99	0,91623
		0,91881
		0,91161
195,1	35,13	1,03260
		1,03420
		1,04040



### Teste de Durbin-Watson

DW = 1,50

Conclusão	Intervalos críticos
Correlação positiva	< 1,27
Correlação negativa	> 2,73
Não correlacionados	{1,45-2,55}
Não conclusivo	{1,27-1,45} {2,55-2,73}

### Teste de Levene modificado por Brown-Forsythe

Estatística	RES 1	RES 2
n	12	12
mediana	-3,77E-04	6,50E-04
dm	-1,44E-04	1,44E-04
SQD	3,38E-05	1,11E-04
Var	6,59E-06	
$t_L$	-0,274	
$t_{0,975}$	2,074	
p	0,7867	

Conclusão:  $t_L < t_{0,975}$ , as variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade).

### ANOVA PARA REGRESSÃO E TESTE DE DESVIO DE LINEARIDADE

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p
Regressão	1	1,868572	1,868572	112794,32	2,61E-42
Resíduo	22	0,000364	1,66E-05		
Falta ajuste	6	0,000175	2,9231E-05	2,473620	0,069180
Entre níveis	7	1,868747			
Erro puro	16	0,000189	1,1817E-05		
Total	23	1,868936			

### ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E SIGNIFICÂNCIA

	Coeffic.	EP	Stat t	p	LC 95% inf	LC 95% sup.
Linear	0,004236	0,001994	2,124068	0,045146	0,000100	0,008372
Angular	0,029469	8,77E-05	335,848649	2,61E-42	0,029287	0,029651

### DADOS AUXILIARES

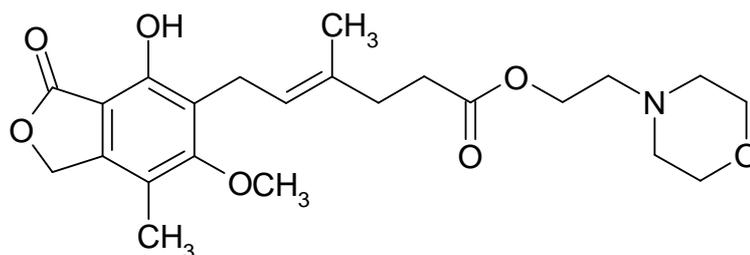
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999902
R <sup>2</sup>	0,999805
R <sup>2</sup> ajustado	0,999796
Erro padrão	0,004070
n	24

Nível	Som. Yk	nk
1	0,54952	3
2	0,92607	3
3	1,29269	3
4	1,66493	3
5	2,02976	3
6	2,39823	3
7	2,74665	3
8	3,10720	3
Total	14,71505	24

**APÊNDICE O** - Monografias de micofenolato de mofetila e micofenolato de sódio matéria-prima e comprimidos para Farmacopéia Brasileira.

## MICOFENOLATO DE MOFETILA

*Mycophenolas mofetil*



$C_{23}H_{31}NO_7$

433,50

115007-34-6

(4*E*)-6-(4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-1,3-di-hidroisobenzofuran-5-il)-4-metil-hex-4-enoato de 2-(morfolin-4-il)etila.

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo, 102,0% de  $(C_{23}H_{31}NO_7)$ , em relação à substância dessecada.

### DESCRIÇÃO

**Características físicas.** Pó cristalino branco ou quase branco.

**Solubilidade.** Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em acetona e ligeiramente solúvel em etanol anidro.

### Constantes físico-químicas

*Temperatura de fusão* (V.2.2): entre 93 °C e 94 °C.

## IDENTIFICAÇÃO

O espectro de absorção no infravermelho (V.2.14) da amostra, previamente dessecada, dispersa em brometo de potássio, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de micofenolato de mofetila SQR, preparado de maneira idêntica.

## ENSAIOS DE PUREZA

**Aspecto da solução.** Dissolver 0,10 g da amostra em etanol. A solução é límpida (V.2.25) e incolor (V.2.12).

**Substâncias relacionadas.** Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 250 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5  $\mu\text{m}$ ), mantida a 45 °C; fluxo da fase móvel de 1,5 ml/minuto. Preparar as soluções imediatamente antes do uso ou conservar entre 4 °C e 8 °C. Proteger as soluções da luz.

*Solução de trietilamina:* transferir 3 ml de trietilamina para balão volumétrico de 1 000 ml e completar o volume com água. Ajustar o pH para 5,3 com ácido fosfórico.

Fase móvel: mistura da solução de trietilamina e acetonitrila (65:35).

*Solução (1):* dissolver 20 mg da amostra em acetonitrila e diluir para 10 ml com o mesmo solvente.

*Solução (2):* diluir 1 ml da *solução (1)* para 100 ml com acetonitrila. Diluir 1 ml da solução resultante para 10 ml com acetonitrila.

*Solução (3):* dissolver 5 mg de micofenolato de mofetila para identificação dos picos SQR (micofenolato de mofetila contendo as impurezas A, B, D, E, F, G e H) em acetonitrila e diluir para 2,5 ml com o mesmo solvente.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 10  $\mu\text{l}$  de cada solução e registrar os cromatogramas por, no mínimo, três vezes o tempo de retenção do pico principal. Os tempos de retenção relativos ao pico do micofenolato de mofetila (pico principal) são cerca de 0,3 para impureza F, 0,4 para impureza A, 0,5 para impureza H, 0,6 para impureza G, 0,8 para impureza B, 1,2 para impureza D e 1,6 para impureza E. O teste somente será válido se o

cromatograma obtido com a *solução* (3) apresentar resolução de, no mínimo, 2,0 entre os picos da impureza A e da impureza H.

Para o cálculo do teor da impureza B, multiplicar a área do pico por 2,1. Em relação ao pico principal do cromatograma obtido com a *solução* (2): a área da impureza F não é maior que cinco vezes (0,5%); a área da impureza B não é maior que duas vezes (0,2%) e as áreas das impurezas A, D, E, G e H não são superiores (0,1%). Para qualquer outra impureza: a área da impureza não é superior à área do pico principal do cromatograma obtido com a *solução* (2) (0,1%). Total de impurezas: no máximo, sete vezes a área do pico principal do cromatograma obtido com a *solução* (2) (0,7%). Limite de exclusão: 0,5 vezes a área do pico principal do cromatograma obtido com a *solução* (2) (0,05%).

**Metais pesados** (V.3.2.3). Proceder conforme descrito em *Método II*. No máximo 0,002% (20 ppm).

**Perda por dessecação** (V.2.9). Determinar em 1 g da amostra, em estufa a 60 °C, sob pressão reduzida, por 3 horas. No máximo 0,5%.

**Cinzas sulfatadas** (V.2.10). Determinar em 1 g da amostra. No máximo 0,1%.

## DOSEAMENTO

Dissolver 0,22 g da amostra em 50 ml de ácido acético anidro e titular com ácido perclórico 0,1 M SV determinando o ponto final potenciométricamente. Realizar ensaio em branco e fazer as correções necessárias. Cada ml de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 43,350 mg de  $C_{23}H_{31}NO_7$ .

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

## ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

## CLASSE TERAPÊUTICA

Imunossupressor.

## MICOFENOLATO DE MOFETILA COMPRIMIDOS

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada  $C_{23}H_{31}NO_7$ . Os comprimidos podem ser revestidos.

### IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

### CARACTERÍSTICAS

**Determinação de peso** (V.1.1). Cumpre o teste.

**Dureza** (V.1.3.1). Cumpre o teste.

**Teste de desintegração** (V.1.4.1). Cumpre o teste.

**Uniformidade de doses unitárias** (V.1.6). Cumpre o teste.

*Procedimento para uniformidade de conteúdo.* Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta* (V.2.14). Transferir cada comprimido para balão volumétrico de 200 ml e adicionar 150 ml de HCl 0,1 mol/l. Agitar, mecanicamente, até desintegração e, após, em ultrassom por 15 minutos. Completar o volume com HCl 0,1 mol/l, homogeneizar e filtrar. Realizar diluições sucessivas até concentração de 0,0025% (p/V), utilizando HCl 0,1 mol/l como solvente. Preparar solução padrão nas mesmas condições. Medir as absorvâncias das soluções em 250 nm, utilizando HCl 0,1 mol/l para ajuste do zero. Calcular a quantidade de  $C_{23}H_{31}NO_7$  nos comprimidos, a partir das leituras obtidas.

### TESTE DE DISSOLUÇÃO

*Meio de dissolução:* ácido clorídrico 0,1 mol/l, 900 ml

*Aparelhagem:* pás, 50 rpm

*Tempo:* 15 minutos

*Procedimento:* após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir, se necessário, com ácido clorídrico 0,1 mol/l, até concentração adequada. Medir as absorvâncias em 250 nm (V.2.14), utilizando *meio de dissolução* para o ajuste do zero. Calcular a

quantidade de  $C_{23}H_{31}NO_7$  dissolvida no meio, comparando as leituras obtidas com a da solução de micofenolato de mofetila SQR na concentração de 0,0022% (p/V), preparada no mesmo solvente.

*Tolerância:* não menos que 80% (Q) da quantidade declarada de  $C_{23}H_{31}NO_7$  se dissolvem em 15 minutos.

## ENSAIOS DE PUREZA

**Substâncias relacionadas.** Proceder conforme descrito no método de *Doseamento*. Preparar as *soluções padrão e teste* como descrito a seguir.

*Solução teste:* pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade de pó equivalente a 25 mg de micofenolato de mofetila para balão volumétrico de 50 ml, adicionar 30 ml de *fase móvel* e deixar em ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com *fase móvel*, homogeneizar e filtrar.

*Solução padrão:* dissolver quantidade, exatamente pesada, de micofenolato de mofetila SQR na *fase móvel* e diluir adequadamente de modo a obter solução a 0,00025% (p/V).

*Procedimento:* injetar, separadamente, 25  $\mu$ l das *soluções padrão e teste*, registrar os cromatogramas por, no mínimo, três vezes o tempo de retenção do pico principal e medir as áreas dos picos. O tempo de retenção relativo ao pico do micofenolato de mofetila (pico principal) é cerca de 1,4 para o ácido micofenólico. Calcular, individualmente, as porcentagens das impurezas segundo a equação:

$$(C_p/C_t) \times (r_t/r_p) \times (1/F) \times 100$$

em que

$C_p$  = concentração, em mg/ml, de micofenolato de mofetila na *solução padrão*;

$C_t$  = concentração, em mg/ml, de micofenolato de mofetila na *solução teste*;

$r_p$  = resposta do pico de micofenolato de mofetila na *solução padrão*;

$r_t$  = resposta do pico de ácido micofenólico na *solução teste*;

F = fator de correção.

Utilizar 1,4 como fator de correção para o cálculo da porcentagem de ácido micofenólico e 1,0 para outras impurezas. No máximo 0,5% de ácido micofenólico e 0,1% para outras impurezas.

## DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 250 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 µm), mantida a 45 °C; fluxo da fase móvel de 1,5 ml/minuto. Preparar as soluções imediatamente antes do uso ou conservar entre 4 °C e 8 °C. Proteger as soluções da luz.

*Solução de trietilamina:* transferir 10 ml de trietilamina para balão volumétrico de 1 000 ml e completar o volume com água. Ajustar o pH para 3,0 com ácido fosfórico.

*Fase móvel:* mistura da *solução de trietilamina* e acetonitrila (70:30).

*Solução amostra:* pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade de pó equivalente a 25 mg de micofenolato de mofetila para balão volumétrico de 50 ml, adicionar 30 ml de *fase móvel* e deixar em ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com *fase móvel*, homogeneizar e filtrar. Diluir, quantitativamente, para obter uma solução com concentração conhecida de 0,05 mg/ml.

*Solução padrão:* dissolver quantidade, exatamente pesada, de micofenolato de mofetila SQR na *fase móvel* e diluir adequadamente de modo a obter solução a 0,05 mg/ml.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 25 µl das *soluções padrão* e *amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub> nos comprimidos a partir das respostas obtidas para as *soluções padrão* e *amostra*.

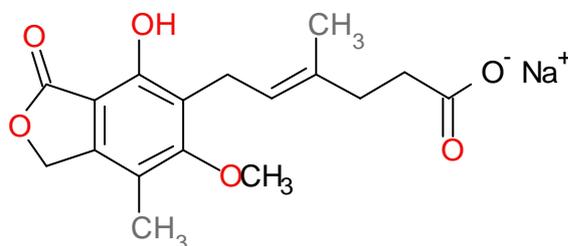
## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

## ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

**MICOFENOLATO DE SÓDIO**  
*Mycophenolas natrium*



$C_{17}H_{19}NaO_6$	342,32	37415-62-6
$C_{17}H_{20}O_6$	320,34	24280-93-1

Sal sódico de 6-(4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-5-ftalanil)-4-metil-4-ácido hexanóico.

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo, 102,0% de ( $C_{17}H_{19}NaO_6$ ), em relação à substância dessecada.

## DESCRIÇÃO

**Características físicas.** Pó cristalino branco ou quase branco.

**Solubilidade.** Facilmente solúvel em água, praticamente insolúvel em acetonitrila, pouco solúvel em etanol e solúvel em metanol. Praticamente insolúvel em ácido clorídrico 0,1 mol/l e facilmente solúvel em hidróxido de sódio 0,1 mol/l.

## Constantes físico-químicas

*Temperatura de fusão* (V.2.2): entre 189 °C e 191 °C.

## IDENTIFICAÇÃO

**A.** O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

**B.** A solução da amostra a 1,0% (p/V) em água responde às reações do íon sódio (V.3.1.1).

## ENSAIOS DE PUREZA

**Metais pesados** (V.3.2.3). Proceder conforme descrito em *Método II*. No máximo 0,002% (20 ppm).

**Perda por dessecação** (V.2.9). Determinar em 1 g da amostra, em estufa a 105 °C, por duas horas. No máximo 2,0%.

## DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 250 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 µm), mantida a 30 °C; fluxo da fase móvel de 1,5 ml/minuto.

*Fase móvel:* mistura de metanol e ácido fosfórico 0,05% (55:45).

*Diluyente:* mistura de metanol e água (55:45).

*Solução amostra:* transferir 22,5 mg da amostra, exatamente pesada, para balão volumétrico de 50 ml. Adicionar 30 ml de *diluyente*, agitar em ultrassom por 10 minutos e completar o volume com *diluyente*. Transferir 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml, completar o volume com *diluyente* e homogeneizar.

*Solução padrão:* dissolver quantidade exatamente pesada de ácido micofenólico SQR em metanol de modo a obter solução equivalente a 0,45 mg/ml de micofenolato de sódio. Transferir 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml, completar o volume com *diluyente* e homogeneizar.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 25 µl das *soluções padrão* e *amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular o teor de C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NaO<sub>6</sub> na amostra, a partir das respostas obtidas com as *soluções padrão* e *amostra*.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

## ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

## CLASSE TERAPÊUTICA

Imunossupressor.

## MICOFENOLATO DE SÓDIO COMPRIMIDOS COM REVESTIMENTO ENTÉRICO

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de ácido micofenólico ( $C_{17}H_{20}O_6$ ).

### IDENTIFICAÇÃO

**A.** O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

**B.** Pesar e pulverizar os comprimidos. Agitar quantidade do pó equivalente a 100 mg de micofenolato de sódio com 10 ml de água. Filtrar. Responde às reações do íon sódio (V.3.1.1).

### CARACTERÍSTICAS

**Determinação de peso** (V.1.1). Cumpre o teste.

**Dureza** (V.1.3.1). Cumpre o teste.

**Teste de desintegração** (V.1.4.1). Cumpre o teste.

**Uniformidade de doses unitárias** (V.1.6). Cumpre o teste.

### TESTE DE DISSOLUÇÃO

#### ETAPA 1

*Meio de dissolução:* ácido clorídrico 0,1 mol/l, 750 ml

*Aparelhagem:* pás, 50 rpm

*Tempo:* 120 minutos

*Procedimento:* após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Medir as absorvâncias em 250 nm (V.2.14), utilizando ácido clorídrico 0,1 mol/l para o ajuste do zero. Calcular a quantidade de  $C_{17}H_{20}O_6$  dissolvida no meio, comparando as leituras obtidas com a da solução de ácido micofenólico padrão, preparada conforme descrito a seguir. Pesar, exatamente, cerca de 11,25 mg de ácido micofenólico SQR, transferir para balão volumétrico de 50 ml. Dissolver e completar o volume com metanol. Diluir, sucessivamente, com ácido clorídrico 0,1 mol/l até concentração de 0,0018% (p/V).

*Tolerância:* não mais que 2% da quantidade declarada de  $C_{17}H_{20}O_6$  se dissolvem em 120 minutos.

## ETAPA 2

Após a retirada da alíquota da *Etapa 1*, adicionar 250 ml de tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 mol/l e ajustar o pH em cada cuba para 6,8 utilizando HCl 2 mol/l. Prosseguir com a dissolução por 45 minutos.

*Procedimento:* após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Medir as absorvâncias em 250 nm (V.2.14), utilizando mistura de ácido clorídrico 0,1 mol/l e tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 mol/l (3 : 1) para o ajuste do zero. Calcular a quantidade de  $C_{17}H_{20}O_6$  dissolvida no meio, comparando as leituras obtidas com a da solução de ácido micofenólico padrão, preparada conforme descrito a seguir. Pesar, exatamente, cerca de 11,25 mg de ácido micofenólico SQR, transferir para balão volumétrico de 50 ml. Dissolver e completar o volume com metanol. Diluir, sucessivamente, com a mistura de ácido clorídrico 0,1 mol/l e tampão fosfato de tampão fosfato de sódio tribásico (3 : 1) até concentração de 0,0018% (p/V).

*Tolerância:* não menos que 75% (Q) da quantidade declarada de  $C_{17}H_{20}O_6$  se dissolvem em 45 minutos.

## DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de micofenolato de sódio. Preparar as *soluções amostra e padrão* como descrito a seguir.

*Solução amostra:* transferir cinco comprimidos para balão volumétrico de 500 ml, adicionar 275 ml de metanol e deixar em ultrassom por 15 minutos. Completar o volume com água e filtrar. Realizar diluições sucessivas com *diluyente* até obter concentração de 0,036 mg/ml de ácido micofenólico.

*Solução padrão:* pesar, exatamente, cerca de 11,25 mg de ácido micofenólico SQR, transferir para balão volumétrico de 50 ml. Dissolver e completar o volume com metanol. Diluir, sucessivamente, com *diluyente* até a concentração de 0,036 mg/ml.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 25 µl das *soluções padrão* e *amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>) nos comprimidos a partir das respostas obtidas para as *soluções padrão* e *amostra*.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

## ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

---

## XII.4 TAMPÕES

### **Tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 mol/l**

Preparação – Dissolver 76,02 g de fosfato de sódio tribásico dodecahidratado em 1 000 ml de água.