

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
GABRIELLA PASSERINI BAVIA

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA
EM ENXAGUATÓRIO BUCAL**

LONDRINA

2021

Gabriella Passerini Bavia

**Validação da Metodologia Analítica para Determinação do Teor de
Digluconato De Clorexidina em Enxaguatório Bucal**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR), como parte das exigências
para obtenção do título de bacharel
em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Silvia Priscila Dias
Monte Blanco

LONDRINA

2021

Gabriella Passerini Bavia

**Validação da Metodologia Analítica para Determinação do Teor de
Digluconato De Clorexidina em Enxaguatório Bucal**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR), como parte das exigências
para obtenção do título de bacharel
em Engenharia Química.

Londrina, 30 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra^a. Silvia Priscila Dias Monte Blanco
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Prof^a. Dra^a. Pricila Marin
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Emerson Rolim de Jesus
Empresa DentalClean

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados, por todas oportunidades e portas abertas ao longo do curso.

Aos meus pais, Adauto e Marcia, e ao meu irmão Guilherme, que estiveram do meu lado e me apoiaram em todas minhas decisões durante este caminho, e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava a este trabalho.

A minha orientadora Silvia, por aceitar me acompanhar, pelas correções e ensinamentos, além de todo incentivo e ajuda durante todo este trabalho.

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes e apoiando, compartilhando juntos cada desafio durante toda a graduação.

Aos professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná por todo conhecimento transmitido durante a graduação.

Por fim, a empresa em que foi realizada o estágio, assim como, os colaboradores da mesma, por todo incentivo e paciência para meu aprendizado.

RESUMO

O digluconato de clorexidina é um antisséptico eficiente utilizado em enxaguatório bucal devido à sua ação bacteriostática. As empresas que utilizam esse composto devem fazer análises para a determinação da quantidade do mesmo em sua formulação, atendendo requisitos da legislação brasileira. Desta forma, faz-se necessário a validação do método analítico empregado quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, avaliação do efeito matriz, precisão por repetibilidade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, que irão garantir que o produto apresenta qualidade e segurança. Com isso, o objetivo deste trabalho foi fazer a validação da metodologia analítica para determinação de digluconato de clorexidina em enxaguatório bucal da empresa DentalClean. Para isto, foi utilizado o método de titulométrico e cálculos estatísticos verificando parâmetros exigidos pela Anvisa. Os resultados obtidos demonstraram que o método avaliado pode ser validado de acordo com a RE 899 de 2003 da Anvisa, alcançando o objetivo proposto no presente trabalho e entregando resultados satisfatórios para a empresa que terá otimização de tempo e redução de custos.

Palavras chave: Controle de qualidade. Validação. Métodos analíticos. Digluconato de clorexidina.

ABSTRACT

Chlorhexidine gluconate is an efficient antiseptic used in mouthwash due to its bacteriostatic action. Companies that use this compound must carry out analyzes to determine its concentration in its formulation, meeting the requirements of Brazilian legislation. Thus, it is necessary to validate the analytical method used regarding the parameters of selectivity, linearity, evaluation of the matrix effect, precision by repeatability, accuracy, detection limit and quantification limit, which will ensure that the product has quality and safety. Thus, the objective of this work was to validate the analytical methodology for the determination of chlorhexidine gluconate in a mouthwash from DentalClean. For this, the titrometric method and statistical calculations were used, verifying parameters required by Anvisa. The results obtained demonstrated that the evaluated method can be validated according to the RE 899 of 2003 from Anvisa, reaching the objective proposed in this work and delivering satisfactory results for the company that will have time optimization and cost reduction.

Keywords: Quality control. Validation. Analytical methods. Chlorhexidine digluconate.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	DentalClean.....	2
2.2	Digluconato de clorexidina em enxaguatório bucal	2
2.3	Validação de método para determinação do teor de digluconato de clorexidina em enxaguatório bucal.....	4
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	5
3.1	Reagentes e Soluções	5
3.1.1	Solução indicadora de Violeta Cristal	5
3.1.2	Solução de ácido perclórico em ácido acético.....	5
3.1.3	Branco e Amostra	6
3.3	Procedimento analítico para determinação de digluconato de clorexidina	6
3.4	Parâmetros de Validação	7
3.4.1	Seletividade	7
3.4.2	Linearidade.....	8
3.4.3	Avaliação do efeito matriz.....	8
3.4.4	Precisão por repetibilidade	8
3.4.5	Exatidão.....	9
3.4.6	Limite de Detecção	10
3.4.7	Limite de Quantificação	10
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	11
4.1	Seletividade.....	11
4.2	Linearidade.....	11
4.3	Avaliação do efeito matriz	13

4.4	Precisão por repetibilidade	14
4.5	Exatidão	15
4.6	Limite de Detecção.....	15
4.7	Limite de Quantificação	16
3	CONCLUSÃO	18
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	19

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação gráfica da curva analítica da fração mássica real versus volume gasto de titulante.	12
Figura 2 - Representação gráfica dos resíduos da linearidade.....	12
Figura 3 - Representação gráfica da fração mássica da amostra versus a fração mássica teórica para solução matriz (CME Solução Matriz) e a fração mássica teórica para solução química de referência do analítico (CME SQR) em solvente (água deionizada).....	14
Figura 4 - Curva de calibração da fração mássica da amostra (%) versus a fração mássica teórica (%).	16

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado do volume em mL da titulação.....	11
Tabela 2 - Resultados precisão por repetibilidade.....	14
Tabela 3 - Resultados de exatidão.	15

1. INTRODUÇÃO

A DentalClean é uma indústria brasileira de produtos de higiene bucal localizada na cidade de Londrina, no Paraná. Em seu portfólio, a empresa possui escovas, géis e fios dentais, enxaguatórios, antissépticos e limpadores de língua, que atendem desde bebê até a linha adulto, além de trabalhar com uma das mais completas linhas profissionais do mercado. A DentalClean possui mais de vinte anos de atuação, estando, atualmente, entre as cinco maiores empresas de saúde bucal do mercado nacional (TERRA, 2019).

O controle de qualidade de uma indústria tem como prioridade garantir a segurança e a eficácia do produto, para então, chegar ao consumidor. É neste setor que é verificado se os produtos obedecem às especificações e os padrões de qualidade, através de análises e certificações, fazendo-se, assim, necessária a definição de métodos analíticos confiáveis (KESIC, 2009).

Diante do exposto, a validação de métodos analíticos é de grande importância na garantia da qualidade, pois, assegura a confiabilidade de seus resultados. Os métodos são avaliados segundo alguns parâmetros estabelecidos, tais como especificidade e seletividade, linearidade, precisão e exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Para tanto, faz-se necessário planejamento de todo o processo de validação, com definição clara do objetivo a ser alcançado.

O digluconato de clorexidina, normalmente chamado de clorexidina, possui função antimicrobiana e vem sendo cada vez mais utilizado nas indústrias farmacêutica e cosmética devido à sua eficiência na assepsia de feridas. Por este motivo, este princípio ativo está presente no enxaguatório bucal produzido pela DentalClean, fazendo-se necessária a utilização de um método analítico validado para a sua quantificação e certificação de qualidade e segurança aos consumidores.

Desta forma, este trabalho teve os objetivos de desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação de digluconato de clorexidina presente nos enxaguatórios bucal da marca DentalClean.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DentalClean

Em janeiro de 2004, a sede da empresa DentalClean foi instalada na cidade de Londrina, porém, a mesma já atuava com o nome de Rabbit desde 1994. Iniciou-se a aquisição de máquinas e matérias-primas de alta qualidade, além da ampliação de sua força de trabalho, sendo possível crescer e atender seus clientes com uma grande variedade de produtos e agilidade na sua distribuição. (DENTALCLEAN, 2001).

A empresa está entre as cinco maiores empresas de saúde bucal do mercado nacional, oferecendo em sua linha produtos, escovas de dentes, fio dental, limpador de língua, géis dentais, antissépticos bucais, entre outros. Além disso, almeja ampliar seu portfólio para a produção de shampoos e condicionadores infantis, os quais estão em fase de testes (DENTALCLEAN, 2001; TERRA, 2019).

A missão e visão da empresa é priorizar a qualidade e o design dos produtos com preços competitivos e ampliação da participação no mercado nacional, atendendo as necessidades e expectativas dos clientes e ao mesmo tempo, garantindo lucros para novos investimentos, como pesquisas, tecnologia e melhoria fabril. Os valores da empresa são o comprometimento, o respeito ao ser humano, a lealdade e a eficácia (DENTALCLEAN, 2001).

2.2 Digluconato de clorexidina em enxaguatório bucal

A clorexidina é um composto sintético derivado da bis-biguanida sendo um dos medicamentos mais usados na assepsia de feridas de pequenas extensões, por não provocar ardor, de fácil aplicação e por ser um antisséptico eficiente. Devido ao seu alto poder antimicrobiano, a clorexidina e seus sais são utilizados em várias áreas do seguimento da saúde (SWEETMAN, 2007; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2012). Pode ser chamada de gluconato ou digluconato de clorexidina e pode ser encontrada sob a forma de soluções aquosas e à base de álcool, gel e pó (BAILEY, 2011).

Desde 1950, a clorexidina é utilizada para desinfecções de mãos e feridas, limpeza da pele e mucosas antes de cirurgias e outros procedimentos de contato em

hospitais, já que seu uso no banho pré-operatório é uma estratégia vantajosa e econômica para prevenção de infecção (BAILEY, 2011).

A ação da clorexidina é utilizada em protocolos de diversos campos da medicina principalmente pela baixa toxicidade, baixo custo, fácil acesso e ampla ação, podendo também ser incorporada em produtos cosméticos (LAHMITI, 2009; CARRILHO, 2010). Possui ação bacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, estudos relatam sua eficácia contra o *Streptococcus Mutans*, agente iniciador da cárie dentária (ALMEIDA, 2001; HORTENSE, 2010). O seu mecanismo de ação antibacteriano é explicado pelo fato da molécula catiônica da clorexidina ser atraída pela carga negativa da superfície bacteriana e, assim, ser adsorvida à membrana celular pelas interações eletrostáticas, sendo ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio. Em dosagens elevadas, a clorexidina, causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana, ou seja, ação bactericida. Já em doses baixas, a integridade da membrana celular é alterada e com isso, ocorre um extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular, tendo uma função de bacteriostático, inibindo o crescimento das bactérias. (HJELJORD et al, 1973; HUGO e LONGWORTH, 1964; RÖLLA e MELSEN, 1975).

Devido à sua grande afinidade com a membrana celular das células da mucosa oral, a clorexidina se adere facilmente à superfície dental e à mucosa bucal, sendo liberada aos poucos durante um período de 24 horas, tendo assim, ação bacteriostática (HERRERA, 2007).

A quantidade de clorexidina utilizada de maneira geral é bastante ampla, sendo utilizada em frações mássicas entre 0,12 e 2,0%. (QUIRYNEN et al., 2001; VASCONCELOS, 2001; BAMBACE et al., 2003; SOUTHERN et al., 2006). Porém, para a Odontologia, sendo a solução para enxaguante bucal a 0,12% a mais utilizada por ter efetividade e menores efeitos adversos. (HORTENSE et al., 2010). Devido a isso, considera-se com especificações cumpridas, quando o resultado está mais próximo possível de 0,12%.

2.3 Validação de método para determinação do teor de digluconato de clorexidina em enxaguatório bucal

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação denominado validação, que é capaz de estimar sua eficácia na rotina do laboratório. (BRITO, 2003).

A validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito, proporcionando alto grau de confiabilidade. Para isto, são analisados alguns parâmetros. (BRASIL, 2021).

- Seletividade: 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.

- Avaliação do efeito matriz: A ausência do efeito matriz garante que componentes presentes na amostra não irão intervir na quantificação do analito.

- Precisão por repetibilidade: Avaliação da proximidade dos resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado.

- Exatidão: Corresponde à proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor real.

- Limite de Detecção: Menor quantidade que pode ser detectada 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.

Busca-se tais critérios estabelecidos pela Anvisa, para que o método estudado seja validado, garantindo segurança ao cliente, na aquisição de um produto de qualidade, visto que a partir do momento que o método é seletivo, linear, preciso e exato, é aprovado pela legislação e o produto se encontra seguro para utilização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada neste trabalho foi baseada em um POP, Procedimento Operacional Padrão (Standard Operating Procedure), elaborado, analisado e aprovado pelo setor de qualidade da empresa DentalClean.

O POP consiste em um roteiro detalhado de todas as operações necessárias para a realização de uma tarefa, e tem como finalidade dentro de qualquer processo funcional, garantir tanto a execução segura e padronizada dos procedimentos das referente atividades, quanto obtenção dos resultados esperados (COLENGHI, 2007).

3.1 Reagentes e Soluções

A clorexidina é recebida em forma líquida de concentração de 20% para o processo de produção em larga escala. Para esta metodologia foi coletada uma pequena quantidade da mesma e guardada em frasco âmbar identificado. Para os testes, foram utilizados dois reagentes, sendo eles, a solução indicadora de violeta cristal e o ácido perclórico 0,1 N em ácido acético, ambos feitos no laboratório da empresa, exclusivamente para a realização das titulações. Além destes, preparou-se o enxaguatório bucal com formulação própria da empresa sem adição de clorexidina, chamado de “Branco” e com adição de clorexidina, chamado de “Amostra”.

3.1.1 Solução indicadora de Violeta Cristal

Em um béquer de 250 mL, adicionou-se 0,1 g de violeta cristal e 100 mL de ácido acético, homogeneizou-se em um agitador magnético e transferiu-se a solução para um frasco âmbar identificado. A solução preparada tem uma validade de 90 dias e deve ser armazenada em temperatura ambiente.

3.1.2 Solução de ácido perclórico em ácido acético

Em um balão volumétrico de 500 mL, adicionou-se 50 mL de solução de ácido perclórico 0,1 N e completou-se o volume para 500 mL com ácido acético. Após

homogeneizado, transferiu-se para um frasco âmbar identificado. A solução preparada tem validade de 90 dias e deve ser armazenada em temperatura ambiente.

3.1.3 Branco e Amostra

A validação da metodologia analítica foi realizada com o digluconato de clorexidina aprovado em todos os testes de controle de qualidade para matéria-prima. Também foi utilizado para cálculos e testes um enxaguatório sem adição de clorexidina, chamado de branco.

Preparou-se 2 litros do enxaguatório branco, contendo todos os componentes da fórmula de Enxaguatório Bucal de Clorexidina, exceto o digluconato de clorexidina. Para o preparo das amostras, foram adicionadas diferentes quantidades de digluconato de clorexidina ao branco, preparando-se, assim, amostras com diferentes concentrações de digluconato de clorexidina.

3.3 Procedimento analítico para determinação de digluconato de clorexidina

Transferiu-se 10 g da amostra, utilizando-se uma balança analítica na pesagem com variação de 0,0001 gramas, para um erlenmeyer de 125 mL, ao qual foi levado à estufa a 72 °C até massa constante, aproximadamente por 24 horas, onde evaporou-se a quantidade de água, restando na parte inferior do Erlenmeyer, apenas a clorexidina e demais materiais não voláteis na fórmula. Após a retirada e o resfriamento em um dessecador, foram adicionados 30 mL de ácido acético glacial, homogeneizado em um ultrassom e adicionadas 6 gotas da solução indicadora de violeta cristal. Em seguida, foi realizada a titulação da preparação com ácido perclórico 0,1 N em ácido acético até a viragem de violeta para verde claro. Realizou-se o mesmo procedimento, desde a pesagem até a titulação, com o branco, resultando em uma cor também verde claro.

Com os valores das massas antes da secagem da amostra e do branco juntamente com os volumes da titulação de ambos, foram realizados os cálculos descritos nas Equações de 1 a 3, seguindo o procedimento de qualidade da empresa. A partir dos cálculos encontra-se a quantidade de digluconato de clorexidina presente em cada grama da amostra, buscando-se um valor de 0,12%, como exigido nas

especificações. Além disso, sabe-se que 1 mL de ácido perclórico equivale a 22,44 mg de gluconato de clorexidina 1%, sendo o valor de 22,44 utilizado na Equações 1 e 2.

$$Branco = \frac{22,44 V1}{M1} \quad (1)$$

$$Amostra = \frac{22,44 V2}{M2} \quad (2)$$

$$\%Digluconato\ de\ clorexidina = \frac{(Amostra - Branco)}{100} \quad (3)$$

Onde:

V1: Volume do titulante utilizado para viragem do branco (mL);

M1: Massa da amostra do branco antes da secagem (g);

V2: Volume do titulante utilizado para viragem da amostra (mL);

M2: Massa da amostra de enxague antes da secagem (g);

3.4 Parâmetros de Validação

Para comprovar, por meio de planos experimentais, que o método analítico apresentado é capaz de determinar a quantidade de clorexidina, de forma precisa no antisséptico bucal, foi realizado a sua validação de acordo com os testes descritos nos itens de 3.4.1 a 3.4.7.

3.4.1 Seletividade

Em béqueres de 250 mL, adicionou-se 1,28 g de clorexidina e, em seguida, completou-se com a solução de branco até a massa de 200g, homogeneizou em um

agitador magnético e foi feita a secagem na estufa, como foi descrito no tópico 3.3. Todo método foi preparado em triplicada, resultando em amostras de frações mássicas de clorexidina iguais a 0,12%. Na etapa da titulação, além do preparado, titulou-se o diluente ácido acético, para efeito de comparação.

3.4.2 Linearidade

As soluções utilizadas para avaliação da linearidade foram preparadas em triplicata de maneira independentes. Em béqueres de 250 mL, adicionou-se adicionados 0,96 g, 1,06 g, 1,28 g, 1,49 g, 1,60 g de clorexidina e, em seguida, completou-se com a solução de branco até a massa de 200g, resultando em amostras de frações mássicas de clorexidina iguais a 0,09%, 0,11%, 0,12%, 0,14%, 0,15% respectivamente. Realizou-se o procedimento descrito no tópico 3.3 para cada amostra preparada para determinação da porcentagem de clorexidina.

3.4.3 Avaliação do efeito matriz

Este procedimento foi dividido em duas etapas. Primeiramente, repetiu-se o procedimento descrito no tópico 3.4.2, sendo os primeiros dados coletados. Para a segunda etapa de dados a serem coletados, em béqueres de 250 mL, adicionou-se adicionados 0,96 g, 1,06 g, 1,28 g, 1,49 g, 1,60 g de clorexidina e, em seguida, completou-se com a solução de branco até a massa de 200g, resultando em amostras de frações mássicas de clorexidina iguais a 0,09%, 0,11%, 0,12%, 0,14%, 0,15% respectivamente. Prosseguiu-se com o procedimento completo descrito no tópico 3.3, sendo obtidos dados de porcentagem de clorexidina, tanto da amostra matriz, quanto da água deionizada.

3.4.4 Precisão por repetibilidade

Foram utilizadas 6 amostras de antisséptico bucal (0,12% de clorexidina), individualmente preparadas, as quais foram avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.

Para cada amostra, foi determinado o teor de clorexidina de acordo com o descrito no tópico 3.3.

Com os resultados, foi calculado o desvio padrão relativo por meio da Equação 4.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) 100 \quad (4)$$

Onde:

DPR: Desvio padrão relativo (%).

DP: Desvio Padrão, sendo este, calculado pela função “DESVPAD” do *software* Excel®, a partir dos dados coletados.

CMD: % de clorexidina.

3.4.5 Exatidão

Neste parâmetro, a análise é pelo método de adição do padrão, no qual adicionou-se quantidades de digluconato de clorexidina ao branco. Foram feitas 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 porcentagens: baixa, média e alta, sendo 0,09%, 0,12% e 0,15%, respectivamente, com 3 réplicas em cada nível. Todas foram preparadas de maneira independente.

Para cada amostra, foi determinado o teor de clorexidina de acordo com o descrito no tópico 3.3.

A exatidão foi expressa pela relação percentual de recuperação do analito de porcentagem conhecida adicionado à amostra, dada pela Equação 5.

$$RECUPERAÇÃO = \left(\frac{CME \times 100}{CE} \right) \quad (5)$$

Onde:

CME: % média experimental em cada amostra.

CE: % teórica desejada.

3.4.6 Limite de Detecção

Com os mesmos dados obtidos do tópico 3.4.2 de porcentagem de clorexidina, foi possível encontrar a determinação do limite de detecção. A partir dos mesmos, encontrou-se o desvio padrão de cada réplica, obtidos pela função “DESVPAD” do *software* Excel®, e plotou-se um gráfico comparativo entre valores da fração mássica da amostra experimental versus a esperada, a fim de obter o coeficiente angular da equação da reta com os valores da fração mássica experimental.

O limite de detecção (LD) foi calculado por meio da Equação 6.

$$LD = \frac{3,3 \Sigma DP}{IC} \quad (6)$$

Onde:

IC: Inclinação da curva de calibração, ou seja, o coeficiente angular da equação da reta dos valores experimentais (%).

DP: Desvio padrão.

3.4.7 Limite de Quantificação

A determinação do limite de quantificação (LQ) foi realizada utilizando os parâmetros da curva de calibração, considerando as particularidades do método analítico, seguindo os mesmos conceitos do tópico 3.4.6 e da Equação 7.

$$LQ = \frac{10 \Sigma DP}{IC} \quad (7)$$

Onde:

IC: Inclinação da curva de calibração, ou seja, o coeficiente angular da equação da reta dos valores experimentais (%).

DP: Desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a metodologia apresentada foi possível realizar os métodos de avaliação dos parâmetros analíticos e, a partir dos resultados obtidos, demonstrar que o método avaliado pode ser validado de acordo com a RE 899 de 2003 da Anvisa.

4.1 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz.

A Tabela 1 apresenta o resultado da seletividade do método para concentração do diluente e da amostra de digluconato de clorexidina após a titulação.

Tabela 1 - Resultado do volume em mL da titulação.

Amostra	Volume (mL)
Ácido acético glacial	0,0
Solução 0,12% Clorexidina	8,78

Analisando os resultados, verifica-se que se trata de um método seletivo, pois a solução diluente ácido acético glacial não interfere na solução, visto que não houve alteração no procedimento de titulação, atendendo os requisitos para aprovação, apresentados na RE 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método, sendo o volume do titulante diretamente proporcional à fração mássica da amostra.

A Figura 1 mostra o gráfico do volume gasto de titulante *versus* a porcentagem da amostra. Com isso, observa-se que a linearidade foi comprovada, visto que o valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, sendo esta, uma exigência da RE 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Na Figura 2 é possível verificar no gráfico dos resíduos da linearidade que os erros foram distribuídos aleatoriamente, sendo este, um requisito para a validação do método.

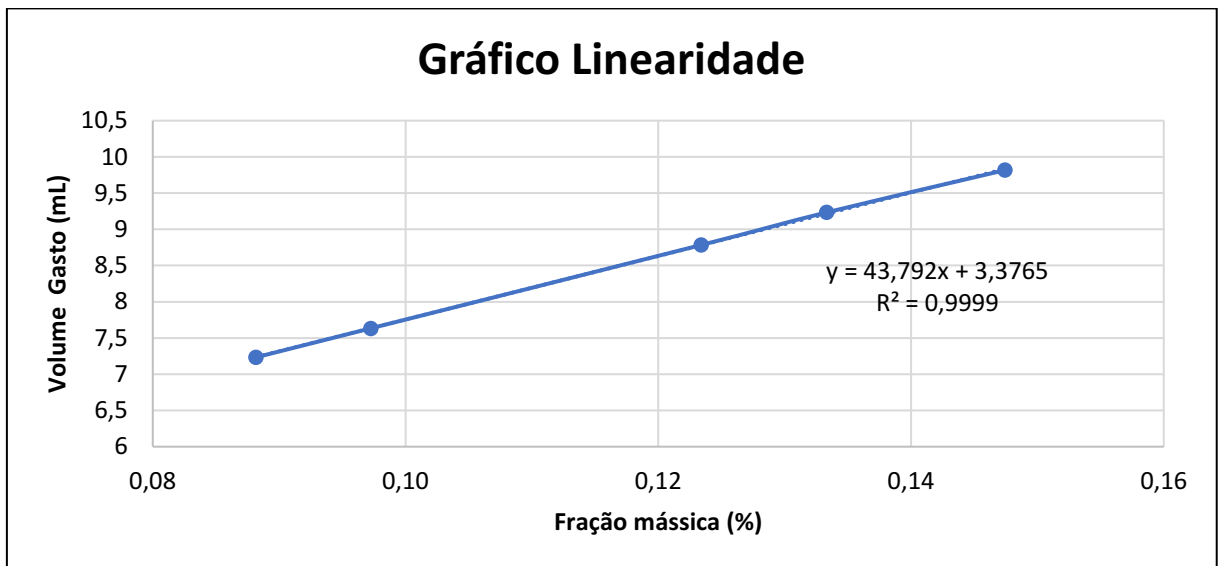


Figura 1 - Representação gráfica da curva analítica da fração mássica real versus volume gasto de titulante.

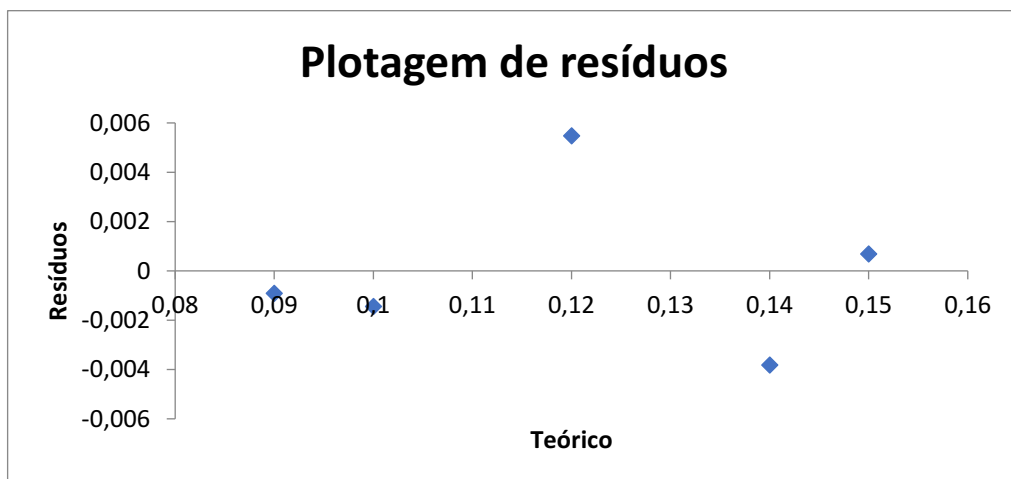


Figura 2 - Representação gráfica dos resíduos da linearidade.

4.3 Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz deve ser avaliado durante a validação para garantir que componentes presentes na amostra não irão intervir na quantificação do analito. Para comprovação da ausência do efeito matriz, é necessário demonstrar que as retas de concentração versus resposta analítica (curva de calibração) obtida com o padrão de referência (SQR) e da curva de calibração obtida com a solução amostra fortificada com soluções de padrões são paralelas. Existem algumas maneiras para avaliar se as inclinações não são estatisticamente diferentes. Para qualquer uma delas, é fundamental que os pressupostos estatísticos sejam atendidos e, se necessário, testados. Uma das maneiras possíveis de se avaliar o efeito matriz é o teste t. Porém antes da sua aplicação, é importante que as variâncias sejam comparadas por meio do teste F de Snedecor.

O teste t compara as inclinações das retas ajustadas segundo as equações presentes no Guia N° 10/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na qual parte-se dos valores da média dos resultados, desvio padrão e variância, calculando os valores de $T_{calculado}$ e $T_{crítico}$, sendo este último um valor tabelado de 2,306. Para o $T_{calculado}$ foi encontrado um valor de -3,774.

Ambos os testes foram feitos pelo *software* Excel®, utilizando-se uma planilha estatisticamente e já aprovada pela empresa, na qual apenas se insere os valores das titulações, e o software retorna se o procedimento foi aprovado ou reprovado.

Resultou-se em um $T_{calculado}$ menor que o $T_{crítico}$, sendo aprovado e considerando que não há efeito matriz significativo. Nesse caso, as retas podem ser consideradas paralelas.

O efeito matriz deve ser avaliado durante a validação para garantir que componentes presentes na amostra não interfiram na quantificação do analito. Concluindo-se então, que o mesmo está ausente, estando de acordo com a RE 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

A Figura 3 mostra a representação gráfica da fração mássica da amostra *versus* a fração mássica teórica para solução matriz (CME) e a fração mássica teórica para solução química de referência do analítico (CME SQR) em solvente (água deionizada).

Apesar do valor do coeficiente de determinação estar baixo, o *software* retornou que o procedimento foi aprovado, onde comprova que existe o paralelismo.

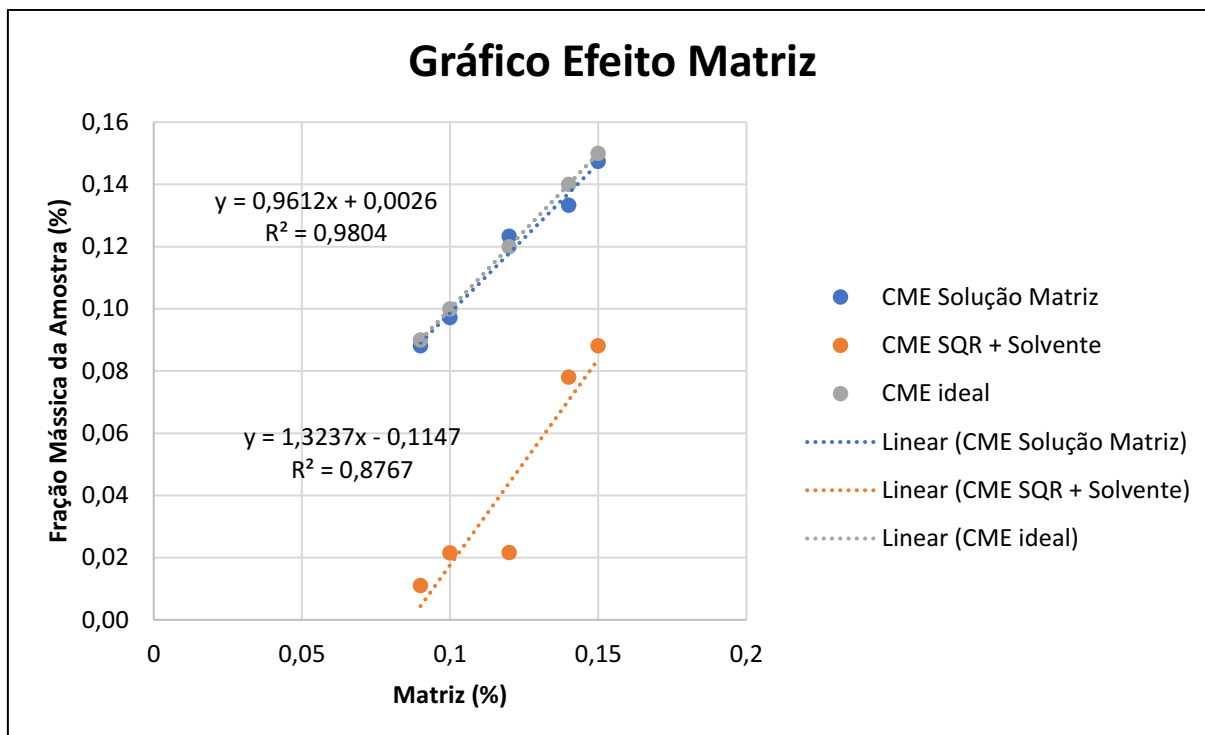


Figura 3 - Representação gráfica da fração mássica da amostra versus a fração mássica teórica para solução matriz (CME Solução Matriz) e a fração mássica teórica para solução química de referência do analítico (CME SQR) em solvente (água deionizada).

4.4 Precisão por repetibilidade

A partir de amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida, foi possível determinar a repetibilidade.

Na Tabela 2 encontra-se a média obtida pelos valores encontrados de porcentagem de digluconato de clorexidina, assim como o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

O parâmetro foi aprovado, visto que atingiu o critério determinado pela a RE 899 de 2003, atingindo um desvio padrão relativo inferior a 5,0%.

Tabela 2 - Resultados precisão por repetibilidade.

Média (%)	Desvio Padrão (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
-----------	-------------------	----------------------------

0,12343

0,00426

3,45496

4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método de estudo em relação ao valor teórico.

Para critério de aceitação, a recuperação média deve estar entre 70 a 150% do valor teórico (USP 37 – NF 33, 2015). Os resultados obtidos para o parâmetro avaliado foram satisfatórios nas três frações mássicas (0,09%, 0,12% e 0,15%).

Na Tabela 3 encontram-se os valores das concentrações teóricas e reais de cada amostra, assim como o resultado de recuperação. A exatidão obtida estaticamente apresentou resultado de aproximadamente 100%, mantendo-se dentro da faixa de aceitação.

Tabela 3 - Resultados de exatidão.

AMOSTRA	CME (%)	CE (%)	RECUPERAÇÃO (%)
M1	0,0886	0,09	98,44678
M2	0,12382	0,12	103,18758
M3	0,14786	0,15	98,5753
MÉDIA	-	-	100,06989

4.6 Limite de Detecção

O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A determinação do limite de detecção foi realizada utilizando os parâmetros de curva de calibração mostrada na Figura 4, considerando as particularidades do método analítico.

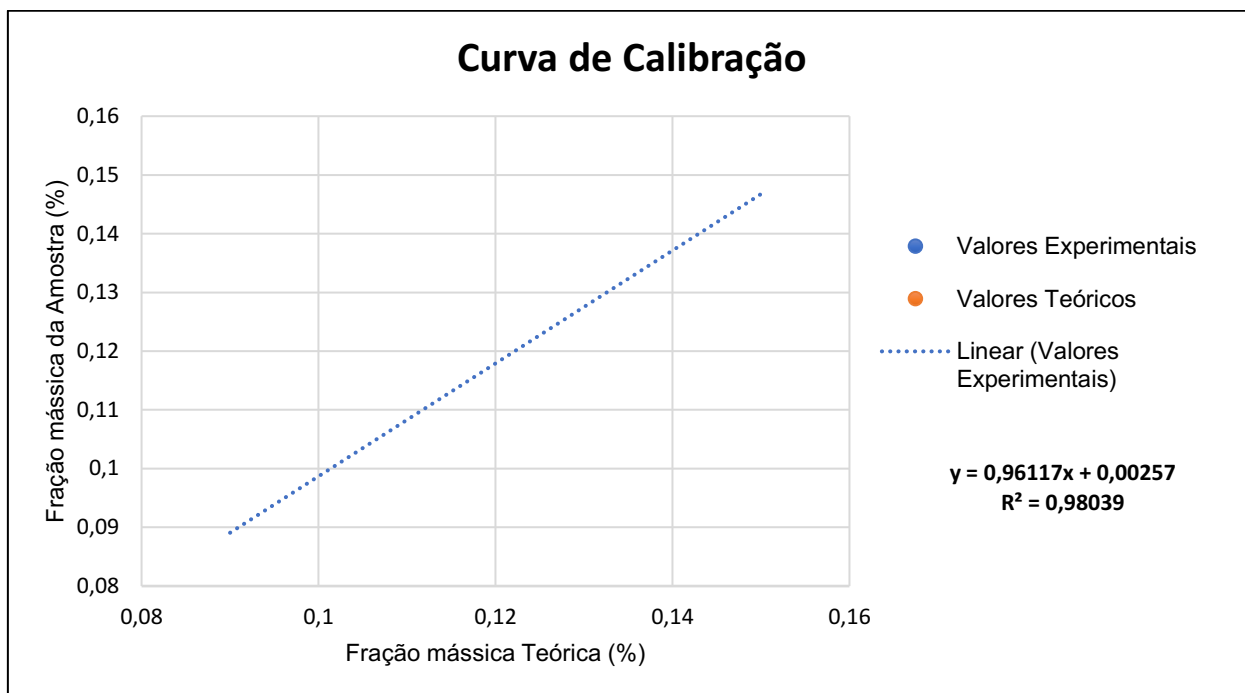


Figura 4 - Curva de calibração da fração mássica da amostra (%) versus a fração mássica teórica (%).

O resultado obtido para o limite de detecção a partir da Equação (6) foi de 0,006% para o ativo digluconato de clorexidina, onde o índice de inclinação foi encontrado pela equação da reta no valor de 0,96117 e desvio padrão de 0,00176 obtido pela função "DESVPA" no *software* Excel®. O valor encontrado demonstra a menor quantidade do analito presente em uma amostra.

4.7 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições estabelecidas. A determinação do limite de quantificação foi realizada utilizando os parâmetros da curva de calibração mostrado na Figura 4, considerando as particularidades do método analítico. O resultado obtido neste parâmetro, calculado a partir da Equação (7), foi de 0,018% para o ativo digluconato de clorexidina, onde o

índice de inclinação foi encontrado pela equação da reta no valor de 0,96117 e desvio padrão de 0,00176 obtido pela função “DESVPA” no *software* Excel®. O valor encontrado demonstra a maior quantidade do analito presente em uma amostra.

A partir dos resultados obtidos em todos parâmetros analisados, pode-se dizer que o método se mostrou eficaz e rápido. Os parâmetros investigados garantiram que o método é exato e preciso para determinação do teor de digluconato de clorexidina e, portanto, é considerado validado conforme a RE 899 de 2003 da Anvisa. Sendo um método que apresenta a confiabilidade e segurança necessárias, garantindo a qualidade do produto. Apresentando-se como uma alternativa de baixo custo para rotina de indústrias como a DentalClean, já que a partir de tal procedimento, o qual deve ser repetido uma vez a cada ano, não haverá necessidade da contratação de laboratórios terceirizados, pois, os testes poderão ser realizados dentro do laboratório de controle de qualidade da própria indústria, otimizando o tempo e reduzindo os custos para a empresa.

3 CONCLUSÃO

A conclusão deste trabalho permitiu realizar a validação do método analítico para a determinação do digluconato de clorexidina em enxaguatório bucal da empresa DentalClean. A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que o método avaliado está de acordo com a RE 899 de 2003 da Anvisa, demonstrando ser seletivo, linear, preciso e exato.

A validação da metodologia analítica traz benefícios para a empresa, tais como a otimização do tempo, sendo este um fator de grande relevância no setor produtivo, estando diretamente relacionado ao atendimento da demanda do mercado e com o faturamento da empresa. Além da redução de custos com a contratação de laboratórios terceirizados para a realização das análises, visto que, a partir do momento que a empresa possui uma metodologia comprovadamente eficaz, a mesma pode realizar as análises necessárias para os laudos técnicos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B. S.; BASTOS, J. R. M. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. RGO, v. 49, n. 3, p. 133-8, 2001.

Bailey RR, Stuckey DR, Norman BA, Duggan AP, Bacon KM, Connor DL, Lee I, Muder RR, Lee BY. Economic Value of Dispensing HomeBased Preoperative Chlorhexidine Bathing Cloths to Prevent Surgical Site Infection. Inf Cont Hosp Epidem. 32(5): 465–471, 2011.

BAMBACE, A. M. J. et al. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. Rev. Biociência, v.9, n.2, p.73-81, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 – Critérios para a validação de métodos analíticos. Disponível em: [ÍNDICE \(anvisa.gov.br\)](https://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 06 de agosto de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para a validação de métodos analíticos e bionalíticos. Disponível em: [ÍNDICE \(anvisa.gov.br\)](https://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 06 de agosto de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº10 de 2017 – Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Disponível em: [ÍNDICE \(anvisa.gov.br\)](https://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 06 de agosto de 2021.

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.

Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. Dent Mater 2010; 26:779–85.

COLENGHI, V.M. O & M e qualidade total: uma integração perfeita. 3. Ed . – Uberaba: ED.V.M – 2007.

DENTALCLEAN. Disponível em: <<https://dentalclean.com.br/empresa/>>. Acesso em: 14 de jun. de 2021.

DENTALCLEAN. Procedimento Operacional padrão (POP): Determinação do Teor de Digluconato de Clorexedina em Enxaguatório Bucal. 2019.

European Pharmacopoeia. 7º Ed. Stransbourg: Council of Europe; 2012. 481 p.

Gigante do mercado de saúde bucal cresce em cinco anos e pretende aumentar em 12 vezes a produção de géis dentais neste ano. **Terra**, 2019. Disponível em: <<https://www.terra.com.br/noticias/dino/gigante-do-mercado-de-saude-bucal-cresce-140-em-cinco-anos-e-pretende-aumentar-em-12-vezes-a-producao-de-geis-dentais-neste-ano,0c66e66ec4bf6073448e5579cf3e9e5616b4mk0m.html>>. Acesso em: 14 de jun. de 2021.

HERRERA, B. et al. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no Distrito de São Carlos do Jamari – RO. Revista de Periodontia, v.17, n.4, p.60-64, 2007.

Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. J Periodontal Res Suppl. 1973;12:11-6.

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo. v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010. Disponível em: http://www.cemoi.com.br/artigos_cientificos/OI_15.pdf.

Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J Pharm Pharmacol. 1964;16:655-62.

KESIC, Dragan. Strategic analysis of the world pharmaceutical industry. Management: Journal of Contemporary Management Issues, {s.l.}, v. 1, n. 14, p.59-76, jan. 2009.

Lahmiti S, El Fakiri K, Aboussad A. Antiseptics in neonatology: the inheritance of the past in the daylight. Arch Pediatr. 2010 Jan;17(1):91- 6. Epub 2009 Oct 7.

QUIRYNEN, M.; AVANTROODT, P.; PEETERS, W.; PAWELS, M.; LOUKE, W.; VAN STEENBERGHE, D. Efeito de diferentes formulas de elixires de clorexidina na placa bacteriana recém-formada. J. Clin. Periodontol., v. 28, p. 1127-1136, 2001.

Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res. 1975;54 Spec No B:B57-62.

SILVIA LFJS. Nova Associação de Digluconato de Clorexidina e Cloridrato de Lidocaína em Gel Urogenital. Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação. [dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009. 175 p.

SOUTHERN, E.N.; McCOMBS, G.B.; TOLLE, S.L.; MARINAK, K. The comparative effects of 0,12% chlorhexidine and herbal oral rinse on dental plaque-induced gingivitis. J. Dental Hygiene, v. 80, n. 1, p. 1-9, 2006.

Sweetman, Sean C. Martindale: the complete drug reference. 35° Ed. London: Pharmaceutical Press; 2007.p.1472-5.

USP 38 NF 33. Corporate Author: The United States Pharmacopeia. Published: United States: U.S. Pharmacopeial Convention, 2015.

VASCONCELOS, J. O uso da clorexidina na prática odontológica. J. Ass. Odontol., v. 27, p. 26-27, 2001.