

Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação de Maleato de Enalapril

Development and Validation of a Method for Enalapril Maleate Determination

Antonio Martins Almeida Junior^a; Roberto Bortolazo Junior^a; Marlene Maria Fregonezi-Nery^b;
Elisabeth Aparecida dos Santos Gianotto^b; Mirela Fulgencio Rabito^{b*}

^aUniversidade Estadual de Londrina, Curso de Farmácia, PR, Brasil

^bUniversidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciências Farmacêuticas, PR, Brasil

*E-mail: mirela.rabito@gmail.com

Resumo

O maleato de enalapril é um anti-hipertensivo de uso contínuo, que atua como inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). A Farmacopeia Brasileira 5^a edição apresenta um método cromatográfico para determinação do enalapril em comprimidos. O presente trabalho desenvolveu e validou um método espectrofotométrico a 208 nm, utilizando água como solvente, para determinação do fármaco em comprimidos e cápsulas manipuladas. O parâmetro de especificidade foi avaliado e verificou-se não haver interferência dos excipientes no comprimento de onda de análise. A curva de calibração foi obtida a partir da relação absorvância x concentração, e apresentou linearidade na faixa de concentração de 5,0 a 13,0 µg/mL, com equação ($y = -0,00528 + 0,061984x$) e coeficiente de correlação de 0,9998. A exatidão foi de 101,1%, e o método apresentou DPR de 0,6% para análise intracorrida e 1,4% para inter-corrida. O Limite de Detecção e Limite de Quantificação foram de 0,02 e 0,06 µg/mL, respectivamente.

Palavras-chave: Espectrofotometria. Maleato de Enalapril. Validação.

Abstract

The enalapril maleate is an antihypertensive of continuous use, which acts as an inhibitor of angiotensin-converting enzyme (ACE). The Brazilian Pharmacopoeia 5th Edition provides a chromatographic method for the determination of enalapril tablets. This study developed and validated a spectrophotometric method at 208 nm using water as a solvent, for the drug determination in tablets and compounded capsules. The specificity was evaluated and it was found that there is no interference from the excipients in the wavelength studied. The calibration curve was obtained from the absorbance ratio x concentration and showed linearity in the concentration range from 5.0 to 13.0 µg/mL, presenting equation ($y = -0.00528 + 0.061984x$) and correlation coefficient of 0.9998. The accuracy was 101.1% and the method showed RSD of 0.6% for intra-run and 1.4% for inter-run. The DL and QL was 0.02 and 0.06 µg/mL respectively.

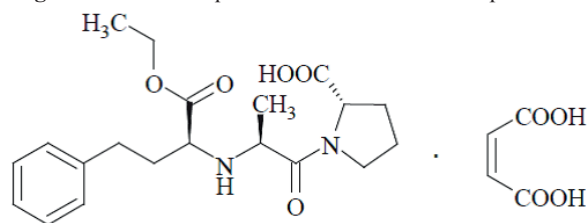
Keywords: Spectrophotometry. Enalapril Maleate. Validation.

1 Introdução

As doenças cardiovasculares adquiriram maior importância a partir do século XX, com o aumento da expectativa de vida da população em geral. Por outro lado, a urbanização trouxe alguns problemas tais como a menor atividade física, alteração nos hábitos alimentares, tabagismo e estresse. Esse aumento na expectativa de vida, juntamente com os problemas decorrentes da mudança no estilo de vida, acabou por determinar o aumento das doenças cardiovasculares (PASSOS; ASSIS; BARRETO, 2006). No Brasil, a hipertensão arterial sistêmica é a doença cardiovascular que mais afeta a população, representando um grave fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência renal, acidente vascular cerebral e outras cardiopatias (BRASIL, 2010).

O maleato de enalapril é um agente anti-hipertensivo que atua como inibidor da enzima conversora de angiotensina, e corresponde quimicamente ao éster etílico da 1[[carboxi-3-fenilprpil]-L-alanilprolina (Figura1).

Figura 1: Estrutura química do Maleato de Enalapril



O enalapril consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME e é comercializado no Brasil como medicamento genérico, similar e referência, na forma de comprimidos de 5 mg, 10 mg e 20 mg. A quinta edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) propõe para determinação do maleato de enalapril em matéria-prima o método de titulação potenciométrica e para matéria-prima e comprimidos cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE. Já a Farmacopeia Americana USP 32 Edição (THE UNID STATES..., 2009) emprega CLAE tanto para matéria-prima como para comprimidos. Vários métodos analíticos

para quantificação deste fármaco encontram-se reportados na literatura científica, sendo aplicáveis à matéria-prima, formas farmacêuticas e associações com a hidroclorotiazida. Estes métodos são a cromatografia líquida de alta eficiência (ALMOMANI, 2001; BONAZZI *et al.*, 1997; GUMIENICZEK; PRZYBOROWSKI; KOWALCZUK, 1997; HALKAR BHANDARI; RANE, 1998; LIU, 2003; NOBILE; RAGGI, 1992; SANE *et al.*, 1992; SHETKAR; SHINDE, 1997; YU *et al.*, 1996), espectrofotometria na segunda derivada (AL-MOMANI, 2001; BONAZZI *et al.*, 1997; HALKAR BHANDARI; RANE, 1998; LIU, 2003; NOBILE; RAGGI, 1992; THOMAS; GHODBANE, 2006), eletroforese capilar (SUN *et al.*, 1997; MASLARSKA; TANCHEVA, BUDEVSKY, 2005), potenciometria (KHALEEL; ABDOON, 2012; ELMALI *et al.*, 2003), polarometria (MABROUK *et al.*, 2003), espectrofotometria no visível (ABEL RAZAK *et al.*, 2002; AYAD *et al.*, 2002; 2003; BLAIH *et al.*, 1996; UKU, 2006), RNM (ZOPPI; LINARES; LONGHI, 2005), Fluorescência (OLIVA *et al.*, 2005) e espectrofotometria no ultravioleta (KÜLKAMP *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de um método eficiente, simples, preciso e com reduzidos custos de análise e impacto ambiental é de grande importância, uma vez que a maior parte dos métodos oficiais empregam CLAE (Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), Farmacopeia Americana (THE UNITED STATES..., 2009), Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA..., 2011), Farmacopeia Europeia (2011) e Farmacopeia Portuguesa (2008) que depende de operadores treinados, equipamentos sofisticados e reagentes orgânicos; ou titulometria, conhecida por suas desvantagens relacionadas à destreza do operador e tempo de análise.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método para determinação de maleato de enalapril em comprimidos e cápsulas, através de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

2 Material e Métodos

2.1 Amostras e reagentes

Amostras comerciais de comprimidos com dosagem declarada de 20 mg de maleato de enalapril: Amostra A (referência), amostra B (genérico), amostras C e D (similares) e amostras de cápsulas manipuladas: E (Londrina-PR), F (São José do Rio Preto-SP), G (Presidente Prudente-SP) e H (Olimpia-SP) foram selecionadas. Empregou-se como substância química de referência o maleato de enalapril padrão secundário (99,8%), fornecido pelo laboratório IQUEGO (Goiânia-GO).

Os excipientes estudados no teste de especificidade foram aqueles empregados nas formulações de comprimidos e cápsulas analisadas neste trabalho: amido de milho, lactose, carbonato sódico ácido, estearato de magnésio, óxido férrico amarelo e óxido férrico vermelho, todos de grau farmacêutico.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau

analítico: ácido clorídrico e hidróxido de sódio e água destilada.

2.2 Equipamentos

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu 160A) de duplo feixe, detector de 190 a 1100 nm e cubetas de quartzo de 1cm. Utilizou-se balança analítica (Mettler AE200) para pesagem dos materiais.

2.3 Validação do método

O método proposto, baseado em espectrofotometria no ultravioleta, foi validado conforme Resolução RE n.899/2003 (ANVISA, 2003) e International Conference on Harmonization (ICH, 2005).

Para o desenvolvimento do método, foram realizados testes com os seguintes solventes: água, solução de ácido clorídrico 0,1M, 0,5M e 1M e solução de hidróxido de sódio 0,1M, a fim de escolher a melhor solução diluente para preparação das amostras, considerando a solubilização do maleato de enalapril. O melhor comprimento de onda foi escolhido realizando a varredura na faixa de 200 a 400nm.

Especificidade: Foi preparada solução padrão de maleato de enalapril de 10,0 µg/mL em água destilada e soluções placebo de cada excipiente. Os excipientes foram selecionados de acordo com a bula do medicamento. Conforme Lachman *et al.* (2001), para cada excipiente existe uma porcentagem mínima e máxima na formulação, de acordo com a função, para obter comprimidos com características farmacotécnicas adequadas. Dessa forma, calculou-se a quantidade de cada excipiente, baseado no valor de peso médio dos comprimidos e as porcentagens recomendadas.

Foi traçado o espectro de cada solução na faixa de 200 a 400 nm e observado a presença de sinais de absorção na faixa de leitura do analito.

Linearidade: Foram preparadas soluções em triplicata nas concentrações de 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 13,0 µg/mL de maleato de enalapril (padrão de trabalho) em água destilada. A leitura das soluções foi efetuada em espectrofotômetro a 208 nm, empregando água destilada como branco. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

Precisão: A repetibilidade e precisão intermediária foram determinadas partindo-se de 6 tomadas de ensaio de 12,5 mg de maleato de enalapril (padrão de trabalho), obtendo-se soluções na concentração de 10,0 µg/mL. A precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento em dois dias diferentes e com dois analistas diferentes. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o Desvio Padrão Relativo (DPR).

Exatidão: A exatidão, expressa em porcentagem, foi avaliada a partir da adição e recuperação de quantidades conhecidas de maleato de enalapril padrão em amostra

comercial (amostra A- medicamento referência). As soluções foram preparadas em triplicata, contendo mistura de solução amostra de 5,0 µg/mL e soluções padrão de 2,0; 5,0; e 7,0 µg/mL de maleato de enalapril. As quantidades recuperadas de maleato de enalapril padrão adicionadas foram calculadas a partir da curva de calibração. Uma recuperação de 98,0 a 102,0 % é recomendada para a exatidão do método.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ): O LD e o LQ do maleato de enalapril para o método proposto foram determinados a partir da curva de calibração padrão e calculados como $3\sigma/S$ e $10\sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo de três curvas de calibração e S é a inclinação da curva padrão.

2.4 Avaliação da aplicabilidade do método nas amostras

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto, foram utilizados quatro medicamentos na forma de comprimidos, de diferentes fornecedores (referência, genérico e similar) e cinco produtos na forma de cápsulas manipuladas. As amostras foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

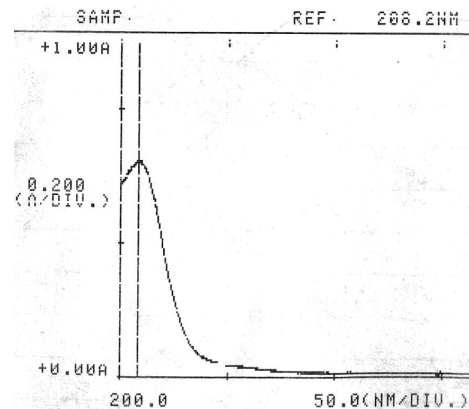
Teor: Para determinação do teor de maleato de enalapril, foram pesadas 10 unidades de cada amostra. Após trituração, foram pesados o equivalente a 10,0 mg de maleato de enalapril, que foi transferido para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 50 mL de água destilada, submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se a solução. As amostras foram filtradas (filtro quantitativo n 42) e procedeu-se a diluição com água destilada para obter uma solução de concentração de 10,0 µg/mL de maleato de enalapril. Efetuaram-se as leituras das absorvâncias a 208 nm, utilizando água destilada como branco. O procedimento foi realizado em triplicata. Calculou-se o teor de maleato de enalapril a partir da curva de calibração.

Uniformidade de Dose Unitária: A determinação de uniformidade de dose unitária foi realizada pelo método da uniformidade de conteúdo para comprimidos e cápsulas duras, para produtos com dose terapêutica menor ou igual 20 mg, de acordo com a Farmacopeia Brasileira. Pesou-se individualmente 10 unidades de cada amostra e transferiu-se cada unidade para balão volumétrico de 200 mL. Adicionou-se 100 mL de água destilada e submeteu-se ao ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente, filtrou-se (filtro quantitativo n42) a solução e transferiu-se 5 mL de cada filtrado para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com água destilada, obtendo-se solução de concentração teórica de 10,0 µg/mL de maleato de enalapril. Procedeu-se a leitura de cada solução a 208 nm, utilizando água destilada como branco. Calculou-se o teor de maleato de enalapril a partir da curva de calibração. O produto passa no teste se o Valor de Aceitação (VA) for menor ou igual a 15. Se VA for maior que 15, é necessário testar mais 20 unidades, sendo que o VA calculado para 30 unidades deve ser menor ou igual a 15.

3 Resultados e Discussão

O método analítico para determinação de maleato de enalapril foi validado através de espectrofotometria na região do ultravioleta a 208 nm (Figura 2), utilizando água como solvente. Após avaliação dos resultados da solubilidade do maleato de enalapril, optou-se pelo uso da água, por ser um solvente de baixo custo, amplamente disponível e que dispensa cuidados excessivos com gerenciamento de resíduos.

Figura 2: Espectro de absorção do Maleato de Enalapril 10 µg/mL



A curva analítica foi construída plotando-se a concentração (x) versus a absorvância (y) e apresentou linearidade significativa, com coeficiente de correlação de 0,9998 e $p < 0,05\%$ no intervalo de concentração de 5,0 a 13,0 µg/mL (Quadro 1).

Quadro 1: Análise de regressão linear da curva analítica do padrão de maleato de enalapril

Parâmetros	Resultados
Faixa de concentração (µg/mL)*	5,0 a 13,0
Equação da reta (n=3)	$y = -0,00528 + 0,061984 x$
Coefficiente de regressão	0,9998
Coefficiente de determinação	0,9999
Nível de significância	$p < 0,05$

*5 concentrações do padrão em triplicata.

O teste unilateral de análise de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear. A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa, bem como não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que t calculados (0,44) foram menores do que do t tabelado (2,015) no nível de 95% de confiança.

A análise dos espectros gerados pelos excipientes comprovou que eles não interferem na análise de comprimidos e cápsulas contendo maleato de enalapril 20 mg, quando utilizado o método proposto nas condições experimentais, uma vez que estes não absorveram na varredura de 200 a 300 nm. Neste caso, nenhum dos excipientes presentes no placebo

apresentou absorção relevante na região próxima a 273 nm.

A precisão do método foi determinada pela estimativa do DPR de 6 repetições do método aplicado à solução padrão em condições idênticas. O desvio padrão relativo de 0,3%, inferior a 5%, indica que o método tem boa repetibilidade.

O Quadro 2 apresenta os resultados da precisão intermediária, que demonstram que as variações entre dias e entre analistas estão de acordo com os limites especificados.

Os resultados da recuperação confirmam a exatidão do método (Quadro 3).

Quadro 2: Resultados da repetibilidade e precisão intermediária, empregando solução de maleato de enalapril a 10,0 µg/mL (n=6).

Parâmetros	Repetibilidade	Inter-dia	Diferentes analistas (intra-dia)	Diferentes analistas (inter-dia)
DPR (%)	0,6	1,4	2,7	1,3

*DPR: desvio padrão relativo

Quadro 3: Resultados do estudo da exatidão de método, empregando solução padrão de maleato de enalapril adicionado à amostra A.

Quantidade* (µg/mL)		Recuperação %*	DPR %**
Adicionada	Recuperada		
2,03	2,04	100,49	1,4
5,07	5,13	101,18	1,1
7,10	7,23	101,69	0,2

*média de 3 determinações

**DPR: desvio padrão relativo

O limite de detecção e quantificação, calculado através das equações da reta para o maleato de enalapril, foram de 0,02 µg/mL e 0,06 µg/mL, respectivamente.

A especificação de teor de maleato de enalapril segundo

compêndios oficiais é de 90,0 a 110,0% do valor declarado.

Os resultados do doseamento (Quadro 4) apresentam valores dentro dos limites especificados, tanto para os produtos comerciais, como para as cápsulas manipuladas.

Quadro 4: Resultados da análise de doseamento de maleato de enalapril nas amostras na concentração de 10 µg/mL, utilizando o método espectrofotometria no UV desenvolvido.

Amostras*	A	B	C	D	E	F	G	H
Teor (%)	92,3 (± 0,71)	96,3 (± 3,42)	91,7 (± 1,64)	100,6 (± 2,93)	91,1 (± 1,33)	109,3 (± 3,45)	94,1 (± 1,48)	96,9 (± 1,38)

*Média de 3 determinações

() Desvio Padrão

Comprimidos: A (referência) B (genérico), C (similar) e D (similar)

Cápsulas manipuladas: E, F, G e H

Para o teste de Uniformidade de dose unitária, as amostras A, B, C, D, F e H foram aprovadas com VA de

8,13; 5,9; 9,79; 6,95; 12,37 e 4,71, respectivamente (Quadro 5).

Quadro 5: Resultados do teste de uniformidade de dose unitária das amostras A, B, C e D (comprimidos) e E, F, G e H (cápsulas manipuladas) com 10 unidades.

Un*	Amostras							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	93,49	100,12	100,06	106,09	98,58	101,25	93,84	99,06
2	92,38	104,95	99,89	103,19	92,63	102,72	95,46	97,81
3	95,44	99,22	97,06	100,54	76,82	102,56	90,04	95,24
4	91,98	105,38	88,19	105,30	94,89	103,86	104,85	99,30
5	91,72	102,22	100,1	106,63	95,84	100,86	94,24	96,59
6	93,52	103,55	100,2	103,47	94,24	104,12	87,20	97,36
7	95,50	104,32	101,87	105,30	95,77	95,92	96,39	97,95
8	94,22	101,13	96,81	103,13	89,79	102,64	92,06	100,15

Continua ...

... Continuação

Un*	Amostras							
	A	B	C	D	E	F	G	H
9	94,84	101,45	97,99	104,51	84,75	105,05	97,64	97,50
10	93,17	101,25	96,80	103,33	85,44	112,93	80,14	101,81
Média	93,63	102,36	97,90	104,15	90,80	103,19	93,19	98,28
DPR**	1,4	2,1	3,8	1,8	6,7	4,5	6,6	1,9
VA	8,13	5,90	9,79	6,95	23,78	12,37	21,10	4,71

*10 unidades

**Desvio Padrão Relativo

Comprimidos: A (referência) B (genérico), C (similar) e D (similar)

Cápsulas manipuladas: E, F, G e H

As amostras E e G apresentaram VA maior que 15, sendo necessário a análise de mais 20 unidades. A amostra E foi aprovada com VA de 10,95. A amostra G não atendeu as especificações, já que obteve VA de 21,10, comprovando a falta de homogeneidade de mistura (Quadro 6).

Quadro 6: Resultados do teste de uniformidade de dose unitária das amostras E e G (cápsulas manipuladas), utilizando o método proposto com 30 unidades.

Un*	E			G		
	1	98,58	88,17	86,03	93,84	82,99
2	92,63	90,02	92,65	95,46	81,64	83,96
3	76,82	86,80	86,39	90,04	88,21	87,38
4	94,89	88,36	90,18	104,85	87,00	79,21
5	95,84	86,03	87,67	94,24	92,97	90,18
6	94,24	87,24	84,07	87,20	79,96	88,46
7	95,77	100,72	84,51	96,39	89,73	90,95
8	89,79	86,36	93,94	92,06	78,64	89,04
9	84,75	90,60	97,85	97,64	94,08	93,27
10	85,44	89,53	79,29	80,14	93,70	93,52
Média	89,50			89,60		
DPR**	5,5			6,1		
VA	10,95			21,10		

**Desvio Padrão Relativo

Como esperado, os comprimidos foram aprovados neste ensaio, uma vez que o processo de mistura em indústrias farmacêuticas é automatizado e o risco de problemas na uniformidade de conteúdo é menor.

4 Conclusão

O método analítico proposto para determinação de maleato de enalapril atende às exigências da Resolução RE nº 899 ANVISA, pois se mostrou específico, linear, preciso e exato, sendo uma alternativa econômica e de fácil aplicação comparado ao método oficial (CLAE). O método proposto utiliza água como solvente que, além de fácil obtenção, minimiza gastos com tratamento de resíduos, quando comparado a métodos que utilizam a solventes orgânicos, além de diminuir danos ambientais e à saúde de colaboradores envolvidos.

Agradecimento

Os autores agradecem à IQUEGO pelo fornecimento de padrão de trabalho.

Referências

- ABDEL RAZAK, O. Spectrophotometric and polarographic determination of enalapril and lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J. Pharm. Bio. Anal.*, v.31, n.4, p.701-711, 2003.
- AL-MOMANI, I.F. Determination of hydrochlorothiazide and enalapril maleate in tablet formulations by reversed-phase HPLC. *J. Chem.*, v.25, n.1, p.49-54, 2001.
- ANVISA. RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.
- AYAD, M.M. et al. Spectrophotometric and AAS determination of ramipril and enalapril through ternary complex formation. *J. Pharm. Bio. Anal.*, v.28, n.3, p.311-321, 2002.
- AYAD, M.M. et al. Spectrophotometric methods for determination of enalapril and timolol in bulk and in drug formulations. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.375, n.17, p.556-560, 2003.
- BLAIH, S.M. et al. Spectrophotometric determination of enalapril maleate and ramipril in dosage forms. *Spectrosc. Lett.*, v.33, n.1, 91-102, 1996.
- BONAZZI, D. et al. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.16, n.3, p.431-438, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. [acesso em 27 ago 2012]. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/caderno_atencao_basica15.pdf.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA; 2010.
- BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. London: The Stationery Office, 2011.
- ELMALI, F. et al. Differential pulse polarographic determination of enalapril maleate. *Turk J. Chem.*, v.27, n.1, p.65-69, 2003
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Council of Europe: Strasbourg, 2011.
- FARMACOPEIA PORTUGUESA. Lisboa: Infarmed, 2008.
- GUMIENICZEK, A.; PRZYBOROWSKI, L.; KOWALCZUK, D. Liquid chromatographic separation and UV determination of certain antihypertensive agents. *Acta Pol. Pharm.*, v.54, n.3, p.179-181, 1997.
- HALKAR, U.P.; BHANDARI, N.P.; RANE, S.H. High performance liquid chromatographic simultaneous determination of amlodipine and enalapril maleate, from pharmaceutical preparation. *Indian Drugs*, v.35, n.3, p.168-169, 1998.

- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q2 (R1), 2005.
- KHALEEL, A.I.; ABDOON, F.M. Construction of ion selective membrane electrodes for the potentiometric determination of enalapril maleate in its pure form and pharmaceutical preparations. *Iraqi Nat. J. Chem.*, v.47, mp.311-321, 2012.
- KÜLKAMP, C.I. *et al.* Desenvolvimento de metodologia de doseamento de cápsulas de maleate de enalapril por espectrofotometria no ultravioleta. *Rev. Bras. Farm.*, v.92, n.2, p.71-76, 2011.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.Á.; KANIG, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.
- LIU, H. Determination of contents of enalapril maleate and its related substances by HPLC method. *Yaoxue Fuwu Yu Yanjiu*, v.3, n.4, p.247-249, 2003.
- MABROUK, M.M. *et al.* Simultaneous spectrophotometric estimation of enalapril maleate and hydrochlorothiazide. *Egypt. J. Biom. Sci.*, v.12, p.141-173, 2003.
- MASLARSKA, V.; TENCHEVA, J.; BUDEVSKY, O. Potentiometric method for quantitative determination of pharmaceutical polyfunctional protolytes. *Bulg Farmatsiya*, v.52, n.1/2, p.34-41, 2005.
- NOBILE, L.; RAGGI, M.A. Fourth derivative spectroscopic determination of enalapril maleate in tablets. *Farmaco*, v.47, n.5, p.811-815, 1992.
- OLIVA, M.A. *et al.* A new fluorescence assay for enalapril maleate. *J. Fluoresc.*, v.15, n.5, p.723-728, 2005.
- PASSOS, V.M.A.; ASSIS, T.D.; BARRETO, S.M. *Hipertensão arterial no Brasil*: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiol Serv Saúde*, v.5, n.15, p.34-37, 2006.
- SANE, R.T. *et al.* Determination of enalapril maleate in pharmaceutical dosage forms by HPLC. *Indian Drugs*, v.29, n.5, p.244-245, 1992.
- YU, C. *et al.* Determination of enalapril by reverse phase HPLC. *Yaowu Fenxi Zazhi*, v.16, n.6, p.389-391, 1996.
- SHETKAR, P.B.; SHINDE, V.M. Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by reversed phase HPLC. *Anal. Lett.*, v.30, n.6, p.1143-1152, 1997.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2009.
- THOMAS, B.R.; GHODBANE, S. Evaluation of a mixed micellar electrokinetic capillary electrophoresis method for validated pharmaceutical quality control. *J. Liquid. Chromatogr.*, v.16, n.9/10, p.1983-2006, 1983.
- SUN BI, Y. Quantitative analysis of antihypertensive compound formulations by capillary zone electrophoresis. *Chinese Chem. Lett.*, v.8, n.11, p.989-992, 1997.
- Ulu ST. Determination of enalapril maleate in pharmaceutical preparations using methyl Orange. *Acta Pharm. Sci.*, v.48, n.3, p.195-203, 2006.
- ZOPPI, A.; LINARES, M.; LONGHI, M.J. Quantitative analysis of enalapril by ¹H NMR spectroscopy in tablets. *Pharm. Biomed. Anal.*, v.37, n.3, p.627-630, 2005.