
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DESINFETANTES HOSPITALARES

SARAH G. SANTOS^{1*}, LEONARDO C. DE ASSIS¹, MAURO L. BEGNINI¹, JOSÉ D. R.
D. FINZER¹.

¹Universidade de Uberaba, Programa de Mestrado em Engenharia Química
*e-mail: sarahg.santos@hotmail.com

RESUMO – Os métodos analíticos são ferramentas de confiabilidade da cadeia produtiva industrial, que impactam diretamente na qualidade do processo. O estudo de desenvolvimento e validação do método analítico para o ativo PHMB (Polihexametileno de Biguanida) para dois desinfetantes hospitalares de nível intermediário apresentados no presente trabalho, foi desenvolvido através de parâmetros estatísticos. Avaliou-se a seletividade, linearidade, exatidão, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação do método analítico, através da leitura das soluções analíticas no espectrofotômetro na região UV-VIS na faixa de 237 nm. Desenvolveu-se o estudo do analito versus desinfetante diluído e desinfetante concentrado, avaliando o comportamento das matrizes de cada um dos produtos acabados. Os critérios de aceitação de cada parâmetro foram definidos de acordo com as orientações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), RDC 166 de 24 de Julho de 2017. Para seletividade quantificou-se para ambas formulações a interferência na matriz na formulação, o método apresentou-se linear, exato e preciso, definiu-se o limite de quantificação e o limite de detecção na concentração de 0,5 p.p.m. Perante os resultados obtidos, o método analítico foi validado para ser utilizado na liberação de lotes para o mercado, garantindo a qualidade da análise no processo de quantificação do teor do ativo PHMB nas formulações estudadas.

INTRODUÇÃO

A Validação de Metodologia Analítica é o processo na qual o laboratório demonstra que o método é adequado ao “propósito”, no que diz respeito a resultados confiáveis e precisos, independente dos possíveis interferentes. A Validação do Método Analítico envolve a definição dos parâmetros a serem validados (identificação) quantificação de ativo/impurezas), por exemplo. A Validação de Metodologia Analítica envolve diversas resoluções e guias, porém a indústria saneante é regida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e segue a RDC N° 47, de 25 de Outubro de 2013 que prevê as Boas Práticas de Fabricação para Produtos Saneantes e para a Validação de Método Analítico RDC N° 166 de 24 de Julho de 2017 que dispõe

sobre Validação de Métodos Analíticos.

O PHMB é uma solução aquosa de 20% de polihexametileno de biguanida, estrutura de polímero composta por duas guanidinas unidas por um nitrogênio ($C_8H_{17}N_5$)_n, podendo ser representada com uma faixa de massa molecular de 400 a 8000, com tamanho de n=2 a n=40, comumente com a média n=11 (Regulation (EU) N° 528/2012, 2015).

O desenvolvimento de cepas multiresistentes aos antibióticos em ambientes hospitalares, vem ganhando notoriedade no cenário da saúde. Estudos recentes, trazem evidências que o risco de pacientes imunossuprimidos adquirirem uma infecção com microrganismos multiresistentes é alto, se o processo de limpeza e desinfecção não forem adequados. Porém, a desinfecção com o ativo correto nas áreas hospitalares podem reduzir a

carga microbiana, trazendo segurança e bem estar ao paciente (RUTALA, *et al.* 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), disponibiliza um guia de Limpeza e Desinfecção de Superfícies, com orientações estratégicas. O desenvolvimento de técnicas incorretas de limpezas e desinfecção de superfícies, pode favorecer a proliferação dos microrganismos.

Segundo o guia de (Segurança do Paciente em Serviços de Saúde Limpeza e Desinfecção de Superfícies, 2010), os setores com alto risco de contaminação podem ser classificadas como: áreas críticas, semicríticas e não críticas. As áreas críticas são definidas como as que existem o maior risco de transmissão, onde se realizam os procedimentos de riscos, como por exemplo, Unidade de Terapia Intensiva, Centro Cirúrgico e Centro de Obstetrícia. As áreas semicríticas são aquelas ocupadas por pacientes com baixa transmissibilidade e doenças não infecciosas, exemplo, enfermarias, apartamentos, ambulatórios e banheiros. As áreas não críticas, são as demais, exemplo, copa e vestiários.

No cenário hospitalar, existem legislações específicas para os critérios de avaliação dos fornecedores de produtos de limpeza a serem utilizados, no intuito de assegurar a qualidade e eficácia (formatar) da limpeza. Além, das orientações dos acessórios e equipamentos utilizados no processo.

O hospital contará com uma equipe SICH (Serviço de Controle de Infecção Hospitalar), responsável por selecionar, testar e aprovar os produtos saneantes, dentro do hospital (Souza, *et. al.* 2021). Dentre as diversas diretrizes legais a serem seguidas dentro dos hospitais, pode-se destacar as RDC nº 700 de 13 de Maio de 2022, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos.

Para um desinfetante hospitalar ser comercializado, o fabricante deverá envolver uma série de exigências regulatórias no intuito de assegurar a qualidade e desempenho do produto. Dentre diversas pode-se citar os registros com os laudos comprovando a eficácia frente a diversos microorganismos, prevista a RDC nº 700 de 13 de Maio de 2022.

O presente trabalho, foi desenvolvido a partir da necessidade de análise quantitativa do ativo PHMB (Polihexametileno de Biguanida) no produto acabado em dois desinfetantes hospitalares fabricados na cidade de Uberaba-MG, por uma empresa que fornece para o mercado nacional produtos para higiene e limpeza profissional. Inicialmente, o desenvolvimento do método de análise começou na Universidade de Uberaba, pelo Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Química. Os primeiros testes para o desenvolvimento do método quantitativo foram realizados em Espectrofotômetro UV-VIS da Universidade de Uberaba.

METODOLOGIA

Para o estudo de validação do método preparou-se as curvas a partir do desinfetante concentrado, desinfetante diluído e analito. Os parâmetros de estudos foram a seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, através da repetibilidade e precisão intermediária, e o limite de quantificação e limite de detecção.

Para avaliação da Seletividade, realizou-se as calibrações das curvas de análises conforme representação na Figura 1. Realizaram-se as leituras no espectrofotômetro UV-VIS na faixa de 237 nm. Para cada concentração, realizaram-se as leituras em 7 (sete) réplicas conforme orientações da ANVISA e aplicaram-se testes estatísticos de hipótese para avaliação entre as variâncias (F-Snedecor) dos dois grupos (matriz desinfetante concentrado *versus* analito) e (matriz desinfetante diluído *versus* analito), conforme Figura 1 que representa a diluição das soluções para leitura no espectrofotômetro.

Para o parâmetro linearidade e faixa de trabalho, repetiram-se os mesmos procedimentos descritos no parâmetro seletividade, entretanto utilizou-se como amostra os produtos desinfetante concentrado, desinfetante diluído e o analito. Aumentou-se uma diluição, de 1 mL em 100 mL, que equivale a 1 p.p.m. Para cada concentração, realizaram-se as leituras em 3 (três) réplicas conforme orientações da ANVISA, realizando o estudo estatístico da linearidade na faixa de

trabalho para cada um dos grupos.

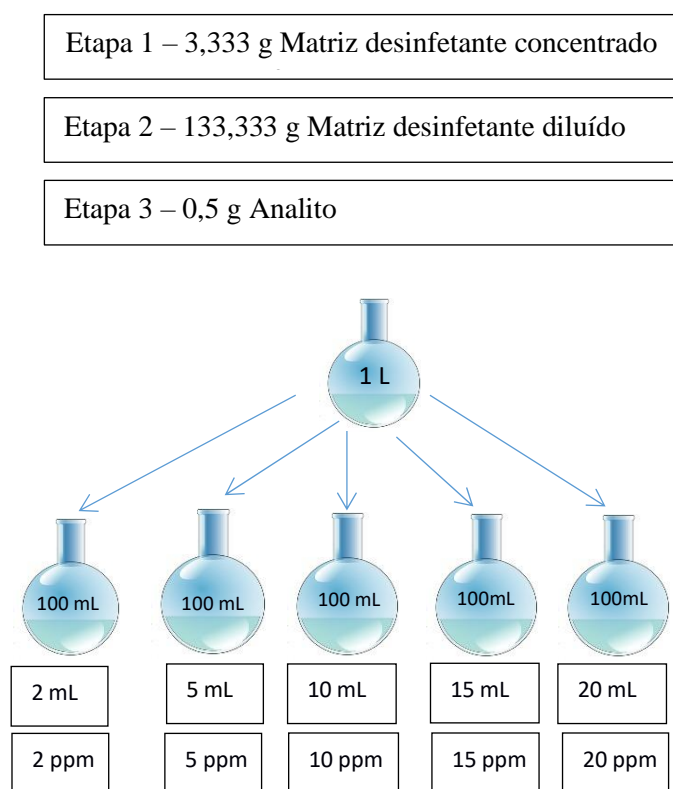


Figura 1: Representação das diluições

Avaliou-se a precisão do método através da repetibilidade e precisão intermediária, as curvas de calibrações seguiram os mesmos critérios da linearidade e faixa de trabalho, entretanto reduziu-se as quantidades de soluções analisadas em 5 p.p.m, 10 p.p.m e 15 p.p.m.

Para repetibilidade, usou-se a estratégia de análises realizadas no mesmo dia, com um mesmo analista e usando o mesmo equipamento. Realizaram-se as leituras em 6 (seis) réplicas por concentração conforme orientações da ANVISA, calculou-se a média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Para as análises para o parâmetro precisão intermediária utilizaram-se dois analistas em dois dias diferentes, usando as mesmas condições analíticas, ou seja, mesmo método analítico e mesmo equipamento. Realizaram-se as leituras em 6 (seis) réplicas por concentração conforme orientações da ANVISA e aplicou-se o programa estatístico ANOVA para avaliações estatísticas do método comparando analistas e dias.

A exatidão foi avaliada realizando-se as

fortificações das amostras de desinfetante concentrado e desinfetante diluído com analito. Para Solução Amostra 1: pesou-se 133,333 g de desinfetante diluído, transferiu-se para o balão de 1000 mL e completou-se com água destilada. Solução Amostra 3: pesou-se 0,5 g de analito, transferiu-se para o balão de 1000 mL e completou-se com água destilada. A fortificação da Solução Amostra 1 com a Solução Amostra 3, chamou-se de Solução Amostra 4, técnica descrita conforme Figura 2. Para Solução Amostra 5, repetiu-se o mesmo processo, porém usou-se a amostra do desinfetante concentrado.

Para verificação da exatidão, realizou-se as leituras em 7 (sete) réplicas, conforme orientações da ANVISA e posteriormente, os cálculos da recuperação (%) do desinfetante diluído e desinfetante concentrado.

Para as análises de limite de quantificação e limite de detecção, fortificou-se as matrizes do desinfetante concentrado com analito e as matrizes do desinfetante diluído com o analito, conforme (Figura 3). Para a determinação do limite de detecção e limite de quantificação aplicou-se respectivamente, as Equação (1) e Equação (2).

$$LD = 3 S_0 \quad (1)$$

sendo, $LD = \text{Limite de detecção}$; $S_0 = \text{Desvio padrão}$

$$LD = 10 S_0 \quad (2)$$

sendo, $LQ = \text{Limite de quantificação}$; $S_0 = \text{Desvio padrão}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seletividade do método analítico espectrofotométrico 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 (Inmetro, 2020).

Foi evidenciado através dos valores de F que, para todas as concentrações em ambos desinfetantes $F_{cal} > F_{tab}$ (variâncias estatisticamente diferentes), ou seja, existe o efeito matriz sobre os resultados do método.

Através das leituras obtidas, avaliou-se a linearidade através da regressão linear para as três amostras (desinfetante diluído, desinfetante concentrado e analito). Para o desinfetante diluído obteve-se o valor de $R^2 = 1$; para o desinfetante concentrado obteve-se o valor de $R^2 = 0,9993$ e para o analito obteve-se $R^2 = 0,9999$, conforme (Figura 2) e (Figura 3).

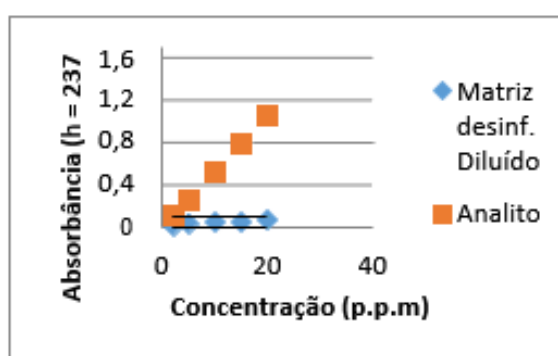


Figura 2: Gráfico para avaliação da seletividade matriz desinfetante diluído *versus* analito.

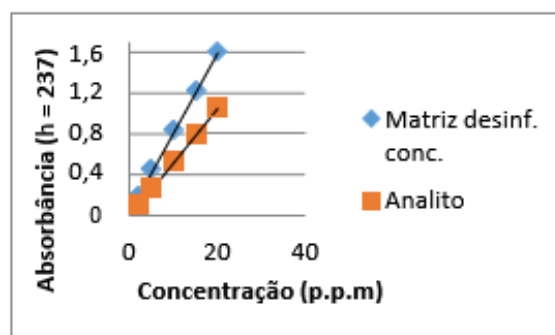


Figura 3: Gráfico para avaliação da seletividade matriz desinfetante concentrado *versus* analito.

O estudo estatístico aplicado ANOVA para o parâmetro precisão intermediária, demonstrou através dos valores que não houve diferença estatística entre analistas e dias, isso porque $F > F_{crit}$; com o p-valor $< 0,05$ para o desinfetante diluído e desinfetante concentrado. Para repetibilidade avaliou-se o DPR% (Desvio Padrão Relativo), observou-se que o desinfetante diluído para as concentrações de 2 p.p.m obteve-se um DPR%

de 3,215%; para 5 p.p.m DPR% 1,312 e para 10 p.p.m DPR% 0,741, esses valores se encontram dentro dos critérios de aceitação, o mesmo acontece para o desinfetante concentrado, para as concentrações de 2 p.p.m obteve-se um DPR% de 0,514%; para 5 p.p.m DPR% 0,306 e para 10 p.p.m DPR% 1,311. A recuperação das amostras estudadas, está descrita na Tabela 1. Os resultados encontram-se dentro dos critérios de aceitação, recomenda-se que a recuperação (%) das amostras estejam entre 90% e 107%, de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Tabela 1: Recuperação das amostras fortificadas com analito, Amostra 4 (desinfetante diluído) e Amostra 5 (desinfetante concentrado).

Nível de fortificação (p.p.m)	AMOSTRA 4 Recuperação (%)	AMOSTRA 5 Recuperação (%)
7	98,975	102,461
10	101,186	96,987
13	99,463	101,275

O limite de detecção e o limite de quantificação definidos para o método analítico está descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Limite de detecção e limite de quantificação da metodologia analítica.

Sol. analítica	Nível de fort. (p.p.m)	Média (Abs. $\lambda = 237$ nm)	DP (p.p.m)	LD (p.p.m)	LQ (p.p.m)
Desinf. Diluído	0,5	0,008	0,001	0,003	0,009
Desinf. Conc.	0,5	0,010	0,001	0,002	0,007
Analito	0,5	0,012	0,001	0,002	0,006

CONCLUSÃO

Ao final do estudo de Validação do Método Analítico Espectrofotométrico

UV/VIS, conclui-se que, o método atendeu todos os requisitos estatísticos de validação na verificação do teor do PHMB para liberação dos produtos acabados para o mercado. Sendo assim, o método de análise garante a confiabilidade na quantificação do teor de ativo no produto acabado. Toda a documentação do processo de Validação do Método Analítico, fica disponível para a avaliação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e rastreabilidade de processo.

REFERÊNCIAS

Agência Europeia de Produtos Químicos. 2015, Regulation (EU) N°45 528/2012 concernig the making available on the market and use of biocidal products. Polyhexamethylene biguanide (Mn = 1600; PDI =1.8) (PHMB). França.

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Boas Práticas às atividades de Validação de Métodos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 700, de 13 de maio de 2022. Dispõe sobre produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos, e seu registro. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

RUTALA,W.A. *et. al.* 2019, Guideline for Desinfection and Sterilization in Healthcare Facilites. Departament of Health & Human Services. USA.

SOUZA, M.G.A; *et. al.* (2021) Fatores de interferência na qualidade da desinfecção e limpeza de superfícies hospitalar. Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v.4, n.2, p.8981-8993 mar./abr.

INMETRO. (2021), Coordenação geral de acreditação.DOQ-CGRE-008:

Orientações sobre método analítico. Rev.008. Abril.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte disponibilizado ao desenvolvimento deste estudo.