

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**CARVEDILOL – ESTUDOS DE ESTABILIDADE E
PERFIL DE DISSOLUÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fibele Analine Lanzasova

Santa Maria, RS, Brasil

2007

CARVEDILOL – ESTUDOS DE ESTABILIDADE E PERFIL DE DISSOLUÇÃO

por

Fibele Analine Lazzanov

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Simone Gonçalves Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARVEDILOL – ESTUDOS DE ESTABILIDADE E
PERFIL DE DISSOLUÇÃO**

elaborada por
Fibele Analine Lazanova

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Simone Gonçalves Cardoso
(Orientadora)

Nadia Maria Volpato (UFRGS)

Ana Rita Breier (URI)

Santa Maria, 17 de dezembro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a meus pais, Alvino e Rita, pelo exemplo, amor, educação, oportunidades e principalmente pelo apoio em todos os momentos da vida.

Aos meus irmãos, Marco e Mastrângello, meu orgulho e admiração.

À Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica.

Ao Liberato Junior, pelo amor, amizade, atenção e companheirismo.

Às amigas e companheiras, Marcela, Rosi, Bianca, Silvia, Gabriela, Lisiane, Lutiane e Aline pela convivência, amizade e momentos de descontração.

Às minhas cunhadas, Virginia e Luciana, pela amizade e carinho.

À bolsista de iniciação científica Débora Argenta, pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Ao Prof. Sérgio Dalmora e aos funcionários do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, Vera, Verinha, Renato, Carmem, Rosecler e Silvana, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prati, Donaduzzi, em especial ao Controle de Qualidade, que possibilitou parte da execução deste trabalho.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

CARVEDILOL – ESTUDOS DE ESTABILIDADE E PERFIL DE DISSOLUÇÃO

AUTORA: FIBELE ANALINE LANZANOVA

ORIENTADORA: SIMONE GONÇALVES CARDOSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de dezembro de 2007.

O presente trabalho buscou avaliar a estabilidade da matéria-prima de carvedilol, bem como a liberação do fármaco *in vitro*, através de estudos de dissolução. No estudo de estabilidade foram utilizadas condições de estresse hidrolítico (em meio ácido, básico e neutro), oxidativo (com peróxido de hidrogênio) e fotolítico (sob luz ultravioleta), as quais foram avaliadas por cromatografia líquida (CL). Posteriormente, avaliou-se a cinética de degradação sob condições básica e oxidativa, onde se verificou maior degradação. O método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM) foi desenvolvido e validado. As amostras de comprimidos contendo carvedilol foram submetidas a estudo de estabilidade acelerada sob condições controladas de temperatura e umidade relativa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$, respectivamente) por seis meses e posteriormente avaliadas por CL-EM/EM e por espectrofotometria no ultravioleta (UV). Na avaliação da liberação do fármaco *in vitro*, as condições a serem utilizadas no teste de dissolução foram testadas durante o desenvolvimento e posteriormente otimizadas durante a validação. Testes físico-químicos como identificação, peso médio, dureza, friabilidade, doseamento, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e dissolução foram avaliados para verificar a intercambialidade farmacêutica entre amostras de comprimidos contendo carvedilol disponíveis no mercado.

Palavras-chave: Carvedilol, estabilidade, perfil de dissolução, comprimidos.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

CARVEDILOL – STABILITY STUDIES AND DISSOLUTION PROFILE

AUTHOR: FIBELE ANALINE LANZANOVA

ADVISER: SIMONE GONÇALVES CARDOSO

Presentation date: Santa Maria, December 17st 2007.

The aim of the present study was to evaluate the stability of the active principal ingredient of carvedilol, and the release of the drug in vitro, through studies of dissolution. In the stability study were used hydrolytic conditions of stress (in the acid, neutral and basic), oxidative (with hydrogen peroxide) and photolytic (under ultraviolet light). Later, assessed to the kinetics of degradation under different conditions by the liquid chromatography (LC) method. The liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated to indicate the molecular mass of formed compounds. The sample tablets containing carvedilol were subjected to accelerated study of stability under conditions of controlled temperature and relative humidity ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$, respectively) for six months and then evaluated by LC-MS/MS and ultraviolet spectrophotometry methods. In order to assess the in vitro release of the drug, the conditions to be used in the dissolution test were tested during development and then optimized during validation. Physico-chemical tests such as identification, weight variation, hardness, friability, assay, content uniformity, time of disintegration and dissolution were evaluated to check the possible replacement between samples of tablets containing carvedilol available on the market.

Keywords: Carvedilol, Stability, Dissolution Profile, Tablets

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do carvedilol.....15

FIGURA 2 – A) Cromatograma da solução de carvedilol após hidrólise básica com o respectivo gráfico da pureza do pico do produto 1. B) Cromatograma da solução de carvedilol após degradação oxidativa com os respectivos gráficos da pureza dos picos dos produtos 1 e 2.....80

ARTIGO CIENTÍFICO 4.1

FIGURE 1 – Chemical structure of carvedilol..... 43

FIGURE 2 – LC chromatograms of carvedilol. A) Chemical reference substance solution. B) After degradation in hydrochloric acid 1.0 N by refluxing at 90°C for 6 hours. C) After degradation in water for 6 hours. D) Methanolic solution of CAR after exposition to UV light for 7 days. E) After degradation in sodium hydroxide 1.0 N by refluxing at 90°C for 6 hours. F) After degradation in hydrogen peroxide 7.5% (v/v) at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), protected from light for 15 hours. Peak 1 – carvedilol, peak 2 and 3 – degraded forms.....44

FIGURE 3 – Representative LC-MS/MS chromatogram of carvedilol in tablets (1000 ng/mL)..45

FIGURE 4 – The full scan LC-MS spectra of carvedilol. A) Chemical reference substance solution: peak 1 - carvedilol. B) After degradation in hydrogen peroxide 7.5% (v/v) at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), protected from light for 15 hours.....46

FIGURE 5 – The Full Scan LC-MS spectra of product B: (A) Before exposition to accelerated stability. B) After accelerated stability for 6 months.....47

ARTIGO CIENTÍFICO 4.2

FIGURE 1 – Chemical structure of carvedilol.....69

FIGURE 2 – Dissolution profiles of carvedilol tablets in acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8, distilled water and 0.1M HCl, using paddle a stirring rate of 50 rpm.....70

FIGURE 3 – Dissolution profiles of carvedilol tablets in acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8, distilled water and 0.1M HCl, using paddle stirring rate of 75 rpm.....71

FIGURE 4 – Dissolution profile of products A, B and C in acetate buffer pH 4.5 using paddle a stirring rate of 50 rpm.....72

FIGURE 5 – Absorption spectrum of carvedilol reference substance (A) and placebo (B).....73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Cinética da degradação de carvedilol em meio básico.....81

ARTIGO CIENTÍFICO 4.1

TABLE 1 – Kinetics of degradation of oxidative solutions of carvedilol.....48

TABLE 2 – Inter-day precision data of LC-MS/MS for carvedilol in samples of pharmaceutical formulation.....49

TABLE 3 – Between-analysts precision data of LC-MS/MS for carvedilol in samples of pharmaceutical formulation.....50

TABLE 4 – Accuracy of LC-MS/MS for carvedilol in samples of pharmaceutical formulation.....51

TABLE 5 – Results from study of method robustness.....52

TABLE 6 – Stability accelerated of product A, B and C for the assay, by UV and LC-MS/MS methods.....53

TABLE 7 – Stability accelerated of product A, B and C for all parameters, except to the assay.....54

ARTIGO CIENTÍFICO 4.2

TABLE 1 – Results of physical evaluation of carvedilol tablets.....74

TABLE 2 – Results of assay, content uniformity and dissolution studies of three brands of carvedilol tablets.....75

TABLE 3 – Comparison of tablets dissolution profiles through the dissolution efficiency (DE).....	76
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	Amostra simulada de excipiente
CL	Cromatografia líquida
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-UV	Cromatografia líquida com detecção no ultravioleta
EM	Espectrometria de massas
ES	Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
N	Normalidade
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRM	Monitoramento de reação múltipla
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
r^2	Coefficiente de determinação
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopéia Americana
V	Volume
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	77
6 CONCLUSÕES.....	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam, na atualidade, o mais importante grupo de doenças, considerando a frequência com que ocorrem e o número de óbitos que provocam.

Relatórios da Organização Mundial da Saúde revelam que essas são responsáveis por 29,2% dos óbitos ocorridos no mundo (DAHLÖF, 2007). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são a causa de 27,4% dos óbitos registrados (IV Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial, 2004).

Os bloqueadores β -adrenérgicos têm recebido muita atenção clínica em virtude de sua eficácia no tratamento de distúrbios cardiovasculares. As diferenças mais importantes destes compostos relacionam-se com o grau de seletividade para os receptores β_1 -adrenérgicos e à presença de outras propriedades associadas (STROE & GHEORGHIADÉ, 2004).

No Brasil, carvedilol é o β -bloqueador de terceira geração disponível na forma de cápsulas, manipuladas em farmácias magistrais, e na forma de comprimidos. Existem atualmente, no mercado brasileiro, em torno de 35 apresentações disponíveis contendo o fármaco produzidas por oito diferentes laboratórios, nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5 e 25 mg.

O carvedilol exerce bloqueio múltiplo dos receptores adrenérgicos além de efeitos antioxidantes e antiproliferativos, o que é importante na deterioração progressiva da disfunção ventricular esquerda e da insuficiência cardíaca (BRISTOW et al., 2003).

A legislação vigente determina que os medicamentos comercializados devam cumprir com especificações que garantam segurança ao consumidor. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde a matéria-prima até o produto acabado e, posterior, vida de prateleira.

Nesse contexto, Ieggli (2005), desenvolveu e validou métodos para quantificação de carvedilol em comprimidos e cápsulas manipuladas por cromatografia líquida (CL), espectrometria por ultravioleta (UV), espectrometria de complexação e volumetria em meio não aquoso. Estudos de estabilidade são, no entanto, escassos na literatura e não existe, até o momento, método desenvolvido e validado para avaliar a liberação *in vitro* do fármaco.

Desse modo, o presente trabalho teve por objetivos dar continuidade aos estudos de controle de qualidade de carvedilol abrangendo estudos de estabilidade e método para perfil de dissolução. No estudo de estabilidade, foram empregados os métodos previamente desenvolvidos

e validados por CL e UV assim como o método por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM/EM) desenvolvido e validado, no presente trabalho. Para o perfil de dissolução, desenvolveu-se e validou-se método por UV. Posteriormente, os métodos foram utilizados para avaliar a intercambialidade de alguns produtos disponíveis no mercado.

Esta dissertação está apresentada na forma de artigos científicos. A partir dos resultados obtidos do estudo de estabilidade de carvedilol juntamente com o desenvolvimento e validação do método de quantificação de carvedilol em comprimidos por CL/EM-EM, elaborou-se o artigo científico intitulado “*LC and LC-MS evaluation of stress degradation behavior of Carvedilol*” (Artigo 1). Baseado nos resultados obtidos com o desenvolvimento e validação de método para dissolução de carvedilol em comprimidos por UV e juntamente com os resultados da intercambialidade farmacêutica de três formulações comerciais, elaborou-se o artigo científico intitulado “*Development and validation of a dissolution test with UV spectrophotometric analysis for carvedilol tablets and pharmaceutical quality evaluation*” (Artigo 2).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características físico-químicas

O carvedilol (Figura 1) está descrito como um sólido à temperatura ambiente e seus cristais são brancos ou quase brancos. É praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool, praticamente insolúvel em soluções ácidas, solúvel em dimetilformida, pouco solúvel em metanol e solúvel em clorofórmio. Quimicamente corresponde a (2RS)-1-(9H-Carbazol-4-iloxi)-3-[[2-(2-metoxifenoxi) etil]amino] propan-2-ol, $C_{24}H_{26}N_2O_4$, cuja massa molecular é 406,48 g/mol (BRITISH PHARMACOPEIA, 2007).

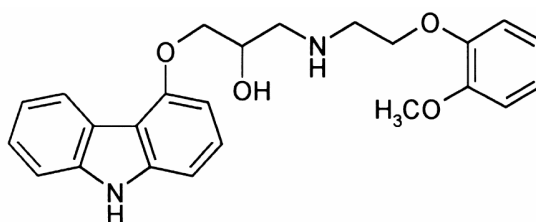


Figura 1 – Estrutura química do carvedilol

Os bloqueadores adrenérgicos são uma classe heterogênea de substâncias e suas diferenças mais importantes referem-se ao grau de seletividade para os receptores β_1 -adrenérgicos e a presença de propriedades associadas (BRISTOW et al., 1992).

Os agentes de segunda geração exercem bloqueio β_1 seletivo e não tem propriedades adicionais, como metoprolol, atenolol e bisoprolol. Não aumentam a resistência vascular periférica e são melhores tolerados em pacientes com insuficiência cardíaca. Contudo, pode induzir declínio do débito cardíaco e aumento das pressões de enchimento ventricular devido ao efeito inotrópico negativo, mesmo em tratamento de uso não prolongado (WAAGSTEIN et al., 1989).

Os agentes de terceira geração, bucindolol e carvedilol, são não seletivos e dotados de propriedades singulares, que podem ser importantes na tolerabilidade e eficácia em pacientes com insuficiência cardíaca (BRISTOW et al., 1992).

O carvedilol é um agente anti-hipertensivo com bloqueio não-seletivo β e α - adrenérgico (RUFFOLO et al., 1998), e tornou-se comercialmente disponível primeiramente na Bélgica em 1990. No Brasil, o primeiro registro comercial foi obtido pela indústria Asta Médica, em 1995, seguido pela indústria Smith-Klein, em 1997, e pela Roche, em 1999, a qual produz o medicamento referência na forma de comprimidos com nome comercial Coreg[®].

2.2 Ação farmacológica e indicações

O carvedilol é um agente β -bloqueador não-seletivo (a seletividade para os adrenoceptores β_1 e β_2 é moderada) com propriedades vasodilatadoras (redução da resistência vascular periférica) atribuídas ao bloqueio dos receptores α . É um fármaco racêmico, sendo que o bloqueio do receptor β pode ser atribuído ao enantiômero S(-), exercendo também uma atividade antioxidante. Os dois enantiômeros demonstram atividade bloqueadora do adrenoceptor α_1 , sendo maior pelo enantiômero R(+) (HOKAMA et al., 1999). Devido ao seu bloqueio β -adrenérgico, suprime o sistema renina-angiotensina-aldosterona, e a retenção hídrica é, portanto, uma ocorrência rara (CUBEDDU et al., 1987).

O fármaco atua como antioxidante e neutralizador de radicais oxigênio, protegendo as membranas cardíacas da peroxidação lipídica induzida pelos mesmos. Previne a depleção, induzida pelo estresse oxidativo, de vitamina E, glutatona e proteínas SH, preservando os principais sistemas antioxidantes endógenos (YUE et al., 1999).

É indicado para tratamento de hipertensão arterial, isoladamente ou em associação a outros agentes anti-hipertensivos, especialmente diuréticos tiazídicos. Também é utilizado no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca e em casos de angina de peito (DUNN et al., 1997).

2.3 Métodos de quantificação

A Farmacopéia Britânica (2007) disponibiliza monografia para o carvedilol na forma de matéria-prima. O método de quantificação indicado é a volumetria de neutralização em meio não aquoso, utilizando ácido perclórico 0,1M como titulante e ácido acético anidro como solvente,

com determinação potenciométrica do ponto final. Para comprimidos não foram disponibilizados, monografias farmacopéicas.

Diversos trabalhos relatam a determinação do carvedilol em fluidos biológicos por CL com diferentes tipos de detectores como: espectrofluorimétrico (VARIN et al., 1986; REIFF, 1987; EISENBERG et al., 1989; HOKAMA et al., 1999; BEHN et al., 2001; BEHN et al., 2001a; BEHN et al., 2001b; PTACEK et al., 2003; XIAO et al., 2005; PÉREZ et al., 2006; RATHOD et al., 2007; ZARGHI et al., 2007; MEDVEDOVICI et al., 2007; RAJESHWARI, et al. 2007), espectrofotométrico no UV (CLOHS & Mc ERLANE, 2001; SAITO et al., 2006) e eletroquímica (MACHIDA et al., 2003). Método por eletroforese capilar tem sido também relatado por CLOHS & Mc ERLANE, 2001.

Técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa encontram-se descritos na literatura para determinação de carvedilol e seus enantiômeros em plasma, por CL (CL/EM-EM) (YANG et al., 2004; BORGES et al., 2005; JEONG et al., 2007; WANG et al., 2007; LI et al., 2007; MCINTOSH et al., 2007) e em urina, por cromatografia gasosa (CG/EM-EM) (MYUNG & JO, 2005).

Outras técnicas, menos usuais e viáveis em laboratórios de controle de qualidade farmacêuticos, têm sido propostas para quantificação do carvedilol em matéria-prima, como a quimiluminometria (PIRES et al., 2005), e para determinação de carvedilol em comprimidos por voltametria diferencial de pulso (RADI & ELMOGY, 2005) e fluorimetria XU et al. (2005).

Devido à carência de métodos para determinação quantitativa do fármaco em formas farmacêuticas, Ieglli desenvolveu e validou métodos para determinação quantitativa do carvedilol em comprimidos e cápsulas manipuladas utilizando a CL, a espectrofotometria no UV, espectrofotometria de complexação (com iodo e de pareamento iônico com azul de bromotimol (BTB) e verde de bromocresol (BCG) e a volumetria em meio não-aquoso utilizando ácido perclórico como titulante (Ieglli, 2005; Ieglli et al., 2005; Ieglli et al., 2007).

2.4 Estudo de estabilidade

Nas últimas décadas o desenvolvimento de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos têm recebido especial atenção tanto pelos órgãos fiscalizadores quanto pelas

empresas produtoras. É dever do fabricante assegurar a qualidade dos produtos aos seus consumidores.

Estabilidade é definida como a capacidade do produto manter, dentro dos limites especificados, e por todo o período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características, que possuía no momento de sua fabricação, garantindo sua eficácia e segurança terapêutica (VADAS, 2000), desde que seja comprovada a não formação de produtos tóxicos ao organismo (CARSTENSEN, 2000). Sendo assim, os métodos indicativos de estabilidade são importantes para avaliar o comportamento do fármaco frente às condições adversas e durante o período de armazenagem, proporcionando, também, a separação e identificação de possíveis produtos de degradação.

As alterações podem ser rápidas ou lentas podendo levar à perda parcial ou total da atividade ou à formação de produtos cuja toxicidade é elevada. A partir dos dados obtidos com relação às modificações como, alterações de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco e presença de produtos de degradação é possível, com boa margem de segurança, estabelecer um prazo mínimo de validade, no qual a formulação será estável (CARSTENSEN, 2000).

Alguns guias e órgãos oficiais contendo diretrizes sobre a condução de estudos de estabilidade estão disponíveis atualmente, como International Conference on Harmonization – ICH. A literatura especializada recomenda que os testes de estabilidade devam consistir de duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados de estabilidade servem para identificar os fatores degradantes, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas. Esses testes são especialmente úteis nos casos em que não se tenham dados sobre os produtos de degradação. A obtenção do fármaco degradado permite controlar e escolher o método mais sensível de quantificação e de identificação dos produtos de degradação. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para propiciar informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos (ICH, 2003; KLICK et al., 2005).

O estudo de estabilidade em condições de estresse pode auxiliar na identificação de prováveis produtos formados e na avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco, estabelecendo possíveis rotas de degradação (ICH, 2003). O emprego de metodologia analítica adequada é essencial para identificação e separação dos produtos de degradação formados (SINGH & BAKSHI, 2000).

Antes de prever o tempo de estocagem de uma formulação é fundamental determinar a cinética de degradação de um fármaco sob condições cuidadosamente controladas. No entanto, a decomposição de fármaco frequentemente não segue esquemas simples de reação. Experimentalmente, pode-se monitorar a velocidade de decomposição de um fármaco pelo decréscimo de sua concentração com o tempo, ou alternativamente, pela dosagem do aparecimento de um dos produtos da decomposição (CARSTENSEN, 2000, FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Ieggli (2005), durante o desenvolvimento do método por CL, ao analisar o parâmetro especificidade sob condições de estresse hidrolítico e oxidativo, observou a formação de picos adicionais, sugerindo a formação de produtos de degradação. Nesse sentido, para complementar estes dados, planejou-se determinar a cinética de degradação do fármaco sob condições de degradação forçada, bem como sugerir, através do método por CL/EM, a massa molecular destes compostos.

Ressalta-se que os escassos estudos referentes à estabilidade do carvedilol que se encontram descritos na literatura não abordaram estudos cinéticos sob condições de degradação forçada, incluindo, basicamente, o desenvolvimento de métodos indicativos da estabilidade, como o método espectrofotométrico na região ultravioleta por Imran et al. (2006), proposto como indicativo de estabilidade para carvedilol e ezetimibe, tanto na forma pura como em formulações, em diferentes solventes. Stojanovi et al. desenvolveram e validaram métodos por CL para determinação de carvedilol e impurezas em comprimidos (2005) e para monitoramento da estabilidade fotoquímica de carvedilol e de seus produtos de degradação (2007).

Pokharkar et al. (2006) desenvolveram uma forma amorfa do carvedilol, que se apresentou estável quanto as suas propriedades físico-químicas quando comparada à sua forma cristalina.

2.5 Estudo de dissolução

Testes de dissolução *in vitro* são uma importante ferramenta de controle de qualidade em diferentes estágios de ciclo de vida de um medicamento. Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico são úteis para identificar variáveis críticas na produção,

escolher entre diferentes formulações, otimizá-las e fazer avaliações de risco, como o caso de fórmulas de liberação controlada (MARCOLONGO, 2003).

Por sua vez, o teste de dissolução constitui-se em procedimento importante na área farmacêutica, pois, para que o fármaco seja absorvido atingindo a circulação sistêmica, deve estar solubilizado. Nesse sentido, os estudos de dissolução são empregados não somente para garantir a qualidade lote-a-lote da forma farmacêutica sólida, mas também para avaliar etapas de produção e de desenvolvimento de novas formulações (FDA, 2003; DRESSMAN et al., 1998).

No desenvolvimento farmacotécnico permite a avaliação de novas formulações, a verificação da estabilidade e possibilita possível correlação *in vitro* – *in vivo*, dependendo da classificação biofarmacêutica do fármaco. Durante a fase de produção e controle de qualidade permite-se detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote (CONSIGLIERI et al., 2000).

Os estudos de dissolução *in vitro* são essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações, considerando também parâmetros importantes como: fármaco e a formulação, equipamento, meio de dissolução, temperatura e o método analítico. Para fármacos que não possuem monografia oficial, há também a necessidade de desenvolver testes de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* (NOORY et al., 2000; ROHRS, 2001; LAGACE et al., 2004).

Diferentes dosagens de um mesmo produto que apresentam perfis de dissolução semelhante, se existir estudo de bioequivalência que comprove a relação *in vitro-in vivo* de uma das dosagens, geralmente a mais alta, com produto de referência as demais podem ser registradas sem a necessidade de novos estudos *in vivo*, apresentando, assim, vantagens do ponto de vista ético, econômico e técnico (MARCOLONGO, 2003).

Para fármacos que não possuem monografia oficial existe necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS et al., 2002). A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 a 7,5) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo-in vitro* (MARQUES & BROWN, 2002).

O volume de meio a ser utilizado em um teste de dissolução depende da condição *sink*, que pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a 5 vezes o volume de meio

necessário para obter a solução saturada do fármaco. Entretanto, atualmente, se aceita que um volume de 3 a 10 vezes o necessário para saturação seja suficiente para manter as condições *sink*. Isto deve ser mantido para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES & BROWN, 2002).

A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir a avaliação da linearidade, precisão, exatidão e especificidade (USP 30, 2007).

Na literatura consultada não foi encontrado método para dissolução de carvedilol em formas farmacêuticas de uso oral. Nesse contexto, tornou-se necessário desenvolvê-lo, pois é uma ferramenta que fornece informações importantes e fundamentais tanto para a pesquisa e desenvolvimento, como na produção e controle de qualidade destas formulações.

2.6 Equivalência farmacêutica

A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos relaciona-se à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco (mesma base, sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa), na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro* (BRASIL, 2004).

A intercambialidade entre o genérico e seu respectivo medicamento de referência baseia-se no conceito da equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação da equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade (STORPIRTIS et al., 2004).

A legislação brasileira, tendo como base a regulamentação técnica e a experiência de diversos países na área de medicamentos genéricos, estabelece que para um medicamento ser registrado como genérico é necessário que se comprove sua equivalência farmacêutica e bioequivalência (mesma biodisponibilidade) em relação ao medicamento de referência indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2007)

O medicamento teste deve cumprir em sua totalidade com os requisitos farmacopéicos da monografia individual, inscrita na Farmacopéia Brasileira. No caso de utilização de algum outro código autorizado pela legislação vigente, os requisitos farmacopéicos da monografia devem ser

complementados com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente, para a forma farmacêutica em estudo. Na falta de monografia farmacopéica oficial, o estudo deve ser realizado utilizando-se método previamente desenvolvido e validado, complementando-se com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente (BRASIL, 2004).

Três diferentes especialidades contendo carvedilol (referência, genérico e similar) foram avaliados no intuito de avaliar sua intercambialidade. Como até o momento não existe monografia oficial, utilizou-se, para quantificação do fármaco o método por espectrofotometria na região ultravioleta desenvolvido e validado por Ieggli et al., (2005), por ser de fácil execução, e por ter custo relativamente baixo, complementando o estudo com os testes específicos para comprimidos, descritos nos métodos gerais da Farmacopéia Brasileira IV edição (1988).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudo de estabilidade sob condições de estresse e desenvolver e validar método para dissolução de comprimidos contendo carvedilol.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade de matéria-prima do carvedilol sob condições de hidrólise (ácida, básica e neutra), oxidativa e fotólise, utilizando o método por cromatografia líquida com detecção no UV.
- Avaliar a cinética de degradação das condições anteriores.
- Realizar estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de diferentes especialidades farmacêuticas.
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.
- Desenvolver e validar método para avaliar a dissolução de comprimidos.
- Realizar estudo de equivalência farmacêutica para avaliar a intercambialidade de diferentes especialidades farmacêuticas.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Artigo

LC and LC–MS evaluation of stress degradation behavior of Carvedilol

Fibele Analine Lazzanov¹, Débora Argenta¹, Marcela Zart Arend¹, Liberato Brum Junior² and Simone Gonçalves Cardoso^{3*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil*

²*Universidade Paranaense, Toledo, Brazil*

³*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil*

*Corresponding author. Phone/fax: + 55 (48) 37215066/37219350

E-mail address: simonegc@ccs.ufsc.br

Abstract

In the present study, forced and accelerated degradation studies of carvedilol (CAR) were carried out according to ICH guideline Q1A (R2). The drug was subjected to acid (1.0 N HCl), alkaline (1.0 N NaOH) and neutral hydrolytic conditions by refluxing at 90°C, as well as to oxidative (7.5% H₂O₂) decomposition, protected from light, at room temperature. Photolysis was carried out in solid state of drug and in methanolic solution. The stress degradation samples were evaluated by LC and LC–MS. The kinetics of degradation was determined by the LC method, previously development and validated for our group, that could separate the degradation products formed under various stress conditions. A LC-MS/MS method was developed and validated and was found to be precise, accurate, specific and selective. Tablets of CAR from three different batches (A,B,C) were subjected to climate chamber with 40°C ± 2°C and 75% ± 5°C relative humidity for 6 months to evaluate the stability under accelerated conditions. The samples were assayed by LC-MS/MS and UV methods. The weight variation, hardness, disintegration time, friability, content and dissolution test were also performed. The drug was relatively stable under acidic, neutral and photolytic stress conditions, but showed instability under alkaline and oxidative conditions. The LC–MS *m/z* values of the two products obtained under oxidative conditions were 224.3 and 283.3 daltons, respectively. The parameters of quality such as hardness, disintegration time and dissolution were influenced by humidity and temperature for product B.

Keywords: Forced degradation, Accelerated Stability, Carvedilol, LC-MS/MS Method, Tablets

1. Introduction

Carvedilol (CAR, figure 1) is an anti-hypertensive agent with non-selective α - and β 1 adrenergic receptor blocking activities. It is available as tablets formulations and has been used for the treatment of hypertension, ischemic heart disease and congestive hearth failure (1).

Stability testing provides evidence for the quality of the bulk drug and its final drug product when they are exposed to influence of environmental factors such as pH, temperature and humidity and includes long-term studies, where the product is stored at room temperature and humidity conditions, as well as accelerated studies where the product is stored under high heat and controlled humidity conditions. Forced degradation helps to determine the intrinsic stability of the molecule by establishing the degradation pathways (2).

Stability studies are linked to the establishment and assurance of safety, quality and efficacy of the drug product. In order to assess stability, the appropriate physical, chemical, biological and microbiological testing must be performed. One of the evaluation criteria is the appearance of impurities and degradations products (3).

The chemical and physical stability of CAR has been studied by some works in pharmaceutical formulations. Stability indicating ultraviolet spectroscopy methods were developed and validated for the determination of ezetimibe and CAR in pure form and their formulations (4). A reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was developed for separation of CAR and its impurities from tablets and for monitoring of the photochemical stability of CAR and its degradation products (5-6). A preparation of amorphous form of CAR and the study of its physico-chemical properties in comparison to pure drug was studied (7). Stability of CAR in an oral liquid veterinary preparation was performed (8) and for research and development of new pharmaceuticals formulations, some works were published (9-12).

The aim of the present study was to evaluate and to compare the stability of carvedilol under stress conditions, as well as to evaluate the physical and chemical stability of tablets under controlled temperature and relative humidity, according to ICH guidelines (2). The analyses were performed by liquid chromatography (LC) (13), liquid chromatography coupled with mass spectrometry methods (LC-MS/MS) and UV (14).

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

Carvedilol chemical reference substance (purity, 99.91%) was purchased by DEG (São Paulo, Brazil). The purity of the reference substance was evaluated by NMR¹³C, NMR¹H and DSC (data not shown). Carvedilol tablets were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified as product A, B and C:

Product A (brazilian reference product, Coreg®) – labeled to contain 25 mg of the drug and the following excipients: lactose, saccharose, magnesium stearate, povidone, crospovidone and colloidal anhydrous silica.

Product B (generic product) - labeled to contain 25 mg of the drug and the following excipients: lactose, microcrystalline cellulose, crospovidone, colloidal silicium dioxide and magnesium stearate.

Product C - labeled to contain 25 mg of the drug and the following excipients: lactose, microcrystalline cellulose, crospovidone, colloidal silicium dioxide and magnesium stearate.

Analytical reagent grade sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). LC grade acetonitrile,

methanol, formic, phosphoric and acetic acid was purchase from Tedia (Fairfield, USA). Ultra pure water, obtained from a Labconco Water Purification Unit (Missouri, USA)

2.2 Forced degradation studies

Forced degradation studies were carried out under the conditions of hydrolysis (acid, alkali and neutral), oxidation and photolysis, as defined by ICH Q1A (R2) (2) and the approach suggested by Singh and Bakshi (15), using CAR chemical reference substance at the concentration of 1 mg/mL solution (stock solution) for all degradation conditions. Acid and alkaline decomposition were performed by dissolving the drug in 1.0 N HCl and 1.0 N NaOH solutions, respectively. These solutions were refluxed at 90 °C for 6 hours. The studies in neutral conditions were conducted similarly (reflux, 90 °C, 6 hours) in water. Aliquots of hydrolytic degraded samples (one aliquot for each time) were neutralized, if necessary, diluted in mobile phase and filtered through 0.22 µm filter before making CL analysis. The oxidative studies were carried out with 7.5% (v/v) hydrogen peroxide, at room temperature (25 ± 2 °C) and protected from light, for a period of 15 hours. The photolytic studies were carried out by spreading the drug substance in solid state in a petri dish with a thickness of about 15 mm and in solution (dissolved in methanol) maintained in quartz cell. These samples were covered with parafilm and exposed for 7 days in photostability chambers with an overall illumination of UVC-254 nm 30W lamp (Philips, Holland). The distance between the lamp and the samples was 10 cm. The temperature into the chamber was controlled and kept always around 25 °C.

2.3 Methods

2.3.1 UV

Analysis of the degraded tablets were carried out using the method previously developed and validated by Ieggli et al., 2005 (14), following the conditions: A Shimadzu double-beam spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) model UV – 1601 PC, with a fixed slit width (2 nm) using 10 mm quartz cell. An amount of powder equivalent to 25 mg of CAR was placed in a 100 mL volumetric flask and about 5 mL of acetonitrile and 20 mL of ethanol were added. After shaking for 15 minutes, the volume was made up with ethanol and the solution was filtered through a quantitative paper filter (Schleicher & Schuell). Further dilution of the filtrate was made with ethanol in order to give a final concentration of 4.0 µg/mL. The absorbances were measured at 244 nm.

2.3.2 LC

Analysis of the degraded samples were carried out using the method previously validated by Ieggli, 2005 (13), following the conditions: a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an SCL-10A_{VP} system controller, LC-10 AD_{VP} pump, DGU-14A degasser, CTO-10A_{VP} column oven, SIL-10AD_{VP} autosampler and an SPD-M10A_{VP} photodiode array (PDA) detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.12 software program. The LC analysis was carried out on a reversed phase Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm I.D., with a particle size of 5 µm). A security guard holder (4.0 mm x 3.0 mm I.D.) was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at controlled-ambient temperature (25 °C) using a mobile phase of

phosphoric acid 0.1%, pH 3.0/acetonitrile (50:50, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL/min using photodiode array (PDA) detector at 241 nm. The injection volume was 10 μ L of solution containing 12.5 μ g/mL for both standard and samples. The chromatographic separation was obtained within 10 minutes.

2.3.3 LC-MS/MS

The LC-MS/MS method was performed on a Waters Alliance LC system (Milford, MA, USA). The peak areas were integrated automatically by computer using a Masslynx (v 4.1) software program. The experiments were carried out on a reversed phase Synergi Fusion (Phenomenex, Netherlands) C₁₈ column (50 mm x 4.6 mm ID, with a particle size of 4 μ m and pore size of 100 Å). A security guard holder (4.0 mm x 3.0 mm ID) was used to protect the analytical column. The LC system was operated isocratically at controlled temperature (40 °C) using a mobile phase of acetonitrile/acetic acid 0.1% (80:20, v/v). This was filtered through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA) and run at a flow rate of 1.0 mL/min (split 1:5). The injection volume was 20 μ L for both standard and samples. The triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA), model Quattro micro, equipped with an ESI source using a crossflow counter electrode run in positive mode (ESI+), was set up in multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions 406.7>100.3 for CAR. For the optimization of mass spectrometer conditions, a mixed standard solution (1000 ng/mL) containing CAR was directly introduced and the following parameters were selected: cone gas and desolvation gas set at 50 and 400 L/h, respectively. Capillary voltage, extractor voltage, RF lens voltage, source temperature and desolvation temperature were 3.90 kV, 2 V, 0.3 V, 120 °C and 400 °C, respectively. The dwell time was set at 0.5 seconds; the collision gas pressure (argon)

was 2.3×10^{-3} mbar. The cone voltage was 40 V and the collision energy was 30 eV. Data acquisition and analysis were performed using the software Masslynx (v 4.1) running under Windows XP on a workstation IBM PC.

2.4 Validation of the LC-MS/MS method

The LC-MS/MS method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and robustness, following ICH guidelines (16).

2.4.1. Specificity

The evaluation of specificity was performed by analyzing solutions of a placebo containing the same excipients of the commercial products in their usual concentration. The samples were chromatographed to determine the extent to which mobile phase components and excipients could contribute to the interference with the analyte.

2.4.2. Linearity and range

Linearity was determined by constructing three calibration curves. For the construction of each calibration curve seven standard concentrations of CAR in the range of 10 – 1500 ng/mL were prepared in acetonitrile/water (50:50, v/v). The peak area ratio of the drug against the respective standard concentrations was used for plotting the graph and the linearity evaluated by least squares regression analysis.

2.4.3. Precision

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of CAR (1000 ng/mL), using the product A, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on two different days (inter-days) and also by another analyst performing the analysis in the same laboratory (between-analysts), using the products A and C.

2.4.4. Accuracy

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the tablet excipients with known amounts of the drug, corresponding to the concentrations of 80, 100 and 120%. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

2.4.5. Limit of quantitation and limit of detection

The limit of quantitation (LOQ), was taken as the lowest concentration of analyte in a sample that can be determined with acceptable precision and accuracy, and the limit of detection (LOD), was taken as the lowest absolute concentration of analyte in a sample that can be detected but not necessarily quantified. These limits were calculated based on the ICH guideline (16).

2.4.6. Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same sample (1000

ng/mL) under a variety of conditions of the method parameters such as flow rate, column temperature, injection volume and changing the mobile phase composition.

2.5 Kinetics of degradation

The concentrations of the remaining CAR determined at the different time intervals of degradations studies were plotted in three different graphs, as follow: (a) concentrations values against time (zero-order kinetics), (b) log of concentration versus time (first-order kinetics) and (c) reciprocal of concentration versus time (second-order kinetics). The determination coefficients (r) were obtained and the best fit observed. Each experiment was done in triplicate (analyzed by LC method) and average values were taken for the analysis (17-18).

2.6 Accelerated Stability Samples

Samples of product A, B and C were stored for six months under accelerated conditions of temperature and humidity ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\text{ RH}$) in climatic chambers (Mecalor, Brazil) (2,19). The samples were analyzed monthly by UV (14) and LC-MS/MS. The weight variation, disintegration, hardness and friability tests, were performed according to Brazilian Pharmacopoeial (20), and the content uniformity and dissolution test by methods previously development and validated by the group.

3. Results and discussion

3.1 LC studies on the stressed solutions

Preliminary stability studies of CAR under acidic, alkali, neutral, oxidative and photolytic stress conditions were performed (Figure 2). No significant changes were observed after stress exposure of CAR in acid, neutral and photolytic (both solid state and methanolic solutions) conditions. On the other hand, the drug degraded gradually in alkali condition with time after 6 hours of reflux at 90 °C, forming additional resolved peaks at 10.67 minutes. CAR showed to be instable after exposure for 15 hours in 7.5% (v/v) hydrogen peroxide, at room temperature, with higher degradation. Two resolved peaks appeared at 6.22 and 9.31 minutes under this condition.

In the present work, the main observed degradation factor was the hydrogen peroxide. In the kinetics determination of the degradation, it was found that around 75% of CAR was degraded in 15 hours. The values of concentration, log of concentration and reciprocal of concentration of the remaining drug versus time are shown in Table 1.

Through the evaluation of the correlation coefficients, it can be concluded that the degradation of CAR under oxidative experimental conditions applied shows a second-order kinetics. The calculated second-order degradation rate constant was $k = 0.0021 \text{ min}^{-1}$.

3.2 Validation of LC-MS/MS method

To obtain the best chromatographic conditions different columns and mobile phases consisting of acetonitrile/water or methanol/water were tested to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Modifiers such as ammonium acetate, formic and acetic acid were tested. Acetic acid was selected because it was easily miscible with organic solvent and led to improve peak symmetry and ionization efficiency of CAR. The best signal was achieved using acetonitrile/acetic acid 0.1% (80:20, v/v) with a flow rate of 1.0 mL/min (split 1:5).

In the present study, electrospray (ESI) was used as the LC-MS/MS interface because the efficiency of ionization of CAR was higher than atmospheric pressure chemical ionization

(APCI). The mass spectrometric response of the analyte was measured by using selected reaction monitoring in which the mass spectrometer is tuned to several sets of ions (multiple reaction monitoring, MRM). In this method a set of precursor ion/product pairs was monitored. The protonated molecular ions $[M + H]^+$ of CAR observed on the full scan mass spectra were m/z 406.7. Moreover, the collision energy in Q2 produced significant fragments for CAR (100.3, 193.9 and 221.8). The MS/MS transition $406.7 > 100.3$ were selected since the ion scan product with m/z 100.3 presented a higher abundance and stability for the CAR. The fragmentation patterns for CAR is according to the literature (21).

The coupling of LC with MS/MS detection in the MRM mode showed high specificity because only the ions derived from the analyte of interest (CAR) were monitored, indicated that no interferences were detected from mobile phase and excipients of the formulation.

The linearity determined by three determinations of the concentrations in the range of 10-1500 ng/mL gave the determination coefficient of 0.9955. The obtained calibration curve was $y=369.11x + 12198$, where x is concentration and y is the peak area of the drug. These results indicating significant linearity of the calibration curve for the method.

The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope (369.11 ± 0.56) and the standard deviation of the intercept (352.27) of the independent curves, determined by a linear regression line. The LOD and LOQ calculated were 2.86 and 9.54 ng/mL, respectively.

A typical chromatogram obtained by the proposed LC-MS/MS method, with the resolution of the symmetrical peak corresponding to CAR in pharmaceutical formulation is shown in Figure 3. The low analysis time of 2.0 minutes allow a rapid determination of the drug, which is an important advantage for the routine analysis

The repeatability of the method was calculated as the RSD of six assays (of the product A) containing CAR in the same range of concentration (1000 ng/mL) performed on the same day

and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.58%. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation (product A and C) on two different days (inter-day, Table 2); the RSD values obtained for each sample were 0.48 and 0.51, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation (product A and C) by two analysts; the values were found to be 0.41 and 0.51%, respectively (Table 3).

The absolute means obtained for accuracy were 100.3, 98.9 and 99.0%, from different solutions containing 800, 1000 and 1200 ng/mL, respectively, with a mean value of 99.40% and RSD of 0.79% as shown in Table 4.

In order to assess the robustness, different parameters were evaluated: flow rate, column temperature, injection volume and changing the mobile phase composition. The results and the experimental range of the selected variables are given in Table 5, together with the optimized values. The obtained values demonstrated that the small variations do not affect the results, indicating that the method its reliability during routine analysis.

3.3 LC–MS studies on forced decomposition samples of carvedilol

The full scan LC-MS spectra of CAR reference standard and oxidated forms after 15 hours of degradation with 7.5% (v/v) hydrogen peroxide are shown in Figure 4.

According to the work by Stojanovic et al, 2007 (5-6) the method for monitoring the photochemical stability of carvedilol was purpose and when exposed to continuous daylight for 100 days at room temperature (25 °C), carvedilol showed to be relatively photostable. The compound 4-hydroxycarbazole was detected in the exposed sample by LC analysis and the impurity C– (2*RS*)-1-(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-3-(9*H*-carbazol-4-yloxy) propan-2-ol was not detected after this period under the described conditions. The (2*RS*)-1-[benzyl][2-(2-

methoxyphenoxy)ethyl]amino]-3-(9H-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol, has molecular mass of 496.60 and is denoted impurity C in the British Pharmacopoeia (BP). The 4-hydroxycarbazole with molecular mass of 183.21, is not mentioned in the BP and is used for the synthesis of CAR hence it can be supposed that it is a synthesis impurity (22-23).

In this paper, it was detected that basic and oxidative factors are really damaging the CAR and the products of degradation observed were different from those. The obtained m/z values in positive ESI mode were compared to the molecular mass of the known degradation products and to the impurities listed in drug monograph in the BP. The LC-MS m/z values of two oxidated forms have molecular mass of 224.3 and 283.3 daltons, respectively (Figure 4). Based on the molecular mass, none of the products have structures similar to the impurities studied by Stojanovic et al, 2007 (5-6).

3.4 Accelerated samples stability

In this study, two methods were employed to evaluate the CAR content after accelerated conditions ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\% \text{ RH}$) for 6 months: the proposed LC-MS/MS method and the UV method (14). No significant decomposition was observed for product A and C, while more than 10% decomposition occurred for product B (Table 6). According to full scan LC-MS spectra (Figure 5), additional peaks were not observed after exposition to temperature and humidity for 6 months. The values obtained from the two methods were compared statistically by the Student's t -test showing non-significant difference ($P > 0.05$) between the experimental results. As shown in Table 7, the results of weight variation, disintegration, hardness, friability, content uniformity and dissolution test of product A and C are in accordance with pharmacopoeial limits and specifications. However, the disintegration time and hardness value increased with time for

product C, while the dissolution rate had a slight decrease for this product. For product B, changes in the disintegration time, hardness value, uniformity content and dissolution rate were observed. According to ICH (2), where significant changes occurs at the accelerated condition the shelf-life would depend of on the outcome of stability testing at the intermediate conditions, as well as the long-term condition.

4. Conclusion

The stability of the carvedilol was investigated using UV, LC and LC-MS/MS procedures. These method permits detection and quantitation of carvedilol in the presence of its degradation products. The kinetic studies indicate that carvedilol undergoes fast degradation in 7.5% (v/v) hydrogen peroxide solution. The rate of oxidative medium followed was second-order kinetics. The results of the validation studies show that the LC-MS/MS method is specific, accurate and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients. Two degradation products at 224.3 and 283.3 daltons were observed by LC-MS analyses of the degraded solution of carvedilol. Moreover, the values obtained from the UV and LC-MS/MS and methods in the study of accelerated stability of tablets containing CAR were compared statistically by the Student's *t*-test showing non-significant difference ($P>0.05$) between the experimental results.

Acknowledgments

The authors thank FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support.

References

- (1) U. Abshagen, **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 10, S23–S32, 1987.
- (2) International Conferences on Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. 2003
- (3) Cong-jun Li, U. Prasad Kari, Lincoln A. Noecker, Stephen R. Jones, Andrew M. Sabo, Timothy J. McCormick, Sean M. Johnston. Determination of degradation products of squalamine lactate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 32, 85-96, 2003.
- (4) Imran, M., Singh, RSP, et al. Stability indicating ultraviolet spectroscopic method for the estimation of ezetimibe and carvedilol. **Pharmazie.** 61, 766-769, 2006.
- (5) Stojanovic, J., Vladimirov, S, et al. Determination of carvedilol and its Impurities in Pharmaceuticals. **Chromatographia.**, 62, 539–542, 2005.
- (6) Stojanovic, J., Vladimirov, S, et al. Monitoring of the photochemical stability of carvedilol and its degradation products by the RP-HPLC method. **J Serb Chem Soc** 72, 37-44, 2007.
- (7) Varsha B. Pokharkar, Leenata P. Mandpe, Mahesh N. Padamwar, Anshuman A. Ambike, Kakasaheb R. Mahadik, Anant Paradkar. Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. **Powder Technology** 167, 20–25, 2006.

- (8) Gordon, SG, Boothe, DM, Gaudette, VA, et al. Stability of carvedilol in an oral liquid preparation. **J Vet Intern Med.** 20, 795-795, 2006.
- (9) Agnihotri, SA, Aminabhavi, TM. Development of novel interpenetrating network gellan gum-poly(vinyl alcohol) hydrogel microspheres for the controlled release of carvedilol. **Drug Dev Ind Pharm.** 31, 491-503, 2005.
- (10) Carvedilol base solid medicinal form. Akrikhin **Pharmaceutical Chem Combine.**
- (11) Egalet, A. et al. Controlled release composition used for treating e.g. hypertension comprises active substance at least partially is in amorphous form, polymer and optionally stabilizing agent. Patents.
- (12) Egalet, A. et al. Controlled release composition used for treating e.g. pain comprises polymeric matrix and coating having opening exposed at surface of matrix. Patents.
- (13) Ieggli, C.V. *Carvedilol – Desenvolvimento e validação de Métodos de Análise*; Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Santa Maria.** 2005, 93 pp.
- (14) Ieggli, C.V.S.; Cardoso, S.G.; Belle, L.P. Validation of UV spectrophotometric and nonaqueous titration methods for the determination of carvedilol in pharmaceutical formulations. **J. AOAC Int.** 88, 1299–1303, 2005.

- (15) Monika Bakshi, Saranjit Singh. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 28, 1011–1040, 2002.
- (16) International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Methodology (ICH-Q2B), November, 2005.
- (17) N. S. Nudelman, Estabilidad de Medicamentos, El Ateneo, Buenos Aires, 1975.
- (18) CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug stability – Principles and practices, third edition, New York, Marcel-denker, Inc, 2000.
- (19) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 ago. 2005.
- (20) Brazilian Pharmacopeia, 4ed. 1988.
- (21) Borges, N.C.C.; Mendes, G.D.; Silva, D.O.; Rezende, V.M. Barrientos-Astigarraga, R.E.; De Nucci, G. Quantification of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence study. **J. Chromatogr. B**. 822, 253-262, 2005.

(22) Boris A. Czeskis, William J. Wheeler. Synthesis of β_3 adrenergic receptor agonist LY377604 and its metabolite 4- hydroxycarbazole, labeled with carbon-14 and deuterium. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**. 48, 407 – 419, 2005.

(23) British Pharmacopoeia, International Edition, HMSO, London, 2007.

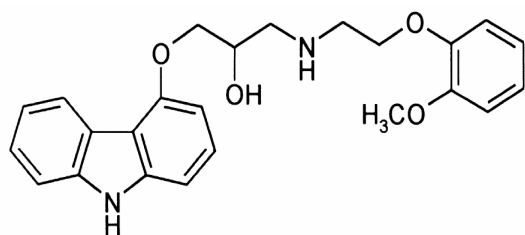


Figure 1. Chemical structure of carvedilol.

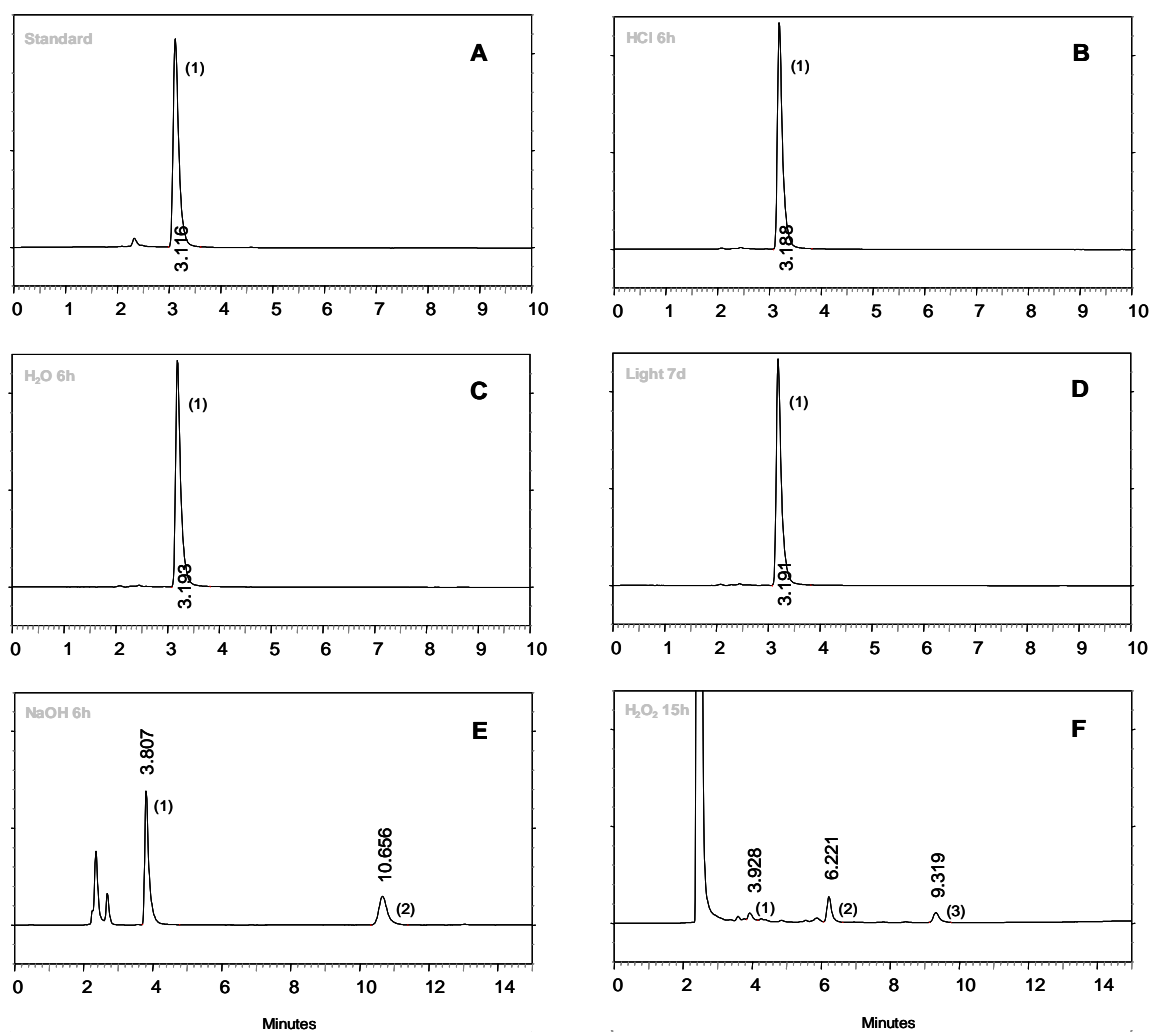


Figure 2. LC chromatograms of carvedilol. A) Chemical reference substance solution. B) After degradation in hydrochloric acid 1.0 N by refluxing at 90°C for 6 hours. C) After degradation in water for 6 hours. D) Methanolic solution of carvedilol after exposition to UV light for 7 days. E) After degradation in sodium hydroxide 1.0 N by refluxing at 90°C for 6 hours. F) After degradation in hydrogen peroxide 7.5% (v/v) at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), protected of light for 15 hours. Peak 1 – carvedilol, peak 2 and 3 – degraded forms.

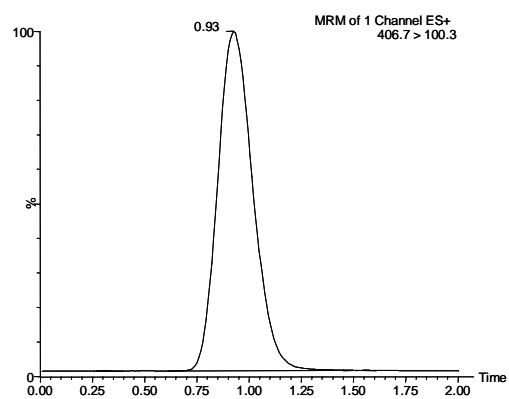


Figure 3. Representative LC-MS/MS chromatogram of carvedilol in tablets (1000 ng/mL).

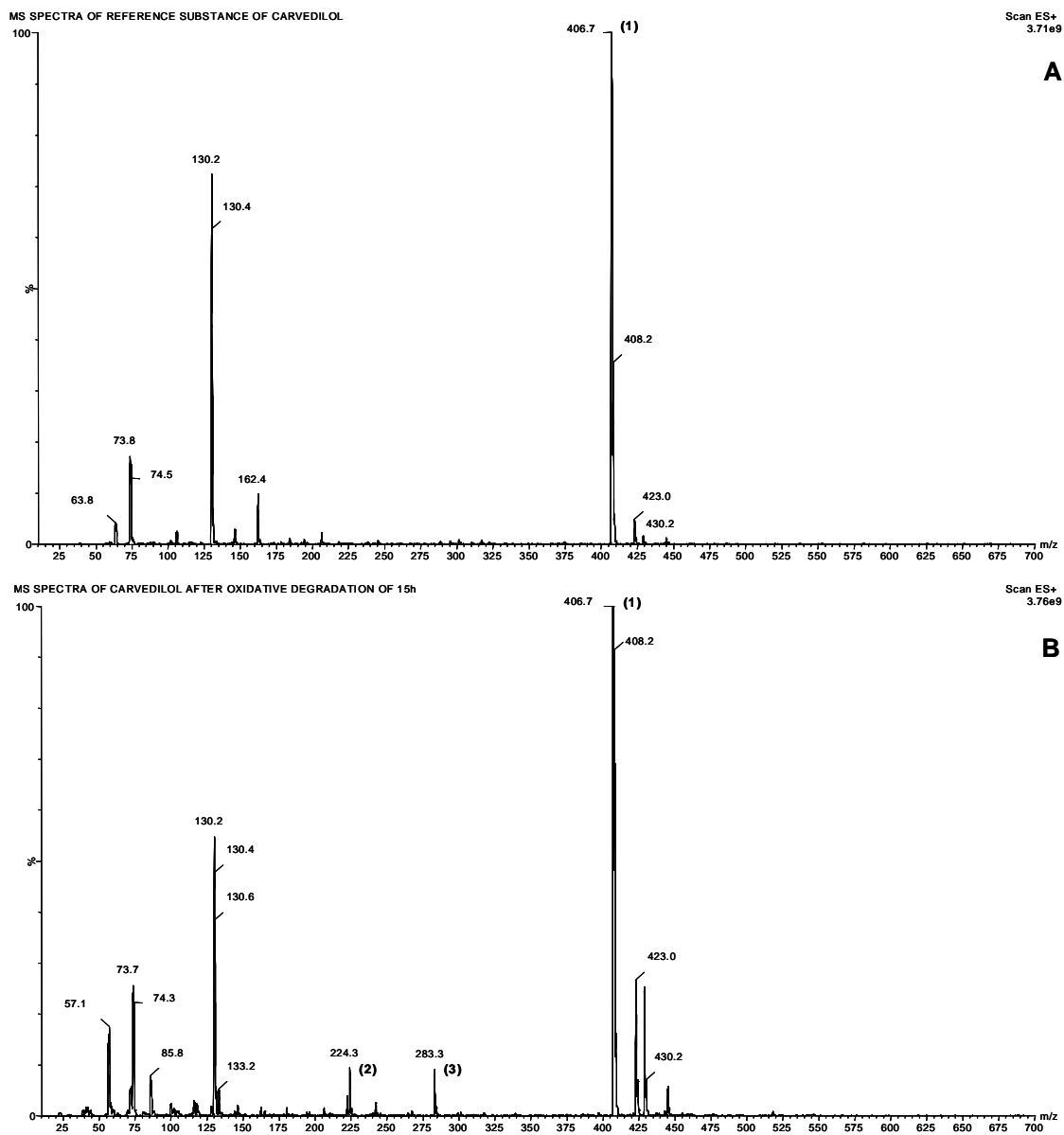


Figure 4: The full scan LC-MS spectra of carvedilol. A) Chemical reference substance solution: peak 1 - carvedilol. B) After degradation in hydrogen peroxide 7.5% (v/v) at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), protected from light for 15 hours.

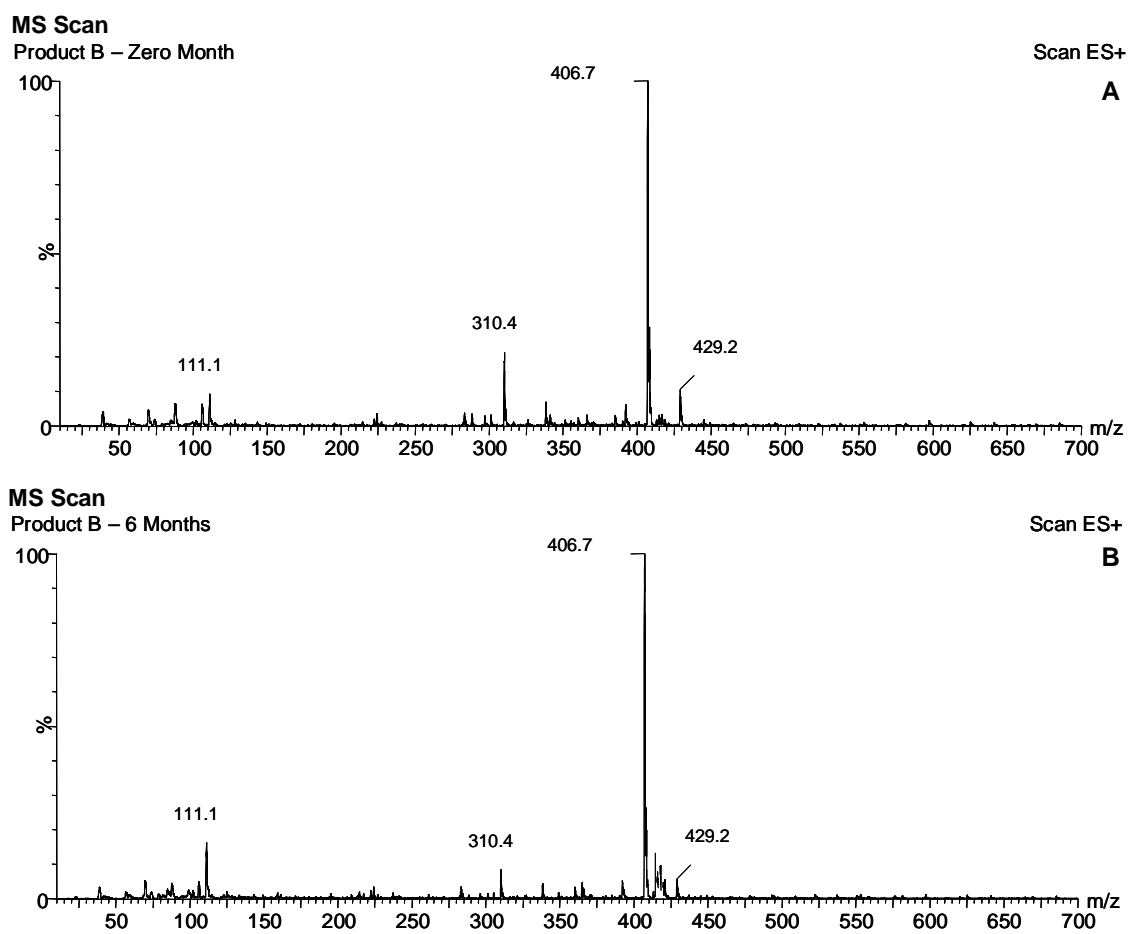


Figure 5: The full scan LC-MS spectra of product B. A) Before exposition to accelerated stability ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\text{ RH}$). B) After accelerated stability for 6 months.

Table 1. Kinetics of degradation of oxidative solutions of carvedilol.

Time (hours)	Concentration of carvedilol ($\mu\text{g/mL}$)	log concentration	1/Concentration
0	12.50	2.00	0.0100
1	11.74	1.97	0.0106
2	8.93	1.85	0.0140
3	8.32	1.82	0.0150
4	7.28	1.77	0.0172
5	6.37	1.71	0.0196
15	3.03	1.38	0.0413
<i>r</i>	0.8254	0.9611	0.9970

Values of correlation coefficients, *r*, for three reaction orders.

Table 2. Inter-day precision data of LC-MS/MS for carvedilol in samples of pharmaceutical formulation.

Sample	Day	Recovery ^a (%)	Mean ^b	RSD ^c (%)
A	1	98.8	99.2	0.48
	2	99.5		
C	1	98.6	98.9	0.51
	2	99.3		

^a Mean of three replicates^b Mean of two days^c RSD = Relative standard deviation

Table 3. Between-analysts precision data of LC-MS/MS for carvedilol in samples of pharmaceutical formulation.

Sample	Analyst	Recovery ^a (%)	Mean ^b	RSD ^c (%)
A	1	98.0	97.8	0.41
	2	97.5		
C	1	98.7	98.3	0.51
	2	97.9		

^a Mean of three replicates^b Mean of two analysts^c RSD = Relative standard deviation

Table 4. Accuracy of LC-MS/MS for carvedilol in samples of pharmaceutical formulation.

Nominal Concentration (ng/mL)	Mean concentration found ^a (ng/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)
800	802.4	1.18	100.3
1000	988.6	0.47	98.9
1200	1188.5	0.94	99.0

^a Mean of three replicates^b RSD = Relative standard deviation

Table 5. Results from of method robustness study.

Conditions	Tablets	
	% (mean \pm sem) ^a	RSD (%)
Recommended conditions ^b	99.6 \pm 0.4	0.6
Mobile phase,	75:25	99.1 \pm 0.2
acetonitrile:acetic acid 0.1%	85:15	101.3 \pm 0.1
Column temperature (°C)	35	98.8 \pm 0.3
	45	98.8 \pm 0.2
Flow rate (mL/min)	0.8	98.1 \pm 0.1
Split 1:5	1.2	97.7 \pm 0.5
Injection volume (μ L)	10	99.2 \pm 0.4
	30	98.8 \pm 0.7

^a Sem is the standard error of the mean

^b The recommended chromatographic conditions were acetonitrile:acetic acid 0.1% 80:20 (v/v) as mobile phase, Synergi Fusion C₁₈ column, column temperature of 40 °C, 1 mL/min flow rate (split 1:5) and 20 μ L of injection volume

Table 6. Stability accelerated of product A, B and C for the assay, by UV and LC-MS/MS methods.

Month	Assay (%)					
	LC-MS/MS ^a			UV ^a		
	A	B	C	A	B	C
0	99.1	98.1	99.9	98.6	100.5	99.7
1	100.2	99.5	99.3	99.1	98.5	101.0
2	98.9	95.4	98.2	96.8	98.0	98.9
3	98.8	99.5	100.0	97.9	98.7	99.7
4	99.7	99.0	99.5	96.9	96.6	98.9
5	97.7	88.1	100.3	95.7	87.4	99.0
6	99.4	86.3	98.5	95.1	82.9	96.0

^aMean of three determinations

Table 7. Stability accelerated of product A, B and C for all parameters, except to the assay.

Parameters	0 month			6 months		
	A	B	C	A	B	C
Weight variation ^a (mg)	81.5	98.5	120.4	82.1	99.7	120.6
Disintegration ^b (min.:sec)	2:50	1:00	0:44	3:00	10:0	3:05
Hardness ^c (N)	51.5	80.0	40.4	53.8	117.4	62.2
Friability ^d (%)	0.23	0.04	0.14	0.27	0.03	0.18
Content Uniformity (%) (n=10) ^e	97.9-105.4	94.7-106.2	102.7-107.9	94.9-105.4	82.8-83.5	95.7-102.6
Dissolution (%) (n=6) ^f	94.8	91.5	97.0	96.7	81.1	90.8

N = Newton

Specifications: ^aMean \pm 7,5%, ^bmaximum 30 minutes in water, ^c minimum 30 N, ^dmaximum 1.5%, ^evariation: 85-115 % and relative standard deviation \leq 6%,
^f%dissolved: \geq 85% in 60 minutes in buffer acetate pH 4.5

4.2 Artigo

Development and validation of a dissolution test with UV spectrophotometric analysis for carvedilol tablets and pharmaceutical quality evaluation

Fibele Analine Lazzanov¹, Débora Argenta¹, Marcela Zart Arend¹, Liberato Brum Junior² and Simone Gonçalves Cardoso^{3,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

²Universidade Panaraense, Toledo, Brazil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

*Corresponding author. Phone/fax: + 55 (48) 37215066/37219350

E-mail address: simonegc@ccs.ufsc.br

Abstract

The aim of the present work was to develop and validate a dissolution method for *in vitro* carvedilol evaluation in tablets, as well as to evaluate the biopharmaceutical quality of some commercial tablets formulations containing this drug through physical and physical-chemical studies. For medium and paddle speed selection, a dissolution media/agitation screen was performed. The chosen dissolution conditions were: acetate buffer pH 4.5 (900 mL) maintained at 37.0 ± 0.5 °C, as medium, using a paddle apparatus at a stirring rate of 50 rpm. The drug release was evaluated by UV spectrophotometric method, at 235 nm. The method was validated according to ICH and USP and the parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy were evaluated, giving results within the acceptable range. The comparative studies of tablets obtained from three brands, denominated A, B and C, showed satisfactory results in the following tests: weigh variation, disintegration, hardness, friability, assay, content uniformity and dissolution test. However, the comparison of the obtained dissolution profiles, realized by DE, showed that the profiles were not similar for tablets of products A, B and C.

Keywords: Dissolution test, Carvedilol, Tablet dosage forms, Validation

1. Introduction

Carvedilol (CAR, figure 1) is an anti-hypertensive agent with non-selective β - and α_1 adrenergic receptor blocking activities. It is available as tablets formulations and has been used for the treatment of hypertension, ischemic heart disease and congestive hearth failure (1). CAR is a racemic compound, and the nonselective β -blocking activity resides mainly in the (*S*)-CAR, while the α -blocking activity is shared by (*R*) and (*S*)-enantiomers. There is a crescent number of works describing the determination of CAR in biological fluids (2-6) and pharmaceutical formulations (7-10) by several methods. The official method for the assay of CAR in bulk form is non-aqueous titration (11). However, no official monograph is available for CAR pharmaceutical formulations and there is no dissolution test for tablets reported in the literature.

The importance of the dissolution rate studies is based on the fact that for a drug to be absorbed and available to the systemic circulation, it must previously be solubilized. Therefore, the dissolution studies are used not only to assess batch-to-batch consistency of drug release from solid dosage forms, but they are also essential in several stages of formulation development, for screening and proper assessment of different formulations (12-13). Moreover, the *in vitro* dissolution studies are relevant to the prediction of *in vivo* performance of the products. Studies on the bioavailability of drugs from a given dosage form revealed that, in many situations, various dosage forms with the same content of the active compound did not give the same therapeutic effect. This is ascribed to differences in physical characteristics of the active compound, in formulation factors or in technological processes used by different manufacturers, therefore, resulting in different bioavailability profiles (13). Recently, the development of dissolution test has been aim of several works, mainly for drugs that do not possess official monographs (14-19).

The aims of the present work were to develop and validate a dissolution method with UV spectrophotometric analysis for CAR tablets formulation, as well as to evaluate the quality of tablets obtained from three different brands of 25 mg CAR tablets.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

CAR chemical reference substance (CAR CRS) (purity, 99.91%) was purchased by DEG (São Paulo, Brazil). The purity of the reference substance was evaluated by NMR¹³C, NMR¹H, DSC and mass spectrometry (data not shown). CAR tablets were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified as product A, B and C:

Product A (reference product, Coreg®) – labeled to contain 25 mg of the drug and the following excipients: lactose, saccharose, magnesium stearate, povidone, crospovidone and colloidal anhydrous silica.

Product B (generic product) - labeled to contain 25 mg of the drug and the following excipients: lactose, microcrystalline cellulose, crospovidone, colloidal silicium dioxide and magnesium stearate.

Product C - labeled to contain 25 mg of the drug and the following excipients: lactose, microcrystalline cellulose, crospovidone, colloidal silicium dioxide and magnesium stearate.

Acetonitrile, ethanol, hydrochloric and acetic acid were purchased from Tedia (Fairfield, USA). Ultra-pure water was obtained from a Labconco Water Purification Unit (Missouri, USA). Sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate monobasic and sodium acetate were

obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All the other chemicals used were the analytical grade.

2.2. Instrumentation

The dissolution test was performed in a Nova Ética dissolution test system, model 299 multi-bath (n=6), in accordance with the United States Pharmacopoeia general method (20). The mediums were vacuum degassed under house vacuum and were maintained at $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by using a thermostatic bath. The drug release percent (DR%) was assayed by UV spectrophotometry, using a double-beam UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan) model UV – 1601 PC, with a fixed slit width (2 nm) using 10 mm quartz cell. The Field-Lab Schott potentiometer was used to determine the pH of all solutions.

2.3 Dissolution test conditions

CAR sink conditions were determined using an amount of drug equivalent a three times of the dose in the pharmaceutical formulation in 900 mL of acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8, distilled water and 0.1M HCl. The CAR stability in these mediums was evaluated for 24 hours at room temperature (protected from light) and kept at $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 2 hours. Two different filters (quantitative filter Schleicher & Schuell, Germany and $0.45 \mu\text{m}$ cellulose acetate membrane filter, Phenomenex, USA) were tested to evaluate some interference. The sample solutions were prepared using a placebo added of an amount of reference standard equivalent to 25 mg of CAR in 900 mL of dissolution medium. The reference substance and sample solutions were filtered using the above filters and the results were compared to those obtained with centrifuged (two minutes at 5000 rpm) samples. Dissolution studies on three

commercially available products of CAR were conducted using paddle (USP apparatus 2). Drug release tests were carried out according to conventional dissolution procedures recommended for single-entity products (13, 21), in 900 mL of different mediums such as acetate buffer pH 4.5 (50 and 75 rpm), phosphate buffer pH 6.8 (50 and 75 rpm), distilled water (50 and 75 rpm) and 0.1 M HCl (50 and 75 rpm) for 60 minutes. At each sample time interval (5, 10, 15, 20, 30, 40 and 60 minutes, for the development of the methodology and 5, 10, 15, 30 and 60 minutes, for the dissolution studies), an exact volume of the sample was withdrawn from each flask and immediately replaced with an identical volume of fresh medium to maintain a dissolution sink condition. Samples aliquots were filtered, dilute to 5.55 µg/mL with dissolution medium and analyzed by UV spectrophotometric method. The cumulative percentage of drug released was plotted against time, in order to obtain the release profile and to calculate the *in vitro* dissolution data ($n=12$).

2.4 Validation of the method

The UV spectrophotometric method used to analyze the CAR samples in acetate buffer pH 4.5 dissolution medium was validated for specificity, linearity, precision and accuracy, according to USP (20) and ICH guideline (22). All absorbances were determined at 235 nm.

2.4.1 Specificity

The evaluation of specificity was performed by analyzing solutions of a placebo containing the same excipients of the commercial products in their usual concentration (these concentrations were determined based in Handbook of Pharmaceutical Excipients) (23) dissolved in 900 mL of the dissolution medium, stirred at 50 rpm for 30 minutes.

2.4.2 Linearity

A CAR CRS stock solution containing 50 µg/mL was prepared in dissolution medium. Aliquots of this solution were diluted with dissolution medium to obtain standard solutions at concentrations of 1, 3, 5, 7, 9 and 11 µg/mL. The calibration curves were prepared on three different days. Linearity was evaluated by linear least-square regression analysis and by ANOVA statistical analysis.

2.4.3 Precision

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration (5.55 µg/mL) sample of CAR tablets (product A), on the same day (intra-day precision), under the same experimental conditions (900 mL of dissolution medium paddle, rotate at 50 rpm, 30 minutes). The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days precision). The intra and inter-days precision were expressed as relative standard deviation (RSD).

2.4.4 Accuracy

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the tablet excipients with known amounts of the CAR CRS, corresponding to the concentrations of 10, 100 and 150%, which were subjected to dissolution test conditions described in the specificity test. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

2.5 Analysis of pharmaceutical tablet dosage forms

CAR tablets were compared on the basis of weight variation, disintegration, hardness, friability (24), assay, content uniformity and dissolution test. The quantitation of CAR in tablet dosage forms were carried out by the UV spectrophotometric method previously validated in our laboratory (8). The dissolution profiles were compared through the dissolution efficiency (DE). The DE was calculated from the area under the dissolution curve at time (measured using the trapezoidal rule) and expressed as a percentage of the area of the rectangle described by 100% dissolution in the same time (25).

3. Results and discussion

The most widely used *in vitro* test available to determine the release rate of drug products is the dissolution test, which is used widely by the pharmaceutical industry and regulatory agencies to assure the quality of drug products (13). A dissolution test with a good precision makes it possible to efficiently compare different alternative formulation candidates to select the dosage form with the most suitable and reproducible drug release profile (26). The *in vitro* studies in this paper were performed using different dissolution conditions. CAR solubility and stability data were used as the basis for the selection of a dissolution medium. The drug was dissolved in acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8, distilled water and 0.1M HCl, and was stable at least 24 hours at room temperature and two hours at 37.0 ± 0.5 °C in these mediums, indicating that drug can be evaluated with precision during all the analysis time in these mediums. The filter evaluation is necessary to determine if it could be used in the dissolution test without adsorption of the drug and that removes insoluble excipients that may otherwise cause high background or turbidity (27). The quantitative and 0.45 μm cellulose acetate filters showed recoveries between 98–102%, while the values obtained from centrifuged

sample solution was less than 85 %. Due to low cost of quantitative filter when compared to 0.45 μm cellulose acetate membrane filter, the first was chosen to be used in dissolution test in the different dissolution mediums.

The dissolutions test conditions were selected based on a screening study performed with product A (reference product), using USP apparatus 2 (paddle) at the stirring speeds of 50 (Figure 2) and 75 rpm (Figure 3). The dissolution of CAR was rapid and essentially complete within 30 minutes in acetate buffer pH 4.5 medium stirred at 50 rpm, and this condition was chosen to carry out the dissolution tests for CAR products (A, B and C) containing 25 mg. The comparison of the dissolution profiles for these products allowed to observe the difference between the formulations (Figure 4). Based in the above results the selected dissolution test conditions were considered satisfactory and discriminative. It was also observed that a percent release was $> 80\%$ in 30 minutes for all products.

The percent CAR release in the dissolution selected medium was evaluated by the UV spectrophotometric method, which was validated. The specificity analysis revealed the UV spectrophotometric method did not suffer interference by the formulation excipients, once the components did not have significant absorbance at 235 nm (Figure 5).

The linearity of CAR response was evaluated from 1-11 $\mu\text{g/mL}$ range that showed good correlation coefficient (0.999), with a slope of 0.094 and a y-intercept of 0.0032. The analysis of variance (ANOVA) showed significant linear regression and no significant linearity deviation ($P > 0.05$), indicating that the method is linear for CAR.

The precision was evaluated through repeatability (precision intra-day) and intermediate precision (precision inter-day). The repeatability demonstrated small RSD for the determinations of CAR analyzed in the same day (1.31%). The RSD for intermediate precision was 1.69%. These results can demonstrate the good precision of the method for dissolution test. In the

dissolution profile the RSD obtained at the earlier time points, up to 15 minutes, were within 6.9% (acceptable < 20%) and the other time points within 2.3% (acceptable < 10%) (n=12) (28).

Samples at 10, 100 and 150 % of the nominal assay concentration were prepared for accuracy test, and the percent found recoveries were, respectively, 95.97, 97.43 and 101.30%, with a mean value of 98.23% and RSD of 2.8%. According to Marques (2002), the recovery must to be in the range of 95–105% of the reference standard weight (17), so it is evident that the method is accurate within the desired range.

Comparative evaluations of pharmaceutical formulations are routinely used in Quality Control (QC). The focus in QC is batch to batch consistency and detection of manufacturing deviations. For QC purposes, the test should be designed to demonstrate that the dosage forms were manufactured according to specifications and all critical manufacturing steps result in a consistent product (29). The analysis of pharmaceutical tablets dosage forms of CAR were compared on the basis of physical parameters (weight variation, disintegration, hardness, friability) and physical-chemical parameters (assay, content uniformity and dissolution test).

The results of weight variation, disintegration, hardness and friability tests are in accordance with pharmacopoeial limits for all marketed products (Table 1). Moreover, the results obtained in the assay, content uniformity and dissolution studies (Table 2) were satisfactory for assuring the QC and safety and therapeutic efficacy of the batches. The comparison of dissolution profiles was performed using the dissolution efficiency (DE) and was calculated for all products (Table 3). The analysis of variance of the DE values shows that the profiles were not similar ($F_{\text{calc}} = 12.33 > F_{\text{crit}} = 3.33, P > 0.05$). The Tukey test showed that products A and C were significantly different from product B, but product A was not significantly different from product C. The difference between the evaluated products could change their bioavailability, and it is necessary to carry out *in vivo* studies to guarantee their bioequivalence.

4. Conclusion

A dissolution test with UV spectrophotometric analysis was developed and validated for CAR tablets. Satisfactory results were obtained with acetate buffer pH 4.5 (900 mL) maintained at 37.0 ± 0.5 °C, as medium, using a paddle apparatus at a stirring rate of 50 rpm. The % drug delivery was higher than 80% in 30 minutes for all evaluated products. The analysis of variance of values showed that the dissolution profiles among the products A, B and C were not similar ($P < 0.05$). The validated UV spectrophotometric method was successfully applied for dissolution studies, demonstrating the advantages of very rapid time of analysis and the relatively low cost for the routine quality control. The analysis of three brands of CAR tablets were performed and the results of weight variation, disintegration, hardness, friability, assay, content uniformity and dissolution test of all products comply with pharmacopoeial limits.

Acknowledgments

The authors thank FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support.

References

- (1) U. Abshagen, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10 (1987) S23–S32.
- (2) P. Ptacek, J. Macek, J. Klima, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 405–410.
- (3) N.C.C. Borges, G.D. Mendes, D.O. Silva, V.M. Rezende, R.E. Barrientos- Astigarraga, G.D. Nucci, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 253–262.
- (4) S.W. Myung, C.-H. Jo, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 70–77.
- (5) R. Gannu, V.V. Yamsani, Y.M. Rao. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 30 (2007) 1677 – 1685.
- (6) A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati, A. Khoddam, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 250–253.
- (7) J. Stojanovic, V. Marinkovic, S. Vladimirov, D. Velickovic, P. Sibinovic, *Chromatographia.* 62 (2005) 539–542.
- (8) C.V.S. Ieggli, S.G. Cardoso, L.P. Belle, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1299-1303.
- (9) J. Stojanovi, S. Vladimirov, V. Marinkovi, D. Velikovi, P. Sibinovi. *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (2007) 37–44.

- (10) S.G. Cardoso, C.V.S. Ieggli, L.P. Belle, *Pharmazie*. 62 (2007) 34-37.
- (11) *British Pharmacopoeia, International Edition*, HMSO, London, 2007.
- (12) S. Furlanetto, F. Maestrelli, S. Orlandini, S. Pinzauti, P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 159-165.
- (13) V.P. Shah, L.J. Lesko, J. Fan, N. Fleischer, J. Handerson, H. Malinowski, M. Makary, L. Ouderkirk, S. Roy, P. Sathe, G.J.P. Singh, L. Tillman, Y. Tsong, R.L. Williams. *Dissolution Technol.* 4 (1997) 15–22.
- (14) J. Menegola, M. Steppe, E. E.S. Schapoval, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 524-530.
- (15) J. S. Space, A. M. Opio, B. Nickerson, H. Jiang, M. Dumont, M. Berry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 1064–1071.
- (16) A. R. Breier, C. S. Paim, M. Steppe, E. E. S. Schapoval, *J. Pharm. Sci.* 8 (2005) 289-298.
- (17) M. Fronza, L. B. Junior, M. Wrasse, T. Barth, S. L. Dalmora, *Acta Farm. Bonaerense*. 25 (2006) 117-122.
- (18) M. D. Malesuik, S. C. Cardoso, L. Bajerski, E. R. Dorigoni, F. A. Lanzasova, *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 27 (2006) 37-49.

- (19) M. Ansari, M. Kazemipour, J. Talebnia. *Dissolution Technologies*. 11 (2004) 16-24.
- (20) The United States Pharmacopeia, Rockville USA, 30rd ed., 2006.
- (21) J.W. Moore, H.H. Flanner. *Pharm. Technol.* 20 (1996) 64-74.
- (22) ICH, Guideline on Validation of Analytical Procedure. International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2005.
- (23) A. Wade, P. J. Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd ed., 1994.
- (24) *Brazilian Pharmacopeia*, 4ed. 1988.
- (25) K. A. Khan. *J. Pharm. Pharmacol.* 27 (1975) 48-49.
- (26) C. Noory, N. Tran, L. Ouder Kirk, V. Shah, *Dissolution Technol.* 7 (2000).
- (27) The United States Pharmacopoeia, *Pharmacopeial Forum* 30 (2004) 351–363.
- (28) *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, 2003.
- (29) S. Azarmi, W. Roac, R. L'obenberg, *Int. J. Pharm.* 328 (2007) 12–21.

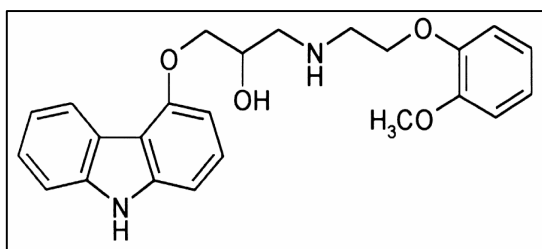


Figure 1. Chemical structure of carvedilol.

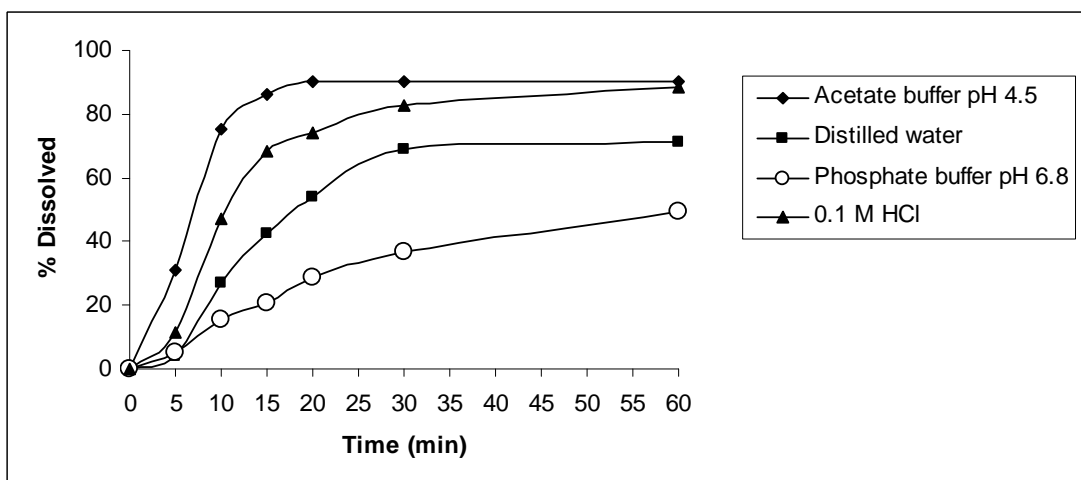


Figure 2. Dissolution profiles of carvedilol tablets in acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8, distilled water and 0.1M HCl, using paddle a stirring rate of 50 rpm.

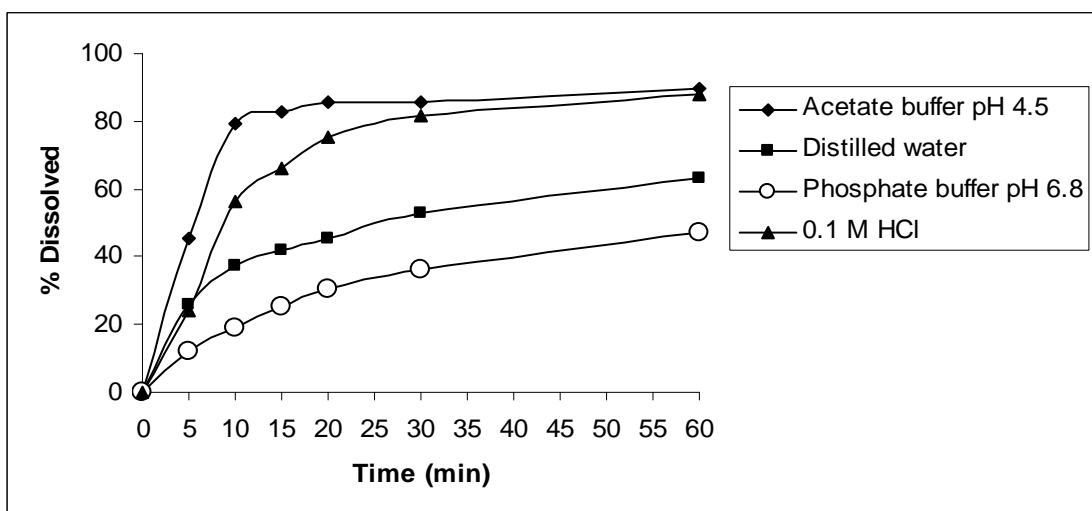


Figure 3. Dissolution profiles of carvedilol tablets in acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8, distilled water and 0.1M HCl, using paddle a stirring rate of 75 rpm.

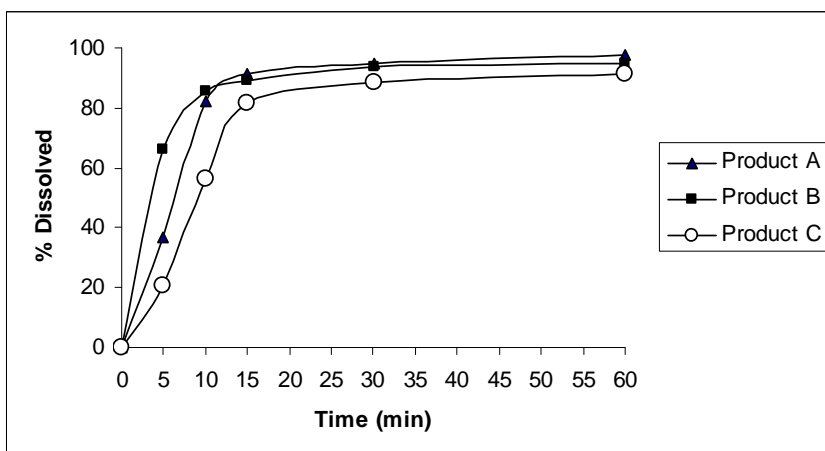


Figure 4. Dissolution profile of products A, B and C in acetate buffer pH 4.5 using paddle a stirring rate of 50 rpm.

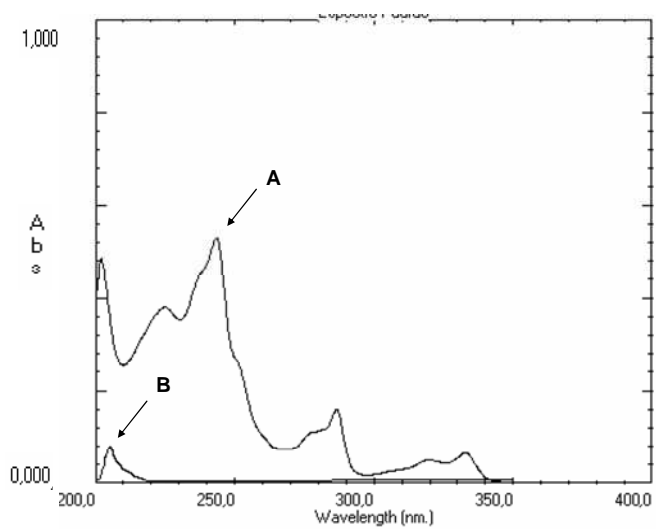


Figure 5. Absorption spectrum of carvedilol reference substance (A) and placebo of Brazilian reference product (B).

Table 1. Results of physical evaluation of carvedilol tablets.

Product	Weight variation ^a (mg) (Mean \pm SD)	Disintegration ^b	Hardness ^c (N)	Friability ^d (%)
A	81.5 \pm 1.25	2 min 50 sec	51.45	0.23
B	120.4 \pm 1.50	44 sec	40.37	0.14
C	98.5 \pm 1.93	1 min	80.03	0.04

SD = Standard deviation

N = Newton

Brazilian Pharmacopeial Specifications: ^aMean \pm 7,5%, ^bmaximum 30 minutes in water, ^c minimum 30 N, ^dmaximum 1.5%

Table 2. Results of assay, content uniformity and dissolution studies of thee brands of carvedilol tablets.

Product	Assay		Content Uniformity		Dissolution	
	(n=3)		(n=10)		(n=6)	
	%	RSD%	% ^a	RSD% ^b	%	RSD%
A	98.64	0.60	97.90 – 105.4	2.30	94.78	2.26
B	99.70	0.15	102.70 – 107.9	1.61	97.03	1.59
C	105.5	0.56	94.72 – 106.2	3.43	91.47	1.19

RSD% = Relative standard deviation

Specifications: ^a 85-115 %, ^b ≤ 6%

Table 3. Comparison of tablets dissolution profiles through the dissolution efficiency (DE).

	Product		
	A	B	C
DE%	85.13	80.06	85.87
SD	1.09	5.18	1.04
RSD%	1.28	6.47	1.22

SD = Standard deviation

RSD% = Relative standard deviation

5 DISCUSSÃO

Os avanços na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para sua avaliação.

Atualmente, existe grande variedade de métodos analíticos que podem ser utilizados no controle de qualidade de rotina. No entanto, a sua escolha deve ser feita de maneira criteriosa, levando-se em conta os objetivos da análise a ser efetuada. A identidade e pureza da amostra a ser analisada, o grau de precisão e exatidão a serem obtidos, a disponibilidade de reagentes e equipamento, e o custo total da análise são fatores que também devem ser considerados.

A espectrofotometria é um dos métodos instrumentais de maior simplicidade em termos de execução e custo, já que os solventes e equipamentos necessários possuem um custo relativamente baixo, além da rapidez de execução das análises. Porém, métodos espectrofotométricos possuem a desvantagem de não serem específicos, no caso de substâncias com estruturas químicas semelhantes. Já os métodos cromatográficos possuem a desvantagem de serem mais onerosos, uma vez que requerem equipamentos e reagentes de maior custo, além de necessitarem de um tempo maior para a realização das análises e analistas devidamente treinados. No entanto, tais métodos permitem que seja realizada a avaliação de possíveis interferentes, como impurezas e produtos de degradação.

A cromatografia líquida, especialmente com detecção no UV, tem sido amplamente empregada em análises farmacêuticas, devido à resolução, precisão e exatidão significativas. A CL acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM), constitui-se em técnica de identificação e caracterização de componentes em misturas complexas de amostras, sendo amplamente adotada na pesquisa clínica, na determinação de fármacos em matrizes biológicas e estudos de estabilidade. Atualmente está sendo usada de modo crescente para análise de matéria-prima e produtos farmacêuticos, pois oferece eficiência na quantificação, alta especificidade e sensibilidade, diminuindo o tempo de ensaio (NIESSEN, 2003; KORFMACHER, 2005).

Os métodos analíticos são, assim, fundamentais para a identificação, quantificação, avaliação da estabilidade e estudos de dissolução de produtos farmacêuticos.

Em relação ao carvedilol verificou-se que existem alguns estudos referentes a desenvolvimento de métodos para análise quantitativa bem como para avaliação de impurezas e não há, até o momento, referências para estudo de dissolução para comprimidos contendo este

fármaco, justificando a realização do presente trabalho. Os resultados obtidos permitiram a elaboração de artigos científicos, sendo que a discussão apresentada a seguir baseia-se nos dois artigos elaborados, referenciados adequadamente, no texto correspondente.

5.1 Estudo de Estabilidade

De acordo com os conceitos internacionais, um medicamento deve ser eficaz, seguro e ter as características de qualidade conforme definido no registro. Por isso, os estudos de estabilidade são considerados necessários para avaliar a capacidade de um produto farmacêutico manter suas propriedades físicas, químicas, microbiológicas e terapêuticas até o término de seu prazo de validade, em uma determinada formulação em uma embalagem específica (KOMMANABOYNA & RHODES, 1999).

Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um fármaco. Essas alterações podem ser de natureza extrínseca – quando dependem de fatores externos às substâncias – ou intrínseca – devido à natureza química da substância (CARSTENSEN, 2000).

Avaliando-se a estrutura química de uma substância química, pode-se ter um indicativo das possíveis alterações que a mesma pode sofrer. Fármacos que contenham na sua molécula grupos funcionais como ésteres, amidas, imidas e outros são suscetíveis de sofrerem hidrólise em meio aquoso ou por ação da umidade. Moléculas que apresentam na sua estrutura grupamentos alcoólicos, fenólicos, ligações duplas e triplas podem sofrer oxidação. Compostos contendo grupos cromóforos como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações são mais sensíveis a radiações luminosas. Neste caso a sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número destes cromóforos na molécula, especialmente se estes estiverem conjugados, permitindo a interação dos elétrons livres. Isomerização, racemizações, rearranjos, oxidações e rupturas de ligações estão entre as mais importantes catalisadas pela luz (NUDELMAN, 1975; CONNORS et al., AMIDON & STELLA, 1986; HACKAMNN, 1991; CARSTENSEN, 2000).

Uma das finalidades de um estudo de estabilidade é determinar se o princípio ativo permanece intacto em relação à dosagem inicial. O método a ser utilizado deve, assim, diferenciar entre o princípio ativo intacto e seu eventual produto ou produtos de degradação (SINGH & BAKSHI, 2002).

No presente trabalho, amostras da matéria-prima de carvedilol foram submetidas a testes de degradação forçada, sob condições hidrolíticas, oxidativas e fotolíticas, utilizando os esquemas propostos por Singh & Bakshi (2000), conforme condições apresentadas no ARTIGO 4.1. Nesta etapa foram utilizados os métodos por CL, previamente desenvolvidos e validados pelo grupo (IEGGLI, 2005; IEGGLI et al., 2005), bem como o método CL-EM/EM desenvolvido e validado, conforme apresentado no ARTIGO 4.1. A cromatografia líquida possibilitou a separação e quantificação de carvedilol e seus diferentes produtos de degradação através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como coluna, fase móvel e método de detecção (detector de arranjo de diodos – DAD). Conforme demonstrado na figura 2 do ARTIGO 4.1, verificou-se que após a hidrólise ácida e neutra, assim como na fotólise, não houve degradação do carvedilol. A concentração do fármaco nestas condições permaneceu praticamente inalterada (diminuição máxima de 5% da concentração inicial), durante todas as determinações nos tempos estabelecidos, não tendo sido detectados picos adicionais. No entanto, conforme a figura 2 do ARTIGO 4.1, tanto na hidrólise básica quanto na condição oxidativa, houve decréscimo da concentração do carvedilol em relação à concentração inicial e também se verificou a formação de picos adicionais. Estes picos encontraram-se bem resolvidos em relação ao pico do carvedilol. Além disso, utilizando o DAD, verificou-se que os picos cromatográficos dos possíveis produtos de degradação permaneceram com elevada pureza em todas as determinações (Figura 2).

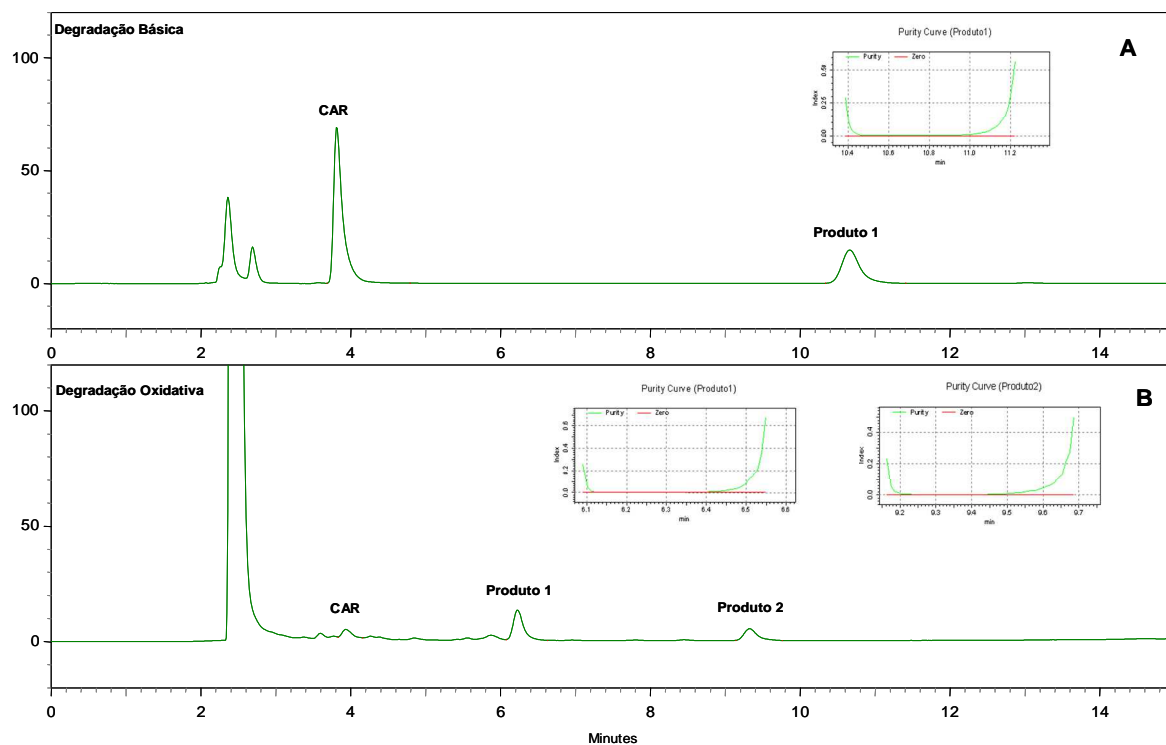


Figura 2. A) Cromatograma do carvedilol após hidrólise básica com o respectivo gráfico da pureza do pico do produto 1. B) Cromatograma da solução de carvedilol após degradação oxidativa com os respectivos gráficos da pureza dos picos dos produtos 1 e 2.

Os resultados da concentração obtidos nas condições de estresse oxidativo e hidrolítico em meio básico, foram plotados em gráficos de concentração versus tempo, \log de C versus tempo e $1/C$ versus tempo, com o objetivo de determinar a cinética da degradação, obtendo-se assim, a ordem da reação e o valor da constante de velocidade de decomposição (k). Como apresentado na tabela 1 do ARTIGO 4.1 e na tabela 1 abaixo, as cinéticas de degradação de carvedilol para os meios oxidativo e básico resultaram em reações de segunda e primeira-ordem e a constante de velocidade de decomposição k foi de 0.0021 min^{-1} e $0,221 \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 1. Cinética da degradação de carvedilol em meio básico.

Tempo (horas)	Concentração de carvedilol (µg/ml)	Log da concentração	1/Concentração
0	12,50	2,00	0,0100
1	10,44	1,92	0,0120
2	9,39	1,88	0,0133
3	8,87	1,85	0,0141
4	7,97	1,80	0,0157
5	7,09	1,75	0,0176
6	6,05	1,68	0,0207
<i>r</i> *	0,9684	0,9838	0,9688

* Valores do coeficiente de correlação.

As amostras degradadas sob condição oxidativa, onde se verificou maior degradação, foram submetidas à análise por espectrometria de massas. Conforme pode ser observado na Figura 4 do ARTIGO 4.1. houve o aparecimento de duas massas moleculares adicionais, correspondentes a 224,3 e 283,6 Daltons. Tendo em vista que as quantidades formadas destes produtos foram relativamente baixas, não foi possível realizar o isolamento para posterior elucidção estrutural destes produtos.

Outra proposta do presente trabalho foi avaliar a estabilidade de comprimidos de carvedilol, de diferentes fabricantes, sob condições de estabilidade acelerada, avaliando a influência da temperatura e umidade tanto em relação à degradação química quanto em relação aos parâmetros físicos.

De acordo com o ICH (2003) e a ANVISA, RE n° 1, de 29 de julho de 2005, o estudo de estabilidade acelerada (sob temperatura de 40 °C ± 2 °C e umidade relativa de 75% ± 5%) deve ser executado com o produto farmacêutico em sua embalagem primária e a frequência dos testes, para formas sólidas de uso oral, é de 0, 3 e 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação (quando aplicável) e dissolução. Para os demais testes deve-se apresentar estudo aos 6 meses comparativo ao momento zero. Baseado no exposto, foram realizadas as análises de peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento, uniformidade de conteúdo e teste de

dissolução nos tempos 0 e 6 meses e um acompanhamento no doseamento nos tempos 1, 2, 3, 4 e 5 meses.

Os métodos por CL-EM/EM e por UV foram aplicados na determinação do teor de amostras comerciais de carvedilol (produtos A, B e C) após submetidas às condições indicadas na resolução referida anteriormente.

Inicialmente, as análises de teor seriam realizadas pelo método por espectrofotometria no UV apresentado por Imram (2006), descrito pelos autores como indicativo de estabilidade. Verificou-se, no entanto, que os teores das amostras, antes de serem submetidas à temperatura e umidade elevadas, foram em torno de 75%, sendo inferiores aos valores obtidos com o método por CL/EM-EM. Devido a isto, as análises foram realizadas pelo método por CL/EM-EM, que foi então validado para fins de quantificação, e por UV, utilizando o método desenvolvido por Ieggli et al., 2005.

Para otimização do método por CL/EM-EM, selecionou-se a ionização por eletrospray (ES) no modo positivo, que apresentou melhor eficiência na ionização de carvedilol. Após a seleção dos parâmetros do equipamento, determinou-se o espectro de massas, observando-se o íon molecular do carvedilol em 406,7 Daltons. A energia de colisão no quadrupolo 2, aplicada ao íon molecular de carvedilol, produziu fragmentos significantes de 100,3; 193,9 e 221,8 Daltons. O íon produto de 100,3 Daltons foi selecionado porque apresentou maior abundância e estabilidade para as finalidades analíticas. A transição utilizada na quantificação das amostras no modo de reações múltiplas (MRM) foi de 406,7>100,3. O método cromatográfico foi executado utilizando fase móvel com vazão de 1,0 mL/min e tempo total de corrida de 2 minutos, o que resultou em menor consumo de solvente orgânico, com conseqüente melhor custo-benefício.

O método por CL-EM/EM apresentou-se linear na faixa de 10-1500 ng/mL ($r^2 = 0,9955$). Conforme demonstrado no ARTIGO 4.1, os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 0,51% (tabelas 2 e 3). O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 99,4%, conforme tabela 4, demonstrando exatidão significativa. Na avaliação da robustez, observou-se que as variações quanto à proporção de acetonitrila, na vazão da fase móvel, volume de injeção e na temperatura da coluna não alteraram os resultados finais. Dessa maneira, os resultados do estudo de validação, conforme tabela 5, demonstraram que a metodologia otimizada apresentou especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, cumprindo os requisitos descritos para métodos analíticos (ICH, 2005).

Os resultados obtidos através dos dois métodos utilizados (CL/EM-EM e UV) para avaliar a estabilidade acelerada dos comprimidos não apresentaram diferenças significativas quando avaliados o teste *t* de Student. O método por espectrofotometria no UV muitas vezes não é sensível o bastante para detectar a degradação de um dado fármaco. O método por UV utilizado neste trabalho mostrou-se, no entanto, sensível para detectar as alterações de concentração, apresentando-se equivalente ao método por CL/EM-EM, que possui maior especificidade e sensibilidade.

Em relação ao teor e uniformidade de conteúdo, utilizando o método por CL/EM-EM, os produtos A, B e C apresentaram decaimento de 0,33%, 11,83% e 0,31%, respectivamente e utilizando o método por UV o decaimento foi de 3,54%, 17,05% e 3,69%, respectivamente.

Quanto às características físicas, verificou-se que a temperatura e a umidade influenciaram algumas características físico-químicas dos produtos analisados. Os produtos A e C, conforme se observa nas tabelas 6 e 7 do ARTIGO 4.1, cumpriram com as especificações para as análises de peso médio, dureza, desintegração, friabilidade e dissolução. O produto B, no entanto, após o sexto mês de estabilidade acelerada, apresentou alterações significativas em alguns parâmetros, como dureza e desintegração, que tiveram um aumento significativo em relação aos valores obtidos no tempo zero bem como em relação à dissolução, onde se verificou uma diminuição na taxa de liberação quando comparada aos resultados obtidos no tempo zero.

Em comprimidos, o aumento da temperatura pode provocar alterações como: a) intumescência e rachadura, ou amolecimento da cobertura do comprimido, uma condição que nunca pode ser verificada à temperatura ambiente; b) perda de umidade dos comprimidos e por isso uma diminuição relativa à velocidade de degradação; c) aumento na dureza ou aumento na fragilidade (HACKMANN, 1991), justificando os resultados obtidos. Mediante estes resultados, verificou-se que características importantes para formas sólidas de uso oral foram alteradas sob condições de temperatura e umidade elevadas demonstrando, assim, a importância de se avaliar tanto as características químicas quanto físicas dos produtos submetidos a estudos de estabilidade.

5.2 Perfil de Dissolução

Com o desenvolvimento da tecnologia e das pesquisas envolvendo a liberação de fármacos, o teste de dissolução surgiu como indicativo para avaliação da qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, nas quais é necessário que ocorra a absorção dos fármacos, para que, desse modo, os mesmos exerçam seus efeitos terapêuticos (MARQUES & BROWN, 2002).

O processo de absorção pode ser modulado pela velocidade de dissolução do fármaco nos líquidos do trato gastrointestinal (SHARGEL & YU, 1999). Entre os fatores que podem alterar a desagregação da forma farmacêutica e a dissolução do fármaco destacam-se (STORPIRTIS, 2004):

- Processo de obtenção do fármaco e suas propriedades físico-químicas como polimorfismo, comportamento estereoquímico das moléculas, tamanho das partículas, higroscopicidade e solubilidade;
- Natureza dos excipientes que compõem as formulações, pois alguns componentes das mesmas – agentes desintegrantes – tendem a favorecer a dissolução, já outros – agentes deslizantes e lubrificantes – dificultam a dissolução;
- Tecnologia de fabricação, a qual, por exemplo, comprimidos obtidos por compressão direta, granulação via seca ou via úmida podem apresentar comportamentos *in vitro* e *in vivo* diferentes.

O carvedilol, embora disponível comercialmente, ainda não possui monografia farmacopéica ou método de dissolução descrito na literatura e com base neste contexto, foi desenvolvido e validado o método de dissolução com determinação quantitativa por espectrofotometria no ultravioleta (ARTIGO 4.2).

No desenvolvimento de um teste de dissolução deve-se considerar a solubilidade e permeabilidade do fármaco, bem como sua estabilidade no meio de dissolução. O carvedilol encontra-se na forma de base livre, na dose máxima de 25 mg, é praticamente insolúvel em água (0,583 mg/L) e apresenta valor de pKa de 7,8. Após administração oral, é rapidamente absorvido pelo organismo, atingindo concentração sérica máxima em aproximadamente 1 hora (YUE, 1999). Segundo Wu & Bennet, (2005) o carvedilol está classificado como um fármaco da Classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), podendo haver correlação *in vitro* – *in vivo*.

Com base nessas propriedades, realizou-se perfil de dissolução utilizando diferentes meios e rotações com o intuito de definir uma condição com melhor poder discriminatório na liberação de carvedilol. O meio e o dispositivo escolhidos devem resultar em um teste que seja discriminativo, exato, robusto e fácil de ser transferido a outros laboratórios. O teste de dissolução mais adequado é aquele que reflete mudanças feitas na formulação, no processo de fabricação, ou nas características físico-químicas do fármaco (tamanho de partícula, área superficial, polimorfos ou estados de hidratação), quando essas mudanças influenciam significativamente a solubilidade ou atividade *in vivo* do produto (MARQUES & BROWN, 2002).

Os perfis de dissolução de carvedilol obtidos com o produto A (medicamento referência), nas diferentes condições avaliadas, estão apresentados nas Figuras 2 e 3, onde verifica-se que a % liberada de carvedilol nos meios água e tampão fosfato pH 6,8 foi em torno de 60% e 50%, respectivamente, em 60 minutos, tanto na rotação de 50 quanto de 75 rpm. Em meios ácidos (HCl 0,1N e tampão acetato pH 4,5), a liberação em 60 minutos foi em torno de 90%, em ambas rotações avaliadas. A variabilidade entre os valores obtidos foi, no entanto, maior em HCl 0,1N e na rotação de 75 rpm. O meio tampão acetato de sódio pH 4,5 na velocidade de 50 rpm foi, assim, o que melhor demonstrou a liberação de carvedilol através do tempo, com precisão. Estas condições foram aplicadas aos produtos B e C. Conforme demonstrado na Figura 4, verifica-se que as diferentes formulações produziram perfis diferenciados, sugerindo que as condições utilizadas foram discriminativas.

A influência do processo de filtração e a estabilidade do fármaco no meio de dissolução devem também ser avaliadas. Desta forma, dois tipos diferentes de filtros (filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose de 0,45 μm) foram avaliados com o intuito de verificar uma possível interferência na liberação de material para as soluções ou alterações significativas na concentração do fármaco. A possibilidade de centrifugar as soluções também foi avaliada e os resultados foram insatisfatórios, conforme descrito no ARTIGO 4.2. Considerando que não houve alteração significativa na concentração do fármaco quando se utilizou o filtro quantitativo, ou membrana, e devido ao menor custo de aquisição, optou-se por trabalhar com o filtro quantitativo durante o desenvolvimento e validação da dissolução.

Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade de soluções da SQR e amostras simuladas de excipientes por um período de 24 horas a temperatura ambiente e por um

período de 2 horas a $37,0 \pm 0,5$ °C, em tampão acetato de sódio pH 4,5, ficaram dentro da faixa de 98 – 102%, indicando que o fármaco foi estável no meio de dissolução e dentro do período de análise otimizado (MARQUES & BROWN, 2002).

A CL e os métodos espectrofotométricos têm sido utilizados em estudos de dissolução. Considerando que o carvedilol possui cromóforos e devido à simplicidade, rapidez e baixo custo, o método por espectrofotometria no ultravioleta foi escolhido. (FORTUNATO, 2005; WANG, et al., 2006).

O método utilizado para avaliar a % dissolvida deve, no entanto, ser adequadamente validado, e a validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir, no mínimo, a avaliação da especificidade, linearidade, precisão e exatidão (USP 29, 2006; MARQUES e BROWN, 2003; ICH, 2005, BRASIL, 2004).

Em relação à especificidade, avaliou-se a possível interferência dos excipientes, através de amostra simulada de excipientes (ASE) e verificou-se que não houve interferência no máximo de absorção de CAR SQR para o método espectrofotométrico conforme ilustrado na Figura 5 do item 4.2.

Na avaliação dos resultados obtidos através das curvas de calibração, realizada através de ANOVA, pôde-se observar que a regressão linear foi significativa e que não houve desvio da linearidade para as curvas preparadas em diferentes dias ($P < 0,05$). A faixa de concentração linear foi de 1 a 11 µg/mL e a equação da reta para o método proposto foi: $y = 0.094 x + 0.0032$, com coeficiente de correlação de 0,999 (USP 29, 2006; BRASIL, 2004).

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), através da avaliação da dissolução de 6 unidades de comprimidos em cada dia. Os coeficientes de variação obtidos foram 1,31% e 1,69%, respectivamente, ou seja, inferiores a 5%, indicando boa precisão do método (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação de CAR SQR adicionada às ASE, diluídas no meio de dissolução. A percentagem de recuperação média obtida foi de 98,23%. Este resultado confere a exatidão do método, já que valores na faixa de 95 – 105% são considerados aceitáveis (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

O método por espectrofotometria no UV mostrou ser específico, linear, preciso e exato, podendo ser utilizado para fins de dissolução de carvedilol em comprimidos.

Os resultados obtidos permitiram, também, comparar os perfis de dissolução dos três produtos testados (A, B e C). Verifica-se na Figura 4, que os valores de percentagem de fármaco dissolvidos, para os três produtos testados, excederam 85% em 15 minutos, e a comparação dos perfis pelo método modelo independente simples, que emprega fator de diferença (f_1) e de semelhança (f_2), não pôde ser aplicada. Foi possível, no entanto, calcular a eficiência de dissolução (ED) (Tabela 3), para os diferentes produtos, as quais foram avaliadas através de ANOVA para indicar a semelhança ou não entre os perfis de dissolução obtidos. A análise por ANOVA indicou haver diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os perfis de dissolução ($F_{\text{calc}} = 12,33 > F_{\text{crit}} = 3,33$, $P < 0,05$). Empregando o teste de Tukey demonstraram que somente o produto B possui perfil de dissolução diferente dos produtos A e C, que não apresentaram diferenças entre si, indicando similaridade.

As especificações do teste de dissolução variam conforme o fármaco, meio, dispositivo, classificação farmacêutica, entre outras. O FDA recomenda que para fármacos de liberação imediata a especificação de um único ponto, com 85% de princípio ativo dissolvido em 60 minutos ou menos, é considerada suficiente para os testes de controle de qualidade lote a lote e, nesses casos, os critérios de aceitação dos fármacos, incluindo o tempo de teste, podem ser estabelecidos com base na avaliação do perfil de dissolução. (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; USP 29, 2006). Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco devem estar dissolvidos em 45 minutos de teste (MARCOLONGO, 2003). Segundo a Farmacopéia Britânica (2007) este é o critério adotado para quase todas as monografias.

Com base nos resultados obtidos nos estudos de dissolução realizados pode-se sugerir que a especificação para a dissolução de carvedilol em comprimidos, quando se utiliza tampão acetato de sódio pH 4,5 como meio de dissolução e pá a 50 rpm, seja de no mínimo 80% de fármaco dissolvido em 30 minutos.

5.3 Equivalência Farmacêutica

As formas sólidas administradas por via oral possuem ampla prescrição clínica devido à praticidade e maior segurança proporcionada pela dosagem unitária (STORPIRTIS, 1999). Na

avaliação de comprimidos devem ser realizados testes que incluam determinações quantitativas e qualitativas através de processos físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos.

No presente trabalho foram avaliados três produtos contendo carvedilol provenientes de três laboratórios industriais diferentes disponíveis comercialmente (produto A, B e C). As análises foram realizadas no sentido de verificar a qualidade e contribuir para um estudo de intercambialidade das mesmas, já que os produtos possuem diferenças consideráveis quanto aos seus custos.

Os comprimidos foram submetidos aos testes físicos e físico-químicos preconizados para o controle de qualidade lote-a-lote de acordo com os Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira, 1988. Os resultados mostraram que os produtos analisados cumpriram com os limites de peso médio especificados com variações inferiores a $\pm 7,5\%$ para os comprimidos com peso médio acima de 80 e até 250 mg. Do mesmo modo, a desintegração em partículas menores ou grânulos ocorreu em tempo inferior a 30 minutos, para as três formulações analisadas. No teste de dureza, os comprimidos apresentaram valores acima do mínimo estabelecido de 30 N e, quando submetidos ao teste de friabilidade, forneceram valores de 0,04% a 0,23%, inferiores ao limite preconizado de 1,5%, demonstrando que os produtos acabados cumprem os parâmetros de qualidade (Tabela 1).

Na determinação do teor do fármaco nos produtos em estudo foi verificado que todos estavam dentro de uma faixa de 90 a 110% da quantidade declarada nas amostras de comprimidos.

A uniformidade de conteúdo permite verificar a correta distribuição do fármaco em cada unidade dos produtos. Constitui-se, assim, em análise muito importante, principalmente para fármacos com janela terapêutica estreita. Segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988) os valores individuais podem variar de 85 a 115%, com CV% máximo de 6%. Todos os produtos cumpriram com as especificações para o teste de uniformidade de conteúdo.

O teste de dissolução, segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), determina a porcentagem da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro do período de tempo especificado, sob aparelhagem e condições experimentais descritas.

Para analisar a % de carvedilol dissolvida nas três formulações de comprimidos, utilizou-se o método desenvolvido e validado de acordo com as condições apresentadas no ARTIGO 4.2. Todos os produtos apresentaram % dissolvida superior a 85% em 60 minutos.

Os resultados obtidos para análise de doseamento, uniformidade de conteúdo e dissolução de carvedilol encontram-se na Tabela 2 do item 4.2.

Em função dos resultados obtidos, pode-se verificar que os produtos A, B e C foram equivalentes farmacêuticos, pois apresentaram resultados adequados em todos os testes a que foram submetidos.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O estudo de degradação forçada, realizado sob condições de hidrólise (ácida, básica e neutra), oxidativa e fotolítica, demonstrou que o carvedilol foi sensível à hidrólise alcalina e oxidação;
- ✓ Nas condições avaliadas, verificou-se o aparecimento de picos adicionais, após degradação sob condições de hidrólise alcalina e oxidativa;
- ✓ O processo de degradação seguiu cinética de primeira e segunda ordem, respectivamente para a hidrólise alcalina e oxidativa;
- ✓ Para a condição oxidativa foram identificadas, através do método por CL/EM-EM, duas massas adicionais, sugerindo a formação de dois produtos de degradação;
- ✓ O método por CL/EM-EM desenvolvido e validado para quantificação de carvedilol em comprimidos, cumpriu com os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez, preconizados para métodos analíticos;
- ✓ O estudo de estabilidade dos comprimidos, realizado sob condições de degradação forçada, demonstrou que, utilizando o método por CL/EM-EM, os produtos A, B e C apresentaram decaimento de 0,33%, 11,83% e 0,31%, respectivamente e utilizando o método por UV o decaimento foi de 3,54%, 17,05% e 3,69%, respectivamente;
- ✓ Os comprimidos do produto B, após 6 meses de estudo acelerado, apresentaram alterações nos parâmetros de dureza, desintegração, teor, uniformidade de conteúdo e teste de dissolução;
- ✓ As condições definidas para o teste de dissolução de carvedilol em comprimidos foram: 900 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5 como meio e aparato pá a 50 rpm;
- ✓ Considerando os resultados obtidos, sugere-se que a especificação seja de no mínimo 80% de carvedilol dissolvido em 30 minutos;

- ✓ O estudo comparativo realizado entre comprimidos provenientes de três diferentes laboratórios indicou que todos apresentaram resultados satisfatórios em todos os testes a que foram submetidos, podendo ser considerados equivalentes farmacêuticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEHN, F. et al. Separation of carvedilol enantiomers in very small volumes of human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 755, n. 1-2, p. 111-117, 2001.

BEHN F.; LÄER S.; SCHOLZ E.H.; Determination of carvedilol in human cardiac tissue by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography Science**. v. 39, p. 121-124, 2001a.

BEHN F. et al. Quantification of HPLC of Carvedilol in Small Volumes of Plasma of Children. **Chromatography**. v. 53, p. 11-12, 2001b.

BORGES, N. C. C. et al. Quantification of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, v. 822, n. 1-2, p. 253-262, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 set. 2004.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 16, de 02 de março de 2007. Regulamento Técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 mar. 2007.

BRISTOW, M. R. et al. Effects of carvedilol on adrenergic receptor pharmacology in human ventricular myocardium and lymphocytes. **Clinical Investigation**, v. 70, n. 1, p. 105-113, 1992.

BRISTOW, M. R. et al. Selective versus Nonselective β -Blockade for Heart Failure Therapy: Are there lessons to be learned from the COMET Trial. **Journal of Cardiac Failure**, v. 9, n. 6, p. 444-453, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, London, 2007. v.1

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug stability – Principles and practices, 3rd ed. New York: Marcel-Dekker, 2000.

CLOHS, L.; MCERLANE, K. M. Development of a capillary electrophoresis assay for the determination of carvedilol enantiomers in serum using cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 545-554, 2001.

_____. Comparison between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the stereoselective analysis of carvedilol in serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 407-412, 2003.

CONSIGLIERE, V. O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H. G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 21, n. 1, p. 23-41, 2000.

CONNORS, K. A.; AMIDON, G.; STELLA, V. J. Chemical Stability of pharmaceuticals. **A handbook for pharmacist**, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

CUBEDDU L. X.; FUENMAYOR N.; VARIN F. Mechanism of the vasodilatory effect of carvedilol in normal volunteers: a comparison with labetalol. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 10, s. 11, p. 81-84, 1987.

DAHLÖF, B. Prevention of Stroke in Patients with Hypertension. **American Journal of Cardiology**, v. 100, p. 17–24, 2007.

DRESSMAN, J. B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DUNN, C. J.; LEA A. P.; WAGSTAFF, A. J. Carvedilol: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders. **Drugs**, v. 54, p. 161-185, 1997.

EISENBERG, E. J. PATTERSON, W. R.; KAHN, G. C. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the enantiomers of carvedilol and its O-desmethyl metabolite in human plasma after chiral derivatization **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 493, p.105-115, 1989.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, August 1997.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios de Físico-Química. São Paulo, Editora São Paulo, 2003.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**. p. 12-14, 2005.

HACKMANN, E. R. M. Metodologia Analítica no Controle de Qualidade de Medicamentos. Anexo 19. São Paulo: USP. Texto apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para concurso de livre docência, 1991.

HOKAMA, N. et al. Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 732, n. 1, p. 233-238, 1999.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guidance for Industry Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products**, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2 (R1): Text and Methodology**, 2005.

IEGGLI, C. V. **Carvedilol: Desenvolvimento e validação de métodos de análise**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

IEGGLI, C. V.; CARDOSO, S. G.; BELLE, L. Validation of spectrophotometric and non-aqueous titration methods for the determination of Carvedilol in pharmaceutical formulations. **The Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1299-1303, 2005.

IEGGLI, C. V.; CARDOSO, S. G.; PLOMBUM, S. C. G. Spectrophotometric determination of carvedilol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. **Pharmazie**, v. 62, n. 1, p. 34-37, 2007.

IMRAN, M.; SINGH, R. S.; CHANDRAN, S. Stability indicating ultraviolet spectroscopic method for the estimation of ezetimibe and carvedilol. **Pharmazie**, v. 61, p. 766-769, 2006.

IV Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 82, p. 1-14, 2004.

JEONG, D. W. et al. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 547-552, 2007.

KLICK, S. et al. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, February, p. 48-66, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 857-868, 1999.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1357-1367, 2005.

LAGACE, M. et al. Developing a discriminating dissolution procedure for a dual active pharmaceutical product with unique solubility characteristics. **Dissolution Technologies**, v. 11, n. 1, p. 13-17, 2004.

LI, S. et al. Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 847, n. 2, p. 174-181, 2007.

MACHIDA M. et al. Measurement of carvedilol in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 798, p. 187-191, 2003.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. A. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-99, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo. São Paulo.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Analytica**, v. 1, p. 48-51, 2002.

MCINTOSH, M. P. et al. Single quadrupole mass spectrometry for pre-clinical pharmacokinetic analysis: Quantitation of carvedilol in dog plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1-2, p. 665-668, 2007.

MEDVEDOVICI, A. et al. Achiral-chiral LC/LC-FLD coupling for determination of carvedilol in plasma samples for bioequivalence purposes. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 1-2, p. 327-335, 2007.

MYUNG, S. W.; JO, C. H. Gas chromatograph-mass spectrometric method for the determination of carvedilol and its metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 822, n. 1-2, p. 70-77, 2005.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 413-436, 2003.

NOORY, C. et al. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. **Dissolution Technologies**, v. 7, n. 1, p. 16-18, 2000.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

PÉREZ-TRUJILLO, M.; VIRGILI, A. Efficient and rapid determination of the enantiomeric excess of drugs with chiral solvating agents: carvedilol, fluoxetine and a precursor of diarylether lactams. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 20, p. 2842-2846, 2006.

PHARMACOPOEIAL FORUM. **Pharmacopoeial Previews**, 30, 2004.

PIRES, C. K. et al. Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 239-244, 2005.

POKHARKAR, V. et al. Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. **Powder Technology**, v. 167, p. 20-25, 2006.

PTÁČEK, P.; MACEK, J.; KLÍMA, J. Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 789, n. 2, p. 405-410, 2003.

RADI, A.; ELMOGY, T. Differential pulse voltammetric determination of carvedilol in tablets dosage form using glassy carbon electrode. **Il Farmaco**, v. 60, n. 1, p. 43-46, 2005.

RAJESHWARI, R. et al. Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 857, n. 2, p. 219-223, 2007.

RATHOD, R. et al. Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 857, n. 2, p.219-223, 2007.

REIFF, K. High-performance liquid chromatographic method for the determination of carvedilol and its desmethyl metabolite in body fluids. **Journal of Chromatography: Biomedical Applications**, v. 413, p.355-362, 1987.

ROHRS, B. R. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, v. 8, n. 3, p. 1-5, 2001.

RUFFOLO R. R.; FEUERSTEIN G. Z.; OHLSTEIN E. H. Recent observations with beta-adrenoreceptor blockade: beneficial effects in hypertension and heart failure. **American Journal of Hypertension**, v. 11, p. 9-14, 1998.

SAITO, M. Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 843, n. 1, p. 73-77, 2006.

SHARGEL, L. & YU, A.B.C. – **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 4a. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999. 768p.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**, p. 1-14, 2000.

_____. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011–1040, 2002.

STORPIRTIS, S. et al. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: Bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n 9-10, 2004.

STROE, A. F.; GHEORGHIADÉ, M. Carvedilol: β -Blockade and Beyond. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 18-27, 2004.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, (USP) 29 ed. Rockville: United States Convention, 2006.

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A. R. **Remington's: The science and practice of pharmacy**. 20 ed. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2000. p. 986-994.

VARIN F.; CUBEDDU L.X.; POWELL J.R.; Liquid chromatographic assay and disposition of carvedilol in healthy volunteers. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 75, p. 1195-1197, 1986.

WAAGSTEIN F. et al. Long-term beta-blockade in dilated cardiomyopathy. Effects of short and long-term metoprolol treatment followed by withdrawal and readministration metoprolol. **Circulation**, v. 80, p. 551-563, 1989.

WANG, S.; CYRONAK, M.; YANG, E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response. A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 701-707, 2007.

WANG, Q.; MA, D.; HIGGINS, J. P. Analytical Method Selection for Drug Product Dissolution Testing. **Dissolution Technologies**, v. 13, n 3, p. 6-13, 2006.

WU, C-Y.; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Journal Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.

XIAO, Y.; WANG, H. Y.; HAN, J.. Simultaneous determination of carvedilol and ampicillin sodium by synchronous fluorimetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 4, p. 567-573, 2005.

XU, L. X. et al. Study on fluorescence property of carvedilol and determination of carvedilol by fluorimetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 855-859, 2005.

YANG, E. et al. Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 609-615, 2004.

YUE, T. L.; RUFFOLO R. R.; FEUERSTEIN G. Antioxidant action of carvedilol: A potential role in treatment of heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 4, p. 39-51, 1999.

ZARGHI, A. et al. Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: Application in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 250-253, 2007.