
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O DOSEAMENTO DE METILDOPA

DEVELOPMENT AND ANALYTICAL METHOD VALIDATION FOR METILDOPA ASSAY

Walleri Christini Torelli Reis¹, Gabriela Bordini Fregonezi¹, Gabriela Uchida Athanázio¹, Mirela Fulgencio Rabito², Elisabeth Aparecida dos Santos Gianotto²
Marlene Maria Fregonezi Nery²

¹ Discente de graduação do curso de Farmácia, UEL.

² Docente do departamento de Ciências Farmacêuticas, UEL.

RESUMO:

Este trabalho descreve um método espectrofotométrico simples, rápido e de baixo custo para análise de metildopa em medicamentos. O método baseia-se na determinação da absorvância do fármaco a 281nm em HCl 0,01M. Os resultados obtidos mostraram que o método proposto é linear na faixa de concentração de 20,0 a 60,0 mg/mL, com precisão intermediária, repetibilidade e exatidão de acordo com as especificações exigidas pela ANVISA. O método proposto foi comparado com o método oficial e aplicado em 4 amostras.

Palavras-chave: Espectrofotometria, anti-hipertensivo, controle de qualidade.

ABSTRACT:

This work describes a simple, fast and low-cost spectrophotometric method for analysis of methyldopa in dosage forms. The method is based on the determination of the absorbance of the drug at 281nm using HCl 0,01M. The results showed that the proposed method is linear in the concentration range from 20.0 to 60.0 mg/mL, with intermediate precision, repeatability and accuracy in accordance with the specifications required by ANVISA. The proposed method was compared with the official method and applied in 4 samples.

Keywords: spectrophotometric, antihypertensive, quality control.

1. INTRODUCAO

A Hipertensão Arterial Sistêmica é uma situação clínica de natureza multifatorial caracterizada por níveis de pressão arterial elevados. No Brasil, a hipertensão acomete uma em cada quatro pessoas adultas. Assim, estima-se que atinja em torno de, no mínimo, 25 % da população brasileira adulta, chegando a mais de

50% após os 60 e está presente em 5% das crianças e adolescentes no Brasil. É responsável por 40% dos infartos, 80% dos derrames e 25% dos casos de insuficiência renal terminal (SBH, 2012). O aparecimento da hipertensão é favorecido por fatores genéticos, pelo excesso de peso, sedentarismo, elevada ingestão de sal, baixa ingestão de potássio e consumo excessivo de álcool. A metildopa, quimicamente conhecida como α -metil-3,4-dihidroxifenilalanina, é um anti-hipertensivo que age como potente agonista dos receptores α_2 , diminuindo a resistência vascular sistêmica. É comercializada no Brasil nas doses de 250 e 500 mg (VERONEZ; SIMÕES, 2008).

A maioria das metodologias descrita na literatura para determinação de metildopa em comprimidos baseia-se na formação de complexos coloridos e determinação por espectrofotometria na região do visível, das quais podemos citar: Basyoni (1985) obteve o composto colorido pela reação do grupo amina com p-fenilenediamina em meio alcalino e detecção do produto final a 540 nm. Da Cruz e Fatibello-Filho (1998) propuseram a determinação de metildopa em formulações farmacêuticas utilizando a reação de oxidação com a enzima polifenol oxidase obtida do extrato de batata doce e a determinação da absorvância do metildopacromo a 480 nm. Zivanovic *et.al.* (1991) baseou-se na reação de metildopa com cloreto férrico na faixa de pH de 3,0-3,5 e o complexo marrom formado determinado a 423 nm. A reação de metildopa com cério IV em meio ácido e leitura a 550 nm foi proposto por Helaleh *et.al.* (1997). Nagaraja *et.al.* (1998) determinaram várias catecolaminas, entre estas a metildopa, utilizando dois métodos. O primeiro envolve a oxidação com n-bromosuccinamida seguida da copulação com isoniazida e formação de composto vermelho, o segundo pela formação de um complexo verde obtido da reação entre o radical o-diidrobenzeno com nitroprussiato de sódio. A formação de produto amarelo obtido pela oxidação de catecolaminas com bismutato de sódio e determinação da absorvância na faixa de 422 a 429 nm foi proposta por Sajjan *et.al.* (2001). Afkami e Nouri-Zadeh (2002) propuseram a quantificação de traços de metildopa e adrenalina baseado na reação com ferro III na presença de 1,10-fenantrolina em pH 5,4 e determinação em 510 nm. Dois métodos baseados na medida das absorvâncias de tris-fenantrolina ferro II (método A) e tris- bipyridil ferro II (método B) obtidos pela oxidação de catecolaminas na presença de 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipyridil a 510 e 522 nm, respectivamente foi desenvolvido por Nagaralli *et. al.* (2002). El-Dien *et. al.* (2005) basearam-se na formação de complexo resultante das catecolaminas com tetramina cobre e copulação com 4-aminoantipirina, enquanto, Ribeiro *et.al.* (2005) basearam-se na reação de complexação de metildopa com molibdato e determinação a 410 nm. Madrakian *et. al.* (2006) desenvolveram a reação de oxidação de catecolaminas com periodato seguido da copulação com o ácido 4-aminobenzoico em pH 4,0 e Tubino *et.al.* (2006) a reação de oxidação de metildopa com o íon férrico na presença de ácido salicílico e ácido clorídrico. Gotardo *et.al.* (2008) propuseram a reação de metildopa e

p-cloranil acelerada por peróxido de hidrogênio, resultando em composto violeta com determinação a 535 nm. A reação com 2,6-dicloroquinona-4-clorimida produzindo composto com determinação a 400nm foi proposta por Gadkarien *et. al.* (2009).

Outros métodos foram propostos como: a cromatografia líquida de alta resolução por Ting (1984), Dolezalova e Tkazykova (1999), Zecevic *et. al.* (2001) e Schieffer (2006); a potenciometria por Badawy *et. al.* (2005); a titulometria por Pathak *et. al.* (1982) e fluorimetria por Salem (1995) para a determinação de metildopa.

A maioria destes métodos possui desvantagens como necessidade de reagentes caros, instrumentos sofisticados e/ou controle rígido das condições experimentais que tornam para análise de rotina.

O método oficial descrito pela Farmacopeia Brasileira é o método colorimétrico baseado na reação da metildopa com tartarato ferroso solução reagente (SR) em presença de tampão acetato de amônio pH 8,5. A SR é composta por sulfato ferroso heptahidratado, tartarato de sódio e potássio e bissulfito de sódio e deve ser preparada no momento do uso devido à problemas na estabilidade da solução.

O presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de uma metodologia utilizando espectrofotometria na região do UV que possa ser empregado na rotina de controle de qualidade. Com a utilização de apenas um reagente, é possível reduzir os potenciais danos ambientais e à saúde dos colaboradores envolvidos na análise e no tratamento do resíduo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais e Reagentes

Amostras: Comprimidos de metildopa (250 mg): A (medicamento referência), B (genérico), C (similar) e cápsula manipulada (250 mg): D. Substância química de referência metildopa, padrão secundário (87,76%) fornecido pela Indústria Química do Estado de Goiás S.A. (IQUEGO). Solução de tartarato ferroso (1 g de sulfato ferroso, 2 g de tartarato de sódio e potássio e 0,1 g de bissulfito de sódio para 100 mL de água). Solução tampão acetato pH 8,5, solução de HCl 0,1M e HCl 0,01M.

Ácido cítrico, edetato de cálcio dissódico, etilcelulose, dióxido de silício, estearato de magnésio, goma guar, hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, propilenoglicol, celulose, álcool anidro, corante amarelo e corante vermelho foram de grau farmacêutico.

2.2 Equipamentos

Balança analítica (Mettler AG204), friabilômetro (ERWEKA 200), durômetro

(ERWEKA TGH200), aparelho de desintegração (ERWEKA ZT3), dissolutor (ERWEKA DT6) e espectrofotômetro UV-VIS (SHIMADZU UV - A160).

2.3 Procedimento

2.3.1 Validação:

O método foi desenvolvido e validado conforme Resolução RE 899/03 e International Conference on Harmonization (ICH-2005) nos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. O método proposto foi comparado estatisticamente com o oficial descrito na Farmacopeia Brasileira 5 ed. (2010).

- Especificidade: preparou-se solução padrão de metildopa na concentração de 50,00 mg/mL em solução de HCl 0,01M e soluções placebo de cada excipiente (ácido cítrico, edetato de cálcio dissódico, etilcelulose, dióxido de silício, estearato de magnésio, goma guar, hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, propilenoglicol, celulose, álcool anidro, corante amarelo e corante vermelho) na concentração correspondente a 100% de analito da quantidade declarada no rótulo. O espectro de absorção foi determinado na faixa de 200 a 400
- Linearidade: foram preparadas soluções em triplicata nas concentrações de 20,00; 30,00; 40,00; 50,00 e 60,00 mg/mL de metildopa padrão em solução de HCl 0,01M. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson.
- Precisão: a repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas partindo-se de 6 tomadas de ensaio de 12,50 mg de metildopa padrão e preparou-se solução de concentração de 50,00 mg/mL em HCl 0,01M. A precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento em dias diferentes e analistas diferentes. A partir dos resultados obtidos calculou-se o Desvio Padrão Relativo (DPR).
- Exatidão: foi avaliada a partir da adição e recuperação de quantidades conhecidas de metildopa padrão na amostra. Foram preparadas soluções em triplicata contendo mistura de solução amostra C de 25,00 mg/mL e soluções padrão de 15,00; 25,00 e 35,00 mg/mL de metildopa em HCl 0,01M. As quantidades recuperadas de metildopa padrão adicionadas foram obtidas a partir da curva de calibração. A recuperação de 98,00 a 102,00% é recomendada para exatidão do método.
- Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ): foram determinados a partir de três curvas de calibração e foram calculados como $10s/S$ e $3s/S$, respectivamente, onde s é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e S é a inclinação da curva média.
- Estabilidade das soluções: foi determinada pela análise da solução padrão de metildopa na concentração de 50,0 mg/mL mantida à temperatura ambiente por 24 horas.

2.3.2 Análise das Amostras:

As amostras foram submetidas às análises descritas na monografia da Farmacopeia Brasileira 5^o edição: peso médio, friabilidade, desintegração, uniformidade de dose unitária, dissolução e teor.

- **Peso médio:** para as amostras A, B e C foram pesadas 20 comprimidos individualmente e determinou-se o peso médio e o desvio padrão. A variação permitida é de $\pm 5,0\%$ para comprimidos acima de 250,0 mg. Para a amostra D o peso médio foi determinado pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a vazia. Com os resultados obtidos determinou-se o peso médio do conteúdo. A variação individual permitida é de $\pm 10\%$ para cápsulas com peso médio até 300,0 mg. Podem ser toleradas não mais que 2 unidades fora do limite especificado, porém nenhuma unidade poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.
- **Uniformidade de dose unitária:** foi realizada pelo método de variação de peso. Pesou-se exatamente e individualmente 10 unidades de cada. A partir do resultado do doseamento de cada amostra calculou-se o conteúdo de metildopa. O produto passa o teste se o Valor de Aceitação (VA) for menor ou igual a 15. Se VA for maior que 15, deve-se testar mais 20 unidades.
- **Dissolução:** os parâmetros utilizados para o teste de dissolução foram: 900 mL de ácido clorídrico 0,1M como meio de dissolução, aparato 1 (cesta), rotação de 50rpm e determinação por espectrofotometria no UV a 280 nm. Das seis unidades testadas inicialmente, se cada unidade apresentar resultado maior ou igual a Q+5% o produto está aprovado. Se o 1^o estágio não foi atendido repete-se o teste com mais 6 unidades. Se a média das 12 unidades testadas for maior ou igual a 80,0% e nenhuma unidade apresentar resultado menor que Q-25% o resultado é considerado satisfatório.
- **Doseamento pelo método oficial:** pesou-se o equivalente a 0,1 g de metildopa, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 50 mL de solução de ácido sulfúrico 0,05 M e agitou-se mecanicamente por 15 min. Completou-se o volume com solução de ácido sulfúrico 0,05M e homogeneizou-se. Filtrou-se a solução rejeitando os primeiros 20 mL. Pipetou-se 5 mL para balão volumétrico de 100 mL, adicionou 5 mL de solução de tartarato ferroso e completou-se o volume com a solução tampão acetato pH 8,5. Preparou-se solução padrão e solução branco nas mesmas condições. Determinaram-se as absorvâncias das soluções a 520 nm e calculou-se a concentração de metildopa nas amostras.

2.3.3 Aplicação do método proposto em amostras:

O método proposto foi aplicado nas amostras estudadas, na concentração teórica de leitura de 50,0 mg/mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos preliminares demonstrou que a metildopa apresenta pico máximo de absorção em 281nm utilizando HCl 0,01M como solvente.

Os resultados da especificidade demonstraram que os excipientes estudados não interferem na análise de metildopa em comprimidos e cápsulas, nas condições experimentais.

A curva de calibração apresentou linearidade dentro da faixa de concentração de 20,00 a 60,00 mg/mL com coeficiente de correlação (R^2) de 0,9997 e equação da reta $y = 0,0134x + 0,0004$. O limite de detecção e quantificação calculado foi de 4,12 e 12,36 mg/mL, respectivamente.

O resultado da precisão indica que o método tem boa repetibilidade, com DPR de 0,45%, inferior a 5%, valor máximo recomendado pela legislação. A TABELA 1 apresenta os resultados da precisão intermediária realizado em dias diferente e analista diferente e apresentaram desvio padrão relativo inferior a 5%.

TABELA 1 - Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária aplicando o método proposto.

Parâmetros	Repetibilidade	Inter-dia	Diferentes analistas (intra-dia)	Diferentes analistas (inter-dia)
DPR (%)	0,45	0,69	0,34	1,04

DPR - desvio padrão relativo

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes. A TABELA 2 apresenta os resultados da exatidão do método.

TABELA 2 - Resultados obtidos no teste de exatidão utilizando amostra C.

Quantidade adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% recuperada
15,0	15,18	101,23 ($\pm 0,22$)
25,0	24,94	99,76 ($\pm 0,09$)
35,0	34,80	99,42 ($\pm 0,18$)

No estudo da estabilidade da solução padrão o fármaco manteve-se estável nas condições avaliadas considerando a temperatura ambiente ($25 \pm 0,2^\circ\text{C}$) por 24 hr,

por 24 h, com teor de 98,78%.

Os resultados do peso médio dos comprimidos e cápsulas de metildopa estão apresentados na TABELA 3. Todas as amostras analisadas apresentaram-se dentro dos limites especificados tanto para comprimidos como para as cápsulas.

TABELA 3 - Resultados do ensaio de peso médio das amostras contendo metildopa 250 mg.

Ensaio	Amostras			
	A	B	C	D
Peso médio (mg)	352,79	391,78	349,70	282,05
DPR (%)	1,04	1,02	1,71	3,04

DPR - desvio padrão relativo

A (referência) B (genérico) C(similar) D (cápsula manipulada)

No teste de friabilidade consideram-se aceitáveis os comprimidos com perda inferior a 1,5% do seu peso. Os resultados das amostras atenderam a especificação, sendo 0,05% para amostra A e 0,01% para B e C.

Os resultados para o ensaio de dissolução para as amostras A, B, C e D estão apresentados na TABELA 4. Todas as amostras foram aprovadas na primeira etapa do teste.

TABELA 4 - Resultados do teste de dissolução realizados nas amostras estudadas.

Amostra	Dissolução (%) (máx.-mín.)
A	94,53 (2,57%) (90,69 - 97,67)
B	103,44 (1,50%) (102,19 - 104,78)
C	100,86 (4,90%) (95,88 - 107,16)
D	94,23 (2,76%) (91,93 - 98,77)

A (referência) B (genérico) C(similar) D (cápsula manipulada)

Para o teste de uniformidade de dose unitária (TABELA 5) todas as amostras foram aprovadas com VA de 3,07; 9,30; 5,22 e 9,87 para as amostras A, B, C e D respectivamente.

TABELA 5 - Resultados do teste de uniformidade de conteúdo nas amostras.

Amostras*	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	100,95	105,25	97,47	97,58
2	100,27	107,52	95,34	100,71
3	100,73	108,40	97,22	95,44
4	101,18	107,06	95,59	100,27
5	100,90	107,61	97,80	99,08
6	101,01	108,43	99,12	95,47
7	99,27	106,59	94,76	94,28
8	103,21	106,65	95,40	94,49
9	102,76	107,06	97,60	92,58
10	99,12	107,52	97,11	92,31
Média	100,92	107,21	96,74	96,22
DPR (%)	1,28	0,87	1,44	3,16

DPR - desvio padrão relativo

A (referência) B (genérico) C(similar) D (cápsula manipulada)

As amostras foram submetidas ao ensaio de doseamento pelos métodos oficial e proposto (TABELA 6). Todas as amostras foram aprovadas com relação ao teor. Quando comparados, os métodos apresentaram DPR menor que 5% demonstrando confiabilidade do método desenvolvido.

TABELA 6 - Resultados da análise de doseamento empregando o método proposto e o método oficial.

Amostra	A	B	C	D
Método proposto (%)	99,00	102,00	98,10	92,00
Método oficial (%)	100,92	107,21	96,74	96,22
DPR (%)	1,71	3,87	2,35	3,34

DPR - desvio padrão relativo

A (referência) B (genérico) C(similar) D (cápsula manipulada)

4. CONCLUSÃO

A metodologia mostrou-se adequada, pois foi devidamente validada de acordo com as exigências da ANVISA e pode substituir a metodologia oficial. Desta forma o método apresenta-se como uma alternativa simples, rápida, de fácil execução, baixo custo e confiável. Dentre as amostras analisadas, todas atenderam as especificações da Farmacopeia Brasileira 5 ed.

5. REFERENCIAS

AFKAMI, A.; NOURI-ZADEH, A. Sensitive-spectrophotometric determination of methyl dopa and adrenaline. *Asian Journal of Chemistry*. v. 14, n. 2, p. 867-73, 2002.

ANVISA - *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. RE nº 899, 29 de maio de 2003.

BADAWY, S. S.; ISSA, Y. M.; TAG-ELDIN, A. S. Potentiometric determination of L-dopa, carbidopa, methyldopa and aspartame using a new trinitrobenzenosulfonate selective electrode. *Eletoanalysis*, v. 8, n. 11, p. 1060-1064, 2005.

BASYONI, S. Spectrophotometric determination of catecholamines. *Journal Pharmacie Belgique*, v. 40, n. 3, p. 185-90, 1985.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira 5.ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

DA CRUZ, V. I.; FATIBELLO-FILHO, O. Spectrophotometric determination of methyldopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymic source. *Talanta*, v. 46, n. 4, p. 559-564, 1998.

DOLEZALOVA, M.; TKACZKOVA, M. Direct high-performance liquid chromatographic determination of the enantiomeric purity of levodopa and methyldopa: comparison with pharmacopoeial polarimetric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 19, n. 3-4, p. 555-567, 1999.

EL-DIEN, F. A. NOUR; ZAYED, M. A.; MOHAMED, G. G.; EL NAHAS, R. A. Spectrophotometric determination of levodopa, carbidopa and alpha-methyldopa. *Egyptian Journal of Chemistry*, v. 48, n.3, p. 259-272, 2005

GADKARIEM, E. A., IBRAHIM, K. E. F., KAMIL, N. A. A., HAGA, M. E. M., EL-OBEID, H. A. A new spectrophotometric method for the determination of methyldopa. *Pharmaceutical Journal*, v. 17, n. 4, p. 303-310, 2009.

GOTARDO, M. A. Um método espectrofotométrico simples para a determinação de metildopa usando p-cloranil na presença de peróxido de hidrogênio. *Ecletica Química*, v. 33, n. 3, p. 7-12, 2008.

HELALEH, M. I. H.; RAHMAN, N.; ABU-NAMEH, E. S. M. Use of cerium(IV) nitrate in the spectrophotometric determination of levodopa and methyldopa in the pure form and pharmaceutical preparations. *Analytical Science*, v. 13, n. 6, p. 1007-1010, 1997.

International Conference on Harmonisation *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q2 (R1), 2005.

MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A.; KHALAFI, L.; MOHAMMADNEJAD, M. Spectrophotometric determination of catecholamines based on their oxidation reaction followed by coupling with 4-aminobenzoic acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society* v. 17, n. 7, p. 1259-1265, 2006.

NAGARAJA, P.; MURTHY, K. C.; SRINIVASA; R. K. S.; GOWDA, N. M. M. Spectrophotometric methods for the determination of certain catecholamine derivatives in pharmaceutical preparations. *Talanta*, v. 46, n. 1, p. 39-44, 1998.

NAGARALLI, B. S.; SEETHARAPPA M.; MELWANKI, M. B.; RAMESH, K. C.; KESHAVAYYA, J. Spectrophotometric investigations of the assay of physiologically active catecholamines in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 6, p.1288-1292, 2002.

PATHAK, V. N., SHUKLA, M. S. R., SHUKLA, I. C. Direct titrimetric determination of the antihypertensive drugs methyldopa and propranolol in pharmaceutical preparation. *Analyst*, v. 107, p. 1086-87, 1982.

RIBEIRO, P. R. S.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R Spectrophotometric determination of methyldopa in pharmaceutical formulations. *Ecletica Química*, v. 30, n. 3, p. 23-28, 2005.

SAJJAN, A. G.; MELWANKI, M. B.; SETHARAMAPPA, J. Spectrophotometric determination of certain vicinal dihydroxybenzene derivatives with sodium bismuthate.

Journal of Analytical Chemistry, v. 56, n. 9, p. 827-829, 2001.

SALEM, F. B. Determination of some catecholamines in pharmaceutical forms. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Science*, v. 9, n.2, p. 143-7, 1995.

SBH. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Acesso em: 27/11/12. Disponível em: <http://www.sbh.org.br/geral/oque-e-hipertensao.asp>

SCHIEFFER, G. W. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic investigation of levodopa preparations II: Levodopa determination. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 68, n.10, p.1299–1301, 2006.

TING, S. Liquid chromatographic determination of methyldopa and methyldopa-thiazide combinations in tablets: collaborative study. *Journal of Association Official Analytical Chemists*. v. 67, n. 6, p. 1118-20, 1984.

TUBINO, M.; BATISTA, D. C. C. D. V.; RODRIGUES, J. A. R. Kinetic Method for the Determination of α -Methyldopa in Pharmaceutical Preparations: Analytical Procedure and Reaction Mechanism Considerations. *Analytical Letters*, v. 39, n. 2, p. 327-339, 2006.

ZECEVIC, M.; ZIVANOVIC, L. V.; AGATONOVIC-KUSTRIN, MINIC, S. D. The use of a response surface methodology on HPLC analysis of methyldopa, amiloride and hydrochlorothiazide in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 24, p. 1019–1025, 2001.

ZIVANOVIC, L.; VASILJEVIC, M.; AGATONOVIC, S.; RADULOVIC, D. Colorimetric assay of methyldopa bulk drug and tablets as its iron(III) complex. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, v.130, n. 5, p.162-5, 1991.