

ARTIGO ORIGINAL

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de gliconato de clorexidina 1% solução tópica e doseamento de marcas comercializadas em Gurupi-TO

Development and validation of analytical methodology for determination of chlorhexidine gluconate 1% topical solution and dosing brands marketed in Gurupi-TO

Gizele Correia Brito Mota¹, Jeane Cândida Lopes²

RESUMO

Introdução: A clorexidina é um dos medicamentos mais usados na assepsia de feridas de pequenas extensões, por não provocar ardor, e por ser um antisséptico eficiente. Métodos analíticos para determinação de clorexidina são descritos em vários compêndios oficiais internacionais, porém, sua maioria, dispõe métodos instrumentais com detecção em equipamentos versáteis de alto custo. **Objetivo:** O estudo tem o objetivo de desenvolver e validar uma metodologia analítica por volumetria colorimétrica para determinação de gliconato de clorexidina solução tópica 1% e dosear cinco diferentes marcas das soluções comercializadas em farmácias de Gurupi-TO. **Materiais e Métodos:** A validação analítica do método para determinação de gliconato de clorexidina soluções tópicas 1% foi realizado de acordo com a RE 899 de 2003, avaliando parâmetros de especificidade,

linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação. Foram analisados também as amostras gliconato de clorexidina solução tópica a 1% retiradas de farmácias do município de Gurupi-TO. **Resultados:** Na validação analítica o método foi considerado específico, preciso, exato, linear e robusto cumprindo todas as exigências da legislação brasileira vigente. E no doseamento das marcas comercializadas de gliconato de clorexidina 1% obteve-se um teor não satisfatório na maior parte das amostras estando estes abaixo das especificações. **Conclusão:** O método titulométrico colorimétrico simples foi adequado sendo um método alternativo para análise, proporcionando para indústria um custo baixo. **Descritores:** Estudos de validação. Técnicas de química analítica. Controle de qualidade. Clorexidina.

ABSTRACT

Introduction: Chlorhexidine is one of the most commonly used drugs in aseptic small extension injuries, not cause burning, and be an effective antiseptic. Analytical methods for the determination of chlorhexidine are described in various international official compendia, but mostly features instrumental methods with detection equipment in versatile high cost. **Objective:** The study aims to develop and validate an analytical methodology for volumetric colorimetric determination for chlorhexidine gluconate topical solution 1% and titrate five different brands of solutions marketed in Gurupi-TO pharmacies. **Material and Methods:** The validation of the analytical method for determining chlorhexidine gluconate 1% topical solutions was performed according to the RE 899 2003 assessing specific parameters, linearity, precision,

accuracy, robustness detection and quantification limit. They also analyzed the samples of chlorhexidine gluconate topical solution 1% taken from pharmacies in the city of Gurupi-TO. **Results:** The analytical validation method was considered specific, precise, accurate, robust linear and fulfilling all the requirements of Brazilian legislation. And in the assay of chlorhexidine gluconate marketed brands 1% was obtained an unsatisfactory content in most samples and these are below specifications. **Conclusion:** The simple colorimetric titration method was appropriate and an alternative method of analysis, providing for industry a low cost. **Descriptors:** Validation studies. Chemistry techniques analytical. Quality control. Chlorhexidine.

¹Farmacêutica. Graduada em Farmácia pelo Centro Universitário UnirG, Gurupi/TO. E-mail: gizelebrito123@hotmail.com

²Farmacêutica. Professora assistente do Departamento de Farmácia do Centro Universitário UnirG. Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal do Tocantins. Gurupi/TO; Brasil. E-mail: jeaneclopes@hotmail.com

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Jeane Cândida Lopes, Rua 42, Quadra 120, Lote 25B, Setor Nova Fronteira,
Gurupi-TO, CEP: 77415-230.
E-mail: jeaneclopes@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A clorexidina é um composto sintético derivado da bis-biguanida sendo um dos medicamentos mais usados na assepsia de feridas de pequenas extensões, por não provocar ardor, de fácil aplicação e por ser um antisséptico eficiente. Devido ao alto poder antimicrobiano, a clorexidina e seus sais são utilizados em várias áreas do seguimento da saúde.¹⁻²

É grande a diversidade de marcas de antissépticos, a base de clorexidina, presentes no mercado. As indústrias farmacêuticas e cosméticas de grande e pequeno porte vêm cada vez mais empregando este ativo em formulações, pelo baixo valor e por ter menor rigor na concessão de registro pelos órgãos reguladores, por ser um medicamento de notificação simplificada (RDC nº 199 de 2006).³⁻⁵

Métodos analíticos para determinação de clorexidina são descritos em vários compêndios oficiais internacionais, porém, em sua maioria, dispõe de métodos instrumentais com detecção em equipamentos versáteis e de alto custo, assim como, o método por cromatografia. Outros métodos, como volumétricos em meio não aquoso, geram resultados insatisfatórios em formulações a base de água.^{2,6-8}

O desenvolvimento de um método analítico preciso envolve um processo de avaliação que necessariamente passa pela validação. A validação deve garantir, por meio de estudos e pesquisas experimentais, que o método referido atenda as exigências das aplicações analíticas apresentadas pela RE Nº 899, de 29 de maio de 2003, obtendo a confiabilidade dos resultados.⁹

O método analítico por volumetria tem larga aplicabilidade por ser econômico, rápido e de fácil acesso, sendo uma alternativa viável no controle de qualidade em farmácias de manipulação e indústrias de pequeno porte.¹⁰

A partir do exposto, o presente estudo tem como objetivo desenvolver um método analítico titulométrico colorimétrico simples, capaz de quantificar a clorexidina mesmo em formulações contendo água como veículo. Seguido da validação analítica, como comprovação da confiabilidade, e análise do teor de clorexidina em antissépticos a base de gliconato de clorexidina e água, realizados em 5 diferentes marcas disponíveis no mercado farmacêutico do município de Gurupi-TO.

METODOLOGIA

AMOSTRAS

A validação da metodologia analítica foi realizada com padrão secundário da solução de Gliconato de Clorexidina 20% aprovado em todos os testes de controle de qualidade para matéria-prima. O padrão foi diluído em água purificada para obtenção da concentração a 1%. Já as amostras de gliconato de clorexidina solução tópica 1% foram escolhidas cinco marcas diferentes, aleatoriamente, comercializadas nas farmácias do município de Gurupi-TO.

METODOLOGIA ANALÍTICA PROPOSTA

Transferiu-se, para um erlenmeyer, 20mL da amostra de Gliconato de Clorexidina 1%, levando para a estufa e dessecando a 100°C até a evaporação da água, deixando esfriar no dessecador. Foram adicionados 50mL de ácido acético glacial e algumas gotas do indicador cristal violeta SI ao erlenmeyer e realizou-se a titulação da preparação com ácido perclórico 0,1M em ácido acético (1mL de Ácido Perclórico 0,1M equivale a 22,44mg de Gliconato de Clorexidina 1%). Realizou-se uma nova titulação sem adição de clorexidina (branco).

O produto cumpre as especificações se estiver entre: 0,95% e 1,05% de teor de Gliconato de Clorexidina 1%.

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS

Especificidade/Seletividade

Para demonstrar a especificidade e a seletividade do método foram realizadas três titulações de amostras de gliconato de clorexidina 1% e do diluente ácido acético glacial (branco).

Linearidade

A linearidade foi determinada pela análise de cinco concentrações diferentes através da curva de calibração do gliconato de clorexidina 1%, concentrações correspondentes a 50%, 80%, 100%, 120% e 150% da concentração de trabalho. Foi preparada uma solução para cada concentração.

Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão foram preparados três lotes distintos, contendo: amostras de concentrações baixa (50%), média (100%) e alta (150%). Foram preparadas três soluções para cada concentração e para cada lote. Totalizando nove amostras para cada lote.

O lote 1 e 2 foi preparado e analisado por uma das pesquisadoras no primeiro dia de análise e o lote 3 foi preparado e analisado por outra pesquisadora da equipe no segundo dia de análise, seguindo o critério de analistas diferentes e dias diferentes.

Robustez

A robustez das soluções analíticas da amostra foi verificada através da variação do fabricante do titulante Ácido Perclórico 0,1M (SV). Foram realizadas três titulações da amostra para cada fabricante do titulante.

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Foi verificada a menor concentração detectável e quantificável, com precisão e exatidão, da amostra através das seguintes preparações decrescentes correspondentes a

10%, 2%, 1%, 0,5% e 0,1% da concentração de trabalho.

AVALIAÇÃO DOS DADOS

Os resultados encontrados foram dispostos em tabelas, no qual foi calculado a média, desvio padrão, desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%), construção de gráficos na função de 1º grau, regressão linear, em aplicativo Excel. Os resultados também foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) fator único e teste t Student com 95% de confiança, para os parâmetros precisão, exatidão e robustez, calculadas por meio do Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Especificidade/Seletividade

A tabela 1 demonstra o resultado da especificidade e seletividade do método para a

solução tópica de gliconato de clorexidina 1%. Como a formulação da solução contém apenas água, foi realizada a titulação com diluente ácido acético glacial já que o método volumétrico se faz em meio não aquoso e a amostra é dessecada antes da titulação.

Tabela 1. Concentração do diluente e da amostra de gliconato de clorexidina 1% após titulação.

Amostra	Média do Volume Gasto (mL)	Resultado (%)
Branco	0,0	0,0
Solução Gliconato de Clorexidina 1%	8,98	100,79

O método foi considerado específico e seletivo ao gliconato de clorexidina, visto que a solução diluente ácido acético glacial (branco) não interfere na titulação. A água, único adjuvante da formulação, não foi quantificada por ser evaporada antes da titulação.

Linearidade

A linearidade foi comprovada na concentração proposta, face aos valores de inclinação significativa e valores de coeficiente de correlação linear superiores a 0,99 (0,99860) estando de acordo com a RE 899 de 2003.⁹

A tabela 2 apresenta os valores das concentrações crescentes após a titulação. A figura 1 representa a curva analítica da concentração teórica vs volume gasto do titulante e na figura 2 uma demonstração gráfica dos resíduos da linearidade.

Tabela 2. Concentração teórica e concentração encontrada após a titulação.

Concentração Teórica (%)	Volume Gasto (mL)	Concentração Real (%)
50	4,45	49,93
70	6,20	69,56
80	7,52	84,37
100	8,91	99,97
120	11,01	123,53
130	11,96	134,19
150	13,49	151,36
R	0,99860	

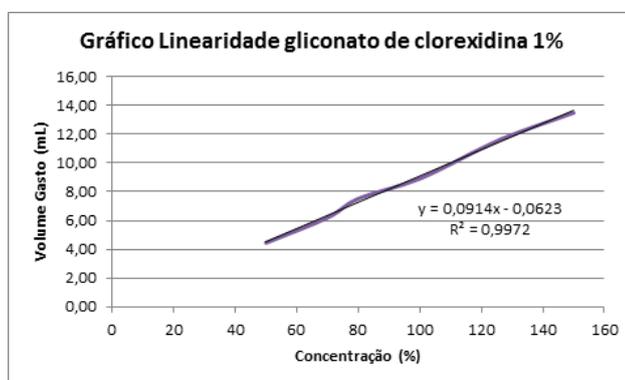


Figura 1. Representação gráfica da curva analítica da concentração teórica vs volume gasto de titulante da solução de gliconato de clorexidina 1%.

O cálculo dos resíduos da linearidade foi obtido através da regressão linear, que demonstra as diferenças entre o valor estimado e os dados observados. O requisito para o método

é que o fator imprevisível (erro) seja distribuído aleatoriamente, o que pôde ser observado na figura 2.

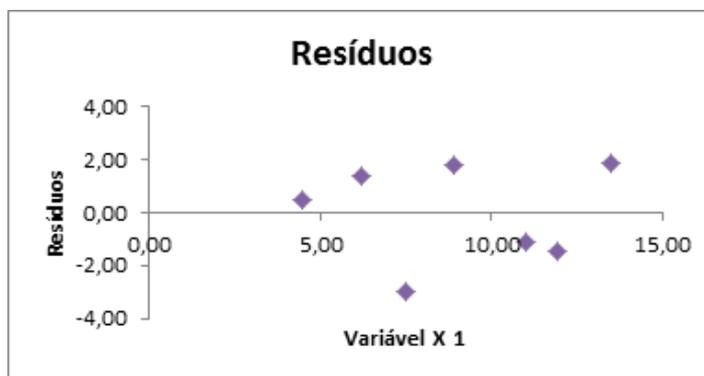


Figura 2. Representação gráfica dos resíduos da linearidade através do cálculo da regressão linear.

Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados mostraram-se satisfatórios para o ativo Gliconato de Clorexidina nas três concentrações diferentes (50%, 100% e 150%) e em 2 dias diferentes com analistas diferentes. A exatidão, obtida estatisticamente, apresentou resultados que variaram entre 99,91% a 101,88%, se mantendo dentro da faixa de aceitação de 95% a 105%. A precisão intra-corridas (repetibilidade) e a precisão inter-corridas (precisão intermediária) apresentaram coeficiente de variação (CV%), variando entre 0,11% a 1,62%, dentro do limite de 5%

conforme estabelecido pela RE nº 899, de 2003.9

O teste da análise de variância (ANOVA) se mostrou satisfatório para as três concentrações (50%, 100% e 150%) e para os três lotes, obtendo um valor de F calculado de 0,174413 para amostras de 50%, F calculado de 1,651341 para amostras a 100% e para as amostras de 150% o F calculado foi de 0,561604, sendo todos valores de F calculado menores que o F tabelado (5,143253) com 5% de significância.

Tabela 3. Resultados precisão e exatidão intra-lotes (repetibilidade).

	Concentração Teórica (%)	Concentração Real (%)	Média (%)	CV (%)	Exatidão (%)
Lote 1	50%	50,60 50,15 50,38	50,38	0,45	100,75
	100%	101,20 101,32 100,76	101,09	0,29	101,09
	150%	147,43 150,80 152,14	150,12	1,62	100,08
Lote 2	50%	50,60 51,05 50,04	50,56	1,00	101,13
	100%	100,42 100,53 100,64	100,53	0,11	100,53
	150%	148,55 152,03 149,00	149,86	1,26	99,91
Lote 3	50%	49,48 51,05 50,38	50,30	1,57	100,61
	100%	100,65 100,44 101,54	100,88	0,58	100,88
	150%	150,91 150,24 153,27	151,47	1,05	100,98

Tabela 4. Resultados precisão inter-lotes (precisão intermediária).

Lote	Concentração		
	50%	100%	150%
1	50,38	101,09	150,12
2	50,56	100,53	149,86
3	50,30	100,88	151,47
Média	50,41	100,83	150,49
CV%	0,27	0,28	0,58
Exatidão	100,61	100,83	100,98

Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação da marca da solução titulante Ácido Perclórico 0,1N SV (Cromoline e Imbralab), pode-se concluir que o método apresentou-se robusto frente a variação proposta, ao aplicar o

teste t de Student obteve-se o t calculado de 0,0143 e o t tabelado de 2,1318 podendo-se concluir que não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis analisadas com 95% de confiança. O resultado encontra-se na tabela a seguir (tabela 5).

Tabela 5. Valores obtidos para a robustez do método titulométrico.

Titulante	Volume Gasto (mL)	Concentração (%)	Média (%)	CV (%)	t calculado	t tabelado
1	8,91	99,97	99,79	0,75	0,0143	2,1318
	8,93	100,19				
	8,95	100,42				
2	9,06	101,65	101,23	0,40		
	9,01	101,09				
	8,98	100,76				

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A Tabela 6 apresenta o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método.

Tabela 6. Valores obtidos para o limite de detecção e limite de quantificação da análise.

Concentração Teórica (%)	Volume Gasto (mL)	Concentração Real (%)
50	4,49	50,38
10	0,91	10,21
5	0,44	4,94
2,5	0,25	2,81
0,5	0,00	0,00
0,1	0,00	0,00

Os resultados obtidos demonstraram-se satisfatórios frente aos parâmetros de Limite de Detecção e Limite de Quantificação para o ativo

gliconato de clorexidina. Portanto, pode-se concluir que o método apresentou seu limite de

detecção na concentração de 2,5% e seu limite de quantificação na concentração de 5%.

Os valores de limite de detecção e de quantificação para os fármacos por um método analítico é importante quando existe a intenção de utilizá-los na quantificação de quantidades dos fármacos em quantidade menores que a faixa de linearidade analisada.⁶

RESULTADOS DOSEAMENTO DAS MARCAS COMERCIALIZADAS DE GLICONATO DE CLOREXIDINA 1% SOLUÇÃO TÓPICA

Após a aquisição de 5 marcas aleatórias de soluções tópicas de gliconato de clorexidina 1% comercializadas em Gurupi (TO), foi realizado o método validado na determinação do ativo. Considerando um critério de aceitação entre 95% a 105% de teor, comum em compêndios oficiais, apenas a marca 1 e 5 estariam aprovadas para comercialização.

Tabela 7. Valores obtidos nas análises de amostras comercializadas de gluconato de clorexidina 1%.

Amostra	Média do Volume Gasto (mL)	Concentração (%)
Marca 1	8,7	0,98
Marca 2	7,5	0,84
Marca 3	7,2	0,81
Marca 4	6,1	0,68
Marca 5	8,9	1,00

Apesar das marcas de clorexidina comercializadas terem sido escolhidas para avaliação do método analítico desenvolvido e, considerando, que o quantitativo de marcas analisadas não foi representativo, encontrarmos amostras fora da especificação de teor é preocupante.

A competição acirrada entre as indústrias nacionais e multinacionais que comercializam medicamentos passam inúmeras vezes por um problema grave relativo à ausência ou insuficiência no sistema de fiscalização, isto proporciona condições ao surgimento e desenvolvimento de empresas pouco estruturadas levando à fraudes e má qualidade dos produtos, o que expõe a risco os usuários dos fármacos. Este quadro caracteriza uma incapacidade dos órgãos governamentais em implantar a legislação na prática.¹¹

Medicamento falsificado é um produto fabricado de maneira incorreta, deliberada e fraudulenta em relação a sua origem ou identidade. Podendo incluir em sua formulação ingredientes corretos ou incorretos, com princípio ativo adequado ou com princípio ativo

insuficiente, estando até mesmo em uma embalagem falsificada. A utilização de medicamentos falsificados ou com desvios de qualidade pode resultar em pacientes que não recebem a quantidade necessária de princípio ativo e, conseqüentemente, podem trazer graves prejuízos a terapêutica. A situação complica quando os produtos adulterados ou deliberadamente formulados utilizam substâncias industriais tóxicas, que não podem ser usadas na fabricação de medicamentos.¹²

Baseado no artigo 6 da lei nº 6360/76, comprovado que determinado produto seja considerado nocivo à saúde ou que não preencheu os requisitos estabelecidos em lei, implicará em sua imediata retirada do comércio e exigência da modificação da formulação de sua composição e nos dizeres dos rótulos, bulas e embalagens, sob pena de cancelamentos do registro e da apreensão no território nacional.¹³

CONCLUSÃO

Conclui-se que o método titulométrico colorimétrico simples proposto para análise do digluconato de clorexidina solução tópica foi adequado, sendo um método alternativo para análise, em vista dos métodos compendiais de alto custo, proporcionando para a indústria um custo baixo, com um tempo de análise curto, acelerando assim a resposta de análise para produção em escala industrial, fator importante no custo final do produto.

O método cumpriu com todas as exigências da legislação brasileira vigente em relação a validação de métodos analíticos, sendo o método específico, preciso, exato, linear e robusto. Além disso, é uma técnica de fácil e rápida execução, com pouco uso de solvente e de baixo custo.

Ao realizar o doseamento das soluções tópicas de gliconato de clorexidina 1% comercializadas obteve um teor não satisfatório na maior parte das amostras estando estes abaixo das especificações, o que pode gerar prejuízo na terapêutica acarretando transtornos aos indivíduos em tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martindale: the complete drug reference. 35º Ed. London: Pharmaceutical Press; 2007.p.1472-5.
2. European Pharmacopoeia. 7º Ed. Strasbourg: Council of Europe; 2012. 481 p.

3. Alaki SM, Loesche WJ, Feigal RJ, da Fonesca MA, Welch K. Preventing the transfer of *Streptococcus mutans* from primary molars to permanent first molars using chlorhexidine. *Pediatr dent.* 2002; 24(2): 103-8.
4. Juliano C, Gavini E, Cossu M, Bonferoni MC, Giunchedi P. Mucoadhesive alginate matrices containing sodium carboxymethyl starch for buccal drug delivery in in vitro and in vivo studies. *J drug deliv sci technol.* 2004; 14(2): 159-63.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 199, de 26 de outubro de 2006. Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 02 abr. 2007.
6. Silva LFJS. Nova Associação de Digluconato de Clorexidina e Cloridrato de Lidocaína em Gel Urogenital. Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação. [dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009. 175 p.
7. Fiorentino FAM. Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo Digluconato de Clorexidina. [dissertação de mestrado]. Araraquara- SP: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho; 2009.
8. USP. United States Pharmacopeia. Official Monographs. 31º Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2008.
9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
10. Henriques BG, Sousa VP, Volpato NM, Garcia S. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação do teor de ácido glicólico na matéria-prima e em formulações dermocosméticas. *RBCF, Rev bras ciênc farm (Impr).* 2007; 43(1): 39-45.
11. Alves NDC, Santos TC, Rodrigues CR, Castro HC, Lira LM, Dornelas CB, Cabral LM. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e officinais do Estado do Rio de Janeiro. *Ciênc saúde coletiva.* 2008; 13(Suppl): 745-53.
12. Counterfeit Drugs. *Bulletin of the World Health Organization.* 1993; 7 (3-4): 464-6.
13. Brasil. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 set. 1976. Seção 1, p. 12647.