

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

JUCIARA ALVES DA SILVA

**DESINFETANTE DE USO GERAL À BASE DE CLOREXIDINA: formulação,
validação da metodologia analítica de doseamento, estabilidade preliminar e avaliação
da eficácia microbiológica**

Cuité
2012

JUCIARA ALVES DA SILVA

**DESINFETANTE DE USO GERAL À BASE DE CLOREXIDINA: formulação,
validação da metodologia analítica de doseamento, estabilidade preliminar e avaliação
da eficácia microbiológica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia
da Universidade Federal de Campina Grande, como
requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana de Souza
Alencar Falcão

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Júlia Beatriz Pereira
de Souza

Cuité
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586d Silva, Juciara Alves da.

Desinfetante de uso geral à base de clorexidina: formulação, validação da metodologia de doseamento, estabilidade preliminar e avaliação da eficácia microbiológica. / Juciara Alves da Silva – Cuité: CES, 2012.

53 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2012.

Orientadora: Dr^a Juliana de Souza Alencar Falcão.

Co-orientadora: Dr^a Julia Beatriz Pereira de Souza.

1. Clorexidina. 2. Desinfetante. 3. Validação. 4. Estabilidade. 5. Eficácia microbiológica. I. Título.

CDU 615.02

JUCIARA ALVES DA SILVA

**DESINFETANTE DE USO GERAL À BASE DE CLOREXIDINA: formulação,
validação da metodologia analítica de doseamento, estabilidade preliminar e avaliação
da eficácia microbiológica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia
da Universidade Federal de Campina Grande, como
requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em 24/10/2012

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Juliana de Souza Alencar Falcão - UFCG
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Júlia Beatriz Pereira de Souza – UFCG
(Coorientadora)

Prof. Dr. Marciano Henrique de Lucena Neto - UFCG

Cuité
2012

A Deus, por sempre abençoar meus dias. Aos meus pais, José S. da Silva e Francisca das Chagas A. da Silva, por estarem sempre ao meu lado e por terem acreditado que este dia chegaria. Esta conquista tem um peso incalculável na minha vida e vocês são parte desta vitória. Os esforços de vocês são dignos do meu reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela fé que me confortou durante os dias de luta e pela força que me foi dada para eu nunca desistir.

Aos meus pais, José Serafim da Silva e Francisca das Chagas Alves da Silva, pelo apoio moral, pela força dada em forma de afeto e compreensão durante os dias mais difíceis e por minha formação moral. O que sou hoje, ou ao menos me arrisco a ser, é o reflexo do amor que vocês me deram.

Agradeço aos meus avós, Rita Maria e Francisco Félix, pelo amor, pelo carinho e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço a minha orientadora Juliana de Souza Alencar Falcão e a minha coorientadora Júlia Beatriz Pereira de Souza, pelo tempo a mim disponibilizado, pela paciência e pelo conhecimento repassado antes e durante o desenvolvimento deste trabalho. Foi de suma importância para minha formação ter a oportunidade de me relacionar com profissionais como vocês. São dignas da minha admiração, profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço ao professor Marciano Henrique de Lucena Neto pelo incentivo nos trabalhos que realizamos juntos, durante a monitoria em Química Orgânica Experimental, e pela generosidade e humildade que sempre me foram concedidas durante nossa convivência acadêmica.

Agradeço a todos os professores que acompanharam durante o meu processo de formação acadêmica, pelo conhecimento repassado e pelo incentivo dado para prosseguir nessa caminhada. Em especial Rand Randall, Toshiyuki Nagashima, Wylly Araújo, Wellington Adriano, Silvokleio Costa, Karina Randau, dentre outros.

Agradeço aos amigos, Fellipe Pedrosa e Maria Aparecida, pela irmandade, pela companhia fiel nos trabalhos e estudos, por estarem presentes nos momentos de alegria e tristeza e por tudo que dividimos durante esses cinco anos de curso. Tenho um carinho imenso por vocês.

Agradeço a Maria da Glória por me acolher nos estudos durante os finais de período em que mais precisei, pela companhia fiel nos dias de laboratório e pela generosidade que sempre me foi oferecida.

Agradeço a todos os funcionários da UFCG, *campus* Cuité, pelos serviços que me foram prestados.

*Nunca se sabe que resultados virão da sua ação,
Mas se você nada fizer, não existirão resultados.*

(Mahatma Ghandi)

As metas são nossas, mas os planos são de Deus.

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Neste trabalho foi obtida uma formulação desinfetante de uso geral à base de clorexidina a partir da manipulação de 15 pilotos. A escolha do agente ativo da formulação, digluconato de clorexidina, foi efetuada com base nas suas propriedades químicas e toxicológicas e por sua abrangência de ação. A escolha dos outros componentes da formulação (cloreto de benzalcônio, cloreto de cetil trimetil amônia, nonil fenol etoxilado, corante, essência e água destilada) ocorreu através de estudos bibliográficos, como também, pelo desenvolvimento técnico da formulação. Após o desenvolvimento da formulação, realizou-se a validação do método analítico para doseamento do agente ativo por espectrofotometria UV/VIS, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão e robustez. Com o intuito de determinar a vida útil do desinfetante foram efetuados ensaios de estabilidade acelerada e de prateleira. Para isso, realizou-se a avaliação físico-química da formulação através das análises do aspecto, pH e viscosidade, em condições de estocagem forçadas com acompanhamento da análise do teor do ativo nas formulações após 40 dias estocadas a 50°C em estufa e a 25°C em prateleira. Além disso, testou-se a eficácia das formulações através da análise por controle microbiológico, realizada através de um método clássico de diluição sucessiva de cunho qualitativo (Concentração Mínima Inibitória), com o intuito de verificar a ação antimicrobiana das formulações desinfetantes para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Durante o desenvolvimento da formulação verificou-se a incompatibilidade do corante hidrossolúvel com o cloreto de cetil trimetil amônia, sendo este ponto crítico solucionado retirando da formulação este último componente. Assim, obtivemos o piloto 14 como formulação aprovada para continuidade dos testes. Através da varredura encontrou-se o comprimento de onda ideal para a quantificação do teor do ativo (230 nm) em solução aquosa na concentração de 7,5 µg/mL. Além disso, a validação da metodologia analítica foi satisfatória, sendo possível quantificar o teor do ativo presente na formulação desinfetante a 3,0 mg/mL, utilizando como fator de correção 0,4. Nos resultados de estabilidade frente às condições de estudo aqui realizadas não foram encontradas alterações significativas quando comparados as formulações no tempo zero e após o estudo de estabilidade acelerada e prateleira. Em relação ao controle microbiológico, as formulações analisadas apresentaram eficácia antimicrobiana satisfatória por inibir os microrganismos em teste na menor concentração utilizada no estudo. Diante destes resultados, o produto desenvolvido está apto a ser utilizado como desinfetante de uso geral.

Palavras chave: Clorexidina, Desinfetante, Validação, Estabilidade, Eficácia microbiológica

ABSTRACT

In this work was obtain a general formulation purpose based chlorhexidine disinfectant from the manipulation of 15 pilots. The choice of the active agent formulation, chlorhexidine digluconate, was made based on their chemical properties and toxicological and its scope of action. The choice of the formulation other ingredients (benzalkonium chloride, cetyl trimethyl ammonium chloride, ethoxylated nonyl phenol, coloring, essence and distilled water) occurred through bibliographical studies, but also by the technical development of the formulation. After the formulation development, was held to validate the active agent analytical method for quantification by spectrophotometry UV/VIS, where the follow parameters were evaluated: selectivity, linearity, range, accuracy, precision and robustness. In order to determinate the disinfectant useful life of, were performed accelerated stability testing and shelf. For this reason, was performed the formulation physico-chemical evaluate by analysis of the appearance, pH and viscosity, on storage conditions forced followed the analysis of the content of active in the formulations after 40 days stored at 50 ° C in a stove and 25 ° C shelf. Additionally, we tested the formulations efficacy through of the analysis by microbiological control, realized by a classical method of successive dilution and qualitative (Minimum Inhibitory Concentration) with the aim of verify the disinfectant formulations antimicrobial action for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Pending the formulation development was verified the incompatibility between the hydrosoluble dye and the cetyl trimethyl ammonium chloride, and this critical point was solved removing this last component of the formulation. Therefore, we obtained the pilot formulation 14 as approved for of the tests continuity. By scanning was found the ideal wavelength for quantifying the content of active (230 nm) in aqueous solution at a concentration of 7.5 mg/mL. Moreover, the analytical methodology validation was satisfactory, being possible to quantify the amount of the active disinfectant present in the formulation to 3.0 mg/mL, using as correction factor 0.4. The stability results compared to the conditions of the study conducted here found no significant changes compared formulations at time zero and after accelerated stability study and shelf. Relative microbiological control, formulations analyzed showed satisfactory antimicrobial efficacy to inhibit microorganisms under test in the lowest concentration used in the study. Given these results, the developed product is suitable to be used as general purpose disinfectant.

Keywords: Chlorhexidine, Disinfectant, Validation, Stability, Efficiency microbiological

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural da clorexidina	20
Figura 2 – Varredura da solução de digluconato de clorexina 7,50 µg/mL	38
Figura 3 – Curva de calibração das soluções de digluconato de clorexidina (n=3)	39
Figura 4 – Teste de eficácia para <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 5 – Teste de eficácia para <i>Staphylococcus aureus</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Preparo de amostras para linearidade	30
Tabela 2 – Avaliação da precisão através do método de repetibilidade	40
Tabela 3 – Análise da exatidão para o método de doseamento de digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV/VIS (n=3).....	41
Tabela 4 – Análise da robustez para soluções de clorexidina a 7,5 µg/mL (n=3).....	42
Tabela 5 – Ensaio de estabilidade em prateleira e acelerada no tempo zero e 40 dias (n=3) .	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
C	Carbono
Cl	Cloro
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DL ₅₀	Dose letal 50%
DP	Desvio Padrão
DP _a	Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva de calibração
g	Gramas
H	Hidrogênio
IC	Inclinação da curva de Calibração
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial
Kg	Quilograma
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Na	Sódio
nm	Nanômetro
PET	Politereftalato de etileno
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
qs	Quantidade suficiente
qsp	Quantidade suficiente para
r	Coefficiente de correlação
RE	Resolução
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
UV/Vis	Ultravioleta visível
µg	Microgramas
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
λ	Comprimento de onda
±	Mais ou menos
n°	Número
™	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Desinfecção desinfetantes	18
3.2 Clorexidina	20
3.2.1 Mecanismo de ação e eficácia	21
3.2.2 Propriedades toxicológicas e segurança	21
3.3 Metodologia e validação de doseamento por espectrofotometria UV/VIS	22
3.4 Testes de eficácia em uma formulação desinfetante	24
3.5 Estudo de estabilidade e avaliação das características físico-químicas de uma formulação desinfetante	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Material	26
4.2 Metodologias	27
4.2.1 Desenvolvimento técnico da formulação desinfetante de uso geral à base de clorexidina	27
4.2.1.1 <u>Técnica empregada para a manipulação da formulação desinfetante contendo clorexidina a 3 mg/mL</u>	28
4.2.2 <i>Validação da metodologia analítica de doseamento do digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV/VIS</i>	28
4.2.2.1 <u>Varredura</u>	28
4.2.2.2 <u>Especificidade</u>	29
4.2.2.3 <u>Linearidade</u>	29
4.2.2.4 <u>Intervalo</u>	30
4.2.2.5 <u>Precisão</u>	30
4.2.2.6 <u>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</u>	30
4.2.2.7 <u>Exatidão</u>	31
4.2.2.8 <u>Robustez</u>	31
4.2.2.8.1 Variações de pH	31
4.2.2.8.2 Ausência e presença de luz	32
4.2.2.8.3 Adição de solvente	32
4.2.3 <i>Doseamento espectrofotométrico do desinfetante contendo digluconato de clorexidina à 3 mg/ mL</i>	32
4.2.4 <i>Testes de estabilidade da formulação desinfetante</i>	33
4.2.4.1 <u>Avaliação físico-química</u>	33
4.2.4.1.1 Análise macroscópica (aspecto)	33
4.2.4.1.2 Avaliação do pH	34
4.2.4.1.3 Avaliação da viscosidade	34
4.2.4.2 <u>Análise do teor</u>	34
4.2.5 <i>Controle microbiológico da formulação desinfetante</i>	34
4.2.5.1 <u>Preparação dos inóculos</u>	34
4.2.5.2 <u>Padronização dos inóculos</u>	35
4.2.5.3 <u>Determinação da eficácia do desinfetante</u>	35

4.2.5.3.1 Preparação do caldo caseína-soja (meio de cultura)	35
4.2.5.3.2 Técnica da CMI	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Desenvolvimento Farmacotécnico da formulação desinfetante de uso geral à base de clorexidina	37
5.2 Resultados da validação da metodologia de doseamento do digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV/VIS	38
<i>5.2.1 Varredura</i>	<i>38</i>
<i>5.2.2 Especificidade</i>	<i>39</i>
<i>5.2.3 Linearidade</i>	<i>39</i>
<i>5.2.4 Precisão</i>	<i>40</i>
<i>5.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	<i>40</i>
<i>5.2.6 Exatidão</i>	<i>41</i>
<i>5.2.7 Robustez</i>	<i>41</i>
5.3 Testes de estabilidade da formulação desinfetante	42
<i>5.3.1 Avaliação físico-química</i>	<i>43</i>
<i>5.3.2 Análise do teor</i>	<i>43</i>
5.4 Controle microbiológico	44
<i>5.4.1 Padronização dos inóculos</i>	<i>44</i>
<i>5.4.2 Teste de eficácia do desinfetante</i>	<i>44</i>
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Os agentes de limpeza são empregados com a finalidade de tornar possível e facilitar a remoção de contaminantes em superfícies correspondendo a produtos de uso indispensável para boas medidas de higiene o que, conseqüentemente, os levam a serem utilizados em grande número (CORRÊA, 2005). Desta forma, o intuito em desenvolver uma formulação desinfetante permite trabalhar de forma relevante nesse contexto, pois torna possível o estudo de um novo produto e, por conseguinte, estimula o interesse em promover novas medidas de ação contra agentes microbianos e novas medidas de desinfecção.

A desinfecção é um processo físico ou químico capaz de eliminar e/ou reduzir a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos e/ou de superfícies. Trata-se de uma etapa indispensável dentro do processo de higienização, conseqüentemente, diminui o risco e disseminação de doenças causadas pelos mesmos (BURTON; ENGELKIRK, 2005). Nesse âmbito, estão os desinfetantes que se caracterizam como substâncias químicas capazes de produzir tal efeito de desinfecção.

A ideia de desenvolver uma formulação de uso geral utilizando-se como agente ativo a clorexidina remete ao fato de que a mesma é um poderoso antisséptico no controle de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e de alguns fungos (FRANCO et al., 2007). Além disso, ela vem expandindo seu uso na indústria farmacêutica, na área odontológica, no processo de assepsia de campo operatório, dentre outros, devido a sua baixíssima toxidez que implica numa maior segurança quanto ao mesmo (BLÜCHER, 2007).

A clorexidina é um antimicrobiano sintético que apresenta alto nível de atividade sem, no entanto, ter os efeitos secundários que a maioria dos antimicrobianos apresenta. Pequenas concentrações de sais de clorexidina são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou exterminar a maioria dos microrganismos, além do que, sendo praticamente isenta de toxicidade e efeitos corrosivos, proporcionando extrema segurança no seu emprego (HORTENSE et al., 2010). Desta forma, acredita-se que utilizar a clorexidina como agente desinfetante de uso geral possibilitará fazer o processo de desinfecção, levando em consideração a sua abrangência de uso, com maior segurança quando comparado ao uso de outros agentes que possuem a mesma ação, porém, que agridem mais o ambiente e geram maiores cuidados aos que os manuseiam.

Problemas triviais em formulações desinfetantes são encontrados, frequentemente, nas prateleiras dos supermercados. A precipitação dos componentes utilizados nas formulações é considerada uma das principais causas da baixa qualidade do produto, podendo este fato,

influenciar na eficácia antimicrobiana do desinfetante. Sendo assim, é de suma importância o desenvolvimento da formulação desinfetante que visa atender um novo produto com ação antimicrobiana que é indispensável no processo de higienização cotidiana.

Os componentes ativos presentes em formulações desinfetantes devem estar em concentrações ideais para garantir que sua ação antimicrobiana ocorra de forma adequada. Desta forma, para a quantificação do teor do agente ativo (digluconato de clorexidina), presente na formulação desinfetante em estudo, validou-se uma das metodologias analíticas mais empregadas atualmente para o doseamento de substâncias ativas, a espectrofotometria UV/VIS.

Além disso, para que o processo de desinfecção ocorra de forma apropriada é necessário que o produto saneante apresente condições viáveis de uso e a um determinado prazo mantenha suas características físicas e químicas iguais a sua formulação no tempo inicial em que foi produzida. Logo, são realizados ensaios de estabilidade com o objetivo de determinar a vida útil do produto saneante através de um estudo de estabilidade acelerada e de prateleira.

Para comprovar a ação desinfetante desejada é necessário que se efetue testes de eficácia com o objetivo de demonstrar e garantir a habilidade do desinfetante em provocar a letalidade dos microrganismos de interesse e assim propiciar que o processo de desinfecção seja efetuado corretamente.

Além da obtenção de uma formulação desinfetante eficaz, objetivo do estudo que será apresentado neste trabalho, o mesmo poderá servir como referencial para maiores preocupações em relação a medidas do processo higienização, testes com outros produtos de mesma ação e, por conseguinte, estimular o desenvolvimento de outros trabalhos nesse âmbito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação desinfetante de uso geral à base de clorexidina.

2.2 Objetivos específicos

- Formular, a partir de um estudo teórico-prático uma formulação de desinfetante de uso geral e produzi-la respeitando as normas vigentes para o produto.
- Validar a metodologia analítica capaz de dosear o agente ativo (digluconato de clorexidina) na formulação.
- Fazer ensaios de estabilidade preliminar na formulação desinfetante.
- Avaliar a eficácia antimicrobiana da formulação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A limpeza é um processo cujo principal objetivo é o desprendimento e/ou separação de sujidades e/ou contaminantes presentes em determinada superfície, também é caracterizada como higienização. Nesse contexto, estão os agentes de limpeza, substâncias químicas que são responsáveis por facilitar e garantir o desempenho adequado de tal processo.

Tipicamente, são compostos por um ou mais componentes ativos o que varia de acordo com sua função técnica de limpeza, aditivos e, usualmente, água. Costuma-se fazer referência aos produtos de limpeza de forma diversa e em função daquilo que se quer neles destacar (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010). Os fabricantes, segundo a sua utilidade, classificam em lavadores de roupa e louça, limpadores de superfície, alvejantes, purificadores do ar, polidores, produtos de higiene pessoal e repelentes. Os órgãos de vigilância e os especialistas, por outro lado, enfatizam a sua dimensão saneante, desinfetante, higienizante, isto é, antiinfecções e infestações de todo tipo, e empregam o nome genérico “domissanitários” (PENNA, 2006).

Nesse âmbito, esses agentes devem proporcionar remoção de microrganismos e/ou sujidades a um nível tal que, os resíduos que persistirem não representem qualquer risco de contaminação, mantendo assim um nível seguro de limpeza, o que os tornam substâncias de uso indispensável e os fazem serem utilizados em grande número (CORRÊA, 2005). Levando em consideração tais conceitos, para ter um bom procedimento de higienização, torna-se essencial compreender a natureza da sujidade que vai ser removida e saber escolher o método e agente de limpeza mais adequados para a sua remoção (BURTON; ENGELKIRK, 2005; BRASIL, 2001).

3.1 Desinfecção e desinfetantes

A desinfecção consiste em controlar ou eliminar os microrganismos indesejáveis, utilizando-se processos químicos ou físicos, que atuam na estrutura ou metabolismo dos mesmos. Os agentes químicos responsáveis por promover tal efeito de desinfecção são chamados de desinfetantes (TRABULSI et al., 2005).

O mecanismo de ação quanto ao poder de desinfecção produzido por um desinfetante está associado às características químicas da formulação e com a natureza do agente ativo utilizado na mesma. Dentre as classes de agentes ativos mais utilizados, encontram-se os compostos à base de cloro, aldeídos, alcoóis, compostos fenólicos, compostos de amônio

quaternário e as biguanidas. A escolha de um agente desinfetante químico deve ser feita considerando se o mesmo é capaz de eliminar os microrganismos indesejáveis de acordo com as características particulares de determinado ambiente e, além disso, atuar em níveis seguros. (HOFFMANN; GARCIA-CRUZ; VINTURIM, 1995.) Nesse âmbito, os desinfetantes são classificados de acordo com sua abrangência como, por exemplo, os desinfetantes para uso domiciliar, também chamados desinfetantes de uso geral que se caracterizam como formulações que possuem na sua composição substâncias microbidas e apresentam efeito letal para microrganismos não esporulados, ou seja, microrganismos que se encontram na forma vegetativa, realizando todas as suas atividades metabólicas. (BURTON; ENGELKIRK, 2005; BRASIL, 2001; INMETRO, 2008).

Os desinfetantes são produtos indispensáveis para a proteção da saúde humana, entretanto, a escolha errada e o mau uso do produto podem provocar danos ao ambiente e a saúde de quem os utilizam. A escolha de produtos desinfetantes pelo consumidor é realizada com base em critérios arbitrários e/ou subjetivos e, conseqüentemente, empregados erroneamente. Embora esses produtos de uso domiciliar não possuam os mesmos objetivos que os de uso hospitalar, devem, do mesmo modo, possuir atividade antimicrobiana por definição e atender aos respectivos padrões microbiológicos que por sua vez são mais flexíveis do que os de uso hospitalar (TIMENETSKY, 1990; PETILLO, 2002).

A escolha dos desinfetantes depende de vários fatores que variam, criteriosamente, de acordo com as características dos microrganismos a que se propiciam atingir. Os microrganismos que podem ser encontrados nas superfícies apresentam maior ou menor resistência aos desinfetantes. Para a escolha de uma formulação desinfetante ideal, fatores como natureza, número e localização dos microrganismos, concentração e potência do agente desinfetante, propriedades físico-químicas, substâncias incompatíveis e metodologia para a desinfecção são de fundamental importância para eleger o que atuará como melhor agente (BURTON; ENGELKIRK, 2005; CORRÊA, 2005).

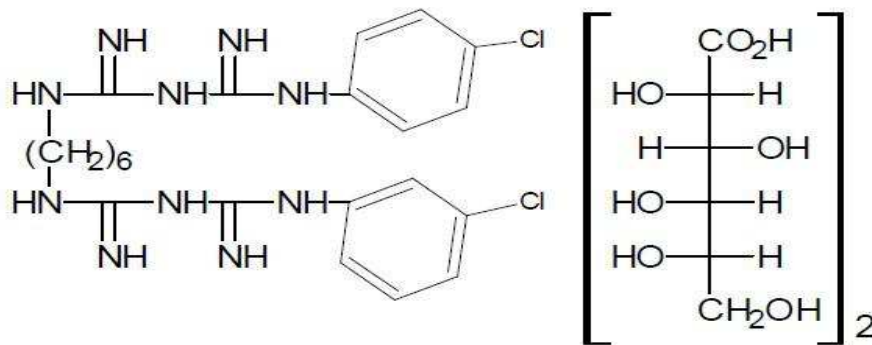
Levando em consideração os fatores legais para uma formulação desinfetante de uso geral, segundo a RDC n.184, de 22 de outubro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são indispensáveis a comprovação de eficácia aos fins propostos, através de análise prévia realizada com o produto acabado e nas diluições de uso indicadas pelo fabricante; avaliação tecnológica de acordo com as características físicas e toxicológicas, considerando as finalidades, instruções de uso e rotulagem adequada (BRASIL, 2001).

3.2 Clorexidina

A clorexidina foi descoberta por cientistas que buscavam um agente antimalária na década de 40, mas ela nunca foi utilizada para este fim. Em 1950, foi inicialmente introduzida na medicina como desinfetante de amplo espectro bacteriano. Já em 1954, era empregada rotineiramente no tratamento de feridas de pele. Em 1959, começou a ser utilizada na Europa na forma tópica para controle de placa e a partir de 1976 seu uso foi popularizado. Desde então, formulações contendo clorexidina vem sendo intensivamente testadas para várias aplicações clínicas, dentre as quais, antisepsia de pele, na lavagem das mãos de cirurgiões e de pessoal médico e paramédico em geral, em urologia, obstetrícia, ginecologia, odontologia, dentre outros. (FRANCO et al., 2007; TRABULSI et al., 2005; BLÜCHER, 2007).

A solução de digluconato de clorexidina 20% (p/v) é uma solução aquosa, que contém não menos que 19% (190g/L) e não mais que 21% (210g/L) de digluconato de clorexidina. Caracteriza-se com um líquido amarelo-pálido límpido, quase inodoro e miscível em água. Sua densidade relativa a 20 °C é 1,06 a 1,07 g/mL (MARTINDALE, 2007).

Figura 1- Fórmula estrutural da clorexidina



Fonte: FÁVERO, 2004.

A clorexidina se caracteriza por ser um agente químico catiônico, da classe das biguanidas (FIG. 1). Sua sinonímia é 1,6 - bis (5 -p-clorofenilbiguanido) hexano, sua fórmula base é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, sendo disponível nas formas de diacetato ($2C_2H_4O_2$), dihidrocloreto ($2HCl$) e digluconato ($2C_6H_{12}O_7$), sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos devido a sua maior solubilidade em água. (BARBIN, 2008; FIORENTINO, 2009).

3.2.1 Mecanismo de ação e eficácia

A clorexidina possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e possui ação limitada em alguns vírus lipofílicos. O seu mecanismo de ação antibacteriano é explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente. Assim, em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular. Desta maneira, embora a clorexidina mate formas vegetativas de bactérias, não demonstra efetividade contra esporos, exceto em temperaturas elevadas. (TORTORA et al., 2000; ZANATTA; RÖSING, 2007; FRANCO et al., 2007; BAMBACE, 2003; PINTO, 2010; BARBIN, 2008).

A clorexidina, assim como os demais agentes químicos, possui algumas incompatibilidades que são capazes de alterar sua eficácia quando na presença de alguns agentes e/ou circunstâncias. A natureza catiônica da clorexidina faz com que ela interaja com alguns detergentes e certos componentes aniônicos, logo ela pode ser inativada na presença de fosfatos, sulfatos além da inibição competitiva que é verificada na presença de cálcio. Além disso, as soluções aquosas dos sais alcançam sua máxima atividade microbiológica e estabilidade química em pH 5 a 8 para que sua ação seja totalmente satisfatória. (BARDAL, 2005; FARIAS; BUFFON; CINI, 2003; MEDEIROS; BARLETTA; KANIS, 2006; FIORENTINO, 2009).

3.2.2 Propriedades toxicológicas e segurança

Ao se trabalhar com qualquer substância química, é importante conhecer suas características e especificidades toxicológicas para garantir os níveis de segurança em relação ao meio ambiente e quem irá manipulá-la e, além disso, viabilizar a sua possibilidade de uso frente aos danos que ela possa ocasionar.

As particularidades toxicológicas da clorexidina já foram estudadas e são conhecidas. Por conseguinte, a toxicidade consoante a DL_{50} é de 1.800 mg/kg/dia (peso corporal) o que a torna praticamente atóxica, além de não ser poluente, não exalar gases, não ser corrosiva e

não provocar irritação na pele e em mucosas. Além disso, sua concentração mínima inibitória está situada bem abaixo de 4% (0,04 g/mL) o que a faz ser considerada um dos biocidas de melhor rendimento e total segurança quando comparada a outras substâncias química que possuem a sua mesma ação (BLÜCHER, 2007; HORTENSE et al., 2010).

3.3 Metodologia e validação de doseamento por espectrofotometria UV/VIS

Segundo Brito et al. (2003), o desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório que denomina-se como validação.

A validação de métodos analíticos está inserida dentre as boas práticas de laboratório e, segundo a RE nº 899 de 29 de maio de 2003, ela deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método a ser utilizado atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Desta forma, a validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito e para isso são analisados os seguintes parâmetros (BRASIL, 2003):

- Varredura: efetuada para a identificação do comprimento de onda mais adequado a ser utilizado nas condições experimentais.
- Especificidade: capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.
- Linearidade: capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
- Intervalo: corresponde à faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico.
- Precisão: avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.
- Limite de Detecção: menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

- Limite de Quantificação: menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.
- Exatidão: corresponde a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor real.
- Robustez: medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Dentre os métodos analíticos para quantificação de substâncias utilizados, encontra-se a Espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV/VIS). A espectrofotometria é fundamentada na lei de *Lambert-Beer*, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde A é a absorbância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA; TEIXEIRA, 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; VOGEL, 2002).

A espectrofotometria UV/VIS tem ampla aplicação em laboratórios de análises e pesquisas físicas, químicas, bioquímicas, farmacológicas, etc. Inúmeras vantagens contribuem para sua popularidade, a principal, é o fato de ser uma técnica espectroscópica quantitativa. Aliado a isto, a técnica tem baixo custo operacional, é de fácil utilização e produz resultados de interpretação geralmente bastante simples. Em laboratórios analíticos, esta técnica é muito utilizada na quantificação direta de pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos ou na quantificação indireta de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas através da titulação de indicadores cromogênicos e/ou reagentes específicos. Desta forma, sua utilização para pesquisa científica e tecnológica abrange uma ampla gama de áreas (GALO; COLOMBO, 2009). Os fatores aqui mencionados serviram como critérios de escolha para a utilização desta técnica neste trabalho.

3.4 Testes de eficácia em uma formulação desinfetante

A importância de se efetuarem testes de eficácia é demonstrar a habilidade do desinfetante para provocar a letalidade dos microrganismos de interesse. Apesar de existirem vários métodos microbiológicos, não existe um único que seja de aceitação universal, uma vez que as exigências de cada país são variadas e, assim, um desinfetante aceito num país pode ser rejeitado em outro. Para efeito de registro e comercialização o método *diluição-uso* é adotado no Brasil como método oficial de avaliação microbiológica. O teste em questão é desenvolvido e executado em laboratórios específicos credenciados pela ANVISA, com o fim de comprovar o grau de capacidade do produto ao que o mesmo se propõe a fazer (PINTO, 2010; BRASIL, 1998, 2007; BUGNO; BUZZO; PEREIRA, 2003). Desta forma, a realização desse teste é indicada quando o interesse é o registro legal do produto saneante.

Os testes de eficácia são vantajosos porque permitem uma melhor comparação entre formulações diferentes quanto à produção de sua ação. Além disso, para exprimir a atividade antimicrobiana é indispensável à avaliação através de métodos microbiológicos, pois para produtos saneantes de uso geral com ação antimicrobiana, somente é possibilitado seu uso, mediante a comprovação de sua eficácia através de análise prévia realizada com o produto acabado (TRABULSI et al., 2005).

3.5 Estudo de estabilidade e avaliação das características físico-químicas de uma formulação desinfetante

A estabilidade é definida como o tempo no qual um produto mantém, dentro dos limites especificados e em todo o seu período de utilização, as mesmas propriedades e características que possuía no momento em que foi obtido (ANVISA, 2011). Logo, os testes de estabilidade são procedimentos preditivos baseados em dados obtidos para produtos armazenados sob condições nas quais se acredita que acelerem mudanças que possam vir a ocorrer em condições de vida de prateleira do produto. Como todo procedimento preditivo, os resultados não são absolutos, mas tem probabilidade de sucesso à medida que mais se aproximam da situação real. (BRASIL, 2004).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros inerentes ao produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e dos demais componentes da formulação, forma de apresentação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (ANVISA, 2011). Desta

mesma forma, segundo os fatores já citados, a avaliação da estabilidade é importante para produtos saneantes, pois estes também necessitam de condições apropriadas para manter suas características físicas e químicas estáveis e, conseqüentemente, garantir sua viabilidade propiciando que seu uso tenha uma ação satisfatória.

O conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos saneantes quanto aos limites de especificação, visam definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de estocagem determinadas. Nesse âmbito, parâmetros como solubilidade, pH, temperatura e incompatibilidades químicas (entre os componentes da formulação e entre a formulação com a própria embalagem do produto) devem ser cuidadosamente avaliadas, pois para que seja mantida as propriedades antimicrobianas da formulação esses parâmetros devem estar em condições ideais (BRASIL, 2005). Além disso, o efeito da solubilidade e do pH pode se manifestar sobre o desinfetante, o microrganismo ou ambos. Portanto, a importância da avaliação das características físico-químicas, contíguo ao desenvolver de uma formulação desinfetante, permite garantir um prazo de uso onde a formulação mantenha suas características adequadas permitindo, como já mencionado, que o resultado de uso da mesma seja viável de acordo com a ação que se propõe efetuar (ZANIN et al., 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os reagentes utilizados no desenvolvimento experimental do trabalho seguem listados abaixo:

- Ágar caseína-soja (Bacto™)
- Ágar nutriente (Bacto™)
- Caldo caseína-soja (Bacto™)
- Cloreto de benzalcônio (EXACTA®)
- Clorexidina (NEOBRAx®)
- Corante sólido hidrossolúvel (POLYCHROM®)
- Essência de lavanda GD (Phyto®)
- Nonil fenol etoxilado (DIAMEX®)
- Solução de cloreto de sódio 0,9%

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento experimental do trabalho seguem listados abaixo:

- Agitador vórtex (Phoenix® AP-59)
- Balança analítica (FA-2104N-BIOPRECISA®)
- Balança semi-analítica (JH2102-BIOPRECISA®)
- Contador de colônias (CP 600 PLUS-Phoenix®)
- Espectrofotômetro visível digital microprocessado (Q7980P-Quimis®)
- Espectrofotômetro UV-VIS (SP-220-BIOESPECTRO®)
- Estufa
- Estufa bacteriológica
- Medidor de pH (PHS-3B-PHTEK®)
- Viscosímetro rotativo analógico (Q-860^a21/A24 – Quimis®)

4.2 Metodologias

Seguem descritos os procedimentos laboratoriais utilizados no desenvolvimento técnico do trabalho:

4.2.1 Desenvolvimento técnico da formulação desinfetante de uso geral à base de clorexidina

Baseando-se em estudos bibliográficos, foram escolhidos os componentes utilizados no desenvolvimento da formulação desinfetante. Levando-se em consideração as características físico-químicas da clorexidina, avaliaram-se as interações entre os componentes das formulações. Foram manipuladas 15 formulações piloto, as quais estão descritas no Quadro 1. Após a definição da quantidade dos componentes, ocorreu a manipulação de forma convencional.

Quadro 1- Composição qualitativa e quantitativa dos componentes utilizados no desenvolvimento da formulação

Componentes (mL)	Formulações em Teste														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Clorexidina	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Nonil fenol etoxilado	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	-	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Cloreto de benzalcônio	2,0	1,0	1,0	1,0	-	2,0	3,0	2,0	3,0	3,0	-	-	3,0	3,0	3,0
Cloreto de cetil trimetil amônia	2,0	2,0	1,0	-	2,0	-	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	-	0,5
Essência	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Corante	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs
Água destilada (qsp)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

A clorexidina foi escolhida como agente ativo da formulação. O nonil fenol etoxilado e o cloreto de cetil trimetil amônia foram utilizados como substâncias com função tensoativa e o cloreto de benzalcônio como conservante. A essência e o corante foram escolhidos levando-se em consideração a qualidade do aspecto físico da formulação.

4.2.1.1 Técnica empregada para a manipulação da formulação desinfetante contendo clorexidina a 3 mg/mL

Foi transferido para um béquer metade da quantidade de água destilada a ser utilizada no processo, respeitando-se a qsp da formulação para 100 mL. Aferiram-se os volumes e em sequência, transferiu-se:

- 3,0 mL do nonil fenol etoxilado, seguido de agitação até completa dissolução.
- 3,0 mL do cloreto de benzalcônio sob agitação até completa solubilização.
- 1,5 mL do digluconato de clorexidina, que foi incorporado na formulação.
- 2,0 mL da essência
- Água destilada qsp 100 mL.
- Corante qs

4.2.2 Validação da metodologia analítica de doseamento do digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV/VIS

Em aceção à RE nº 899 de 29 de maio de 2003 que dispõe do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, para o estudo aqui proposto, a validação em questão é classificada de acordo com sua aplicação como pertencente à Categoria I (testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas). Logo, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão e robustez (BRASIL, 2003).

4.2.2.1 Varredura

A varredura foi efetuada para a identificação do comprimento de onda mais adequado a ser utilizado nas condições experimentais. Desta forma, foram realizadas leituras de amostra da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina 20% (p/v) na concentração de

7,50 µg/mL (Anexo A). Utilizando-se um micropipetador automático, retirou-se uma alíquota de 3,75 µL da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina 20% (p/v) e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, posteriormente, adicionou-se água destilada pra suceder-se a diluição. A mesma foi filtrada e colocada em uma cubeta de quartzo e os valores de absorbância foram detectados em espectrofotômetro após exposição à radiação ultravioleta visível (UV/VIS) nos comprimento de ondas de 200 a 400 nanômetros (nm). Utilizou-se como branco a água destilada e as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2 Especificidade

A especificidade foi determinada através de uma formulação placebo, ou seja, que não continha o digluconato de clorexidina. A amostra foi filtrada e colocada em uma cubeta de quartzo e os valores de absorbância foram detectados em espectrofotômetro UV/VIS, após leitura no comprimento de onda de 230 nm que foi definido através da varredura. Utilizou-se como branco a água destilada.

4.2.2.3 Linearidade

A linearidade foi realizada a partir de amostras em concentrações diretamente proporcionais do analito (digluconato de clorexidina). Primeiramente, foi preparada uma solução estoque de digluconato de clorexidina 20% (p/v) na concentração 0,1 g/mL. A partir dessa solução estoque foram preparadas cinco soluções do analito nas concentrações indicadas na Tabela 1. A análise foi realizada em triplicata para cada concentração do mesmo. As amostras foram filtradas e colocadas em cubetas de quartzo e foi efetuada a leitura em 230 nm através da espectrofotometria UV/VIS. Utilizou-se como branco a água destilada. Em função das concentrações analisadas e valores de absorbância encontrados, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação. Desta forma, a linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração.

Tabela 1- Preparo de amostras para linearidade (n=3)

Concentração das amostras (µg/mL)	Alíquota (mL) retirada da solução de 0,1 g/mL	Volume utilizado na diluição
2,50	2,50	100 mL
3,75	3,75	100 mL
5,00	5,00	100 mL
6,25	6,25	100 mL
7,50	7,50	100 mL

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

4.2.2.4 Intervalo

Obtido a partir dos resultados adquiridos no item 4.2.2.3 (linearidade).

4.2.2.5 Precisão

A precisão foi avaliada a partir de medições repetitivas, onde os testes foram realizados pelo mesmo analista, em curto espaço de tempo e fazendo uso da mesma instrumentação. Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de digluconato de clorexidina 20% (p/v) na concentração 0,1 g/mL. A partir da solução estoque foram produzidas sete amostras da solução na concentração de 7,50 µg/mL, logo, para cada amostra foi retirado 7,5 mL da solução estoque e que foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e efetuou-se a diluição com adição de água destilada. As amostras foram filtradas e colocadas em cubetas de quartzo e realizou-se a leitura através de espectrofotometria UV/VIS no comprimento de onda de 230 nm. Utilizou-se como branco a água destilada.

4.2.2.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados a partir das equações 1 e 2, respectivamente, utilizando-se os dados obtidos através de três curvas de calibração construídas a partir das amostras especificadas na Tabela 1 (item 4.2.2.3).

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (2)$$

Onde, IC refere-se à inclinação da curva de calibração, DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y. Os valores foram obtidos após a construção de três curvas.

4.2.2.7 Exatidão

A exatidão do método de doseamento do digluconato de clorexidina, através de espectrofotometria UV/VIS, foi determinada a partir de cálculos estatísticos resultantes da avaliação da proximidade dos resultados das amostras com o valor verdadeiro (concentração experimental) em relação as concentrações de digluconato de clorexidina pré-determinadas (concentração teórica), concomitantemente, ao teste de linearidade. As amostras utilizadas no teste de linearidade (Tabela 1, item 4.2.2.3) tiveram seus valores de teor calculados contra uma curva de calibração e, assim, a partir de cálculos estatísticos determinou-se a exatidão.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Média da Concentração Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.2.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas modificações nos parâmetros de análise que seguem descritos nos itens abaixo:

4.2.2.8.1 Variações de pH

Preparou-se soluções de HCl 0,1M e NaOH 0,1M. Em um béquer foi colocada uma solução de clorexidina em água destilada, previamente preparada, na concentração de 7,50 µg/mL. A análise ocorreu em um medidor de pH, previamente, calibrado.

Primeiramente, a amostra foi exposta a uma variação de pH para meio ácido acrescentando-se, cuidadosamente, com auxílio de um conta-gotas HCl 0,1M até que a solução atingisse pH em torno de 4,0. Posteriormente, foi realizada leitura da amostra no espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 230 nm. Já para a exposição da amostra a variação de pH básico, o ajuste ocorreu utilizando-se NaOH 0,1M até que a solução de clorexidina atingisse pH em torno de 10,0. Também, foi realizada a leitura da amostra nas mesmas condições que para a exposição ácida. Os testes para ambas as exposições ocorreram

em medida direta e em três repetições. Utilizou-se uma diluição na concentração de 7,50 µg/mL como referencial para os posteriores resultados.

4.2.2.8.2 Ausência e presença de luz

Foram preparadas soluções de clorexidina em água destilada na concentração de 7,50 µg/mL. Foram guardadas em prateleira três amostras expostas a luz e três amostras cobertas em papel laminado para que se evitasse contato com a luz. As amostras, durante o teste, permaneceram em temperatura ambiente (25°C). Após passarem sete dias nas condições descritas, foram realizadas leituras das amostras no espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda a 230 nm. O mesmo foi feito com uma diluição na mesma concentração e em tempo zero para posterior comparação das absorbâncias encontradas. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.2.8.3 Adição de solvente

Utilizando-se um balão volumétrico de 100 mL, dilui-se 3,75 µL de digluconato de clorexidina em uma solução hidroalcoólica a 30%. A amostra foi filtrada e colocada em uma cubeta de quartzo e os valores de absorbância foram detectados em espectrofotômetro UV/VIS, após exposição a 230 nm. Utilizou-se como branco a solução hidroalcoólica a 30%. O teste foi realizado em três repetições.

4.2.3 Doseamento espectrofotométrico do desinfetante contendo digluconato de clorexidina à 3 mg/mL

O teor da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina utilizado na composição da formulação é de 20% (p/v). Para cada 100 mL de formulação desinfetante foram adicionados 1,5 mL do padrão secundário de clorexidina.

O doseamento do digluconato de clorexidina na formulação ocorreu através de uma amostra na concentração de 7,50 µg/mL feita a partir da diluição da formulação desinfetante em água destilada. Desta forma, uma alíquota de 0,25 mL da formulação desinfetante foi transferida para um balão de 100 mL. A amostra foi filtrada e colocada em uma cubeta de quartzo e os valores de absorbância foram detectados em espectrofotômetro UV/VIS, após exposição ao comprimento de onda de 230 nm. Utilizou-se como branco a água destilada. O

doseamento foi realizado para a formulação desinfetante em tempo zero, para a formulação armazenada em estufa (50°C) e para a formulação armazenada em prateleira (25°C), ambas 40 dias após serem produzidas.

Para a determinação do teor de digluconato de clorexidina presente nas formulações em estudo (Anexo B), calculou-se a concentração a partir da equação da reta que foi obtida através do estudo de linearidade: $y(\text{abs}) = 0,1218x - 0,02733$. Onde, $y(\text{abs})$ é o valor de absorvância e x é a concentração experimental em $\mu\text{g/mL}$. Logo teor é igual ao valor de “ x ” multiplicado pelo fator de correção (concentração teórica/concentração experimental).

4.2.4 Testes de estabilidade da formulação desinfetante

Foram realizados ensaios de estabilidade em curto prazo. Foram projetadas situações, baseando-se no “Guia para Realização de Estudos de Estabilidade de Produtos Saneantes” presente na Resolução RE nº 01, de 29 de julho de 2005, para precipitar a degradação química e mudanças físicas do produto saneante em condições de estocagem forçadas (BRASIL, 2005). Para o mesmo foram produzidos três litros de formulação desinfetante que foram acondicionados em garrafas de politereftalato de etileno (PET) com capacidade de 250 mL. Onde, 1,5 litros foram colocados em estufa a 50°C e 1,5 litros colocados em prateleira à temperatura ambiente (25°C), ambos foram armazenados nas condições descritas durante o período de 40 dias. Foi produzida uma formulação em tempo zero para ser utilizada como referencial na avaliação das formulações que permaneceram no estudo de estabilidade.

4.2.4.1 Avaliação físico-química

Para a avaliação físico-química da formulação, em meio aos testes de estabilidade, foram realizados os seguintes testes:

4.2.4.1.1 Análise macroscópica (aspecto)

A análise macroscópica foi realizada com a utilização da formulação em tempo zero como referencial, servindo assim, como base avaliativa. A partir disso, foram feitas comparações a olho nu, levando em consideração a análise dos seguintes parâmetros: separação de fases, alterações de cor, odor, turvação e precipitação de componentes.

4.2.4.1.2 Avaliação do pH

Realizou-se as determinações do pH nas formulações em tempo zero, 40 dias prateleira (25°C) e 40 dias estufa (50°C). As medições foram efetuadas por medida direta em medidor de pH, previamente, calibrado. O teste ocorreu em três repetições.

4.2.4.1.3 Avaliação da viscosidade

Utilizou-se um viscosímetro rotativo analógico, na velocidade de 60 rpm e com utilização do rotor 12. A escolha desses parâmetros, velocidade e rotor, ocorreu de acordo com o manual do equipamento que leva em consideração a fluidez da substância que está sendo analisada. As formulações desinfetantes apresentam uma baixa fluidez. A viscosidade das formulações em estudo foi determinada a 25°C e foram efetuadas em três repetições.

4.2.4.2 Análise do teor

A análise do teor ocorreu de acordo com o descrito no item 4.2.3. O teor foi determinado para as formulações em tempo zero, 40 dias prateleira e 40 dias estufa. A análise ocorreu em triplicata.

4.2.5 *Controle microbiológico da formulação desinfetante*

O controle microbiológico foi realizado com o intuito de se analisar a eficácia da formulação desinfetante.

4.2.5.1 Preparação dos inóculos

Realizou-se um repique em meio inclinado com ágar nutriente dos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os mesmos foram incubados em estufa bacteriológica à temperatura ótima de crescimento, 37°C, durante 24 horas. O inóculo foi preparado a partir da suspensão em solução de cloreto de sódio 0,9% (solução salina) aos microrganismos de interesse, separadamente. Foram realizadas sucessivas diluições e as amostras foram colocadas em tubos de vidro e analisadas no espectrofotômetro visível digital microprocessado no comprimento de onda de 580 nm até a obtenção 50% de transmitância.

4.2.5.2 Padronização dos inóculos

Realizou-se a padronização para as suspensões de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambas em solução salina com 50% de transmitância (inóculos). Preparou-se 11 tubos, cada um com 9,0 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Para o tubo de número 1 transferiu-se, com auxílio de um micropipetador automático, 1,0 mL do inóculo. Agitou-se o tubo 1, transferiu-se 1,0 mL retirado do mesmo para tubo de número 2 e o processo foi repetido da mesma forma, sucessivamente, até o tubo de número 12. Desta forma, foram feitas diluições de 10^0 até 10^{-11} .

Para a quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) dos meios, realizou-se plaqueamento em ágar caseína-soja para as diluições 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11} . Foram transferidas para placas de Petri 1,0 mL de cada diluição e, cuidadosamente, adicionou-se o meio cultura ágar caseína-soja liquefeito a 45°C. O plaqueamento foi realizado em triplicata para cada concentração das diluições mencionadas. As placas foram incubadas em temperatura ótima de crescimento dos microrganismos, 37°C, durante 48 horas. Após o determinado tempo, realizou-se a contagem das UFCs no contador de colônias (CP 600 PLUS-Phoenix®).

4.2.5.3 Determinação da eficácia do desinfetante

Baseando-se em um trabalho realizado por Penna (2006), a determinação da eficácia para a amostra química (formulação desinfetante) foi feita utilizando-se um método clássico de diluição sucessiva chamado de Concentração Mínima Inibitória (CMI). Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.5.3.1 Preparação do caldo caseína-soja (meio de cultura)

Foram preparados 240 mL de caldo caseína-soja. Desta forma, pesou-se em uma balança semi-analítica 5,94 g do componente sólido e foram adicionados 240 mL de água destilada onde o mesmo foi solubilizado.

4.2.5.3.2 Técnica da CMI

Foram selecionados doze tubos de rosca com capacidade de 20 mL. Distribuiu-se

1,0mL de meio de cultura (caldo caseína-soja) para cada tubo, exceto para um deles. Os tubos e todo o material a ser utilizado no experimento foram autoclavados sob pressão constante e temperatura de 121°C, durante 15 minutos, ocorrendo assim esterilização dos mesmos. Os tubos foram numerados de 1 a 12. Para o primeiro e o segundo da série foi adicionado 1,0 mL da amostra em teste (desinfetante contendo clorexidina). Agitou-se o tubo 2 e transferiu-se 1,0 mL para o tubo 3. Repetiu-se a transferência sucessiva até o tubo de número 11, obtendo-se as concentrações conforme o Quadro 2.

Quadro 2- Concentrações utilizadas na determinação da eficácia da formulação desinfetante na técnica da CMI

Tubos	Concentração (digluconato de clorexina)	
	%	mg/mL
1	100 (amostra pura)	3,00
2	50	1,50
3	25	0,750
4	12,5	0,375
5	6,25	0,1875
6	3,15	0,0937
7	1,56	0,0468
8	0,78	0,0234
9	0,39	0,0117
10	0,19	0,0058
11	Meio + Amostra	-
12	Meio + Inóculo	-

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Adicionou-se para todos os tubos, exceto para o de número 11, 100 µL do inóculo (item 4.2.5.1- Preparação dos inóculos). Logo, no tubo 11 (controle negativo) existe apenas o meio de cultura e a amostra química em teste e no tubo 12 (controle positivo) há apenas o meio de cultura e o inóculo com o microrganismo em teste. Desta forma, a turvação no tubo 12 garante que ocorreu o desenvolvimento do microrganismo em teste e a não turvação do tubo 11 implica que não houve contaminação durante o desenvolvimento do procedimento. Os tubos foram incubados a temperatura ótima de crescimento, 37°C, durante o tempo de 24 e 48 horas.

O teste de concentração mínima inibitória foi realizado para as formulações desinfetantes em tempo zero, no tempo de 40 dias armazenada em prateleira a 25°C e armazenada em estufa a 50°C. Além disso, o teste ocorreu em triplicata para cada formulação e para cada um dos microrganismos (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) em teste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento técnico da formulação desinfetante de uso geral à base de clorexidina

A formulação de desinfetante de uso geral foi desenvolvida a partir de um estudo teórico-prático, propondo-se usar a clorexidina como agente ativo da formulação. Após a elaboração das 15 formulações piloto, conseguiu-se definir a formulação onde os componentes a ela pertencentes mostraram-se compatíveis entre si e com o agente ativo utilizado na mesma.

O problema encontrado durante o desenvolvimento da formulação, em relação ao aspecto físico, foi a precipitação do corante hidrossolúvel. Para que o mesmo fosse resolvido, buscou-se fazer ajustes nos componentes tensoativos utilizados na formulação (nonil fenol etoxilado e cloreto de cetil trimetil amônia). O cloreto de cetil trimetil amônia mostrou-se incompatível por ocasionar a formação de precipitado na formulação e foi retirado da mesma. O problema foi resolvido e a formulação que apresentou aspecto visual satisfatório e seguiu para os testes de estabilidade e eficácia foi o piloto de número 14 (QUA. 3).

Quadro 3- Formulação desinfetante escolhida após os testes de desenvolvimento

Componentes	Quantidade dos componentes em mL
Clorexidina	1,5
Nonil fenol etoxilado	3,0
Cloreto de benzalcônio	3,0
Essência	2,0
Corante	qs
Água destilada	qsp 100

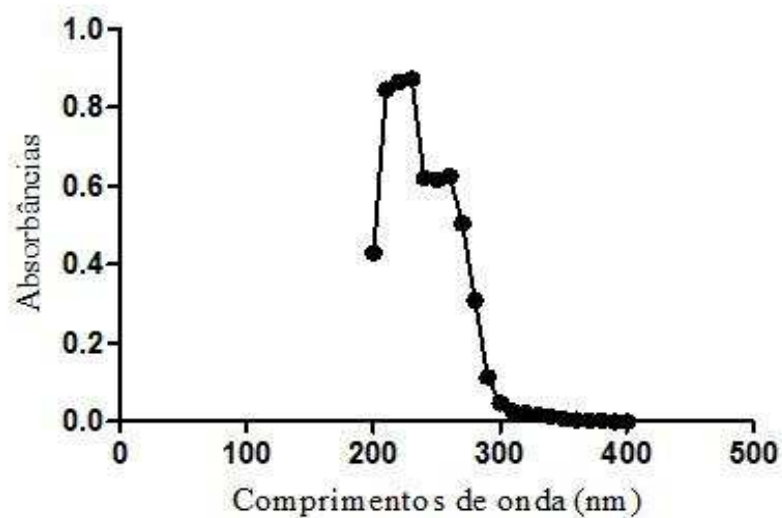
Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

5.2 Resultados da validação da metodologia de doseamento do digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV/VIS

5.2.1 Varredura

A partir das leituras da amostra, realizadas por espectrofotometria UV/VIS, da solução padrão secundário de digluconato de clorexidina 20% (p/v) na concentração de 7,50µg/mL nos comprimentos de onda de 200nm a 400nm, conseguiu-se definir o comprimento de onda mais alto, considerado o mais adequado para a análise da amostra em questão. Desta forma, segundo os dados expressos na Figura 2, onde os valores de absorbância estão representados no eixo y e os comprimentos de onda no eixo x, 230nm é o comprimento de onda que possui maior definição em relação às absorbâncias encontradas.

Figura 2- Varredura da solução de digluconato de clorexina 7,50 µg/mL.



Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

Fiorentino (2009), em um estudo de desenvolvimento e controle de qualidade de uma formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina, utiliza em seu trabalho o mesmo comprimento de onda (230nm) aqui encontrado para a realização de testes de doseamento do digluconato de clorexidina através da espectrofotometria UV/VIS. Desta forma, é provável que a varredura realizada neste trabalho tenha obtido um resultado satisfatório.

5.2.2 Especificidade

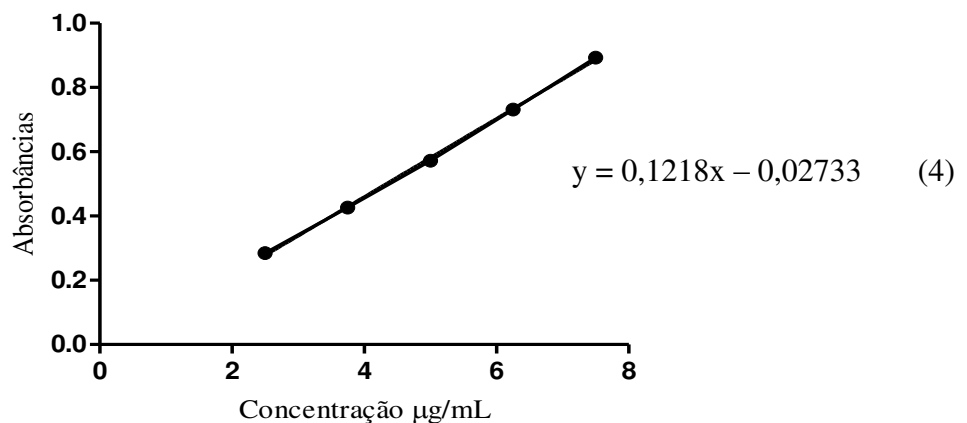
Segundo Brito et al. (2003) o termo especificidade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Analisando-se a especificidade do método, descrito no item 4.2.2.2, a formulação placebo examinada a partir da espectrofotometria UV/VIS não apresentou leitura no comprimento de onda de 230 nm. Desta forma, o método mostrou-se específico para o doseamento do digluconato de clorexidina.

5.2.3 Linearidade

Segundo a RE nº 899 de 29 de maio de 2003, a linearidade é considerada satisfatória se o coeficiente de correlação (r^2), como critério mínimo aceitável, apresentar o valor de 0,99 (BRASIL, 2003). A linearidade do método foi verificada através da construção de três curvas autênticas de calibração de soluções de digluconato de clorexidina em cinco diferentes concentrações de 2,5 a 7,5 $\mu\text{g/mL}$ que se encontram no intervalo (faixa de trabalho) de 33% a 100% da concentração do teste, ou seja, dentro da faixa de aceitação do produto final (item 4.2.2.3). A representação gráfica da curva pode ser observada na Figura 3.

A curva de calibração das soluções de digluconato de clorexidina apresentou um coeficiente de correlação $r^2 = 0.9971$, próximo de 1, demonstrando que há correlação linear entre as concentrações e as áreas dos picos na faixa de concentração analisada. Este valor foi calculado considerando a equação da reta ($y = ax + b$), onde x é a concentração teórica em $\mu\text{g/mL}$ e y é o valor da área obtido nas leituras por espectrofotometria UV/VIS.

Figura 3- Curva de calibração das soluções de digluconato de clorexidina (n=3)



Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

A Figura 3 demonstra a curva de calibração das amostras de digluconato de clorexidina, onde, o eixo x representa o valor das concentrações das amostras e o eixo y, os valores de absorbâncias encontrados.

5.2.4 Precisão

A precisão foi efetuada através de amostras submetidas a ensaios de repetibilidade. A partir dos resultados laboratoriais, avaliou-se este parâmetro através de cálculos para determinar o coeficiente de variação e o desvio padrão (TAB. 2).

Tabela 2- Avaliação da precisão através do método de repetibilidade.

Soluções de clorexidina com concentração teórica 7,50 µg/mL	Absorbâncias (230 nm)	Concentração experimental de clorexidina (µg/mL)
01	0,901	7,62
02	0,886	7,49
03	0,902	7,62
04	0,888	7,51
05	0,885	7,49
06	0,893	7,55
07	0,880	7,45
Média	-	7,53
Desvio Padrão	-	0,066
Coeficiente de Variação (%)	-	0,87

Fonte: Dados da pesquisa, 2012.

O coeficiente de variação encontrado foi de 0,87%. Segundo a RE nº 899 de 29 de maio de 2003, não se admite valores superiores a 5% para o coeficiente de variação, indicando que o valor encontrado é aceitável (BRASIL, 2003). Além disso, o desvio padrão foi menor que 1% e o mesmo também encontra-se dentro dos limites aceitáveis para o método em questão (CHASIN, 1998). Desta forma, é possível afirmar que o método apresenta uma precisão satisfatória.

5.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção foi calculado a partir da fórmula expressa na equação 1 (item 4.2.2.6) e seu resultado corresponde a menor concentração do digluconato de clorexidina que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Desta forma, com base nos resultados obtidos o LD encontrado no experimento

é de 0, 2360 µg/mL. Já o Limite de Quantificação, expresso matematicamente equação (item 4.2.2.6), corresponde à menor concentração do digluconato de clorexidina, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições experimentais adotadas. O LQ encontrado foi de 0, 780 µg/mL. Desta forma, as concentrações utilizadas durante os testes de validação encontram-se dentro desses limites, e assim, garante que o digluconato de clorexidina presente nas soluções pode ser detectado e quantificado, adequadamente.

5.2.6 Exatidão

A exatidão do método analítico segundo os resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Análise da exatidão para o método de doseamento de digluconato de clorexidina por espectrofotometria UV/VIS (n=3)

Concentração teórica de clorexina (µg/mL)	Concentração experimental de clorexidina (µg/mL)			Dados estatísticos			
	1	2	3	Média	*DP	**CV%	Exatidão(%)
2,50	2,57	2,59	2,52	2,56	0,036	1,40	102,40
3,75	3,69	3,73	3,74	3,72	0,026	0,69	99,20
5,00	5,14	4,96	4,99	5,03	0,096	1,90	100,60
6,25	6,03	6,26	6,38	6,22	0,177	2,84	99,52
7,50	7,61	7,49	7,57	7,55	0,061	0,80	100,60

Fonte: Dados da pesquisa, 2012. *DP= desvio padrão; ** CV= coeficiente de variação.

Segundo os valores apresentados, o método de doseamento do digluconato de clorexidina, por espectrofotometria na região do ultravioleta visível, mostrou-se exato, tendo em vista que os valores resultantes situam-se dentro do limite que é considerado aceitável para este parâmetro, de 95 % a 105 % (LEITE, 2002).

5.2.7 Robustez

Os resultados obtidos no estudo de robustez, onde, mediu-se a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos e, desta forma,

mostrou a indicação da sua dependência durante o uso normal (BRITO et al., 2003, LA ROCA et al., 2007), encontram-se expressos na Tabela 4.

Tabela 4- Análise da robustez para soluções de clorexidina a 7,5 µg/mL (n=3)

Soluções de clorexidina com concentração teórica 7,50 µg/mL	Média da concentração experimental (µg/mL)	Coefficiente de variação
Presença de luz	6,34 ± 0,17	2,68
Ausência de luz	6,46 ± 0,23	3,56
Solução hidroalcoólica 30%	-	-
Tempo zero	7,52 ± 0,05	0,66
pH 4,0	6,71 ± 0,09	1,43
pH 7,5	7,52 ± 0,05	0,66
pH 10,0	7,48 ± 0,07	1,00

Fonte: Dados da pesquisa, 2012

De acordo com os resultados encontrados na Tabela 4, o método mostrou-se robusto para as condições de presença e ausência de luz e para as variações de pH que apresentaram coeficiente de variação abaixo de 5% (BRASIL, 2003). Entretanto, a diluição de digluconato de clorexidina em solução hidroalcoólica 30% provocou alterações na leitura por espectrofotometria UV/VIS, portanto, para esse teste o método não se mostrou robusto o que indica que o uso de solução hidroalcoólica não é viável para estudos de quantificação do digluconato de clorexidina a partir do método aqui utilizado.

5.3 Testes de estabilidade da formulação desinfetante

Os ensaios de estabilidade em curto prazo permitiram precipitar a degradação química e mudanças físicas da formulação desinfetante em condições de estocagem forçadas, nas situações que foram projetadas. Desta forma, no tempo em que ocorreu o estudo verificou-se que as características físico-químicas permaneceram estáveis e o produto poderia ser utilizado dentro de suas condições viáveis no tempo em que ocorreu o estudo. Cabe lembrar que o estudo de estabilidade em curto prazo permitiu avaliar essas condições temporariamente. Para a determinação da vida útil do produto deve-se realizar ser confirmado através de um estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

5.3.1 Avaliação físico-química

A avaliação físico-química permitiu, previamente, definir as características físicas e químicas aceitáveis das formulações em estudo e, assim, admitir encaminhá-las para o teste de eficácia. Os resultados encontrados no estudo encontram-se expressos na Tabela 5.

Tabela 5- Ensaio de estabilidade em prateleira e acelerada no tempo zero e 40 dias (n=3)

Testes	Especificação	Análise inicial	Tempo e Condições (formulações)		
			T0*	T40**(prateleira)	T40(estufa, 50°C)
Aspecto	uniforme	Aprovado	Uniforme	Uniforme	Uniforme
Cor	uniforme	Aprovado	Uniforme	Uniforme	Uniforme
Odor	agradável	Aprovado	Agradável	Agradável	Agradável
pH	7,0	Aprovado	7,21 ± 0,03	5,58 ± 0,02	5,16 ± 0,05
Viscosidade	5,0 cP	Aprovado	5,0 cP	5,0 cP	5,0 cP
Teor do ativo*** (mg/mL)	3,0	Aprovado	2,97 ± 0,02	2,91 ± 0,01	2,83 ± 0,07
Teor do ativo (%)	100	Aprovado	99	97	94,3

Fonte: Dados da pesquisa, 2012. Baseado em BRASIL, 2005.

* T0 = tempo zero

** T40 = tempo de 40 dias

***Fator de correção= 0,4

De acordo com o especificado na Tabela 5, as formulações em análise não apresentaram modificações em relação ao aspecto, cor e odor e viscosidade, isso implica dizer que as propriedades físicas mantiveram-se uniformes para as formulações em estudos o que as tornam aceitáveis segundo os critérios estabelecidos.

Os agentes ativos utilizados na desinfecção possuem uma faixa de pH ideal que estabelece a viabilidade de seus efeitos; a faixa de pH em que o digluconato de clorexidina apresenta sua máxima atividade microbiológica e estabilidade química situa-se entre 5,0 e 8,0 (ANFARMAG, 2004, FIORENTINO, 2009). Durante os 40 dias de estocagem as formulações em prateleira (25°C) e estufa (50°C) apresentaram variações nos valores de pH, porém, essas variações encontram-se na faixa de pH ideal de ação do agente ativo presente nas formulações e, desta forma, este fator não implicou em alterações quanto a ação do produto.

5.3.2 Análise do teor

Em relação ao teor especificado na tabela 5, o teor do agente ativo para as formulações

que permaneceram em prateleira (25°C) e estufa (50°C) apresentou apenas uma pequena quantidade de variação quando comparado a formulação em tempo zero, fator este que mostra que as formulações em questão permaneceram estáveis fisicoquimicamente durante o tempo de estudo.

5.4 Controle microbiológico

Através do controle microbiológico avaliou-se a eficácia das formulações desinfetantes em estudo.

5.4.1 Padronização dos inóculos

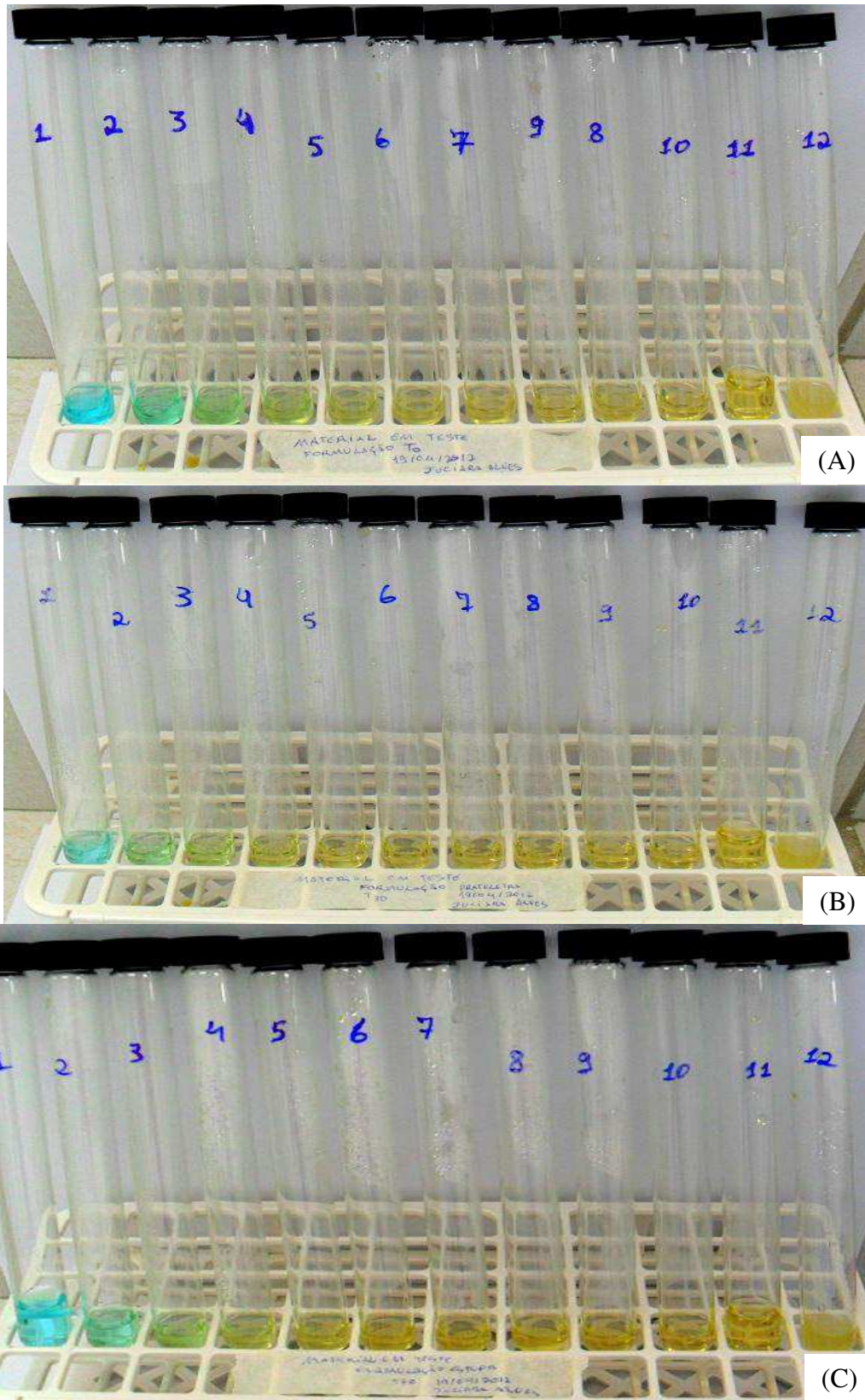
Para obtenção dos resultados do número de UFCs/mL calculou-se a média do número de unidades formadoras de colônias contadas em cada placa multiplicado pelo seu respectivo fator de diluição utilizado (PINTO, 2010). Para os padronizados a 50 % a 580 nm, foram obtidos os valores de aproximadamente 115×10^{10} e 200×10^{10} UFC/mL para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

5.4.2 Teste de eficácia do desinfetante

Baseado na técnica da CMI correspondente a determinação da concentração mínima inibitória, no intervalo de 24 e 48 horas, quanto à resistência dos microrganismos estudados. A avaliação do teste ocorre a olho nu, desta forma, o procedimento torna-se apenas de cunho qualitativo, por meio da observação da presença ou ausência de turvação do meio. A CMI corresponde ao tubo de maior diluição onde se verifica a ausência de crescimento bacteriano (PENNA, 2006).

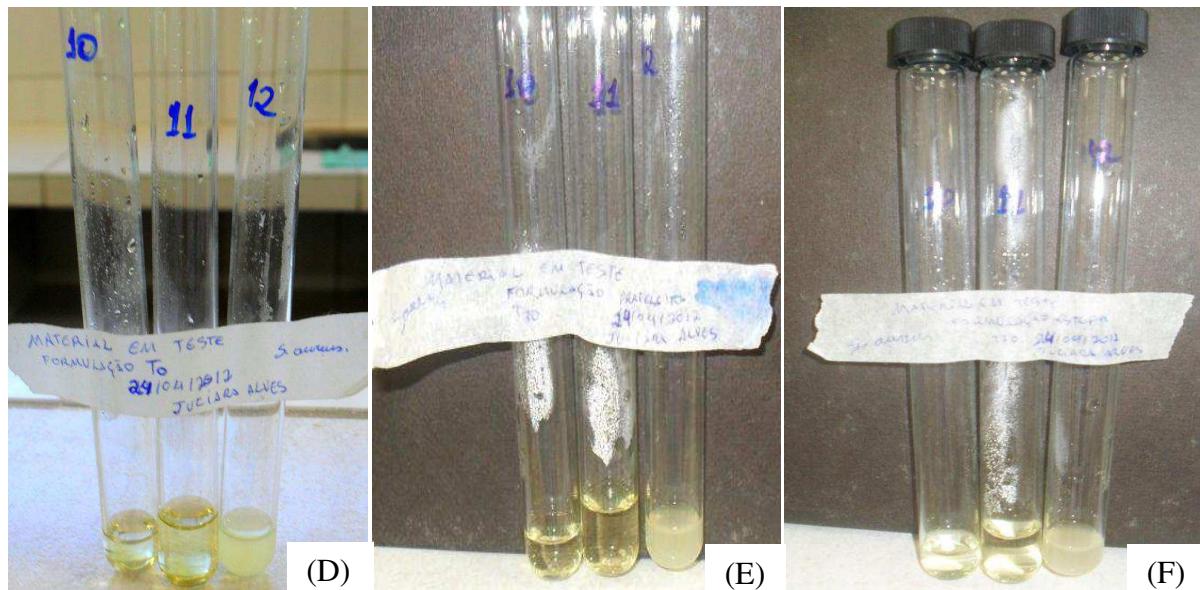
As diluições realizadas para as formulações em tempo zero, 40 dias prateleira (25°C) e 40 dias estufa (50°C), analisadas em triplicata e no tempo de 24 e 48 horas para a *Escherichia coli* (FIG.4) e o *Staphylococcus aureus* (FIG.5) não apresentaram turvação nos tubos com o agente químico desinfetante até a menor concentração utilizada que foi de 0,0058 mg/mL, isto indica que as formulações apresentaram eficácia antimicrobiana sobre os microrganismos testados no estudo, apesar dos valores encontrados no doseamento destas formulações apresentarem perda de 3% (prateleira) e 5,7% (estufa). Além disso, os controles negativo (tubo11) e positivo (tubo 12) responderam de acordo com o esperado para ambos os testes.

Figura 4- Teste de eficácia para *Escherichia coli*



As imagens representam o teste de eficácia, com o inóculo de *Escherichia coli*, analisadas após 48 horas para as formulações em tempo zero (A), 40 dias prateleira (B) e 40 dias estufa (C). Foto: Juciara Alves da Silva.

Figura 5- Teste de eficácia para *Staphylococcus aureus*



As imagens representam o teste de eficácia, com o inóculo de *Staphylococcus aureus*, analisadas após 48 horas para as formulações em tempo zero (A), 40 dias prateleira (B) e 40 dias estufa (C). Foto: Juciara Alves da Silva.

Embora a não turvação dos meios que continham a formulação desinfetante indiquem que não ocorreu algum tipo de ação microbiana, a metodologia de avaliação qualitativa pode ocultar alguma atividade antimicrobiana importante. Portanto, um acompanhamento pela avaliação quantitativa é sempre interessante (TIMENETSKY; ALTERTHUM, 1988). Logo, a atividade antibacteriana evidenciada no método quantitativo não pode ser desprezada em relação ao método qualitativo, principalmente quando este é utilizado para a qualificação de produtos desinfetantes. Além disso, os testes “*in vitro*” confirmam apenas a atividade antimicrobiana de um produto desinfetante, mas não a real capacidade de desinfecção em relação a superfícies e suas particularidades que em algumas situações podem agir como fatores interferentes e prejudicar a ação do componente ativo desinfetante.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados perante o estudo aqui desenvolvido, as seguintes conclusões podem ser mencionadas:

- A formulação desinfetante (piloto 14) de uso geral foi desenvolvida com qualidade satisfatória, em relação aos testes empregados.
- O método por espectrofotometria UV/VIS validado para o doseamento do digluconato de clorexidina na formulação desinfetante satisfaz os critérios de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez, conforme exigido para essa categoria de método analítico. Desta forma, foi possível realizar o doseamento do agente ativo (digluconato de clorexidina) na formulação desinfetante.
- Nas condições em que se realizou o estudo de estabilidade, as formulações permaneceram estáveis quanto aos parâmetros físico-químicos (análise macroscópica, pH e viscosidade), logo, as características analisadas para as formulações após 40 dias em prateleira (25°C) e estufa (50°C) mantiveram-se iguais as especificadas para a formulação em tempo zero. Além disso, não ocorreram alterações significativas quanto ao teor de digluconato de clorexidina nas formulações em análise o que determina uma boa estabilidade da formulação para o tempo em que ocorreu o estudo. Um estudo de estabilidade de longa duração seria necessário para uma verificação mais específica da vida útil do produto saneante.
- O teste de eficácia, realizado através do controle microbiológico utilizando-se a técnica de CMI, demonstrou que as formulações em tempo zero, prateleira (25°C) e estufa (50°C) tiveram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos expostos no estudo (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), nas condições experimentais utilizadas. Desta forma, entende-se que a formulação para estes microrganismos apresenta eficácia antimicrobiana de acordo com o método empregado, já que não houve turvação até a menor diluição empregada no teste (0,0058 mg/mL).

REFERÊNCIAS

ANFARMAG. Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais. **Manual de Incompatibilidades Farmacotécnicas em Preparações de Uso Tópico**. 2. ed. São Paulo, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira**. 2. ed. 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/arquivos/FNFB20Dez%.pdf>. Acesso em: 05 de junho de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988 - **Normas para registro dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm. Acesso em: 27 de abril de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.184, de 22 de outubro de 2001 - **Procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários e outros de natureza e finalidade idênticas**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2001/184_01rdc.htm. Acesso em: 12 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 22 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1.ed. Brasília. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 01, de 29 de julho de 2005 - **Guia para Realização de Estudos de Estabilidade de Produtos Saneantes**. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/show=1810>. Acesso em: 23 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007- **Regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana**. Disponível em: www.saude.mg.gov.br/legis/rdc-anvisa28/07.htm. Acesso em 02 de junho de 2012.

BAMBACE, Andrea Moreira Jacobucci et al. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Revista Biociências**. Vol.9, n. 2, p.73-81. Taubaté, 2003.

BARBIN, Luiz Eduardo. **Análise química da clorexidina misturada ou não ao hidróxido de cálcio**. 2008. 148p. Dissertação (Doutorado em Odontologia Restauradora, subárea de Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

BARDAL, Priscila Ariede Petinuci. **Avaliação dos efeitos de dentifrícios contendo clorexidina sobre o desenvolvimento de placa dentária, gengivite, cálculo e Imanchamento extrínseco do esmalte dentário em pacientes sob tratamento ortodôntico.** Dissertação (Mestrado em Ortodontia e Odontologia em Saúde Coletiva) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Bauru, 2005.

BLÜCHER, Astrid Garcia Von. **Dispositivos para liberação lenta de clorexidina para prevenção de periimplantite.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2007.

BRITO, Natile Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente.** Vol. 13, p. 129-146. Curitiba, 2003.

BUGNO, Adriana; BUZZO, Adriana Aparecida; PEREIRA, Tatiana Caldas. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Produtos Saneantes Destinados à Limpeza. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** Vol. 39, n. 3. São Paulo, 2003.

BURTON, Gwendolyn R. Wilson; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia: para as ciências de saúde.** Tradução de E. F. Toros. 7.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005.

CHASIN, A. A. M. et al. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia,** v.1, n.1, p. 1-6, 1998.

CORRÊA, Lilia Modesto Leal. **Saneantes domissanitários e saúde: um estudo sobre a exposição de empregadas domésticas.** 83p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

FARIAS, Nayanna Coutinho de, BUFFON, Marilene Magalhães; CINI, Rafael 3. Avaliação *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*. **Visão Acadêmica.** Vol. 4, n. 2, p. 83-88. Curitiba 2003.

FÁVERO, Maria Luiza Drechsel. **Desenvolvimento de dentifrício como veículo para o digluconato de clorexidina no controle químico da placa bacteriana.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

FIorentino, Flávia Angélica Másquio. **Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina.** Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2009.

FRANCO, Ana Paula Gebert de Oliveira et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. **UEPG Ciência Biol. Saúde.** p.53-58. Ponta Grossa, 2007.

HOFFMANN, F.L., GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. **Higiene Alimentar.** Vol. 9, n.39, p.29-34. 1995.

GALO, Luiz André; COLOMBO Márcio Francisco. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova.** vol.32 no.2 São Paulo. 2009.

HORTENSE, Sandra Regina et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**. p.178-84. São Paulo, 2010.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Relatório sobre análise em desinfetantes de uso geral**. 23 p. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://repositorios.inmetro.gov.br/handle/10926/1626>. Acesso em 05 de junho de 2012.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**. Vol. 88, p. 177-180, 2007.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4 ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2002.

MARTINDALE: the complete drug reference. 35th. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. p.1472-1475.

MEDEIROS, Gláucia H. Faraco de; BARLETTA Fernando Branco; KANIS Luiz Alberto. Avaliação química do parâmetro físico-químico de soluções de digluconato de clorexidina 2,0% disponíveis no mercado. **RFO UPF**. p. 56-59. 2006.

NASCIMENTO, Henry Mendes; DELGADO, Denise Aparecida; BARBARIC, Ivana Filomena. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**. p.11-13. 2010.

PENNA, T. C. V. **Desinfecção e Esterilização Química**. Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica. Universidade de São Paulo. 2006. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/Departamentos/FBT/HP_Professores/Penna/Livro/Desinfeccao_e_Esterilizacao_Quimica_Capitulo08.pdf. Acesso em 27 de janeiro de 2009.

PETILLO, Vera Lúcia Siqueira. **A prevenção da poluição química de interiores e o uso de produtos de limpeza**. XXVIII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. México, 2002.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2010.

ROCHA, Fábio R. P.; TEIXEIRA, Leonardo S. G. estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria. UV-VIS. **Química Nova**. Vol. 27, n. 5, 807-812, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Editora Bookman. Porto Alegre, 2002.

TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. **Revista Saúde Pública**. p. 47-50. São Paulo, 1990.

TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Determinação da atividade antimicrobiana de desinfetantes domésticos. **Rev. Microbiol.** p. 46-51, 1988.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. et. al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TRABULSI, Luiz Rachid et. al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. LTC – Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2002.

ZANATTA, Fabrício Batistin; RÖSING, Cassiano Kuchenbecker. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**. p. 35-43. 2007.

ZANIN, Sandra Maria W et al. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**. v.2, n.2. p 47-58. 2001.

**ANEXO A - CÁLCULO PARA OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO DE DIGLUCONATO DE
CLOREXIDINA NA CONCENTRAÇÃO DE 7,5 µg/mL**

Dados:

- C_1 = concentração inicial do digluconato clorexidina 20% (p/v) = 0,2 g/mL
- C_2 = concentração a ser obtida = 7,5 µg/ mL
- V_1 = volume de digluconato de clorexidina a ser utilizado na diluição para obtenção da concentração C_2
- V_2 = valor total da diluição = 100 mL

Logo, temos que:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Então, temos:

$$200000 \mu\text{g/ mL} \times V_1 = 7,5 \mu\text{g/ mL} \times 100 \text{ mL}$$

Desta forma,

$$V_1 = 0,00375 \text{ mL} = 3,75 \mu\text{L}$$

ANEXO B - CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA PRESENTE NA FORMULAÇÃO DESINFETANTE A 3 mg/mL

Dados:

- Concentração da formulação (3 mg/mL) diluída em água destilada utilizada para o doseamento = 7,5 µg/ mL.
- Equação da reta: $y(\text{abs}) = 0,1218x - 0,02733$. Onde, $y(\text{abs})$ é o valor de absorbância encontrado no espectrofotômetro UV/VIS a 230 nm e x = concentração experimental em µg/mL.
- FC = fator de correção = concentração teórica ÷ concentração experimental

Assim, temos que:

$$y(\text{abs}) = 0,1218x - 0,02733. \text{ Onde, } y(\text{abs}) = 0,894$$

$$0,894 = 0,1218x - 0,02733$$

$$x = 7,5 \mu\text{g/ mL}$$

$$\text{FC} = \text{concentração teórica} \div \text{concentração experimental}$$

$$\text{FC} = 0,003 \text{ g/ mL} \div 0,0000075 \text{ g/ mL}$$

$$\text{FC} = 400$$

$$\text{Para um resultado direto em mg/ mL, temos } \text{FC} \div 1000 = 0,4$$

Logo, o teor de digluconato de clorexina presente na formulação desinfetante é igual a:

$$\text{Teor} = \text{valor de } x \text{ (equação da reta)} \times \text{FC}$$

$$\text{Teor} = 7,5 \times 0,4$$

$$\text{Teor} = 3,0 \text{ mg/ mL}$$