



CURSO DE FARMÁCIA

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE DROPROPIZINA EM SOLUÇÕES ORAIS COMERCIAIS

MILLENA ALMEIDA MONSORES

Macaé-RJ
Dezembro/2022

MILLENA ALMEIDA MONSORES

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE DROPROPIZINA EM SOLUÇÕES ORAIS COMERCIAIS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vítor Todeschini

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Maximiliano Sangoi.

Macaé-RJ

Dezembro/2022

CIP - Catalogação na Publicação

M755

Monsores, Millena

Validação de um método espectrofotométrico para determinação de dropropizina em soluções orais comerciais / Millena Monsores - Macaé, 2022.
55 f.

Orientador(a): Vítor Todeschini.

Coorientador(a): Maximiliano Sangoi.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Antitussígeno. 2. Controle de qualidade. 3. Espectrofotometria.
I. Todeschini, Vítor, orient. II. Sangoi, Maximiliano, coorient. III. Título.

CDD 615

MILLENA ALMEIDA MONSORES

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE DROPROPIZINA EM SOLUÇÕES ORAIS COMERCIAIS**

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado como requisito para
obtenção do grau de farmacêutico

Macaé, em 20 de dezembro de 2022

Vítor Todeschini <http://lattes.cnpq.br/7772590613565656>

Marina Nemitz <http://lattes.cnpq.br/4337263185352442>

Thiago Barth <http://lattes.cnpq.br/2954810429809063>

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por nunca desistir de mim quando eu mesma pensava em desistir, foi uma longa caminhada e hoje eu posso dizer que consegui. Entrei em uma das melhores Universidades do Brasil e cheguei ao final, estou preparada para me tornar uma profissional Farmacêutica.

Agradeço imensamente aos meus pais, Sandra e Anderson, por sempre me apoiarem em tudo, por cada conversa e conselho, cada esforço que fizeram para me manter na faculdade, cada momento em que me tranquilizaram e me encorajaram a continuar. Eu os amo e os deixarei orgulhosos.

Aos meus avós, Bárbara, Ionisel e Dejair, que sempre me ajudaram e acreditaram no meu potencial, que muitas vezes mesmo de longe, nunca deixaram de estar presente.

Ao meu falecido avô Tiagua, que sei que está sempre olhando e cuidando de mim. Saudades.

Aos meus tios, que são pilares da minha vida e me incentivaram nessa longa jornada, perguntando como eu estava indo, se precisava de algo, se poderiam ajudar de certa forma, sempre presentes. À vocês, minha gratidão.

Em especial meu tio Tiago, a pessoa pra quem eu ligava reclamando o quão estressante e difícil eram as disciplinas, ou o quão desesperada eu estava talvez por não ter ido tão bem em uma prova, uma pessoa que fez toda a diferença nos meus anos de faculdade e na minha vida, sempre me ouviu, me apoiou e me encorajou a continuar. Obrigada por tudo, eu sei que eu vou te dar muito orgulho.

Aos meus amigos, verdadeiros presentes que a UFRJ me deu, aqueles que me aturaram por longos anos e que deixaram tudo mais leve, obrigada por cada risada, desespero e lições.

As minhas meninas, obrigada por me abraçarem e me aceitarem nesta segunda família, a família de Macaé, como por vezes chamamos, dividir apartamento vai muito além de dividir apenas um espaço, nós dividimos nossos corações. Obrigada por me aturarem em cada surto seja de disciplinas, escrevendo TCC ou assuntos pessoais, e por cada risada, gargalhada e infinitos momentos de diversão que cultivamos nesses anos.

Aos meus orientadores, Maximiliano e Vitor, por me aceitarem no laboratório desde 2018, vocês me deram um espaço no laboratório, responsabilidades, o que me fez crescer pessoalmente e profissionalmente. Obrigada por todos os ensinamentos, correções, disciplina, autonomia e apoio.

A todos que fazem parte do grupo GPMAEB, obrigada pelos ensinamentos. Em especial a Anna e a Mikaelly, que fizeram grande parte da minha jornada e sempre me ajudaram em meio aos experimentos, vocês me ensinaram muito.

Agradeço ainda a todos os professores que eu tive a oportunidade de conhecer e aprender, com certeza fizeram a diferença na minha vida!

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas transformações”. (Rubem Alves)

RESUMO

Introdução: Para o alívio da tosse são indicados medicamentos das classes dos antitussígenos, expectorantes e mucolíticos. Dentre esses medicamentos há a dropropizina, um antitussígeno de ação periférica que atua inibindo o reflexo da tosse não produtiva indicada no tratamento sintomático e a curto prazo de tosse seca. No Brasil a dropropizina é somente comercializada nas formas farmacêuticas de xarope e solução oral, não havendo métodos analíticos oficiais para avaliação da qualidade do fármaco na literatura.

Objetivo: Este estudo tem como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método espectrofotométrico no ultravioleta para determinação quantitativa de dropropizina em soluções orais comerciais.

Materiais e métodos: Para o desenvolvimento deste método foram utilizadas a substância química de referência e a solução oral (30 mg/ mL) da dropropizina adquiridos comercialmente. Foi utilizado o espectrofotômetro de feixe duplo PerkinElmer Lambda UV-Vis 35. O método foi desenvolvido objetivando a facilidade de aplicação e confiabilidade analítica, tendo sido validado segundo guias aceitos internacionalmente através dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. A solução de trabalho preparada em água obteve concentração final de 15 µg/mL, a determinação espectrofotométrica foi realizada entre 200-400 nm e a análise quantitativa usando a primeira derivada em 249 nm.

Resultados e discussões: A especificidade do método foi comprovada a partir da primeira derivada em 249 nm permitindo determinar a dropropizina mesmo na presença dos excipientes farmacêuticos. A linearidade foi realizada nas faixas de concentração de 6 a 24 µg/mL ($r = 0,9997$, $n = 7$) em 249 nm, mostrando-se em conformidade com o preconizado. Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 0,36 e 1,18 µg/mL, respectivamente. A precisão foi realizada intra e interdias obtendo-se um desvio padrão relativo de 1,41%, dentro da faixa aceitável, indicando que o método possui excelente repetibilidade e precisão intermediária. Os valores de exatidão também mostraram-se excelentes, com um valor médio de recuperação de 99,44%. A robustez foi comprovada através de uma avaliação por delineamento fatorial completo demonstrando que o método é capaz de obter resultados adequados mesmo com as pequenas e deliberadas

modificações realizadas durante o ensaio. **Conclusão:** O método espectrofotométrico mostrou-se ser específico, linear, preciso, exato e robusto, além de possuir baixo custo e ter uma baixa utilização de reagentes poluentes. Portanto, esse método pode ser aplicado com sucesso na análise quantitativa de dropropizina em soluções orais e contribuir para a melhoria do controle de qualidade e para a pesquisa de novas alternativas analíticas.

Palavras chave: antitussígeno, controle de qualidade, derivada de primeira ordem, ultravioleta visível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da dropropizina.....	23
Figura 2 - Esquema das etapas que compõem a análise em um espectrofotometro UV-Vis.....	25
Figure 3 - <i>Chemical structure of dropropizine</i>	36
Figure 4 - <i>Zero-order absorption spectra (a) and first-order derivative spectra (b) of dropropizine reference substance solution and placebo solution, in water at concentration of 15 µg/mL.....</i>	43
Figure 5 - <i>First order derivative spectra of dropropizine reference solutions, in water in the range of 6 to 24 µg/mL.....</i>	44
Figure 6 - <i>Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions on the dropropizine assay for the robustness test using the full factorial design.....</i>	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Medicamentos utilizados no tratamento da tosse isentos de prescrição, disponíveis no Brasil.....	20
Quadro 2 – Métodos cromatográficos descritos na literatura para a determinação de dropropizina e levodropropizina.....	25

LISTA DE TABELAS

Table 1 - <i>Intra-day and inter-day precision data of 1D-UV spectrophotometric method for dropropizine oral solution dosage forms.....</i>	45
Table 2 - <i>Experimental values obtained in the recovery test for dropropizine by using the 1D-UV spectrophotometric method.....</i>	45
Table 3 - <i>Selected full factorial design for the robustness testing of dropropizine.....</i>	46

LISTA DE ABREVIATÖES

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CFE	Conselho Federal de Farmácia
cm	Centímetro
DROPRO	Dropropizina
DPR	Desvio Padrão Relativo
FB6	Farmacopeia Brasileira 6ª edição
h	Hora
ICH	International Conference on Harmonization
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
R ²	Coefficiente de Determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta Visível
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Tosse.....	19
3.2 Tratamento da tosse.....	22
3.3 Dropropizina.....	23
3.4 Controle de qualidade.....	23
3.5 Métodos espectrofotométricos	24
3.6 Métodos analíticos de determinação de dropropizina.....	25
3.7 Derivada de primeira ordem.....	28
3.8 Validação metodológica	28
3.8.1 Especificidade.....	29
3.8.2 Linearidade.....	29
3.8.3 Precisão.....	29
3.8.4 Exatidão.....	30
3.8.5 Limites de quantificação e qualificação.....	30
3.8.6 Robustez.....	31
4. INTRODUÇÃO AO ARTIGO CIENTÍFICO	32
4.1 Artigo Científico (<i>Drug Analytical Research</i> , v. 4, n. 2, p. 12-18, 2020).....	33
5. DISCUSSÃO GERAL	51
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A tosse é um meio de defesa reflexa que pode ser voluntária ou involuntária, ela tem por função eliminar secreções das vias aéreas, envolvendo desde a proteção contra aspiração de corpos estranhos à defesa contra disfunção ou lesões ciliares, e ainda, está relacionada a diversas doenças pulmonares e extrapulmonares. A tosse pode ser caracterizada como seca ou produtiva e classificada em aguda, subaguda ou crônica a depender de sua duração (II DIRETRIZ BRASILEIRA NO MANEJO DA TOSSE CRÔNICA, 2006).

O estímulo da tosse pode decorrer de diversas causas como infecções, alergias, mudanças de temperatura, asma, doença do refluxo gastroesofágico, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica. Devido esse estímulo, o ato de tossir involuntariamente pode se tornar incômodo ao paciente, levando o mesmo a se automedicar. Para que isso não se torne realidade, é de suma importância que o farmacêutico esteja atento durante a anamnese para descobrir a real causa da tosse e determinar uma solução para a melhora do mesmo, e caso seja necessário, orientá-lo e encaminhá-lo a um atendimento médico especializado (RODRIGUES *et. al.*, 2017; CFF, 2021).

Como indicação farmacêutica, há medicamentos isentos de prescrição que podem ser utilizados pelo paciente, as classes mais utilizadas para o alívio do sintoma da tosse são os antitussígenos, os expectorantes e os mucolíticos (CFF, 2021). Na classe dos antitussígenos há a dropropizina que possui ação periférica e atua inibindo o reflexo da tosse não produtiva através da ação sobre os receptores periféricos e seus condutores aferentes, este fármaco é indicado para tratamentos a curto prazo em adultos e crianças maiores de 2 anos. Internacionalmente a dropropizina é comercializada nas formas farmacêuticas xarope, solução oral e comprimido, tanto em sua mistura racêmica como na forma de seu enantiômero puro S(-), a levodropropizina, porém no Brasil, a dropropizina é apenas comercializada nas formas farmacêuticas de xarope e solução oral (BALBANI, 2012).

Diversas são as técnicas analíticas com possibilidade de aplicação nas análises farmacêuticas, todas com vantagens e desvantagens dependendo das amostras a serem analisadas, complexidade operacional, consumo de

reagentes e treinamento de analistas. A espectrofotometria no ultravioleta (UV) se destaca na detecção e quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas, por apresentar rapidez, baixo custo operacional e confiabilidade dos resultados, sendo sua principal utilização no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas (JUNIOR *et al.*, 2017).

Ao desenvolver uma metodologia analítica faz-se necessário a validação da mesma, a fim de confirmar a confiabilidade, qualidade e segurança dos resultados, fornecendo evidências objetivas de que os requisitos específicos estão sendo atendidos, assegurando por meio de estudos experimentais sua finalidade, e visando suas determinações qualitativas, semi quantitativas e quantitativas (GIL, 2010; JUNIOR *et al.*, 2017; BRASIL, 2017). A nível nacional, a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) descreve os parâmetros que devem ser avaliados, enquanto que a nível internacional, as agências reguladoras utilizam orientações do *International Conference on Harmonization (ICH)* (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Considerando que a tosse possui um impacto médico, social e econômico, é essencial possuir métodos analíticos de domínio público para a avaliação da qualidade dos medicamentos usados em seu tratamento e controle. Destaca-se que não foram encontrados métodos de análise de dropropizina na formulação de solução oral em compêndios oficiais, assim como na literatura consultada para avaliações qualitativas e quantitativas do produto acabado.

Devido a importância do controle de qualidade para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos e a limitação de métodos analíticos em compêndios oficiais sobre a dropropizina, pretende-se através deste trabalho, otimizar e validar um método espectrofotométrico de determinação de dropropizina em soluções orais, e ainda, aprimorar a seletividade do mesmo em primeira derivada. Assim, o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos com pouca produção de resíduos e com baixa toxicidade, associados ao uso da função derivada, poderiam atender a esses propósitos, justificando a realização deste trabalho.

Por essas razões, entende-se que este estudo contribuirá para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade e

garantindo a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponibilizados para a população.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria no ultravioleta para determinação quantitativa de dropropizina em soluções orais.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento do método por espectrofotometria por UV buscando-se um método rápido, seguro, confiável e de baixo custo operacional;
- Validação do método por espectrofotometria por UV considerando os parâmetros de acordo com guias nacionais e internacionais de validação;
- Aplicação da metodologia na análise de soluções orais contendo a dropropizina.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Tosse

A tosse além de ser um sintoma respiratório muito comum, é também, um mecanismo de proteção das vias aéreas controlada pelo córtex e tronco cerebral, com isso, seu reflexo tem potencial para eliminar secreções e aspirar corpos estranhos, sem esse reflexo pode ocorrer retenção de secreções nas vias aéreas, levando a infecções ou danos respiratórios (BALBANI, 2012; GALVÃO, 2017).

Esse reflexo só é possível devido à fisiopatologia da tosse que consiste das fases inspiratória, compressiva e expiratória, seguindo-se a fase de relaxamento. Primeiramente ocorre um estímulo irritativo dos receptores localizados nas vias aéreas dando início à fase inspiratória, onde o indivíduo de forma voluntária ou involuntária, tenta inspirar o máximo de ar possível, em seguida ocorre a fase compressiva, onde a glote se fecha por cerca de 0,2 segundos, e com isso, ativa o diafragma e os músculos da parede torácica e abdominal, aumentando a pressão intratorácica e comprimindo as vias aéreas e os pulmões, logo vem a fase expiratória onde ocorre uma abertura da glote que expulsa o ar em alta velocidade resultando no som característico da tosse, e por fim, na fase de relaxamento ocorre o relaxamento dos músculos e o retorno das pressões aos níveis basais (II DIRETRIZ BRASILEIRA NO MANEJO DA TOSSE CRÔNICA, 2006).

Para melhor identificação da causa dos sintomas de acordo com o histórico descrito pelo paciente, é possível classificar a tosse para determinação do tratamento mais adequado. Dessa forma, a tosse pode ser caracterizada em seca ou produtiva e classificada em aguda, subaguda ou crônica (CFF, 2021).

A tosse seca (não produtiva) ocorre quando os estímulos irritativos não são acompanhados de secreção, enquanto a tosse produtiva vem acompanhada de secreção, com ou sem expectoração. De acordo com a duração, a tosse pode ser classificada como aguda, subaguda ou crônica. O sintoma de tosse aguda ocorre por até três semanas e é estimulado frequentemente por infecções no trato respiratório superior ou pelo agravo de

doenças pré-existentes, como resfriado, gripe, infecção por SARS-CoV-2, rinite, laringite, faringite. O sintoma de tosse subaguda ocorre em uma tosse persistente de três a oito semanas, a causa mais comum é a tosse pós-infecção ou o prolongamento de um resfriado comum sem evidências de pneumonia como coqueluche, tuberculose ou ainda, a pós-infecção pelo vírus SARS-CoV-2. O sintoma de tosse crônica tem duração por mais de oito semanas e as causas mais comuns são a síndrome da tosse das vias aéreas superiores, asma, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica (II DIRETRIZ BRASILEIRA NO MANEJO DA TOSSE CRÔNICA, 2006; CFF, 2021).

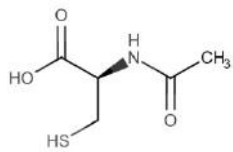
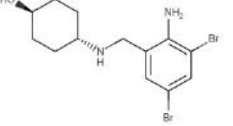
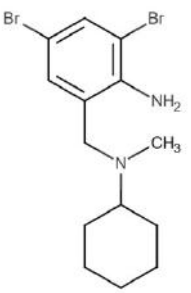
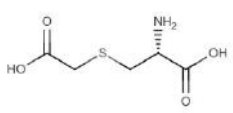
3.2 Tratamento da tosse

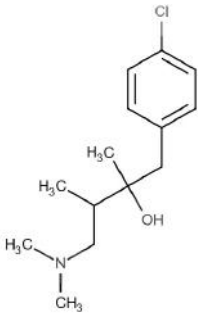
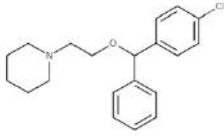
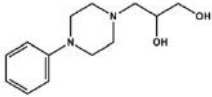
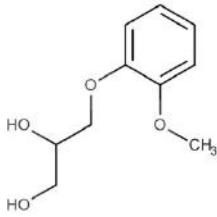
O tratamento farmacológico da tosse deve ser realizado por um período de tempo o mais curto possível, e caso os sintomas permaneçam, deve-se procurar atendimento médico. O tratamento farmacológico isento de prescrição pode ser dividido em três classes, os antitussígenos, os expectorantes e os mucolíticos. Os antitussígenos agem suprimindo ou inibindo a tosse ao atuar a nível central, causando depressão do centro bulbar que controla o reflexo da tosse, os expectorantes estimulam os mecanismos de eliminação do muco com movimentos ciliares que impulsionam a secreção até a faringe, e os mucolíticos promovem a liquefação do muco, tornando-o mais fluido, facilitando sua expulsão (CRF-SP, 2010).

Segundo o Guia de Prática Clínica 2021, a dropropizina está entre os medicamentos de classe antitussígenos, sendo utilizada como terapia farmacológica de segunda linha.

A seguir, pode-se observar uma adaptação em formato de quadro (Quadro 1), sobre fármacos indicados para o tratamento da tosse, disponíveis no Brasil e isentos de prescrição médica.

Quadro 1 – Medicamentos utilizados no tratamento da tosse isentos de prescrição, disponíveis no Brasil.

Fármaco	Mecanismo de ação	Indicação	Estrutura química
Acetilcisteína	Diminui a viscosidade das secreções pulmonares facilitando sua remoção através da tosse, por drenagem postural ou por meios mecânicos.	Tosse produtiva	
Ambroxol	Corrige a produção das secreções traqueobrônquicas e reduz sua viscosidade, estimula a síntese e a liberação do surfactante pulmonar, reativando a função mucociliar.	Tosse produtiva	
Bromexina	Possui efeito secretolítico, reduzindo a viscosidade do muco, e secretomotor, aumentando a quantidade de expectoração na região dos brônquios, facilitando a expectoração e aliviando a tosse.	Tosse produtiva	
Carbocisteína	Regula a viscosidade das secreções mucosas do trato respiratório, alterando a síntese das glicoproteínas do muco, tornando a secreção mais fluida e melhorando a depuração mucociliar, logo, uma tosse mais efetiva.	Tosse produtiva	

Clobutinol	Interrompe o reflexo da tosse por sua ação no centro da tosse, não causando depressão respiratória e ação sedativa central.	Tosse não produtiva	
Cloperastina	Inibe o centro da tosse situado no bulbo, não causando depressão do centro respiratório.	Tosse não produtiva	
Dropropizina	Inibe o reflexo da tosse reduzindo a excitabilidade dos receptores traqueobrônquicos por meio da ação miorelaxante brônquica, produzindo uma melhor ventilação pulmonar. Não causa efeito de depressão respiratória e efeito emético.	Tosse não produtiva	
Guaifenesina	Estimula as secreções do trato respiratório ao provocar irritação da mucosa gástrica, aumentando o volume líquido respiratório e diminuindo a viscosidade do muco.	Tosse produtiva	
Iodeto de potássio	Diminui a viscosidade do muco com o aumento da secreção do trato respiratório.	Tosse produtiva	K-I

FONTE: (Adaptada: CRF-SP,2010; DRUGBANK, 2022)

3.3 Dropropizina

A dropropizina é um fármaco antitussígeno sintético ativo nos receptores periféricos e condutores aferentes, indicada para o tratamento da tosse não produtiva de adultos e crianças maiores de 2 anos. Ela age inibindo o reflexo da tosse não produtiva ao reduzir a excitabilidade dos receptores traqueobrônquicos e possui efeito sedativo na tosse, com ação miorelaxante brônquica, melhorando assim, a ventilação pulmonar. É isenta de efeitos secundários de antitussígenos de ação central como depressão respiratória e efeito emético. Além da tosse não produtiva, possui ainda, atividade sobre a tosse alérgica por apresentar ação lítica sobre o broncoespasmo produzido pela histamina. Possui rápida absorção pelo trato gastrointestinal, concentrações plasmáticas máximas observadas de 15 a 30 minutos após administração oral e meia-vida plasmática de aproximadamente 2 a 3 horas (CRF-SP, 2010).

Quimicamente, a dropropizina é descrita como 3-(4-fenil-1-piperazinil) - 1,2-propanodiol (Figura 1). Esta substância pertence à classe dos compostos orgânicos conhecidos como fenilpiperazinas, que contém um esqueleto de fenilpiperazina, constituído por uma piperazina ligada a um grupo fenil (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2019; DRUGBANK, 2022).

A dropropizina possui ainda, um S(-) enantiômero denominado levodropropizina. Estudos clínicos indicaram-na tão eficaz quanto medicamentos de ação central, e ainda, mais segura por apresentar menos efeitos colaterais centrais como sedação e sonolência (LAVEZZO *et al.*, 1992; DE BLASIO *et al.*, 2011; DE BLASIO *et al.*, 2012; ZANASI *et al.*, 2015).

Tanto a dropropizina como a levodropropizina são antitussígenos de ação periférica que reduzem a sensibilidade das fibras C vagais. Há sinais de que as fibras C brônquicas consigam inibir o reflexo da tosse, onde os receptores adaptáveis interagem com estas fibras, gerando inflamação neurogênica em resposta ao seu próprio estímulo (ácido cítrico, tabagismo, bradicinina), e assim, passam a liberar taquicininas que ativam tais receptores adaptáveis (II DIRETRIZ BRASILEIRA NO MANEJO DA TOSSE CRÔNICA, 2006; BALBANI, 2012).

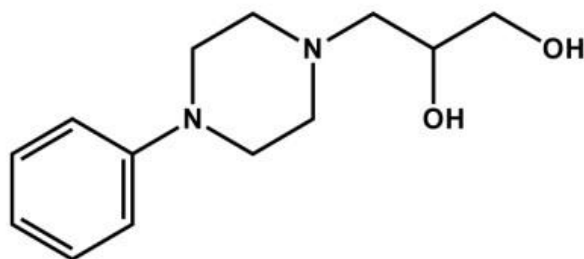


Figura 1 - Estrutura química da dropropizina.

3.4 Controle de qualidade

O controle de qualidade é a parte das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) que se refere à coleta de amostras, especificações, execução de testes, organização de documentos e procedimentos de liberação, que certificam que os testes necessários sejam executados e considerados adequados para uso, comercialização ou distribuição (BRASIL, 2022).

A Farmacopeia Brasileira (FB) é o compêndio farmacêutico nacional que estabelece métodos e monografias com exigências mínimas de qualidade, autenticidade e pureza de insumos farmacêuticos, medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária. Cabe a FB, estabelecer os parâmetros de aceitabilidade dos produtos disponibilizados à população, para posterior controle e fiscalização sanitária (FB6, 2019).

A partir dos métodos e monografias descritos na FB, é possível realizar junto ao controle de qualidade, a validação de determinado produto farmacêutico. Porém, quando não há métodos em monografias ou quando os métodos são inadequados para o produto que se pretende registrar, ou ainda, quando pode haver uma melhora em um método já existente, deve-se desenvolver e validar um método analítico próprio de acordo com a legislação vigente da ANVISA (VIEIRA *et al.*, 2013).

Uma vez que, não são encontrados métodos de análise de dropropizina em compêndios oficiais e números limitados de estudos na literatura, torna-se significativo a otimização e validação de um método para determinação de dropropizina, que contribuirá para o domínio tecnológico e científico,

aprimorando a área de controle da qualidade e garantindo sua segurança e eficácia terapêutica.

3.5 Métodos espectrofotométricos

O controle de qualidade emprega diversas metodologias para análises quantitativas como cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese, espectrofotometria no ultravioleta. Dito isto, destaca-se a técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) por ser amplamente utilizada na detecção e quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas, e por possuir vantagens como rapidez, baixo custo, simplicidade, precisão, robustez e confiabilidade dos resultados (JUNIOR *et al.*, 2017).

Os espectrofotômetros utilizados na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) são equipamentos capazes de registrar dados fazendo uso da Lei de Lambert-Beer. Esta constitui uma relação entre a absorvância em função do comprimento de onda, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática colimada. O espectrofotômetro UV-Vis (Figura 2) é composto por fonte de radiação, seletor de comprimento de onda, celas de absorção (cubetas), detector de radiação e uma unidade de leitura e de processamento de sinal (FB6, 2019).

O espectrofotômetro UV-Vis utiliza como fonte luminosa uma lâmpada de deutério e tungstênio, que fornecem radiação necessária para a análise. Utiliza ainda o modo transmissão, que mede a diminuição da intensidade da radiação em determinados comprimentos de onda quando a radiação passa através da amostra, sendo calculada quando a amostra é disposta no feixe óptico entre a fonte e o detector (FB6, 2019).

Entre os instrumentos que equipam o espectrofotômetro está ainda, o monocromador, composto desde a fenda de entrada à fenda de saída, isolando a banda de comprimento de onda desejada na amostra de forma que somente a banda de interesse seja detectada e medida, o compartimento que recebe a amostra é a cubeta (FB6, 2019).

Por fim, a amostra é detectada pelo detector que apresenta uma conexão com um computador e programa apropriado, permitindo o registro da

obtenção dos espectros de absorção das substâncias em meio digital (FB6, 2019).

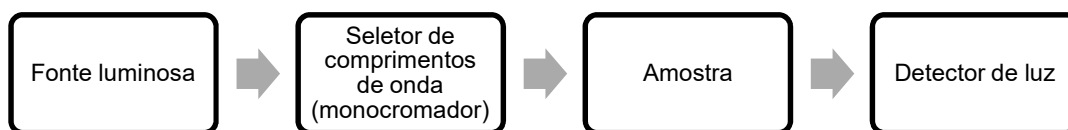


Figura 2 - Esquema das etapas que compõem a análise em um espectrofotômetro UV-Vis. Fonte: Harris, 2013.

3.6 Métodos analíticos de determinação de dropropizina

Apesar da dropropizina não estar descrita em compêndios oficiais, existem métodos analíticos descritos na literatura sobre a dropropizina e seu enantiômero, levodropropizina, em diferentes matrizes, como matéria-prima, formulações farmacêuticas, plasma e urina. No quadro 2 a seguir é possível observar esses dados. Vale ressaltar que, não são encontrados na literatura métodos de determinação de dropropizina em solução oral.

Quadro 2 – Métodos cromatográficos descritos na literatura para a determinação de dropropizina e levodropropizina.

Método	Condições analíticas	Deteção	Matriz
CLAE/UV	Coluna C18 (250 mm 4,6 mm, 5 µm) a 25 C; Fase móvel: acetonitrilo (contendo 15 mM ácido fosfórico): água (30:70, v/v) pH 8,0; fluxo taxa: 1 mL/min.	238 nm	Matéria-prima e xarope
CLAE/UV	Coluna C18 (150 mm 4,6 mm, 3,5 µm) a 40 C; Fase móvel: A: 0,025M de di-hidrogénio potássico tampão ortofosfato e 0,005M de sódio 1-tampão ácido	223 nm	Xarope

	hexanossulfónico B: água e acetonitrilo (10:90, v/v) Eluição gradual; Taxa de fluxo: 1 mL/min; Volume de injeção: 10 µL.		
CLAE/UV	Coluna C18 (250 mm 4,6 mm, 5 µm); Fase móvel: metanol: tampão fosfato (60:40) pH 6,8; Fluxo taxa: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL.	248 nm	Comprimidos
CLAE/UV	Coluna C18 (250 mm 4,6 mm; 5 µm) a 30 C; Fase móvel: acetonitrilo: trietilamina 0,1%, pH 3 50:50 (v/v); Taxa de fluxo: 1 mL/min; Injeção volume: 20 µL.	240 nm	Xarope
CLAE/UV	Coluna C18 (200 mm 4 mm; 5 µm) a 37 C; Móvel fase: metanol: 0,05M dietilamina (20:80, v/v) pH 3 ajustado com ácido fosfórico; Taxa de fluxo: 1 mL/min; Volume de injeção: 50 µL.	240 nm	Plasma canino
CLAE/UV	Coluna C18 (250 mm 4 mm, 10 µm); Fase móvel: metanol: 0,025 mol/L ácido fosfórico (98:2) pH 3 ajustado com trietilamina; Taxa de fluxo: 1 mL/min; Volume de injeção: 20 µL.	238 nm	Gotas orais
CLAE/UV Quiral	Coluna Chiralpak AD-H (150 mm 4,6 mm, 5 µm) a temperatura ambiente; Fase móvel: hexano: álcool anidro: DEA (55:45: 0,1% v/v); Taxa de fluxo: 1,4 mL/min; Volume de injeção: 20 µL.	254 nm	Matérias-primas e comprimidos

CLAE/FL	Coluna embalada com poliestireno divinilbenzeno partículas (150 mm 4 mm, 5µm) na sala temperatura; Fase móvel: 0,1M monossódico fosfato pH 3: metanol (70:30, v/v), contendo 0,5% (v/v) de tetrahidrofurano; Taxa de fluxo: 0,5 mL/min; Volume de injeção: 100 µL.	240 nm e 350 nm	Soro e plasma humano
CLAE/EM	Coluna C18 (100 mm 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: 10 mM de acetato de amónio (1% ácido fórmico, v/v): metanol (55:45, v/v); Taxa de fluxo: 0,5 mL/min.	Ionização de eletrospray positivo; Modo monitor de reação múltipla (m/z 237 → m/z 120).	Plasma humano
CLAE/EM	Coluna Chiralpak IG-3 (100 mm 4,6 mm, 3 µm) a 40C; Fase móvel: metanol com 0,05% dietilamina; Taxa de fluxo: 0,5 mL/min; Volume de injeção: 20 µL.	Ionização de eletrospray positivo; Modo monitor de reação múltipla (m/z 237 → m/z 160).	Plasma de ratos
CG/EM	Coluna capilar HP-1 (12 m 0,2 mm); Modo de injeção: sem divisão; Gás portador: hélio; Taxa de fluxo: 1 mL/min; Temperatura da porta de injeção: 280 C; Temperatura da coluna programada de 100 C a 310 C.	Ionização por elétrons; modo de varrimento completo (m/z 50-550)	Urina humana

CLAE/UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta;

CLAE/FL: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector

fluorimétrico; CLAE/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector

de espectrometria de massas; CG/EM: Cromatografia gasosa

com detector de espectrometria de massas. FONTE: (Adaptado: MACHADO *et al.*, 2019)

3.7 Derivada de primeira ordem

Durante uma análise por espectrofotometria pode ocorrer uma sobreposição de bandas devido a mistura de componentes da amostra, dificultando a compreensão do espectro. Para melhorar essa compreensão o próprio espectrofotômetro utiliza um software de interface, um programa que controla o funcionamento de todo o equipamento, e que possibilita derivar até a quarta ou mais derivadas (PASCHOAL *et al.*, 2003).

Ao realizar a primeira derivada, o espectro resulta na supressão das bandas largas, no realce das bandas estreitas, entre outras modificações, mas ainda obedecendo a Lei de Beer-Lambert. Nessa aplicação ocorre a anulação do comprimento de onda máximo (λ_{max}) do espectro de ordem zero, tornando positivo onde a absorção aumenta e negativo onde ela diminui, dessa forma, é possível individualizar melhor os constituintes de uma amostra, eliminando as interferências e permitindo uma melhor visualização e entendimento do espectro formado (PASCHOAL *et al.*, 2003).

3.8 Validação metodológica

A validação é um processo documentado contínuo que necessita de uma estratégia analítica bem planejada no decorrer de todo o desenvolvimento do medicamento, com o objetivo de garantir que um novo método analítico conduza informações confiáveis e interpretáveis capazes de mostrar a qualidade dos ensaios, através de sua comparabilidade, rastreabilidade, confiabilidade, e ainda, evitar dados analíticos não confiáveis que possam conduzir prejuízos financeiros (BRASIL, 2017). Com isso, a validação garante a qualidade e segurança analítica dos produtos farmacêuticos. Os principais parâmetros preconizados para validação segundo a legislação estão descritos a seguir.

3.8.1 Especificidade

A especificidade do método avalia a capacidade de identificação ou quantificação do analito em questão na presença de componentes presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz, além disso, as amostras devem ser submetidas sob diferentes condições de degradação, para também avaliar tal interferência (BRASIL, 2017).

3.8.2 Linearidade

A linearidade consiste em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito em questão. Para que esse método seja realizado deve-se primeiramente escolher uma faixa de trabalho a ser avaliada que deve conter no mínimo cinco concentrações diferentes da substância química de referência em triplicata (BRASIL, 2017).

Para avaliar o resultado da linearidade é necessário realiza-se uma representação de um gráfico de dispersão contendo as respostas encontradas em função da concentração do analito, expressos pela equação da reta ($y = ax+b$) pelo método dos mínimos quadrados, onde são avaliados os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), bem como a significância do coeficiente angular, onde, o nível de significância deve ser de 5%, o coeficiente de correlação 0,990 e o coeficiente angular $\neq 0$ (BRASIL, 2017).

3.8.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos através dos ensaios analíticos das amostras preparadas de acordo com o método descrito, sendo expressa a partir da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. (BRASIL, 2017)

A repetibilidade deve ocorrer sob as mesmas condições de operação, analista e instrumentação, em uma única curva analítica. As amostras devem ter no mínimo 9 determinações, sendo 3 concentrações (baixa, média e alta) em triplicata ou seis réplicas de 100%. A precisão intermediária deve demonstrar a proximidade entre os resultados obtidos de uma mesma amostra,

em um mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, com analistas diferentes. A reprodutibilidade deve demonstrar a proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes. O cálculo da precisão é realizado a partir da dispersão dos resultados conforme a fórmula $DPR = (DP/CMD) \times 100$, onde DPR é o desvio padrão relativo, CMD é a concentração média determinada e DP é o desvio padrão (BRASIL, 2017).

3.8.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico se dá pelo grau de concordância entre os resultados individuais em relação a um valor dado como verdadeiro. As amostras devem ser preparadas de maneira independente com no mínimo 9 determinações, sendo elas, 3 concentrações (baixa, média e alta) em triplicata (BRASIL, 2017).

Para avaliar a exatidão, esta pode ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de acordo com a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, a partir da fórmula abaixo:

$$\text{RECUPERAÇÃO} = \frac{\text{CONCENTRAÇÃO MÉDIA EXPERIMENTAL}}{\text{CONCENTRAÇÃO TEÓRICA}} \times 100$$

3.8.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção avalia a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado. Este limite pode ser calculado a partir da fórmula $LD = 3,3 \cdot \sigma / IC$, onde σ é o desvio padrão e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2017).

Já o limite de quantificação avalia a menor quantidade do analito na uma amostra que pode ser identificado com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas. Este limite pode ser calculado a partir da fórmula $LQ = 10 \cdot \sigma / IC$, onde σ é o desvio padrão e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2017).

3.8.6 Robustez

A robustez é um parâmetro que avalia a capacidade do método desenvolvido de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas como, temperatura, pH, solvente (BRASIL, 2017).

4. INTRODUÇÃO AO ARTIGO CIENTÍFICO

Sabendo-se que a dropropizina não apresenta um método de análise descrito em compêndios oficiais e que os dados sobre a mesma na literatura analítica para avaliações quantitativas e qualitativas em produto acabado são limitados, a parte experimental do presente trabalho baseia-se na importância clínica da dropropizina, por não possuir tais registros disponíveis para sua determinação, dessa forma, foi realizado a otimização e validação de um método espectrofotométrico para determinação de dropropizina em soluções orais comerciais. A metodologia, materiais e resultados estão dispostos em forma de artigo científico, cujo qual foi publicado no final de 2020 pela revista *Drug Analytical Research* v. 4, n. 2, p. 12-18, intitulado *Validation of a green spectrophotometric method for the determination of dropropizine in commercial oral solutions*.

4.1 Artigo científico

Drug Analytical Research

ISSN: 2527-2616

Drug Anal. Res., v. 4, n. 2, p. 12-18, 2020

Validation of a green spectrophotometric method for the determination of dropropizine in commercial oral solutions

Millena Almeida Monsores^a, Mikaelly Pereira Caet^a, Anna Karolina Mouzer da Silva Machado^b, Marina Cardoso Nemitz^a, Vítor Todeschini^a, Maximiliano da Silva Sangoi^{a, b, *}

^a*Curso de Farmácia, UFRJ, Macaé-RJ, Brasil;* ^b*Programa de Pós-graduação em Produtos Bioativos e Biociências, UFRJ, Macaé-RJ, Brasil.*

**Corresponding author: maxsilvasangoi@yahoo.com.br*

ABSTRACT

The present work describes a green first-order derivative spectrophotometric (1D-UV) method for determination of dropropizine in commercial oral solutions. The method was developed using ecologically correct solvents and validated according to International Conference on Harmonization (ICH) recommendations. The response was linear in the concentration range of 6–24 µg/mL ($r = 0.9997$, $n = 7$) at wavelength 249 nm, which was the zero crossing point of excipient solutions. The detection and quantitation limits were 0.36 and 1.18 µg/mL, respectively. The method showed adequate precision, with a relative standard deviation values lower than 1.41%. Excellent values of accuracy were obtained, with a mean value of 99.44%. The method proved to be robust by a full factorial design evaluation. It is simple, it has low cost, and it has low use of polluting reagents. Minimum environmental hazards observed and the results obtained attest to the reliability of the proposed green method, showing to be specific, linear, precise, accurate and robust. Thus, the validated 1D-UV spectrophotometric method was successfully applied to the quantitative analysis of dropropizine in oral solutions dosage forms, helping to improve quality control and environmental improvement.

Keywords: dropropizine; spectrophotometry; pharmaceutical analysis; validation; green method.

Introduction

The cough reflex serves to clear the airways of excessive secretions and foreign matter and can also be voluntarily evoked. It has a protective role, but can sometimes become excessive, non-productive and troublesome to patients. Cough is one of the most common reasons why individuals seek medical attention, and can be classified as acute cough (lasting less than 3–4 weeks) and chronic cough (lasting more than 8 weeks) (1, 2).

The most common cause of acute cough is an upper respiratory tract infection such as allergy, sinusitis, and flu. However, chronic cough can be a feature of a number of pulmonary disorders such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer, or extrapulmonary disorders such as gastro-esophageal reflux disease (1, 2). Besides, dry-cough is one of the most common symptoms of coronavirus disease 2019 (COVID-19). COVID-19 is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The SARS-CoV-2 primarily affects the respiratory system, and respiratory distress/failure is seen in severe/critically ill COVID-19 patients (3). Thus, the use of a cough suppressant can be applied in the palliative care setting.

In patients, the cause of cough remains unexplained even after some low detailed assessments (4). Chronic cough has a prevalence of over 12% in the general population and can reduce the quality of life of patients and a significant economic cost for the individual and society (1, 2, 5). There are very few safe and effective treatments for cough, consisting mainly of antitussives, expectorants and mucolytics, alone or in combinations (6, 7). The poor tolerability of most antitussives on the market is closely related to central nervous system side effects. However, dropropizine, a peripherally acting antitussive drug, has a good tolerability and safety profile (2).

Dropropizine (fig. 3) is chemically described as 3-(4-phenyl-1-piperazinyl)-1,2-propanediol. This substance belongs to the class of organic compounds known as phenylpiperazines, which contains a phenylpiperazine skeleton, consisting of a piperazine bound to a phenyl group (8, 9). Dropropizine and its (S)-enantiomer, levodropropizine, act in non-productive cough of adults and children older than 2 years. The drugs inhibit the cough

reflex through action on peripheral receptors and their afferent conductors (1, 10).

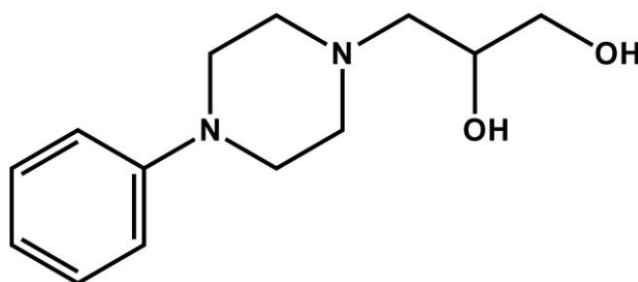


Figure 3 - Chemical structure of dropropizine.

For routine analysis, a simple, rapid, and cost-effective analytical method is preferred. Spectrophotometric methods are the most commonly used techniques and continue to enjoy wide popularity. These methods are more economic and simpler, compared to methods such as chromatography and electrophoresis, and can provide a very useful alternative for routine analysis of pharmaceutical formulations (11-17). For comparison, one typical liquid chromatograph generates more than 1 L of organic waste daily. This amount of solvent waste is from the operation of liquid chromatographs only, without the waste originating from sample preparation (18).

Derivative spectrophotometry is an analytical technique which consists in the differentiating of normal spectrum by mathematical transformation of spectral curve into a derivative (first- or higher derivatives). This technique usually improves resolution bands, eliminates the influence of background or matrix and provides more defined fingerprints than traditional ordinary or direct absorbance spectra, since it enhances the detectability of minor spectral features (19). The common availability of the instrumentation, the simplicity of procedures, speed, precision and accuracy of the technique still make spectrophotometric methods attractive (20).

Green analytical chemistry is a research field that incorporates sustainable analytical approaches to minimize the toxicity and amounts of wastes keeping the analytical performance. There are many analytical strategies for this purpose, such as the miniaturization of the sample preparation, the application of solventless extraction techniques, the

development of new technologies with low waste production and the substitution for less toxic solvents (18, 21-27).

Dropropizine is marketed in the form of a racemic mixture or its pure enantiomer, levodropropizine, and is available worldwide in various pharmaceutical forms such as tablets, syrup and oral solution. In Brazil, it is available only in liquid dosage forms of syrup and oral solution, in different concentrations. Due to the absence of analytical methods for the determination of this drug in oral solutions dosage form, the aim of this study was to develop and validate an analytical method with green spectrophotometric approaches, according to the International Conference on Harmonization (ICH) guideline (28). Therefore, this method contributes to the research on new analytical alternatives with advantages for the quality control of pharmaceutical formulations and, thus, promote public health and environmental benefits.

Experimental

Chemicals and reagents

Dropropizine reference standard was purchased from European Pharmacopoeia (Strasbourg, France). Dropropizine 30 mg/mL oral solutions were acquired on local market. All products were used within their shelf life period. All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. Ultrapure water (Milli Q Gradient System, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used for all the analyses. Each oral liquid dosage form was labeled containing the following excipients: benzoic acid, citric acid, sodium benzoate, ethoxylated hydrogenated castor oil, sodium saccharin, sucralose, neroli aroma, purified water.

Apparatus and experimental conditions

A UV-Vis Lambda 35 double-beam spectrophotometer (PerkinElmer, Singapore) with 1 cm quartz cells was used. UV WinLab software 6.0 was used for instrument control and data acquisition. The first-order derivative spectra of solutions were recorded at a fast scan speed, the spectra were obtained by

instrumental electronic differentiation using a wavelength interval of 2 nm in the range of 200-400 nm. The determinations were made at 249 nm. The spectrophotometric measurements were recorded by using water as a blank solution.

Preparation of reference solution

For the preparation of the reference solution, 30 mg dropropizine reference substance was diluted in methanol, obtaining a concentration of 600 µg/mL. The reference solution was stored at 2–8°C protected from light and diluted daily to an appropriate concentration with water.

Preparation of sample solution

A quantity equivalent of 30 mg of dropropizine were transferred into individual 50 mL volumetric flasks. After adding 30 mL of methanol, the flasks were mixed for 3 minutes. The samples were made up to volume with the same diluent. This solution was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore Corp). An aliquot of 125 µL was transferred into a 5 mL volumetric flask and marked up to volume with water in order to produce a final concentration of 15 µg/mL (working solution).

Validation of the 1D-UV method

Method validation was performed following ICH specifications for specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, limit of detection (LD) and quantitation (LQ) (28).

Specificity

The specificity evaluation was performed by preparing placebo containing the same excipients of the commercial products. Placebo solutions (15 µg/mL in theory) were prepared using the same procedure for the sample preparations (n = 3). In a separate study, drug with the same concentration was prepared independently from pure drug stock and analyzed. To maintain an

adequate simulation of the presence of excipients in real samples, the concentration for both solutions was the same. All the solutions were scanned from 200 to 400 nm, evaluated by first-derivative spectra and checked for any interference in the absorbance at tested wavelength (249 nm).

Linearity

The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, each one with seven concentrations of dropropizine prepared in water, in the range of 6 to 24 µg/mL (6, 9, 12, 15, 18, 21, and 24 µg/mL). The linearity range was validated at 40-160% of the target assay concentration. The linearity was evaluated by linear regression analysis. The least-squares regression method was used to calculate the correlation coefficient, y-intercept, and slope of the regression line. Analysis of variance (ANOVA) was applied for proving compliance of the linear model.

Precision

The precision was determined by repeatability (intraday precision) and intermediate precision (interday precision). Repeatability was evaluated by assaying six determinations at the same concentration (15 µg/mL), during the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision was studied by comparing the results obtained on three different days. Precision was expressed as relative standard deviation (RSD).

Accuracy

This parameter was determined by the recovery test that consisted on adding known amounts of reference solution to the sample solution (prepared according to sample preparation). Aliquots of 50 µL, 75 µL, and 100 µL of dropropizine reference solution at a concentration of 600 µg/mL were transferred to the sample solutions during the last dilution of the samples. The final concentrations of reference substance in each level were: 15, 18, and 21 µg/mL.

LD and LQ

LD/LQ parameters are not a requirement for drug assay; however, it is always useful to demonstrate that the analyses are being conducted in a region which is above the LQ value. The LD and LQ were calculated based on the standard deviation of the response (y-intercepts of regression lines) and the slope using three independent analytical curves, as defined by ICH. LD and LQ were calculated as $3.3\sigma/S$ and $10\sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

Robustness

In order to study the simultaneous variation of the factors in the considered responses, a multivariate approach using design of experiments is recommended in robustness testing. A full factorial design was used to examine the effects of three factors, studied at two levels (high and low): wavelength (247 nm; 251 nm), different solvents (water: ethanol (4:1, v/v); water: methanol (4:1, v/v)) and sample temperature (5 °C; 23 °C) in 8 experiments. The low and high levels were deliberately selected on the basis of small changes in method parameters, providing an indication of its reliability during normal usage. The response is the percentage of dropropizine in the oral solutions dosage forms (relative to their label claimed concentration) obtained compared to the reference solution in each experiment. All experiments were performed in randomized order to minimize the effects of uncontrolled factors that may introduce a bias into the response. The statistical analyses of the data were performed by the Minitab 17 (Minitab Inc, State College, PA, USA) data analysis software.

Sample analysis

For dropropizine quantitation in the oral solutions dosage forms, the sample solutions prepared in triplicate were diluted to an appropriate concentration (15 µg/mL) with water, filtered, and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance.

Results and Discussion

Method development

The spectrophotometric technique provides economic, practical and significant advantages over other methods. The development of the spectrophotometric method was more convenient, since it is simple, less time consuming and environmentally friendly for the routine analysis of dropropizine in oral solutions dosage forms. In addition, dropropizine syrup forms were also evaluated during development of the method, but due the presence of excipients that absorb light in the UV region, the method was not selective enough for syrup formulation.

The environmental impact of analytical procedures is the factor that has to be considered during solvent selection in optimization processes (18). In this work, different solvents were investigated to develop a suitable 1D-UV spectrophotometric method for the analysis of dropropizine in oral solutions. For selection of diluents, the criteria employed were the sensitivity of the method, the easiness of the sample preparation, and the solubility of the drug. Methanol was selected to first step dilution of dropropizine since it had a great capability to dissolve the drug in reference substance. However, in order to reduce the use of organic solvent, water was used as final diluent. Water is the better solvent considering toxicological risks and the absence of demanding residue storage, and it presented a good potential to dissolve the drug in conditions assayed. Considering sample preparation as usually the most polluting step in an analytical method, the use of non-polluting solvent was the ecological approach established in this work.

The use of solvents is one of the main environmental problems faced by analytical chemistry. Due to the impossibility of applying techniques with less waste production, solvents should be chosen with environmental awareness (18). There are solvent selection guides, developed by pharmaceutical companies that may give some clues for optimization methods in terms of solvents (29). All of these solvent selection guides are based on environmental, health and safety criteria. Alcohols and water, as used in this work, as well as

some esters, are classified as "recommended". Hazardous or highly hazardous are hydrocarbons, chlorinated solvents and some of the ethers (18).

The drug stability study was accomplished for the development and validation of the method. The stability of dropropizine in water was evaluated to verify if any spontaneous degradation occurs when the samples are prepared. The data obtained showed that sample solutions were stable during up to 48 h at 2–8 °C and for 6 h at room temperature, showing nonsignificant change (< 2%) relative to freshly prepared samples, as suggested (30).

Zero-order UV-Vis spectrum of dropropizine in water showed maximum drug absorption wavelength around 237 nm. However, an interference from the excipients present in oral solutions was verified in all the region of dropropizine absorption spectrum, which precludes the analytical use of zero-order spectrophotometry (fig. 4a). The first derivative was considered to be ideal for solving the overlapping of excipients absorption over dropropizine signal. As observed in Figure 2b, the zero crossing for placebo solution appears at 249 nm. Therefore, this value was selected as optimum to determine dropropizine in the presence of the pharmaceutical excipients.

Derivative spectra can be used to clarify absorption bands in more complex UV spectra. Compared with conventional spectrophotometric determinations, derivative spectrophotometry has proved to be of a great value in eliminating the interference from excipients (19), especially when applied to liquid formulations with large amounts of excipients with UV interference.

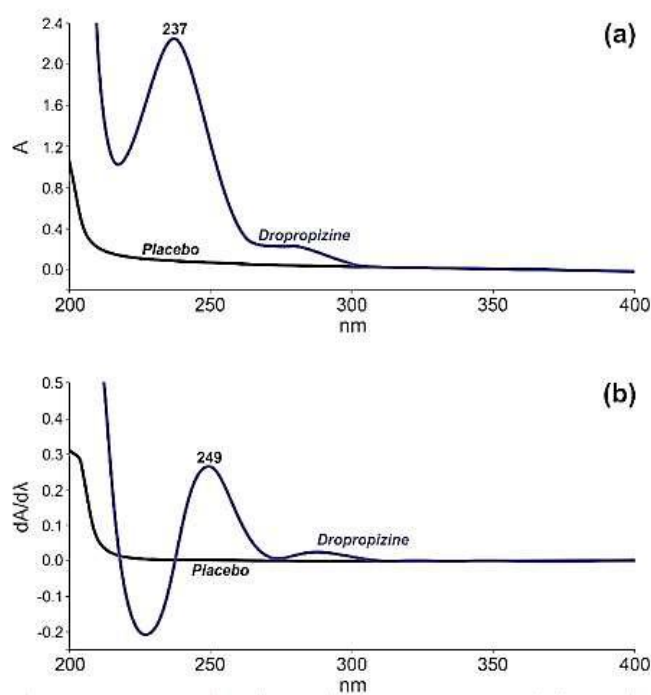


Figure 4 - Zero-order absorption spectra (a) and first-order derivative spectra (b) of dropropizine reference substance solution and placebo solution, in water at concentration of 15 µg/mL.

Method validation

Specificity

The spectrum analyzes show that it was possible to identify the analyte in question (dropropizine) in the presence of the placebo solution (fig. 4b). Both dropropizine and the placebo solution were diluted with water; the spectrum was successful in the first absorption order at 249 nm, confirming the specificity of the method.

Linearity

A linear relationship was found between the absorbance and the concentration of dropropizine in the range of 6 to 24 µg/mL (fig. 5). The representative linear equation was $y = 0.0181x + 0.0007$, calculated by the least squares method, and the correlation coefficient ($r = 0.9997$) was highly significant. The analytical data were validated by means of ANOVA that demonstrated significant linear regression (f calculated = 21330.37 > f critical = 4.60; $P < 0.05$) and no significant deviation from linearity (f calculated = 2.48 < f

critical = 2.96; $P > 0.05$). These results were proven according by successful application of the analytical method to synthetic mixtures of the drug product components to which known amount of analyte added within the range of method.

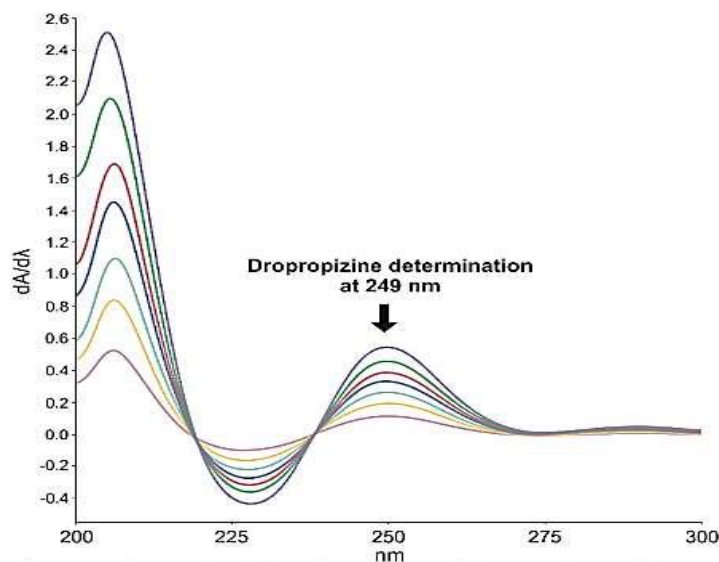


Figure 5 - First order derivative spectra of dropropizine reference solutions, in water in the range of 6 to 24 $\mu\text{g/mL}$.

Precision

Precision was determined by studying the intra-day and inter-day precision. The experimental values obtained for the determination of dropropizine in real samples are presented in table 1. The variability of the results was low with RSD values of less than 1.05% to intra-day precision, and the value of inter-day precision was 1.41% in oral solutions dosage forms. RSD values found for the analytical method were within the acceptable range indicating that this method has excellent repeatability and intermediate precision.

Table 1 - Intra-day and inter-day precision data of 1D-UV spectrophotometric method for dropropizine oral solution dosage forms.

Day	Concentration found ¹ (µg/mL)	RSD ² (%)
1	15.04	0.99
2	14.73	1.05
3	15.09	0.83
Mean ³	14.96	1.41

¹Mean of six replicates, ²RSD (Relative standard deviation),

³Mean of eighteen replicates.

Accuracy

The excellent mean percentage recovery values and their RSD values less than 2% were found satisfactory. At each level of the dropropizine concentration three determinations were performed. The mean recovery was 99.44% (RSD = 1.08%) for oral solutions dosage forms (table 2). These results revealed that any small change in drug concentration in these solutions could be accurately determined by the proposed analytical method.

Table 2 - Experimental values obtained in the recovery test for dropropizine by using the 1D-UV spectrophotometric method.

Added level (µg/mL)	Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration ¹ (µg/mL)	RSD ²	Accuracy
6	15	15.06	1.84%	100.41%
9	18	17.93	1.63%	99.62%
12	21	20.64	1.51%	98.28%

¹Mean of three replicates, ²RSD (Relative standard deviation).

LD and LQ

For calculating the LD and LQ, the calibration equations were generated by using the mean values of the three independent standard curves. The obtained values were 0.36 and 1.18 µg/mL, respectively.

Robustness

The susceptibility of the developed analytical methods to changes was tested in order to evaluate their robustness. For this purpose, a full factorial design was used; the experimental model and the corresponding responses are summarized in table 3.

The significance of the effects was evaluated by a Pareto chart (fig. 6) that consists of bars with a length proportional to the absolute value of the estimated effect, divided by the pseudo-SE defined by Lenth (31). The codes A, B, and C correspond to each of the parameters. The combination of two or three codes indicates the interaction effect between the variables. The bars are displayed based in the size of the effect, with the largest effect on the top. The chart includes a vertical line at the critical t-value for an α value of 0.05. The effects in which the bars are smaller than the critical t-value were not considered significant and did not affect the response variables (32).

Table 3 - Selected full factorial design for the robustness testing of dropropizine.

Assay	Wavelength (nm)	Temperature (°C)	Solvent¹	Assay² (%)
1	251	23	A	97.30%
2	251	23	B	97.11%
3	251	5	B	98.83%
4	247	5	A	98.33%
5	247	5	B	99.95%
6	247	23	A	101.47%
7	247	23	B	100.85%
8	251	5	A	99.51%

¹Solvent A (water: methanol, 4:1); Solvent B (water: ethanol, 4:1), ²Mean of three replicates.

Method Application

Acceptable results of application of the proposed method in oral solution dosage forms (fig. 6) were obtained, demonstrating the quality of the pharmaceutical samples and the applicability of the validated method for quality control analysis of dropropizine. It should be considered that excipients did not

interfere in the determination of the active compound. In addition, it is important to note that the method is not selective for the determination of enantiomeric purity and can be successfully applied in the analysis of dropropizine or levodropropizine oral solutions.

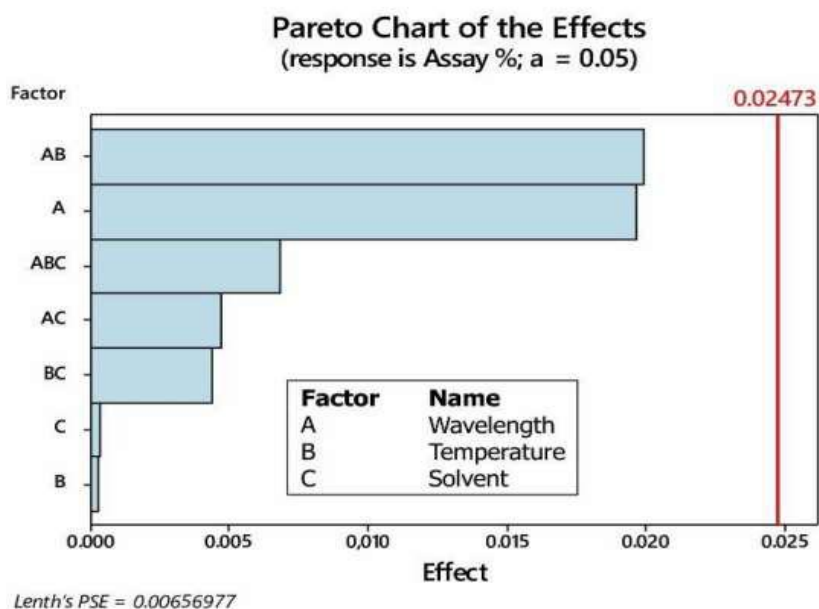


Figure 6 - Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions on the dropropizine assay for the robustness test using the full factorial design.

Conclusions

Producing drugs with proven safety, quality, and efficacy should be a concern of all pharmaceutical industries. In this sense, development of appropriate analytical methods is necessary for the quality control of pharmaceuticals.

This work presents an environmentally friendly, useful, simple, efficient and reliable 1D-UV spectrophotometric method for the determination of dropropizine in oral solution dosage forms requiring only minor sample preparation steps. The green method was validated showing satisfactory data for all tested parameters, thus offering advantages over other analytical methods due to its speed, simplicity, and lower cost. Besides, the method

produces very low levels of hazardous waste, promoting benefits to public health and the environment and contributing to the technological and scientific domain in the area of quality control of pharmaceutical products.

Therefore, the proposed method is adequate and can be conveniently used for the routine quality control of dropropizine in oral solutions.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq, FAPERJ and PIBICUFRJ for the financial support.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Dicipinigaitis PV, Morice AH, Birring SS, McGarvey L, Smith JA, Canning BJ, et al. Antitussive drugs - Past, present, and future. *Pharmacol Rev.* 2014; 66: 1-44.
2. Birring S, de Blasio F, Dicipinigaitis PV, Fontana G, Lanata L, Page C, et al. Antitussive therapy: A role for levodropropizine. *Pulm Pharmacol Ther.* 2019; 56: 79- 85.
3. Rahman A, Niloofa R, De Zoysa IM, Cooray AD, Kariyawasam J, Seneviratne SL. Neurological manifestations in COVID-19: A narrative review. *SAGE Open Med.* 2020; 8: 1-10.
4. Haque RA, Usmani OS, Barnes PJ. Chronic idiopathic cough: a discrete clinical entity? *Chest.* 2005; 127(5): 1710-1713.
5. Morice AH, Fontana GA, Belvisi MG, Birring SS, Chung KF, Dicipinigaitis PV. ERS guidelines on the assessment of cough. *Eur Respir J.* 2007; 29: 1256-1276.
6. Chung KF, Chang AB. Therapy for cough: active agents. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002; 15: 335-338.
7. Balbani AP. Cough: neurophysiology, methods of research, pharmacological therapy and phonoaudiology. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2012; 16: 259-268.
8. Drug Bank. Drug & Drug Target Database.
9. European Pharmacopoeia. 8th. Edition. Strasbourg: Council of Europe, 2013.

10. Dicipinigaitis PV. Current and future peripherallyacting antitussives. *Respir Physiol Neuro*. 2006; 152: 356-362.
11. Sangoi MS, Todeschini V, Steppe M. Second-order derivative UV spectrophotometric method for the determination of fesoterodine and comparison with LC, CE and LC-MS/MS in commercial extendedrelease tablets. *Acta Chim Slov*. 2012; 59: 136-143.
12. Ashour S, Bayram R. Selective and validated kinetic spectrophotometric method for the determination of irbesartan in pure and pharmaceutical formulations. *Ann Pharm Fr*. 2019; 77(2): 101-111.
13. Corte AC, Sfair, LL. Development and validation of analytical methodology for quality evaluation of tibolone in capsule pharmaceutical form through UV spectrophotometry. *Drug Analytical Research*. 2019; 3(2):7-11.
14. Gomes P, Negretto CMU, Naisinger ZB, Lorenzoni R, Wingert NR, Raffin RP. Second-derivative spectrophotometry for the analysis of simvastatin in polymeric Nanocapsules. *Drug Anal Res*. 2019; 3(2): 12-17.
15. Oppe TP, Menegola J, Schapoval EES. Development and validation of UV spectrophotometry and liquid chromatography methods for determination of cefpirome in raw material and pharmaceutical dosage. *Drug Anal Res*. 2019; 3(1): 42-50.
16. Naguib AI, Abdelaleem EA, Hassan ES, Hassan ES. Comparative study of eco-friendly spectrophotometric methods for accurate quantification of mebendazole and quinifamide combination; Content uniformity evaluation. *Spectrochim Acta A*. 2020; 235: 1-10.
17. Darwish HW, Ali NA, Naguib IA, Ghobashy MRE, Al-Hossaini AM, Abdelrahman MM. Stability indicating spectrophotometric methods for quantitative determination of bromazepam and its degradation product. *Spectrochim Acta A*. 2020; 238: 1-10.
18. Tobiszewski M. Metrics for green analytical chemistry. *Anal Methods*. 2016; 8: 2993-2999.
19. Ojeda CB, Rojas FS. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Anal Chim Acta*. 2004; 518(1-2): 1-24.
20. Rojas FS, Ojeda CB. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004-2008: a review. *Anal Chim Acta*. 2009; 635(1): 22-44.
21. Anastas PT. Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit Rev Anal Chem*. 1999; 29:3, 167-175.
22. Keith LH, Gron LU, Young JL. Green analytical methodologies. *Chem Rev*. 2007; 107: 2695-2708.

23. Mohamed HM. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *Trends Anal Chem.* 2015; 66: 176-192.
24. Korany MA, Mahgoub H, Haggag RS, Ragab MAA, Elmallah OAA. Green chemistry: Analytical and chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2017; 40(16): 839-852.
25. Saroj S, Shah P, Jairaj V, Rathod R. Green analytical chemistry and quality by design: A combined approach towards robust and sustainable modern analysis. *Curr Anal Chem.* 2018; 14(4): 367-381.
26. Gama MR, Melchert WR, Paixão TRLC, Rocha FRP. An overview of the Brazilian contributions to green analytical chemistry. *An Braz Acad Sci.* 2019; 91: 1- 33.
27. Merey HA, Ramadan NK, Diab SS, Moustafa AA. Green spectrophotometric methods for the determination of a binary mixture of lidocaine hydrochloride and cetylpyridinium chloride in the presence of dimethylaniline. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020; 242: 1-12.
28. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).* Geneva, Switzerland, 2005. 17p.
29. Prat D, Hayler J, Wells A. A Survey of solvent selection guides. *Green Chem.* 2014; 16: 4546-4551.
30. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. 2003; 987(1-2): 57-66.
31. Lenth RV. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics.* 1989; 31: 469-473.
32. Vanaja K, Rani RHS. Design of experiments: concept and applications of Plackett Burman design. *Clin Res Regul Aff.* 2008; 24(1): 1-23.

5. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento do método de determinação de dropropizina em soluções orais se deu a partir da técnica de espectrofotometria UV-Vis, essa técnica foi escolhida por apresentar vantagens econômicas, práticas e significativas como simplicidade, tempo curto de análise, uso de solventes ecologicamente corretos, em relação a outros métodos analíticos.

A seleção do solvente foi realizada empregando alguns critérios que deveriam ser levados em consideração, como a sensibilidade do método, a facilidade de preparo da amostra e a solubilidade do fármaco. O metanol foi o primeiro solvente a ser testado na etapa de diluição da dropropizina, por possuir grande capacidade de dissolver o fármaco na substância de referência, mas, com o intuito de reduzir o uso de solvente orgânico, a água também passou pelo teste e mostrou-se adequada apresentando bom potencial de dissolução da dropropizina, nas condições testadas.

Dessa forma, a água foi escolhida como solvente final considerando os riscos toxicológicos e a ausência de demandas de armazenamento de resíduos. Além disso, a fim de verificar qualquer ocorrência de degradação espontânea durante a preparação das diluições da dropropizina em água, foi realizado um estudo de estabilidade. O resultado do estudo demonstrou que as soluções amostra permaneceram estáveis até 48 h a 2–8 °C e por 6 h à temperatura ambiente, apresentando alteração não significativa (<2%).

O espectro UV-Vis de ordem zero da dropropizina em água mostrou comprimento de onda máximo de absorção do fármaco em torno de 237 nm, porém, foi verificada a interferência dos excipientes presentes nas soluções orais em toda a região do espectro, impossibilitando o uso analítico da espectrofotometria de ordem zero (Figura 4a). Portanto, a primeira derivada foi considerada ideal para resolver a sobreposição da absorção dos excipientes sobre o sinal da dropropizina, demonstrando comprimento de onda máximo de absorção em 249 nm (Figura 4b). O comprimento de onda encontrado demonstrou total possibilidade de identificação da dropropizina na presença da solução placebo (Figura 4b), comprovando a especificidade do método.

A linearidade do método foi comprovada pela escolha de 7 pontos (6-24 µg/ mL) para a realização da curva de relação linear (absorvância pela

concentração) (Figura 5). A equação linear encontrada foi $y = 0,0181x + 0,0007$, e o coeficiente de correlação ($r = 0,9997$), altamente significativo. A validação dos dados obtidos foi realizada por meio da ANOVA que demonstrou regressão linear significativa (f calculado = 21330,37 > f crítico = 4,60; $P < 0,05$) e nenhum desvio significativo da linearidade (f calculado = 2,48 < f crítico = 2,96; $P > 0,05$).

Os valores obtidos experimentalmente apresentados na tabela 1 do artigo, em relação a precisão, demonstraram baixa variabilidade, com valores de DPR inferiores a 1,05% intra-dia e 1,41% inter-dia. Os valores então encontrados estavam dentro da faixa aceitável, indicando uma excelente precisão do método.

A avaliação da exatidão obteve valores médios de recuperação de porcentagem (99,44%) e valores de DPR (1,08%) excelentes e satisfatórios (tabela 2). Com esses resultados foi possível afirmar que qualquer pequena alteração na concentração de dropropizina em soluções orais, poderia ser determinada com exatidão pelo método proposto.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram gerados a partir dos valores médios das três curvas padrão independentes e aplicados à fórmula descrita no item 3.6.5. Os valores alcançados foram de 0,36 e 1,18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para analisar a robustez foi utilizado um planejamento fatorial completo, o modelo experimental e as respostas correspondentes que podem ser observados na tabela 3 do artigo. A significância dos efeitos foi avaliada por um gráfico de Pareto (figura 6). O gráfico inclui uma linha vertical de t crítico em α de 0,05. Os efeitos em que as barras são menores que o valor t crítico não foram considerados significativos e não afetaram as variáveis de resposta. Dessa forma, os resultados alcançados demonstraram a qualidade das amostras farmacêuticas e a aplicabilidade do método validado para análise de controle de qualidade da dropropizina. Ressaltando ainda que, os excipientes não interferiram na determinação do composto ativo.

6. CONCLUSÃO

A fim de comprovar a segurança, qualidade e eficácia da produção de medicamentos, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para o controle de qualidade de fármacos. Este trabalho apresenta um método espectrofotométrico de primeira derivada simples, eficiente e confiável para a determinação de dropropizina em formas farmacêuticas de solução oral.

O método validado foi considerado específico, linear, preciso, exato e robusto de acordo com os requisitos preconizados pelo ICH. Além disso, mostrou-se eficiente, seguro, confiável e de baixo custo operacional em relação a outros métodos analíticos, contribuindo para o domínio tecnológico e científico na área do controle da qualidade de produtos farmacêuticos. Dessa forma, o método proposto é adequado e pode ser convenientemente utilizado para o controle de qualidade rotineiro da dropropizina em soluções orais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

II Diretrizes Brasileiras no Manejo da Tosse Crônica. *Jornal Brasileiro Pneumologia*, v. 32, s. 6, p. 403-446, 2006.

Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. **Bula do medicamento dropropizina**. Disponível em: <<https://dam.abbott.com/pt-br/documents/pdfs/nossas-bulas/v/BU-21-vibrat-bula-profissional-final.pdf>> Acesso: 20.03.22.

BALBANI AP. Tosse: neurofisiologia, métodos de pesquisa, terapia farmacológica e fonoaudiológica. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2012; 16: 259-268.

CRF-SP. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Organização PanAmericana da Saúde. Fascículo II – Medicamentos Isentos de Prescrição. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo: Organização Pan-Americana de Saúde – Brasília. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 25 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 658, de 30 de Março de 2022**. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 31 de março de 2022.

CAET, M. Avaliação da dissolução *in vitro* de formulações contendo dropropizina como pré-requisito à bioisenção. Trabalho de conclusão de curso (graduação no curso de Farmácia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2020.

Conselho Federal de Farmácia (CFF). Guia de prática clínica: sinais e sintomas respiratórios: tosse. Conselho Federal de Farmácia – Brasília, 2021.

DE BLASIO, F.; VIRCHOW, J. C.; POLVERINO, M.; ZANASI, A.; BEHRAKIS, P. K.; KILINÇ, G.; BALSAMO, R.; DE DANIELI, G.; LANATA, L. Cough management: a practical approach. *Cough*, v. 7, p. 1-12, 2011.

DE BLASIO, F.; DICPINIGAITIS, P. V.; DE DANIELI, G.; LANATA, L.; ZANASI, A. Efficacy of levodropropizine in pediatric cough. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 25, p. 337-342, 2012.

DRUGBANK. Dropropizine. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB13785>>. Acesso em: 20/09/2022

FARMACOPEIA BRASILEIRA (FB6), volume 1. 6ª ed. Brasília: Anvisa-Fiocruz, 2019.

FARMACOPEIA EUROPEIA, 10ª ed.; Council of Europe: Strasbourg, 2019.

GIL, E. S. **Controle Físico-químico de Qualidade de Medicamentos**. 3ª edição Ed.São Paulo: Pharmabooks, 2010.

HARRIS, Daniel C. Análise química quantitativa. 8. ed. Rio de Janeiro. LTC, 2013.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, Step 4, 2005.

JUNIOR, E. J. A. G.; ROEDER, J. S.; OLIVEIRA, K. B. L.; FERREIRA, M. P.; SILVA, J. G. Validação de Método Analítico para a Quantificação de Paracetamol em Solução Oral por Espectrofotometria no UV. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p.1747-1759, 2017.

LAVEZZO, A.; MELILLO, G.; CLAVENNA, G.; OMINI, C. Peripheral site of action of levodropropizine in experimentally-induced cough: Role of sensory neuropeptides. *Pulmonary Pharmacology*, v. 5, p. 143-147, 1992

LENTH RV. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics*. 1989; 31: 469-473.

MACHADO, A. K. M. S.; NEMITZ, M. C; TODESCHINI, V.; SANGOI, M. S. Characteristics, properties and analytical methods for determination of dropropizine and levodropropizine: a review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2019.

MONSORES, M. A.; CAET, M. ; MACHADO, A. K. M. S.; NEMITZ, M. C; TODESCHINI, V.; SANGOI, M. S. **Validation of a green spectrophotometric method for the determination of dropropizine in commercial oral solutions**. *Drug Analytical Research*, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2020.

PASCHOAL, L. R. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, 2003.

RODRIGUES, M. S.; GALVÃO, I. M. Aspectos fisiopatológicos do reflexo da tosse: uma revisão de literatura. *Revista de Medicina*, v. 96, n. 3, p. 172-176, 2017.

ZANASI, A.; LANATA, L.; FONTANA, G.; SAIBENE, F.; DICPINIGAITIS, P.; DE BLASIO, F. Levodropropizine for treating cough in adult and children: a metaanalysis of published studies. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, v. 31, p. 1-6, 2015.