
Determinação quantitativa do digluconato de clorexidina em formulações antissépticas de uso tópico e soluções bucais

Marcos Paulo GUILHERME¹, Bruno Martins de CARVALHO², Helena Miyoco YANO¹, Luiz Fernando Ortiz GASPARIN¹, Valéria Adriana Pereira MARTINS¹, Luz Marina TRUJILLO¹, Edilene Afonso VIEIRA¹, Fernanda Fernandes FARIAS¹, Maria Cristina SANTA BÁRBARA²

¹Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos e ²Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes – Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz

A solução com digluconato de clorexidina é um medicamento antisséptico de uso tópico, utilizada na assepsia de feridas de pequenas extensões, por não provocar ardor, ser de fácil aplicação e baixo risco¹. Está regulamentada pela RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) n° 107, de 05/09/2016². Os fabricantes devidamente autorizados podem comercializar o medicamento obedecendo a alguns critérios: solução aquosa ou alcoólica com concentrações de 0,5 a 1,0 % e soluções com tensoativos até 4 % de clorexidina, com a advertência da não utilização em pessoas com sensibilidade². As soluções tópicas regularizadas como produtos cosméticos não podem ultrapassar 0,3 % deste ativo³.

Em virtude da pandemia da COVID-19, foi publicada a Resolução RDC n° 350, de 19/03/2020, permitindo o uso de solução de digluconato de clorexidina na concentração de 0,5 % como preparação antisséptica ou sanitizante oficinais⁴.

O uso de clorexidina para a higienização da pele é seguro e sua absorção é baixa. No entanto, poderá ocorrer irritação na pele conforme a frequência de utilização e da concentração do ativo na formulação. No mercado existem diversas marcas de

antissépticos de uso tópico e enxaguatórios bucais à base de clorexidina.

O presente estudo avaliou duas metodologias existentes na literatura, com baixo custo e resposta eficaz, para a determinação do digluconato de clorexidina nas matrizes enxaguatório bucal e solução antisséptica. As metodologias utilizadas foram a espectrofotometria na região do ultravioleta (UV-Vis) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), uma técnica muito utilizada na indústria, porém de alto custo. Na avaliação verificou-se o desempenho das metodologias analíticas através dos parâmetros de linearidade, seletividade, exatidão, repetitividade, limites de detecção e quantificação⁵.

Para a verificação das metodologias foi utilizada solução padrão de digluconato de clorexidina a 20 %, marca Neobrax®, Brasil, lote 201902013. As amostras analisadas foram adquiridas no comércio de São Paulo, sendo 07 antissépticos de uso tópico na concentração 10 mg/mL (A a G) e 04 enxaguatórios bucais (H a K) 0,12 g%.

Para o ensaio por espectrofotometria, utilizou-se como base o método de Fiorentino⁶. Utilizou-se etanol como solvente e como melhoria para minimizar os resíduos gerados no

ensaio, foi proposta a substituição do etanol por água. A partir de diluições do padrão concentrado em água, foram preparadas soluções nas concentrações de 2, 4, 5, 7, 9, 15 e 20 µg/mL para a construção da curva analítica. A solução aquosa do digluconato de clorexidina (7 µg/mL) foi avaliada na faixa compreendida entre 200 – 250 nm e observou-se apenas um pico de absorção máxima a 232 nm, o qual foi escolhido para a realização das leituras. Para efeito de comparação, foi preparada curva analítica nas mesmas concentrações utilizando álcool como diluente e verificou-se melhor correlação dos pontos na curva analítica preparada com água, com os valores: coeficiente de correlação $R = 0,9999$ e equação da reta $y = 0,0316x - 0,0102$. Para a curva analítica preparada em etanol obteve-se $R = 0,9988$ e equação da reta $y = 0,0383x - 0,002$. O método apresentou linearidade a 232 nm para as concentrações preparadas (2, 4, 5, 7, 9, 15 e 20 µg/mL) em triplicatas independentes. O limite de quantificação (LQ) foi determinado pelo menor ponto da curva analítica e o limite de detecção (LD) pelo cálculo como $LD = LQ/3,3$. A exatidão realizada nos termos da recuperação apresentou os resultados entre 103 a 109 %, o que atendeu a especificação adotada (80 a 110 %)⁵. Os resultados obtidos para a precisão intermediária foram avaliados estatisticamente por ANOVA para um intervalo de confiança de 95 %, a fim de determinar a existência de diferença significativa entre as respostas encontradas entre diferentes dias e analistas. A análise estatística para os resultados apresentou F calculado menor que F crítico (3,68) e p -valor superior a 0,05, indicando que não há diferença significativa entre analistas e dias, com coeficiente de variação de 0,46 %, conforme indicado na Tabela 1.

A otimização e validação da metodologia de determinação de digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV-Vis demonstrou ser adequada para análise das amostras de soluções antissépticas. A utilização da água como diluente proporcionou menor impacto ao meio ambiente, além da redução de custo e melhor estabilidade da solução em relação às variações de temperatura ambiente (menos volátil). O método foi considerado adequado para as amostras incolores, como a maioria das soluções antissépticas. Entretanto, para as amostras

coloridas, como a maioria dos enxaguatórios bucais, houve interferência analítica do corante na determinação do digluconato de clorexidina.

Em vista da limitação da metodologia para determinação de digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV-Vis, efetuou-se a otimização do método por CLAE-UV com o objetivo de eliminar a interferência dos corantes.

O estudo por CLAE-UV baseou-se na monografia de determinação de cloridrato de clorexidina em enxaguatório bucal da Farmacopeia Americana (USP)⁷. O método por CLAE-UV foi desenvolvido em cromatógrafo líquido Shimadzu Class VP 10, com detector UV a 258 nm e volume de injeção 25 µL. Nos ensaios de otimização foram verificados a proporção do tampão e solvente orgânico da fase móvel, a vazão e o tempo de retenção, bem como o comprimento de onda para a obtenção de resultados analíticos satisfatórios que atendessem a adequabilidade do método. Preparou-se uma solução dissolvendo-se 27,6 g de fosfato de sódio monobásico e 10 mL de trietilamina em 1,5 L de água, ajustou-se o pH para 3,0 com ácido fosfórico e diluiu-se com água para 2,0 L. Esta solução resultante foi misturada com acetonitrila na proporção 70:30 (v/v) e denominada solução A. A fase móvel indicada na monografia da USP é composta por um gradiente de concentração entre a solução A e acetonitrila. Foram testadas misturas de diferentes proporções entre a mistura de tampão fosfato de sódio monobásico e trietilamina, pH 3,0, e acetonitrila em modo isocrático, partindo-se da proporção 1:1 e aumentando-se a concentração aquosa, com avaliação do impacto das mudanças no tempo de retenção e na resolução dos picos do cromatograma. O comprimento de onda descrito pela Farmacopeia Americana de 239 nm foi alterado para 258 nm, citado em literatura⁸. Após os testes, a fase móvel com melhores resultados foi constituída de solução tampão fosfato de sódio monobásico e trietilamina pH 3,0 e acetonitrila, proporção 34,3:65,7 (v/v), em modo isocrático, com fluxo de 1,2 mL/min. A coluna cromatográfica que apresentou melhor desempenho foi a Spherisorb® ODS2, Waters, 4,6x150 mm, partículas de 5 µm, utilizando forno de temperatura a 40 °C. Após a otimização do método CLAE-UV foi avaliada a estabilidade da solução padrão de clorexidina no período de três

dias e obteve-se variação de área menor que 3 % em relação à solução padrão inicial.

Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico são partes integrantes dos métodos de cromatografia líquida e verificam se o equipamento e o método analítico estão operando de modo a fornecer resultados confiáveis para a corrida analítica. Os resultados dos testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram: 1,63 de fator de cauda; 1.798,6 pratos teóricos e coeficiente de variação de 1,87 %. Desta forma, o método otimizado atendeu aos parâmetros de adequabilidade do sistema. O diluente (solução A) não apresentou sinal durante a corrida cromatográfica nas condições analíticas, indicando a especificidade do método na região do ultravioleta.

O método apresentou linearidade na faixa de 45 a 105 µg/mL com coeficiente de correlação $R = 0,99969$ e equação da reta $y = 48713x - 61585$. A curva analítica foi preparada por adição de padrão na amostra. O LD foi calculado através da curva analítica como $LD = LQ/3,3$, e o LQ considerado a partir da primeira concentração da curva analítica. O resultado da precisão intermediária do método foi obtido através do coeficiente de variação (CV %). A aplicação do teste F nos resultados da precisão intermediária para as seis determinações apresentou F calculado, menor que F crítico (7,146) e p -valor superior a 0,05, indicando que não houve diferença significativa entre os resultados. A exatidão realizada nos termos da recuperação apresentou os resultados entre 99 a 109 %, atendendo a especificação adotada (80 a 110 %)⁵. O método otimizado e validado por CLAE-UV é considerado simples, rápido e seletivo para quantificação do digluconato de clorexidina para as matrizes em estudo (solução antisséptica e enxaguatório bucal).

A Tabela 1 apresenta o resumo dos resultados obtidos dos testes de validação para as duas metodologias avaliadas, UV-Vis e CLAE-UV.

A preparação das amostras avaliadas de solução antisséptica e enxaguatório bucal adquiridas no comércio local (A a K), envolveu a diluição com água ultrapura para análise por espectrofotometria UV-Vis e diluição com a solução A para análise por CLAE-UV.

Tabela 1. Resultados dos testes de validação para as duas metodologias avaliadas, UV-Vis e CLAE-UV

Parâmetro	Método por UV-Vis	Método por CLAE-UV
	R= 0,9999	R= 0,9999
Linearidade	$y = 0,0316x - 0,0102$ Faixa de trabalho: 2 a 20 µg/mL	$y = 48713x - 61585$ Faixa de trabalho: 45 a 105 µg/mL
Limite de Quantificação	2 µg/mL	45 µg/mL
Limite de Detecção	0,60 µg/mL	3,71 µg/mL
Precisão Intermediária	CV = 0,46 % p valor = 0,12 $F_{calc} = 2,40$ (95 % de confiança)	CV = 0,03 % p valor = 0,34 $F_{calc} = 2,51$ (95 % de confiança)
Exatidão	103 a 109 %	99 a 109 %

A Tabela 2 apresenta os resultados das 07 amostras de antissépticos de uso tópico e 04 amostras de enxaguatório bucal analisadas pelas duas metodologias analíticas (UV-Vis e CLAE-UV), sendo que para o enxaguatório bucal não foi possível realizar as determinações por espectrofotometria (UV-Vis) devido à interferência no sinal pelo efeito de matriz.

Tabela 2. Resultados da determinação de clorexidina, em amostras antissépticas (solução tópica e enxaguatório bucal). As amostras denominadas de A a G são soluções de uso tópico e as amostras de H a K são soluções de enxaguatório bucal

Amostras	Metodologias Analíticas	
	UV-Vis	CLAE-UV
	mg/mL*	
A	10,6	11,0
B	10,0	10,4
C	10,5	10,9
D	10,6	10,6
E	10,6	10,6
F	9,3	9,4
G	10,1	10,2
	g%*	
H	-	0,11
I	-	0,12
J	-	0,13
K	-	0,12

* Valor declarado no rótulo de solução tópica 10,0 mg/mL (A a G) e da solução enxaguatório bucal 0,12 g% (H a K)

Todas as amostras analisadas apresentaram os resultados satisfatórios quanto ao teor de digluconato de clorexidina declarados na rotulagem, atendendo a legislação⁹.

Embora o método por CLAE-UV seja uma técnica de maior custo, apresentou-se mais

adequado para a análise das diferentes matrizes avaliadas, enquanto a espectrofotometria respondeu satisfatoriamente somente para a matriz do antisséptico de uso tópico. A validação permitiu a implantação da metodologia por CLAE-UV para determinação do teor de digluconato de clorexidina na rotina do laboratório, em adição à análise por espectrofotometria, já implantada anteriormente, assim possibilitando a análise de amostras contendo corantes, de modo a fornecer subsídios às ações de Vigilância Sanitária.

REFERÊNCIAS

1. Amoras LS. Uso da clorexidina na medicina: revisão de literatura [trabalho de conclusão de curso de especialização]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2013. [acesso 2021 Fev 17]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000903190&opt=1>

2. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 107, de 05 de setembro de 2016. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 199, de 26 de outubro de 2006, que dispõe sobre os medicamentos de notificação simplificada. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 06 set 2016. Seção 1(172):31.

3. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 fev 2015. Seção 1(29):39.

4. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 350, de 19 de março de 2020. Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários

para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes oficinais sem prévia autorização da Anvisa e dá outras providências, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 mar 2020. Seção 1(55):154.

5. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 09. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibrensaio

6. Fiorentino FAM. Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009. [acesso 2021 Mar 12]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/91688>

7. United States Pharmacopeia. 42nd ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2020.

8. Gavlick WK. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine and p-chloroaniline using a specialty column and a photodiode-array detector. J. Chromatogr. 1992; 623(2):375-380.

9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 3, de 20 de janeiro de 2012. Aprova o regulamento técnico "listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas" e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 jan 2012. Seção 1(15-A):2-11.