

ISSN (*on-line*) 1984-2368

# Boletim do Instituto Adolfo Lutz

---

**Bol Inst Adolfo Lutz. 2021: ano 31, número único**





# Boletim do INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Bol Inst Adolfo Lutz. 2021: ano 31, número único

## **Diretor-Geral do Instituto Adolfo Lutz**

Dra. Adriana Bugno

## **Membros do Corpo Editorial**

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar

Laís Anversa Trevejo

Leonardo José Tadeu de Araújo

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Marisa Ailin Hong

Renato Pereira de Souza

Valéria Adriana Pereira Martins

## **Diagramação**

Márcia Liane Buzzo

## **Editoração**

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar

Márcia Liane Buzzo

## **Núcleo de Acervo do IAL**

Rocely A. Bueno Moita

ISSN (*on-line*) 1984-2368

---

## **Contato**

Avenida Dr. Arnaldo, 355

Cerqueira César – CEP 01246-902

E-mail: [bial@ial.sp.gov.br](mailto:bial@ial.sp.gov.br)

São Paulo, SP – Brasil

Telefone: (11) 3068-2867

Núcleo de Acervo

---

# Sumário

- 01** | Estudo para ampliação do prazo de armazenamento de materiais de laboratório esterilizados por calor seco
- 02** | Segurança no uso do Colilert® para avaliação microbiológica da qualidade da água tratada para diálise
- 03** | Determinação quantitativa do digluconato de clorexidina em formulações antissépticas de uso tópico e soluções bucais
- 04** | P-fenilenodiamina (PPD) em henna para uso em sobrancelhas

---

# Estudo para ampliação do prazo de armazenamento de materiais de laboratório esterilizados por calor seco

---

Kátia Cristina da Silva RODRIGUES<sup>1</sup>, Janaína Antonio De VECCHI<sup>1</sup>, Carmen Lúcia Aparecida MACHADO<sup>1</sup>, Aurélio da ROCHA<sup>1</sup>, Ellen Gameiro HILINSKI<sup>1</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz

<sup>2</sup>Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz

---

**I**ndependentemente do tipo de amostra a ser analisada quanto à sua característica microbiológica, é imprescindível que o preparo do material laboratorial de suporte atenda aos requisitos necessários para a confiabilidade dos resultados analíticos gerados. Desta forma, todos os utensílios, vidrarias e outros materiais que sejam empregados no manuseio das amostras ou para a condução das diferentes etapas dos ensaios analíticos devem ser adequadamente limpos e esterilizados.

Esterilidade é a ausência de micro-organismos viáveis e esta condição para um determinado lote de produção é definida em termos probabilísticos por meio de um processo de produção adequadamente validado. Esta probabilidade de sobrevivência está associada à carga microbiana, tipo e resistência dos micro-organismos presentes, bem como pelas condições de tempo e temperatura empregadas no processo de esterilização<sup>1</sup>.

A evolução do conhecimento técnico-científico levou ao desenvolvimento de diversas técnicas de esterilização baseadas em meios físicos, as quais incluem o calor (seco e úmido), a filtração e a radiação; físico-químicos, tais como os processos que utilizam principalmente óxido de etileno, ácido peracético, entre outros<sup>1,2</sup>.

Há diversos métodos de esterilização descritos em literatura<sup>2,3</sup>, amplamente empregados no preparo de materiais de suporte às análises laboratoriais, cabendo ao profissional selecionar o método mais adequado para cada tipo de material a ser processado, de acordo com as respectivas características de resistência térmica. O tratamento térmico é uma das formas mais empregadas em processos de esterilização, sendo o calor seco um dos processos esterilizantes mais utilizados na indústria farmacêutica, podendo ser realizados em estufas ou túneis, com aplicações de temperaturas superiores a 300 °C para os túneis<sup>2</sup>. A garantia de qualquer processo de esterilização está associada à validação deste processo, envolvendo a qualificação de instalação do equipamento de esterilização, qualificação de operação (capacidade do equipamento em realizar o processo de esterilização no intervalo definido) e qualificação de desempenho (demonstração de que o equipamento opera em conformidade aos requisitos pré-estabelecidos e que o processo de esterilização atinge os objetivos)<sup>1</sup>. Os estudos de estabilidade e uniformidade térmica de equipamentos e de instrumentos de medição são itens básicos para determinar a exatidão de medição e, portanto, garantir a confiabilidade dos resultados laboratoriais. Esta exigência está prevista no

item 6.4 da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025 – Equipamentos e no Anexo B do documento Orientação para a calibração de câmaras térmicas sem carga<sup>4,5</sup>.

Por sua vez, a manutenção da condição de esterilidade está estreitamente relacionada à forma de acondicionamento dos materiais esterilizados após o processo de esterilização, bem como ao prazo de validade deste processo. Este estudo teve por objetivo avaliar por quanto tempo o material esterilizado por calor seco no Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança permanece na condição de esterilidade, permitindo, assim, sua utilização na rotina laboratorial pelo tempo definido. O prazo de validade de processo de esterilização atual prevê a utilização destes tipos de materiais por até 30 dias.

Para este estudo foram selecionados os seguintes materiais: pipetas de vidro graduadas, tubos de ensaio de 10 mm de diâmetro, balões volumétricos, pinças, tesouras e espátulas de metal para comporem os lotes de materiais a serem esterilizados.

O procedimento de esterilização do material selecionado foi realizado em estufa de esterilização qualificada. Esta qualificação do equipamento consistiu na determinação dos parâmetros de uniformidade e distribuição térmica, estabilidade térmica e desvio da temperatura de controle. Os procedimentos para o estudo de qualificação operacional do equipamento em questão, os quais envolveram a avaliação dos processos de operação do equipamento com e sem carga demonstraram que, por manter-se dentro da faixa de variação de  $\pm 5$  °C, este foi considerado aprovado para o uso pretendido.

Os materiais selecionados foram preparados de acordo com procedimentos adotados pelo laboratório, preconizados em compêndio farmacopeico<sup>1</sup>, sendo após os procedimentos de lavagem e secagem, embalados como descrito a seguir: as pipetas de vidro graduadas foram acondicionadas em estojos metálicos apropriados para processos de esterilização por calor seco; os tubos de ensaio e os balões volumétricos foram tamponados com papel alumínio e as pinças, tesouras e espátula de metal foram envolvidas em papel Kraft.

Os materiais, após o preparo, foram submetidos ao processo de esterilização por

calor seco a  $180 \pm 5$  °C durante 60 minutos, em consonância com o compêndio farmacopeico<sup>1</sup>. Foram preparados três lotes com os materiais descritos e os mesmos foram submetidos a três ciclos independentes de esterilização, em dias distintos. Após o procedimento de esterilização, os materiais foram acondicionados em armários fechados, próprios para armazenamento de materiais esterilizados, sob condições controladas de luz e umidade.

Os três lotes de materiais esterilizados foram avaliados quanto à presença de contaminantes microbianos nos seguintes intervalos de tempo: T0 (imediatamente após o processo de esterilização); T1 (30 dias após a data de esterilização); T2 (60 dias após a data da esterilização) e T3 (90 dias após a data da esterilização), ou seja, os materiais ficaram armazenados, nas condições descritas, até 90 dias após o procedimento de esterilização a que foram submetidos.

Para a avaliação da presença de contaminantes microbianos no material armazenado foram executados 144 ensaios de esterilidade bacteriana e fúngica, conforme as diretrizes contidas em compêndio farmacopeico<sup>1</sup>. Para cada tempo de armazenamento estabelecido, foram avaliadas, por lote de esterilização, quatro unidades de pipetas de vidro graduadas, quatro unidades de tubos de 10 mm, duas unidades de balões volumétricos e duas unidades de pinças de metal, não tendo sido evidenciado crescimento microbiano em nenhum dos ensaios de esterilidade bacteriana e fúngica realizados nos materiais ensaiados.

Diante dos resultados pode-se afirmar a condição de esterilidade dos materiais que ficaram armazenados pelo tempo proposto de 90 dias, pois não foi evidenciada a presença de crescimento microbiano. Estes resultados permitem concluir que as condições envolvendo desde o preparo do material, o processo de esterilização e o armazenamento têm as características necessárias para a obtenção de material laboratorial de suporte adequado para a utilização na rotina de análise do Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança. Acrescenta-se, ainda, que o aumento do tempo de guarda do material pelo período acima proposto colabora para a redução de custos no que se refere à menos utilização de equipamentos em

temperaturas elevadas, pois há redução de consumo de energia elétrica pelo laboratório despendido neste tipo de atividade.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 2019. 6ª ed. v.1. [acesso 2021 Abr 16]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Volume+I+Pronto.pdf/4ff0dfe8-8a1d-46b9-84f7-7fa9673e1ee1>

2. Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto A. Controle biológico da qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 4ª ed. São Paulo: Manole; 2015.

3. Pelczar MJ, Reid RD, Chan ECS. Microbiologia. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1981.

4. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2017. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

5. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação – CGCRE. Orientação para a calibração de câmaras térmicas sem carga. DOQ-CGCRE-028, 1ª revisão. [acesso 2021 Abr 23]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-28\\_01.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-28_01.pdf)

---

# Segurança no uso do Colilert<sup>®</sup> para avaliação microbiológica da qualidade da água tratada para diálise

---

Fernando Pontes de Lima e SILVA<sup>1</sup>, Maricélia Navarro Pinheiro FLORES<sup>2</sup>, Ellen Gameiro HILINSKI<sup>1</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança – Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

<sup>2</sup>Núcleo de Ciências Biomédicas – Centro de Laboratório Regional X – Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto

<sup>3</sup>Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

---

A presença de coliformes totais é um dos parâmetros exigidos para a avaliação da qualidade microbiológica da água tratada para diálise, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada N<sup>o</sup> 11/2014<sup>1</sup>. De acordo com o Quadro II, mencionado em seu Artigo 49, a água tratada pelo Sistema de Tratamento e Distribuição de Água para Hemodiálise deve apresentar ausência de coliformes totais em 10 mL como parte integrante do padrão de qualidade ideal para a sua aplicação nos serviços de diálise<sup>1</sup>.

Para esta avaliação, emprega-se metodologia qualitativa, baseada na pesquisa de um organismo indicador e sua respectiva população, onde os resultados são expressos em termos de presença ou ausência de crescimento.

Uma das metodologias utilizadas para a comprovação da presença ou ausência de coliformes totais baseia-se na utilização de substratos cromogênicos, a qual detecta a existência de enzimas específicas na identificação de micro-organismos. Desta forma, meios de cultura líquidos contendo substratos cromogênicos são empregados para, de acordo com as atividades enzimáticas específicas para a detecção e diferenciação de micro-organismos, selecionar o micro-organismo alvo por meio da alteração de coloração da solução amostra

desencadeada pela metabolização dos indicadores presentes na composição do meio.

O substrato enzimático Colilert<sup>®</sup>, cuja utilização é preconizada por compêndio oficial<sup>3</sup>, utiliza a metodologia do substrato definido para a detecção simultânea de coliformes totais e de *Escherichia coli*, com redução de 50 % do tempo de resposta frente à metodologia convencional. Os dois indicadores nutrientes, orto-nitro-fenil beta-d-galactopiranosídeo (ONPG) e metilumbeliferil-beta-d-glicuronídeo (MUG), são as principais fontes de carbono presentes no Colilert<sup>®</sup> e podem ser metabolizados pela enzima  $\beta$ -glucuronidase presente nas espécies de *E. coli*. A medida que os coliformes totais desenvolvem-se no Colilert<sup>®</sup>, o ONPG presente no substrato é metabolizado pela  $\beta$ -galactosidase, resultando na alteração da coloração da solução amostra de incolor para amarela<sup>2,3</sup>.

Como evidência de apropriada gestão do sistema da qualidade, os laboratórios devem atender aos requisitos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025/2017<sup>4</sup> para a seleção e desenvolvimento de métodos de ensaios, utilização de métodos não normalizados, bem como para a validação de métodos, a fim de garantir que os métodos de ensaio empregados conduzam à obtenção de resultados confiáveis e

adequados à qualidade pretendida. A implantação e utilização de métodos normalizados pelos laboratórios necessitam ser acompanhadas pela realização do estudo de verificação e neste caso, o laboratório deve demonstrar através de estudos experimentais que o método atende às exigências das aplicações analíticas e que possui, portanto, condições de executá-lo de maneira adequada dentro das condições específicas existentes em suas instalações<sup>5</sup>.

A utilização de métodos de ensaios normalizados para enumeração e detecção de micro-organismos em matrizes como alimentos, águas, cosméticos, saneantes, medicamentos e fármacos constitui importante ferramenta para determinação da qualidade microbiológica dos produtos sujeitos à regulação sanitária, sendo a confiabilidade dos resultados analíticos por eles obtidos assegurada através da avaliação do desempenho da metodologia utilizada, dentre outros procedimentos implantados para a garantia da qualidade. Para os métodos qualitativos, os parâmetros avaliados são especificidade, sensibilidade, precisão, taxa de falso-positivo e taxa de falso-negativo<sup>6</sup>.

Com o objetivo de realizar a verificação do método compendial preconizado por APHA (2017)<sup>3</sup> para avaliação de amostras de água através do método do substrato cromogênico, os experimentos foram executados utilizando-se os micro-organismos “alvos”: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, representantes do grupo dos coliformes bem como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, considerado neste estudo, como micro-organismo “não alvo”. Foram empregadas suspensões de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* que correspondessem a uma variação entre 1 e 3 UFC/ $\mu$ L e suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* que contivesse aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  UFC/100  $\mu$ L. Foram avaliados os parâmetros especificidade, robustez, precisão intermediária e limite de detecção.

A especificidade representa a capacidade do método em promover uma resposta positiva em meio aos diferentes micro-organismos que podem estar presentes em uma amostra. Em se tratando de métodos microbiológicos seletivos, a demonstração da especificidade também envolve o desafio com

micro-organismos que não são de interesse para o método sob avaliação, e que devem resultar na obtenção de resultados negativos. Foram realizados 40 experimentos conduzidos por dois diferentes analistas, para comprovar a ausência de interferência entre o substrato enzimático, os micro-organismos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e a matriz água purificada estéril, demonstrada pela presença de coloração amarela (para coliformes totais, representado pela *Klebsiella pneumoniae* – 12 replicatas); presença de coloração amarela e de fluorescência azul para a pesquisa de coliformes termotolerantes, representado pela *Escherichia coli* (12 replicatas) e a ausência de coloração no frasco contendo o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* (04 replicatas), bem como nos frascos contendo somente água purificada (04 replicatas). As replicatas que continham a mistura dos micro-organismos alvos e não alvo demonstraram: presença de coloração amarela e fluorescência azul no frasco contendo a mistura dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (04 replicatas) e presença de coloração amarela e ausência de fluorescência nos frascos contendo *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (04 replicatas). Pode-se afirmar que, no presente estudo os comportamentos observados demonstraram que o substrato enzimático foi capaz de promover o crescimento dos micro-organismos alvos, mesmo em misturas com possíveis interferentes. Adicionalmente, nenhuma das réplicas ensaiadas para a matriz água resultou em alteração de coloração, evidenciando a especificidade em não promover resultados falsos positivos após o período de incubação.

Os resultados de precisão, obtidos a partir das 24 replicatas ensaiadas para os micro-organismos alvos *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, permitiram concluir que não foram obtidos resultados falso-negativos, visto que foi observada a presença de coloração amarela para ambos os micro-organismos considerados, além da fluorescência azul para a *Escherichia coli*. Foi evidenciada detecção positiva para os micro-organismos alvos presentes em mistura de suspensões microbianas contendo níveis elevados de *Pseudomonas aeruginosa*. Para

avaliação do parâmetro robustez, foram empregadas duas estufas bacteriológicas para incubação dos frascos inoculados com os diferentes micro-organismos bem como para os frascos contendo apenas a água purificada em contato com o substrato enzimático. Caracterizada pelo grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos no teste por análise da mesma amostra com variações das condições normais de ensaio tais como instrumentos, lotes de reagentes e laboratórios, a robustez possibilita estabelecer a viabilidade da técnica face às variações deliberadas nos parâmetros operacionais. Foram executados 40 experimentos em dias distintos, considerando três analistas e dois equipamentos para incubação das amostras ensaiadas, não sendo evidenciada discordância entre os resultados analíticos obtidos. Desta forma, pode-se afirmar que o método avaliado não sofreu interferência estatisticamente significativa frente às condições de robustez avaliadas.

Por fim, o limite de detecção é o menor número de micro-organismos em uma amostra que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas. Para a determinação do limite de detecção do método, optou-se por preparar suspensões dos micro-organismos alvos próximas ao proposto pelo fabricante do substrato avaliado (1 UFC/100 mL). Experimentos laboratoriais indicaram que foi possível a preparação de suspensão dos micro-organismos alvos entre 1 e 3 UFC/ $\mu$ L. Desta forma, todos os experimentos foram conduzidos com suspensões dentro desta ordem de grandeza.

Os 32 experimentos realizados foram capazes de detectar a presença dos micro-organismos alvos, estando estes em mistura de suspensões microbianas ou puros. Ainda, quando em mistura com micro-organismo não alvo, mesmo em altas concentrações, foi possível evidenciar o bom desempenho do substrato avaliado. Assim, todos os frascos adicionados do micro-organismo *Klebsiella pneumoniae* demonstraram presença de coloração amarela, além de fluorescência azul, quando adicionados de suspensão individual de *Escherichia coli*, dentro da faixa de obtenção de micro-organismos entre 1 e 3 UFC/100 mL. Visto que o limite de detecção é caracterizado pelo menor número de micro-organismos em

uma amostra que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas, o limite de detecção do método foi definido como 3 UFC/100 mL.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método de substrato enzimático, apresenta as características necessárias para a obtenção de resultados analíticos com a qualidade e a confiabilidade exigidas, sendo considerado adequado para o uso na rotina do Núcleo de Ensaio Biológicos e de Segurança para a avaliação da presença/ausência de coliformes totais em amostras de água tratada.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1 (50):40-2. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867923/%284%29RDC\\_11\\_2014\\_COMP.pdf/beaf0fc13-a2d9-42d0-892b-60e0390c16e3](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867923/%284%29RDC_11_2014_COMP.pdf/beaf0fc13-a2d9-42d0-892b-60e0390c16e3)
2. Bula do substrato enzimático “Kit de análise Colilert”, IDEXX Laboratories, Inc., One Drive, Westbrook, Maine 04092, USA. [acesso 2021 Mar 10]. Disponível em <https://www.idexx.com.br/files/colilert-procedure-en.pdf>
3. American Public Health Association – APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23<sup>rd</sup> edition. Washington, DC, 2017.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT, 3<sup>a</sup> ed., 32 p; 2017.
5. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) – Coordenação Geral de Acreditação (CCGRE). Orientação sobre validação de métodos

analíticos. DOQ-CGCGRE-008, 9ª revisão, 30 p; 2020. [acesso 2021 Mar 10]. Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?torganismo=calibensaios](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios).

6. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) – Coordenação Geral de

Acreditação (CCGRE). Orientação sobre avaliação de desempenho de métodos analíticos – microbiologia. DOQ-CGCGRE-089, 12 p; 2017. [acesso 2021 Mar 10]. Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?torganismo=calibensaios](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios).

---

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

---

Marcos Paulo GUILHERME<sup>1</sup>, Bruno Martins de CARVALHO<sup>2</sup>, Helena Miyoco YANO<sup>1</sup>, Luiz Fernando Ortiz GASPARI<sup>1</sup>, Valéria Adriana Pereira MARTINS<sup>1</sup>, Luz Marina TRUJILLO<sup>1</sup>, Edilene Afonso VIEIRA<sup>1</sup>, Fernanda Fernandes FARIAS<sup>1</sup>, Maria Cristina SANTA BÁRBARA<sup>2</sup>

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

---

A solução com digluconato de clorexidina é um medicamento antisséptico de uso tópico, utilizada na assepsia de feridas de pequenas extensões, por não provocar ardor, ser de fácil aplicação e baixo risco<sup>1</sup>. Está regulamentada pela RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) nº 107, de 05/09/2016<sup>2</sup>. Os fabricantes devidamente autorizados podem comercializar o medicamento obedecendo a alguns critérios: solução aquosa ou alcoólica com concentrações de 0,5 a 1,0 % e soluções com tensoativos até 4 % de clorexidina, com a advertência da não utilização em pessoas com sensibilidade<sup>2</sup>. As soluções tópicas regularizadas como produtos cosméticos não podem ultrapassar 0,3 % deste ativo<sup>3</sup>.

Em virtude da pandemia da COVID-19, foi publicada a Resolução RDC nº 350, de 19/03/2020, permitindo o uso de solução de digluconato de clorexidina na concentração de 0,5 % como preparação antisséptica ou sanitizante oficinais<sup>4</sup>.

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

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

O presente estudo avaliou duas metodologias existentes na literatura, com baixo custo e resposta eficaz, para a determinação do digluconato de clorexidina nas matrizes enxaguatório bucal e solução antisséptica. As metodologias utilizadas foram a espectrofotometria na região do ultravioleta (UV-Vis) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), uma técnica muito utilizada na indústria, porém de alto custo. Na avaliação verificou-se o desempenho das metodologias analíticas através dos parâmetros de linearidade, seletividade, exatidão, repetitividade, limites de detecção e quantificação<sup>5</sup>.

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

Para o ensaio por espectrofotometria, utilizou-se como base o método de Fiorentino<sup>6</sup>. Utilizou-se etanol como solvente e como melhoria para minimizar os resíduos gerados no

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

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

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

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

O estudo por CLAE-UV baseou-se na monografia de determinação de cloridrato de clorexidina em enxaguatório bucal da Farmacopeia Americana (USP)<sup>7</sup>. O método por CLAE-UV foi desenvolvido em cromatógrafo líquido Shimadzu Class VP 10, com detector UV a 258 nm e volume de injeção 25 µL. Nos ensaios de otimização foram verificados a proporção do tampão e solvente orgânico da fase móvel, a vazão e o tempo de retenção, bem como o comprimento de onda para a obtenção de resultados analíticos satisfatórios que atendessem a adequabilidade do método. Preparou-se uma solução dissolvendo-se 27,6 g de fosfato de sódio monobásico e 10 mL de trietilamina em 1,5 L de água, ajustou-se o pH para 3,0 com ácido fosfórico e diluiu-se com água para 2,0 L. Esta solução resultante foi misturada com acetonitrila na proporção 70:30 (v/v) e denominada solução A. A fase móvel indicada na monografia da USP é composta por um gradiente de concentração entre a solução A e acetonitrila. Foram testadas misturas de diferentes proporções entre a mistura de tampão fosfato de sódio monobásico e trietilamina, pH 3,0, e acetonitrila em modo isocrático, partindo-se da proporção 1:1 e aumentando-se a concentração aquosa, com avaliação do impacto das mudanças no tempo de retenção e na resolução dos picos do cromatograma. O comprimento de onda descrito pela Farmacopeia Americana de 239 nm foi alterado para 258 nm, citado em literatura<sup>8</sup>. Após os testes, a fase móvel com melhores resultados foi constituída de solução tampão fosfato de sódio monobásico e trietilamina pH 3,0 e acetonitrila, proporção 34,3:65,7 (v/v), em modo isocrático, com fluxo de 1,2 mL/min. A coluna cromatográfica que apresentou melhor desempenho foi a Spherisorb® ODS2, Waters, 4,6x150 mm, partículas de 5 µm, utilizando forno de temperatura a 40 °C. Após a otimização do método CLAE-UV foi avaliada a estabilidade da solução padrão de clorexidina no período de três

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Todas as amostras analisadas apresentaram os resultados satisfatórios quanto ao teor de digluconato de clorexidina declarados na rotulagem, atendendo a legislação<sup>9</sup>.

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

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

## REFERÊNCIAS

1. Amoras LS. Uso da clorexidina na medicina: revisão de literatura [trabalho de conclusão de curso de especialização]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2013. [acesso 2021 Fev 17]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000903190&opt=1>
2. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 107, de 05 de setembro de 2016. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 199, de 26 de outubro de 2006, que dispõe sobre os medicamentos de notificação simplificada. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 06 set 2016. Seção 1(172):31.
3. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 fev 2015. Seção 1(29):39.
4. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 350, de 19 de março de 2020. Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes oficinais sem prévia autorização da Anvisa e dá outras providências, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 mar 2020. Seção 1(55):154.
5. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 09. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2020. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?torganismo=calibrensaos](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibrensaos)
6. Fiorentino FAM. Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009. [acesso 2021 Mar 12]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/91688>
7. United States Pharmacopeia. 42<sup>nd</sup> ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2020.
8. Gavlick WK. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine and p-chloroaniline using a specialty column and a photodiode-array detector. J. Chromatogr. 1992; 623(2):375-380.
9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 3, de 20 de janeiro de 2012. Aprova o regulamento técnico "listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas" e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 jan 2012. Seção 1(15-A):2-11.

---

# P-fenilenodiamina (PPD) em henna para uso em sobrancelhas

---

Maria Cristina SANTA BÁRBARA<sup>1</sup>, Fernanda Fernandes FARIAS<sup>2</sup>, Helena Miyoco YANO<sup>2</sup>, Valéria Adriana Pereira MARTINS<sup>2</sup>, Edilene Afonso VIEIRA<sup>2</sup>, Luz Marina TRUJILLO<sup>2</sup>, Luiz Fernando Ortiz GASPARIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneante e <sup>2</sup>Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos – Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz

---

O pigmento *Lawsonia* (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) conhecido popularmente como henna, é obtido a partir do pó das folhas secas da planta da espécie *Lawsonia inermis* L da família Lythraceae, tem a coloração verde e quando dissolvido em água ou óleo produz uma tinta de cor vermelha. Durante séculos a henna tem sido utilizada como corante natural de tecidos, borrachas, cabelos, unhas e aplicado às mãos e pés como expressão de arte corporal em culturas árabes e hindus<sup>1,2</sup>. A henna é relativamente segura e são poucos os relatos relacionados às reações alérgicas quanto ao seu uso.

A partir do ano 2000, novos modos de aplicação da henna vêm surgindo tais como a micropigmentação da pele, que se tornou um modismo crescente na população, a coloração de cabelos e sobrancelhas (maquiagem permanente) e a tatuagem com o uso da tintura henna negra. A literatura reporta que o costume de tatuar-se com henna não pode ser considerado isento de riscos e inofensivo à saúde devido à ocorrência de casos de reações adversas por exposição a estes tipos de produtos. Este fato foi relacionado à ocorrência de queixas de reações alérgicas na pele, por possível adulteração da henna com o composto p-fenilenodiamina (PPD), um derivado da anilina, uma amina aromática que em geral apresenta coloração branca. Quando exposta ao ar, adquire a coloração vermelha, depois castanha e finalmente preta em razão do processo oxidativo<sup>2</sup>. O PPD é um dos cinco compostos químicos identificados como sensibilizantes fortes pelo Comitê Científico sob Segurança de Uso desde 1961.<sup>3</sup> A adição do PPD ao

pó de henna tem o intuito de modificar a coloração marrom-avermelhada dos seus pigmentos naturais para coloração preta ou cor de ébano, aumentando o tempo de duração da tatuagem. A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 03, de 20/01/2012, restringe o uso de PPD na concentração máxima de 6% p/p em corantes de oxidação para coloração de cabelos, com a condição de uso e com as seguintes advertências que devem constar no rótulo: “pode causar reação alérgica”, “contém fenilenodiamina” e “não usar em cílios ou sobrancelhas”. Os produtos de henna para uso em sobrancelhas não estão regulamentados em legislação, mas devem apresentar segurança de uso<sup>4</sup>.

No Brasil, de acordo com a Resolução RDC nº 55, de 06/08/2008<sup>5</sup>, os produtos usados nos procedimentos de pigmentação artificial da pele são classificados como produtos para a saúde destinados ao embelezamento ou correção estética. Para os pigmentos destinados a colorir a pele (tatuagens) ainda não existe regulamentação no país. Na União Europeia, o PPD é proibido em cosméticos para uso cutâneo; entretanto, é permitido em pigmentos para uso capilar em até 6 % (p/p)<sup>6</sup>.

O presente estudo teve como objetivo identificar e quantificar o teor de PPD em 10 amostras de produtos de henna para uso em sobrancelhas; sendo sete amostras adquiridas no comércio da cidade de São Paulo com a descrição henna para sobrancelhas (pelo e pele), de diferentes marcas, lotes e tonalidades e três amostras fiscais de produtos de henna profissional para sobrancelhas encaminhadas pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo ao Centro de Medicamentos Cosméticos e

Saneantes do Instituto Adolfo Lutz. Estas amostras foram apreendidas para atender denúncia por queixa técnica associada aos produtos. Duas destas foram coletadas na modalidade de análise fiscal em triplicata e uma na modalidade de análise fiscal única.

As análises de identificação de PPD em amostras de henna para sobrancelhas foram conduzidas utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). A separação foi realizada de forma isocrática em uma coluna cromatográfica em fase reversa C8, com fase móvel constituída de uma mistura trietanolamina a 1 % em água (pH ajustado a 8,4 com ácido fosfórico) e acetonitrila na proporção 99:1 (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna de 32 °C, comprimento de onda 280 nm e tempo de corrida de 10 minutos. Para o preparo da amostra pesou-se cerca de 200 mg do produto de henna para sobrancelhas e diluiu-se em 10 mL de solução aquosa de sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) a 0,1 % (p/v), preparadas em tubos para centrífuga de 15 mL com tampa de rosca. Os tubos foram colocados em agitador mecânico por um minuto para homogeneização da mistura e em seguida, centrifugados por 30 minutos a 4000 rpm. Os sobrenadantes foram filtrados em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm em *vials* e analisados em cromatógrafo líquido Waters, modelo Alliance. O padrão de p-fenilenodiamina (PPD) da Sigma-Aldrich lote #WXBC1642V, com 99,4 % de pureza foi preparado em diluente na concentração de 30 µg/mL<sup>7</sup>.

As amostras analisadas apresentaram tempo de retenção do pico principal correspondente ao padrão de PPD, confirmados, ainda com a amostra fortificada com o padrão de p-fenilenodiamina.

Os resultados obtidos revelaram a presença de picos característicos do padrão de PPD em todas as amostras constituídas de henna para sobrancelhas, os quais foram quantificados e os valores obtidos variaram de 1,74 % a 3,28 % (p/p), estando, portanto em desacordo com a legislação vigente<sup>4</sup>, que não permite o uso de produtos cosméticos em cílios e sobrancelhas que contenham PPD. Dentre as amostras analisadas, somente uma declarava no rótulo a presença de PPD em sua formulação, refletindo desconhecimento da legislação.

Considerando que a totalidade dos resultados obtidos está em desacordo com a legislação e ainda, que a prática de colorir a sobrancelha vem sendo utilizada com grande frequência pela população tornando-se um modismo, uma ferramenta importante para a garantia de uso seguro deste tipo de produto sem riscos adicionais à saúde do usuário, seria o estabelecimento de programa de monitoramento da qualidade dos produtos

cosméticos de henna para sobrancelhas. Uma das ações no estabelecimento de um programa de monitoramento poderia abranger também o aspecto educativo, na orientação aos fabricantes quanto aos requisitos que devem ser seguidos no processo de fabricação desta categoria de produtos, em cumprimento à legislação.

## REFERÊNCIAS

1. Ahmed HAM, Maaboud RMA, Latif FA, El-Dean AMK, El-Shaie KM, Vilanova E et al. Different analytical methods of para-phenyldiamine based hair dye. *J. of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2013;3(3):17-25. <http://dx.doi.org/10.4236/jcdsa.2013.33A1003>
2. Oliveira RAG de, Zanoni TB, Bessegato GG, Oliveira DP, Umbuzeiro GA, Zanoni MVB. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. *Química Nova*. 2014;37(6):1037-46. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140143>
3. U.S. Government Publishing Office. Electronic Code of Federal Regulations (e-CFR). Title 16 - Commercial Practices. Chapter II- Consumer Product Safety Commission. Subchapter C - Federal Hazardous Substances Act Regulations. Part 1500 – Hazardous Substances and Articles: Administration and Enforcement Regulations. § 1500.13 Listing of “strong sensitizer” substances. Disponível em: [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?node=pt16.2.1500&rgn=div5#se16.2.1500\\_113](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?node=pt16.2.1500&rgn=div5#se16.2.1500_113)
4. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 03, de 20 de janeiro de 2012. Dispõe sobre os requisitos técnicos "Listas de substâncias que os produtos de Higiene Pessoal, cosméticos e Perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas". *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 20 jan 2012. Seção 1(15-A):2.
5. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 06 de agosto de 2008. Dispõe sobre o registro de produtos utilizados no procedimento de pigmentação artificial permanente da pele. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 8 ago 2008. Seção 1(152):51.
6. European Medicines Agency – EMA. ICH Topic Q1 A (R2) Stability Testing of new drug substances and products. Londres: European Medicines Agency; 2003. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf)

7. Santa Barbara MC, Yano HM, Farias FF, Gasparin LFO, Vieira EA, Trujillo LM et al. Otimização e validação intralaboratorial de método analítico por CLAE/UV para identificação e quantificação de p-

fenilenodiamina em tinturas de henna para cabelos e sobrancelhas. *Vigil. sanit. debate.* 2019;7(2):62-8. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01265>



