

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Flávia Michelin Dalla Nora

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NO
PRINCÍPIO DE FRASCO ÚNICO EMPREGANDO ENTALPIMETRIA
NO INFRAVERMELHO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE
ALIMENTOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

Santa Maria, RS

2018

Flávia Michelin Dalla Nora

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NO
PRINCÍPIO DE FRASCO ÚNICO EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO
INFRAVERMELHO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS E
PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Santa Maria, RS

2018

Dalla Nora, Flávia Michelin
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NO
PRINCÍPIO DE FRASCO ÚNICO EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO
INFRAVERMELHO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS E
PRODUTOS FARMACÊUTICOS / Flávia Michelin Dalla Nora.-
2018.

85 p.; 30 cm

Orientador: Juliano Smanioto Barin
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. infravermelho 2. entalpimetria 3. termografia 4.
integração de processos 5. química analítica verde I.
Barin, Juliano Smanioto II. Título.

Flávia Michelin Dalla Nora

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NO
PRINCÍPIO DE FRASCO ÚNICO EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO
INFRAVERMELHO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS E
PRODUTOS FARMACÊUTICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Aprovado em 06 de agosto de 2018:

**Juliano Smanioto Barin, Dr.
(Presidente/Orientador)**

Cezar Augusto Bizzi, Dr. (UFSM)

Cristiano Augusto Ballus, Dr. (UFSM)

Fabiana Ernestina Barcellos da Silva, Dra. (UNIPAMPA)

Fávero Reisdorfer Paula, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria** e ao **Núcleo de Tecnologia em Alimentos** pela possibilidade de execução deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro na condução da pesquisa.

Ao professor **Juliano Smanioto Barin**, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e pela transmissão de conhecimentos.

Aos professores **Cezar Augusto Bizzi, Cristiano Augusto Ballus, Fabiana Ernestina Barcellos da Silva e Fávero Reisdorfer Paula** pela participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do **Núcleo de Tecnologia em Alimentos** e do **Setor de Química Industrial e Ambiental** pela amizade, pelas contribuições neste trabalho e pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas e amigos do **Núcleo de Tecnologia em Alimentos** e do **Setor de Química Industrial e Ambiental**, pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos meus pais **Romualdo e Jurema** e a minha irmã **Daiana**, pelo apoio, confiança, afeto, incentivo e exemplo de vida e ao meu namorado **Alfran Tellechea Martini**, pelo companheirismo, afeto e apoio concedido em todos os momentos.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NO PRINCÍPIO DE FRASCO ÚNICO EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS

AUTORA: Flávia Michelon Dalla Nora

ORIENTADOR: Juliano Smanioto Barin

Os métodos clássicos de controle de qualidade químico tais como a determinação da uniformidade de conteúdo (UC) em medicamentos, índice de saponificação (IS) em óleos comestíveis e teor de cloro ativo em saneantes são baseados, frequentemente, em métodos volumétricos. Em geral, estes métodos demandam elevada quantidade de amostra, demasiado tempo para execução do procedimento e diversas etapas. Desta forma, métodos alternativos de análise que superem essas desvantagens são de grande interesse para aplicação em rotinas laboratoriais. Uma alternativa para o desenvolvimento de métodos analíticos mais ambientalmente corretos é a miniaturização, a qual possibilita a análise com mínima geração de resíduos. Neste contexto, a integração de processos analíticos evita o emprego de vários frascos, sendo que todas as etapas são feitas em um único frasco de reação, minimizando os erros sistemáticos e aleatórios, impactando a qualidade dos resultados. Neste sentido, a técnica de entalpiometria no infravermelho térmico (TIE) foi empregada para determinação do índice de saponificação em óleos comestíveis, da uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril e de cloro ativo em soluções de hipoclorito de sódio. Foram utilizadas microplacas, uma pipeta multicanal para a adição dos reagentes e uma câmera de infravermelho para monitoramento de temperatura gerada a partir das reações químicas. Nos métodos propostos, todas as operações foram realizadas em microplacas, reduzindo o volume de amostra utilizado e permitindo a execução de todas as etapas analíticas no mesmo poço. Os resultados obtidos por TIE apresentaram adequada precisão e boa concordância em relação às metodologias oficiais. Foi observado que os métodos propostos proporcionaram redução do tempo de análise, do consumo de reagentes, de amostra e de energia mostrando-se uma alternativa adequada para aplicação em análise de rotina e de acordo com as bases da química analítica verde.

Palavras-chave: termografia, entalpiometria, infravermelho térmico, controle de qualidade.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS BASED ON SINGLE FLASK PRINCIPLE EMPLOYING INFRARED THERMAL ENTHALPIMETRY FOR QUALITY CONTROL OF FOODS AND PHARMACEUTICAL PRODUCTS

AUTHOR: Flávia Michelon Dalla Nora

ADVISER: Juliano Smanioto Barin

The classical methods of chemical quality control such as determination of content uniformity (CU) in medicines, saponification value (SV) in edible oils and active chlorine content in bleaching are often based on volumetric methods. In general, these methods require high amount of sample, too much time for performing the procedure and several steps for execution. In this way, alternative methods of analysis that overcome these disadvantages are interesting for application in laboratory routines. An alternative for the development of more environmentally correct analytical methods is miniaturization, which enables analysis with a minimal waste generation. The integration of analytical processes avoid the use of several flasks, all steps being done in a single reaction flask, minimizing the systematic and random errors, impacting in the quality of the results. In this sense, the thermal infrared enthalpimetry (TIE) technique was used to determine the saponification value in edible oils, the uniformity content in captopril tablets and active chlorine in sodium hypochlorite solutions. For this, microplates and a multichannel pipette were used for the addition of the reagents and an infrared camera for temperature monitoring generated from the chemical reactions were used. In the proposed methods, all operations were performed in microplates, reducing the volume of sample used and performing all analytical steps in the same well. The results obtained by TIE showed suitable accuracy and good agreement with official methods. In addition, it was observed that the proposed methods provided reduction of analysis time and reagent, sample and energy consumption, being a suitable alternative for application in routine analysis according to the principles of the green analytical chemistry.

Keywords: thermography, enthalpimetry, infrared thermal imaging, quality control

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1	ENTALPIMETRIA	8
2.2	TERMOGRAFIA NO INFRAVERMELHO	10
2.3	ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO TÉRMICO (TIE)	11
2.4	QUÍMICA ANALÍTICA VERDE	14
2.4.1	Frasco único de reação	16
2.4.2	Análise métrica aplicada à química analítica verde	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	ARTIGO 1: Miniaturized, High Throughput And Green Determination Of Saponification Value Of Edible Oils Using Thermal Infrared Enthalpimetry	21
5	MANUSCRITO 1: A Novel Thermal Infrared Enthalpimetric Method For Fast, High-Throughput Determination Of The Content Uniformity Of Captopril Tablets	30
6	MANUSCRITO 2: A Green Method For Determination Of Active Chlorine In Bleaching Solutions By Thermal Infrared Enthalpimetry	52
7	DISCUSSÃO	77
8	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de medicamentos, produtos alimentícios e saneantes baseados em metodologias convencionais é usualmente realizado com base em ensaios volumétricos. A maioria dos compêndios nacionais e internacionais utilizam análises volumétricas para realizar o controle de qualidade seja de produtos químicos, alimentícios ou de preparações farmacêuticas. Entretanto, os métodos convencionais de análise são caracterizados, na sua maioria, por requererem elevado tempo de análise e pela necessidade de realização de diversas etapas sucessivas, prejudicando por vezes a precisão dos resultados obtidos (MASINO *et al.*, 2005). Além disso, em alguns casos é necessário o emprego de equipamentos para aquecimento de grandes volumes de amostra, o que reflete em elevado consumo energético e conseqüentemente em maior emissão de gases poluentes ao meio ambiente (GAŁUSZKA *et al.*, 2013). Pode-se ainda mencionar como desvantagem dos métodos convencionais a elevada quantidade de amostra e de reagentes requerida, o que é diretamente proporcional a quantidade de resíduos gerado (MASINO *et al.*, 2005). Desta forma, métodos que possibilitem a miniaturização e a integração de processos em um único frasco de reação são uma alternativa adequada para aumentar o caráter sustentável das análises efetuadas (MELCHERT *et al.*, 2012; GAŁUSZKA *et al.*, 2013).

Como pode ser visto, as análises químicas podem ser consideradas causadoras de poluição ambiental, demandando consumo de energia e de reagentes tóxicos ao meio ambiente. Tendo em vista o que foi exposto anteriormente com relação aos inconvenientes dos métodos convencionais de análise, métodos alternativos que permitam superar essas desvantagens são uma tendência. Desta forma, os métodos que consideram o impacto ambiental e a sustentabilidade como critérios de desenvolvimento e operação trazem outras informações para a escolha de um analista, as quais constituem as bases de uma subárea que tem crescido exponencialmente nos últimos anos, chamada de química analítica verde (GAŁUSZKA *et al.*, 2013).

Considerando a necessidade atual por métodos que permitem a execução de análises de controle de qualidade de forma mais ambientalmente correta e com elevada frequência de análises quando comparada aos métodos convencionais, foi desenvolvida a técnica de entalpimetria no infravermelho (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*), a qual é baseada na determinação de analitos através da entalpia de reação. A análise entalpimétrica por TIE é feita através de uma câmara de infravermelho, a qual permite um mapeamento da temperatura superficial sem a necessidade de contato direto com a amostra. Desta forma, é feita

a medição da temperatura antes e após a adição de um reagente em excesso estequiométrico e a variação de temperatura obtida é relacionada diretamente com a concentração do analito. Com o emprego de uma câmera de infravermelho, a avaliação pode ser feita de forma não invasiva e sem contato, além de que a temperatura é obtida de diversos pixels, o que reflete diretamente em medidas mais uniformes de temperatura em comparação a utilização de medidores de temperatura pontuais, como termômetros e termistores (BARIN *et al.*, 2015).

No contexto de desenvolvimento de metodologias analíticas ambientalmente corretas e mais sustentáveis em relação aos métodos convencionais, o presente trabalho propõe métodos analíticos alternativos aos comumente utilizados. Com o objetivo de superar as desvantagens dos métodos convencionais, foi feita a combinação entre as análises entalpimétricas com a termografia no infravermelho resultando na TIE, a qual foi utilizada para a determinação de analitos comumente determinados por métodos volumétricos. Para isso foram utilizadas microplacas de polipropileno e poliestireno como frascos de diluição e reatores, fazendo com que todo o procedimento analítico seja realizado em um único frasco a fim de buscar resultados rápidos e em escala miniaturizada. Neste trabalho, os métodos propostos foram desenvolvidos a fim de realizar o controle de qualidade do índice de saponificação em óleos vegetais, a qualidade de comprimidos de captopril e dos saneantes mais comumente empregados nas indústrias de alimentos de vários segmentos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENTALPIMETRIA

Técnicas de análise baseadas no monitoramento da variação de entalpia de uma reação são denominadas técnicas entalpimétricas e pertencem ao campo da calorimetria. Através destas é possível determinar a concentração de um reagente ou, até mesmo de um catalisador. Este campo da calorimetria se subdivide em três principais técnicas: i) a titulação termométrica; ii) a entalpimetria por injeção em fluxo; e, iii) a entalpimetria por injeção direta (DIE, do inglês *Direct Injection Enthalpimetry*) (GRIME, 1981).

A titulação termométrica é empregada com o objetivo de obter o ponto final de uma titulação através da diferença de temperatura gerada durante a adição de um titulante em um frasco adiabático. Em contrapartida, tanto a entalpia de injeção em fluxo quanto a DIE são caracterizadas pela injeção de um excesso estequiométrico de reagentes. Nestas análises é feita a determinação da temperatura do meio antes e após a injeção do reagente em excesso e essa

variação é relacionada diretamente com a concentração do analito em solução (BOUDEVILLE & BURGOT, 1992; NAJIB *et al.*, 2007). A diferença entre estes dois métodos está relacionada com a forma com que é feita a injeção dos reagentes, sendo que na DIE os reagentes são inseridos em um frasco de reação através de uma seringa, enquanto na injeção em fluxo um sistema constituído por tubulações que são utilizadas para a injeção da amostra e do reagente em excesso (WASILEWSKI *et al.*, 1964; PRIESTLEY *et al.*, 1965). Dentre as três técnicas calorimétricas já mencionadas, a titulação termométrica foi a técnica com maior aplicação até os anos 60. No entanto, com o passar do tempo foi sendo substituída pela DIE devido as vantagens inerentes a ela, tais como maior facilidade e rapidez na execução do procedimento experimental (BARIN *et al.*, 2015).

Em todas estas análises entalpimétricas é necessário o emprego de um componente eletrônico semiconductor chamado de termistor. Este componente é o detector da técnica, o qual apresenta variação na sua resistência elétrica dependendo da variação de temperatura do meio (OLIVEIRA & PASQUINI, 1988; MORRIS & LANGARI, 2012). Mesmo apresentando-se adequado, os resultados podem ser prejudicados devido a presença de algumas interferências de ordem física e química, fruto da necessidade de contato direto com a solução em análise. Além disso, em algumas situações, estes componentes podem fornecer respostas inexatas, tendo em vista que não são inertes e são suscetíveis a danos estruturais, tais como corrosão e danos mecânicos dependendo das características das soluções analisadas. Este fato mostra que a necessidade na calibração rotineira destes componentes é de extrema importância quando são empregados em análises termométricas, a fim de garantir adequada exatidão das análises realizadas (WASILEWSKI *et al.*, 1964; PRIESTLEY *et al.*, 1965). Neste contexto, formas alternativas para realizar a medição de temperatura sem contato com a amostra são importantes, tendo em vista os inconvenientes que o uso de métodos convencionais apresentam.

Considerando que para a análise entalpimétrica por DIE é necessário o emprego de grandes quantidades de soluções em excesso estequiométrico, dispositivos calorimétricos de alto custo e que apresentam baixa frequência de análise, estes métodos foram desaparecendo e sendo substituídos por outros de maior praticidade (WASILEWSKI *et al.*, 1964). Além disso, os termistores empregados são de baixa sensibilidade de detecção, possibilitando que estas técnicas sejam empregadas somente para determinação de concentrações relativamente altas (PRIESTLEY *et al.*, 1965). Neste sentido, técnicas de análise baseadas na determinação da variação de temperatura que consigam superar estas desvantagens são de elevada importância. Neste contexto, a termografia no infravermelho foi utilizada na TIE com o objetivo de

monitorar a temperatura liberada por reações químicas de forma simples, fácil, rápida e sem a necessidade de contato direto com a amostra (BARIN *et al.*, 2015).

2.2 TERMOGRAFIA NO INFRAVERMELHO

O espectro eletromagnético de infravermelho compreende comprimentos de onda que começam em cerca de 0,75 μm e vão até 100 μm e estão relacionadas com a temperatura do material a ser analisado. De acordo com Ng (2009), a radiação infravermelho é subdividida em quatro regiões, sendo a região do próximo, médio, distante e extremo, que apresentam comprimentos de onda entre 0,75 e 2,50 μm , 2,5 e 8,0 μm , 8 e 15 μm e 15 e 100 μm , respectivamente. Qualquer material que esteja a uma temperatura acima de zero absoluto (-273,15 °C) emite radiação infravermelho, a qual pode ser utilizada como informação para diversos fins (HOLST, 2008; NG, 2009; ATKINS & DE PAULA, 2010).

A termografia no infravermelho se divide em dois tipos principais, a ativa e a passiva. A diferença entre estes dois tipos está relacionada com a necessidade ou não de um estímulo externo para que haja a emissão da radiação. Na análise de temperatura pela termografia passiva, a radiação infravermelho é emitida por qualquer corpo que esteja a uma temperatura acima do zero absoluto sem que haja estímulo proveniente de qualquer natureza. Em contrapartida, na termografia ativa é necessário que o corpo seja submetido a um estímulo prévio pelo uso de fontes de calor, radiações eletromagnéticas, radiações mecânicas, dentre outros, e assim, é verificada uma resposta em termos de diferença de emissão de radiação infravermelha antes e após o estímulo (WIECEK, 2005; GOWEN *et al.*, 2010).

A energia térmica emitida por objetos na forma de ondas eletromagnéticas na faixa do infravermelho tem sido empregada para monitoramento de processos industriais e para avaliação da qualidade em diversas áreas do conhecimento. Alguns exemplos de áreas que utilizam imagens termométricas são a medicina, que utiliza para diagnóstico de tumores, engenharia civil e elétrica a fim de avaliar a presença de comprometimento estrutural ou sobrecarga energética e na área militar e de segurança que se baseiam em imagens termométricas para rastreamento de possíveis perigos à população (SUSZYŃSKI & ZARZYCKI, 2015).

A determinação pontual da temperatura através da utilização de termômetros, termopares e termistores fornece uma série de desvantagens, tais como a necessidade de um contato direto com a amostra e a obtenção de um único resultado (PRIESTLEY *et al.*, 1965; STAHL, 1994). Neste sentido, o emprego de câmeras termográficas é uma alternativa frente a

essas formas convencionais, aliando a praticidade, ausência de um contato direto com a amostra e a possibilidade de um mapeamento da temperatura superficial de um objeto (NOTT & HALL, 1999). Desta forma, é possível obter vários pontos de medida, refletindo em análises mais exatas e precisas por meios não invasivos. Além disso, o emprego de câmeras termográficas possibilitam a aquisição de dados em uma velocidade relativamente alta em comparação às formas convencionais, podendo chegar a kHz, o que permite explorar a mudança de temperatura em curtos períodos de tempos (CUIBUS *et al.*, 2014). Estas vantagens no emprego de câmeras de infravermelho tornam a sua utilização de elevada importância na área de alimentos. Neste contexto, algumas aplicações já tem sido feitas, tais como para fins de controle de temperatura de frangos durante o aquecimento, avaliação do tempo de secagem de frutas, monitoramento de defeitos em tomates, qualidade de maçãs e presença de infestações de insetos em grãos de trigo (FOSTER *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; CUIBUS *et al.*, 2014).

2.3 ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO TÉRMICO (TIE)

Recentemente, Barin e colaboradores (2015) desenvolveram a entalpimetria no infravermelho térmico (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*), a qual consiste em uma adaptação da DIE. Essa nova abordagem foi desenvolvida com o objetivo de superar as desvantagens e inconvenientes presentes na DIE, apresentando-se como uma técnica simples e rápida para emprego na área de análise química. Essa técnica permite que seja feito o monitoramento de uma área superficial sem que haja contato, possibilitando a determinação de vários pontos de temperatura através da utilização de uma câmera de infravermelho. Para a execução do procedimento experimental básico da técnica, é necessária a utilização de uma pipeta multicanal para adição dos reagentes em microplacas descartáveis, de uma câmera de infravermelho para monitoramento da temperatura de reação e de um agitador magnético para mistura dos reagentes.

A sequência do procedimento é feita de tal forma que primeiramente é feita a adição da amostra à microplaca, seguida pela adição do reagente em excesso através da pipeta multicanal. Durante todo o procedimento, é feita uma gravação na forma de vídeo pela câmera de infravermelho, de onde serão obtidos os valores de temperatura antes e após a adição do reagente em excesso estequiométrico. Os sinais analíticos de temperatura são obtidos instantaneamente e a média da temperatura (ΔT) é determinada por meio de um software, com taxa de aquisição de dados geralmente de 30 Hz. Os valores de temperatura são extraídos das imagens normalmente empregando uma área de 180 pixels para monitoramento de cada reação.

Como os dados são obtidos a partir da média de valores em intervalos de tempo de 2 s antes e após a injeção do reagente em excesso estequiométrico, cerca de 10.800 valores são utilizados tanto para as amostras quanto para cada ponto da curva de calibração plotada. Para a obtenção dos resultados, a variação de temperatura encontrada é utilizada para determinar a concentração da amostra através de uma curva de calibração adequada (BARIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; TISCHER *et al.*, 2017).

Com base nesta técnica foram obtidos resultados promissores explorando reações de oxirredução, neutralização, precipitação e complexação. Concordâncias compreendidas entre 96 e 101% foram obtidas em relação aos métodos convencionais para determinação de cloreto, cálcio, ferro e acidez em amostras de soro fisiológico, comprimidos de sulfato ferroso, comprimidos de carbonato de cálcio e vinagre, respectivamente. Nesta primeira abordagem da TIE, os métodos desenvolvidos apresentaram vantagens em relação aos métodos convencionais, como a redução do volume de amostra e de reagentes e a maior frequência de análise, que permite atingir 1140 amostras por hora. Desta forma, o método proposto pelos autores mostrou-se uma alternativa adequada e viável aos métodos volumétricos comumente utilizados na análise química (BARIN *et al.*, 2015).

Uma nova abordagem da TIE foi proposta por Ferreira (2016) com o objetivo de determinar a acidez total em refrigerantes e acidez total, fixa e volátil em vinho tinto, branco e espumante. Neste estudo, as microplacas de poliestireno comumente empregadas na TIE foram substituídas por microplacas de papel filtro com o objetivo de reduzir ainda mais a quantidade de resíduos gerada e aumentar a sensibilidade. Para isso, as microplacas utilizadas foram fabricadas pelo método de impressão a jato de cera considerando as mesmas dimensões das microplacas tradicionalmente utilizadas. Com isso, foi possível obter microplacas com facilidade, baixo custo, portabilidade e biodegradabilidade. Concordâncias entre 96 e 104% em relação aos métodos oficiais foram obtidas com o método proposto. Em termos de frequência de análise, foi possível determinar a acidez total de 480 amostras por hora e de 120 amostras no mesmo período para determinação de acidez fixa. Além disso, o uso de microplacas em papel permitiu a pré-concentração das amostras para a análise de acidez fixa em um tempo relativamente baixo, tendo em vista que a quantidade de amostra utilizada é significativamente menor. Em termos de gasto de reagentes e de amostra, estes foram reduzidos em cerca de 200 vezes em relação ao método convencional, sendo que o gasto energético foi 60 vezes menor quando a TIE em microplacas foi empregada, indicando um menor impacto ambiental e maior eficiência de análise (FERREIRA, 2016).

Uma alternativa para o controle de qualidade de vinagres com relação a determinação da acidez foi proposta empregando a TIE. Foi feita a determinação da acidez total, fixa e volátil de seis tipos de vinagres empregando microplacas de poliestireno como reatores. Neste trabalho, foi necessária uma etapa de preparo de amostra para a determinação da acidez fixa, sendo que a etapa de determinação foi feita nos mesmos reatores previamente utilizados, evitando o manuseio excessivo da amostra. Com o emprego da TIE, as possíveis interferências inerentes a cor de algumas amostras durante a determinação da acidez pelo método oficial não foram observadas, visto que é feita a avaliação somente da variação da temperatura no meio. De acordo com os resultados obtidos, foi possível realizar a determinação da acidez com adequada precisão das medidas, que foram de 1,7 e 2,4% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente. Dentre as principais vantagens do método proposto em relação a determinação por volumetria de neutralização estão a elevada frequência de análise (até 480 amostras por hora), redução no consumo de reagentes em 4 vezes e de energia elétrica em 10 vezes. Foi feita ainda a avaliação da exatidão do método proposto, o qual apresentou concordâncias entre 93 a 108% com o método oficial de análise, mostrando-se uma alternativa adequada para aplicação em rotinas laboratoriais (TISCHER *et al.*, 2017).

Outra aplicação recente da TIE explorou o efeito do calor de diluição para determinação do teor alcoólico de bebidas destiladas. Os métodos disponíveis para determinação de etanol em bebidas alcoólicas geralmente requerem altas quantidades de amostra. Além disso, requerem normalmente uma etapa prévia de preparo de amostra, tornando estes métodos morosos e caracterizados por um elevado gasto energético. Com o objetivo de contornar estas desvantagens e buscando uma análise simples e rápida, sem a necessidade de etapas de preparo de amostra, a TIE foi proposta para determinação do teor alcoólico em vodka e cachaça. Neste trabalho, parâmetros tais como o volume total, velocidade de dispensação, velocidade de agitação e a proporção dos reagentes foram otimizados no método para obtenção de resultados mais precisos e exatos. De acordo com este trabalho, a concordância obtida entre a TIE com a determinação pelo método oficial foi de 99,4 a 100,9%, mostrando adequada exatidão. Com relação aos aspectos relacionados ao impacto ambiental, empregando a TIE o tamanho da amostra utilizada foi 83 vezes menor em relação ao método oficial. Além disso, nenhum reagente tóxico foi necessário para as análises, sendo realizada utilizando-se como reagente apenas água. Em termos de gasto energético, a TIE permitiu a determinação do teor alcoólico em bebidas destiladas utilizando cerca de 10.600 vezes menos energia, estando de acordo com a química analítica verde. Deste modo, a TIE apresentou-se como uma técnica promissora na

área de controle de qualidade químico em diversos campos, sendo que diversas aplicações ainda podem ser desenvolvidas (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Recentemente a TIE foi aplicada como técnica de determinação simultânea do teor de sal e de acidez em amostras de picles. Neste estudo foi feita uma prévia investigação da possibilidade do uso de diferentes ácidos para a determinação de acidez, sendo que, os resultados obtidos mostraram que tanto ácido láctico quanto ácido acético podem ser utilizados para a determinação da acidez total das amostras. Além disso, foi feito um estudo em relação a possíveis interferentes utilizados no processamento das amostras tais como açúcar e condimentos, os quais não comprometeram a exatidão dos resultados obtidos por TIE em comparação ao método oficial. Com o emprego da TIE para avaliação da qualidade das amostras uma concordância compreendida entre 94 e 103% foi obtida em comparação ao método oficial de análise. Além disso, o método proposto pelos autores possibilitou a determinação da acidez total e do teor de sal em 4 amostras diferentes por minuto. Desta forma, a frequência de análise alcançada pela TIE chega a 240 determinações de ambos os parâmetros por hora, o que levaria até dois dias para análise de acordo com o método oficial. Esta nova abordagem permite a determinação de dois parâmetros de qualidade de amostras de picles com uma frequência de análise que pode chegar a até 48 vezes maior em comparação ao método oficial, impactando diretamente em menor custo de análise, sendo ideal para aplicação em rotinas laboratoriais (TISCHER *et al.*, 2017).

2.4 QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

O aumento exponencial da população mundial aliado à industrialização são os principais fatores que proporcionaram o desequilíbrio ambiental atual. Isso se deu principalmente pela substituição da mão de obra pela mecanização, requerendo desta forma maiores quantidades de energia e poluindo de forma mais substancial o meio ambiente. Esta questão ambiental vem afetando diretamente a saúde humana e animal, sendo um problema mundialmente discutido há anos. Neste contexto, temas relacionados ao desenvolvimento sustentável têm crescido nos últimos anos e diversas áreas vem se adaptando ao uso de alternativas mais ambientalmente corretas quando se trata de novos produtos, processos de fabricação, metodologias analíticas e materiais utilizados no processamento de produtos. Neste cenário atual, a química é uma das ciências que mais contribui com a poluição ambiental, em virtude de que, materiais de origem química são utilizados em indústrias de diversos ramos e, quando descartados, acabam por agravar ainda mais a poluição ambiental. Com base nessas afirmações, uma nova tendência

surgiu na década de 90, buscando através da química, aumentar a sustentabilidade ambiental. Essa nova área denominada de química verde, prevê o desenvolvimento sustentável principalmente do setor industrial, buscando empregar processos de larga escala que permitam a produção de forma menos poluente. Neste contexto, indústrias farmacêuticas, automotivas, aeroespacial, cosmética, eletrônica, de alimentos, assim como áreas como a de síntese de novos produtos e de controle de qualidade em geral, dentre outras, têm buscado cada vez mais substituir antigos processos químicos prejudiciais ao meio ambiente por processos que sejam mais ambientalmente corretos (FEKETE *et al.*, 2009; GALUSZKA *et al.*, 2013; HAQ *et al.*, 2017; KÜMMERER, 2017).

A partir da química verde, no ano de 2000, foi criada a subárea relacionada com a etapa de controle de qualidade chamada de química analítica verde, a qual é focada principalmente no uso de práticas de análise laboratoriais mais ambientalmente corretas. Busca-se uma condição de compromisso durante o desenvolvimento de métodos analíticos que contemplem a obtenção de resultados com qualidade similar ou superior aliado a redução do impacto ambiental, dos riscos operacionais e do custo de execução (ANASTAS & WARNER, 1998; GALUSZKA *et al.*, 2013; VACCARO, 2016; HAQ *et al.*, 2017).

Conceituada como um design de química sustentável, a química analítica verde tem impulsionado uma grande quantidade de pesquisas no mundo todo a fim de projetar produtos e metodologias que sejam ambientalmente corretas, seguras e economicamente viáveis. O cerne da química analítica verde é embasado em 12 princípios básicos, os quais ajudam a alcançar maior sustentabilidade através do desenvolvimento de métodos inovadores através de um correto planejamento e concepção sistemática dos métodos de análise. Dentre estes princípios básicos, os mais importantes a serem atingidos são a diminuição ou eliminação de produtos químicos, que refletem diretamente na prevenção de geração de resíduos, bem como o uso de solventes e reagentes seguros, aumento da eficiência energética e redução da derivatização de substâncias no caso de análises cromatográficas. Com isso, são alcançadas melhores condições ambientais e de saúde dos operadores. Entretanto, muitas vezes não é possível a remoção de produtos químicos durante as etapas de processos, sendo que vários autores indicam a viabilidade na reutilização destes compostos através de técnicas de purificação, diminuindo desta forma a emissão de poluentes ao ambiente. Outro ponto bastante importante em relação a química verde está relacionado com a possibilidade em utilizar reagentes oriundos de fontes renováveis ao invés de reagentes de origem não renovável, diminuindo assim o impacto ambiental (ANASTAS & EGHBALI, 2010; GALUSZKA *et al.*, 2013; PENA-PEREIRA *et al.*, 2015).

Buscando uma maior sustentabilidade dos métodos analíticos, técnicas de análise direta, sem a necessidade de uma etapa de preparo de amostra são consideradas uma alternativa viável para o aumento do caráter sustentável das análises químicas. Além disso, o uso de técnicas automatizadas, onde não é necessário um operador, proporciona um aumento da segurança do procedimento, sendo este um dos princípios básicos da química analítica verde. Outro ponto importante está relacionado com a necessidade de uso de diversos equipamentos para a análise química, o que demanda em sua maioria, maiores gastos de energia, assim como de reagentes. Neste sentido, técnicas analíticas que permitem a determinação de diversos analitos simultaneamente, são consideradas alternativas verdes em comparação ao uso de diversas técnicas para uma análise completa (ANASTAS & EGHBALI, 2010; GALUSZKA *et al.*, 2013; ELDIN *et al.*, 2016).

Outra questão de grande importância relacionada com o maior caráter sustentável da química analítica está relacionado a possibilidade em utilizar métodos miniaturizados. Isso se dá principalmente pelo fato de que, quanto menores forem as exigências em termos de quantidade de amostra, assim como de reagentes, menores serão os resíduos gerados, tornando estes métodos mais ambientalmente corretos. No entanto, alguns métodos miniaturizados por vezes tornam-se questionáveis em termos de exatidão, precisão e sensibilidade visto que, como por exemplo em análises de traços, amostras muito pequenas podem acarretar prejuízo destas análises e das figuras de mérito devido aos erros de amostragem (ANASTAS & EGHBALI, 2010; GALUSZKA *et al.*, 2013; KÜMMERER, 2017).

2.4.1 Frasco único de reação

Um dos 12 princípios da química analítica verde é a integração de processos, com o objetivo de realizar todas as etapas necessárias para a análise empregando um único frasco reacional. Neste sentido, a ocorrência de problemas relacionados com a exatidão e precisão do método, relacionados a perdas e contaminações de analitos, podem ser contornados quando o uso de um único frasco de reação é utilizado. Isso se deve ao fato de que todas as etapas envolvidas na análise são feitas no mesmo reator, diminuindo assim a incidência de erros aleatórios e sistemáticos na análise, proporcionando resultados satisfatórios. Nessa alternativa, o principal objetivo é integrar todas as etapas analíticas em um menor número de etapas possível utilizando um único frasco reacional. Este processo possibilita o uso de menores quantidades de reagentes, menor tempo de execução, menor consumo energético, assim como menores emissões de poluentes ao meio ambiente (ANASTAS & EGHBALI, 2010; GALUSZKA *et al.*, 2013).

Uma forma de integração de processos bastante elegante é o uso de microplacas com função de frasco único de reação, onde todas as etapas envolvidas durante uma análise química são feitas em um único poço, ou seja, desde a etapa de preparo de amostra até a etapa de determinação. Com o uso destes métodos miniaturizados juntamente com a integração de processos é possível desenvolver métodos de controle de qualidade simples, rápidos, apresentando sensibilidade, exatidão e precisão adequada mesmo quando pequenas quantidades de amostra e reagentes são empregadas. Além disso, utilizando um único frasco para execução do procedimento analítico, a eficiência do método analítico é aumentada, permitindo na maioria dos casos, maior frequência analítica, o que é de extrema importância principalmente no desenvolvimento de métodos analíticos utilizados em análises de rotina (ANASTAS & EGHBALI, 2010; GAŁUSZKA *et al.*, 2013; DALLA NORA *et al.*, 2018).

A integração de processos pelo uso do frasco único reacional tem sido amplamente empregada na área de síntese de substâncias orgânicas. Empregando um único frasco para a execução das reações químicas na área de síntese orgânica permite a obtenção de produtos de forma mais ambientalmente correta. Isso se deve principalmente pelo fato de que todas as etapas envolvidas, tais como reação, extração e purificação dos compostos são feitas no mesmo reator, acarretando em menor consumo de solventes e reagentes. Neste contexto, diversos estudos vem sendo desenvolvidos nos últimos anos para melhoria da eficiência dos processos de obtenção de energia e reciclagem de materiais nos quais são destacados os benefícios ambientais que são alcançados (KLEMEŠ *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; FITZPATRICK & LEY, 2016; HAYASHI, 2016; FAN *et al.*, 2018).

2.4.2 Análise métrica aplicada à química analítica verde

Os laboratórios químicos possuem um importante papel em relação a sustentabilidade ambiental, visto que contribuem significativamente para a poluição do ar, água e solo. Neste contexto, a ideia de química verde tem atraído todos os setores relacionados à química, especialmente a área de química analítica, com o objetivo de aperfeiçoar os métodos já consagrados para torná-los mais ambientalmente corretos. No entanto, durante o desenvolvimento de novas metodologias analíticas buscando benefícios ao meio ambiente, torna-se necessário uma análise criteriosa afim de tornar os ganhos ou perdas palpáveis. Hoje em dia já existem diversas ferramentas que podem ser empregadas para avaliação do caráter sustentável de processos e métodos de análise, tais como a Análise de Ciclo de Vida (LCA, do inglês *Life Cycle Assessment*), Índice Nacional de Métodos Ambientais (NEMI, do inglês

National Environmental Methods Index), Escala Ecológica Analítica e o Índice de Procedimento Analítico Verde (GAPI, do inglês *Green Analytical Procedure Index*) (EPA, 2006; KEITH *et al.*, 2007; CINELLI *et al.*, 2014; TOBISZEWSKI *et al.*, 2015; PARR & SCHMIDT, 2018; PŁOTKA-WASYLKA, 2018).

A análise do ciclo de vida de um produto ou de uma metodologia analítica consiste na avaliação quantitativa de todos os materiais envolvidos desde a sua produção até o descarte final. Essa ferramenta permite avaliar o impacto ambiental e, com base nos dados obtidos, aperfeiçoar tanto os processos produtivos, de controle de qualidade até o descarte final, objetivando a obtenção de metodologias menos agressivas ao meio ambiente (EPA, 2006; PARR & SCHMIDT, 2018). Contudo, a obtenção dos dados e dimensionamento de todas as variáveis associadas a cada material utilizado na análise química é frequentemente morosa e em muitos casos de difícil execução, tornando sua aplicabilidade limitada.

Outra ferramenta que pode ser empregada com o objetivo de avaliar o potencial verde de métodos analíticos é o NEMI. Esta abordagem avalia o impacto ambiental de forma qualitativa, indicando se os métodos são menos ou mais agressivos ao meio ambiente. Essa ferramenta permite a interpretação do índice verde de procedimentos com base nas cores utilizadas em uma circunferência dividida nas seguintes partes: risco operacional, consumo de energia, consumo de reagentes e volume de resíduo gerado. Os quatro campos da circunferência recebem cores (verde, laranja ou vermelho) de acordo com a gravidade do impacto ambiental, as quais são estabelecidas com base em valores pré-definidos. Desta forma, quanto maior a porcentagem coloração verde na figura, maior o caráter sustentável seja do método analítico ou dos procedimentos para obtenção de algum produto (RAYNIE, 2009; TOBISZEWSKI *et al.*, 2015).

Utilizando uma escala numérica, a Escala Ecológica Analítica é uma forma de avaliação da sustentabilidade dos métodos analíticos. Essa abordagem emprega um valor máximo de caráter verde de 100 pontos, sendo que a cada penalidade contrária a sustentabilidade ambiental dos métodos, são subtraídos desta pontuação valores pré-definidos que vão de 0 a 3. Desta forma, quanto mais próximo à 100 pontos, maior o caráter sustentável da metodologia em avaliação. A avaliação através da Escala Ecológica Analítica leva em consideração características tais como a quantidade de reagentes empregada, potenciais riscos oferecidos ao laboratorista, quantidade de resíduos gerados, bem como o consumo de energia necessário para a execução dos procedimentos. Neste sentido, esta ferramenta permite avaliar em termos

quantitativos o impacto ambiental dos procedimentos adotados em uma escala de 0 a 100 (GAŁUSZKA *et al.*, 2012).

Recentemente uma nova ferramenta foi desenvolvida com o objetivo de avaliar um maior número de informações, buscando considerar desde a etapa de coleta da amostra até a obtenção dos resultados finais de uma análise química. Esta nova abordagem alia as qualidades das outras ferramentas disponíveis para avaliação da sustentabilidade ambiental com uma maior diversidade de informações. Neste sentido, o GAPI baseia-se no uso de 5 pictogramas subdivididos em 2, 3 ou 4 regiões, as quais correspondem individualmente por uma informação específica do método analítico estudado. Dentre as informações utilizadas para a avaliação do caráter verde do método analítico, tem-se os aspectos relacionados a etapa de coleta e preservação da amostra, etapa de preparo da amostra, uso de reagentes e compostos e informações relacionadas às técnicas instrumentais empregadas durante a análise. Como os pictogramas são subdivididos em 2, 3 ou 4 regiões, uma vasta quantidade de informações podem ser obtidas dessas imagens, visto que cada uma recebe uma cor (na escala de verde ou amarelo) dependendo do impacto ambiental que causam ao meio ambiente (PŁOTKA-WASYLKA, 2018).

Para a avaliação através do uso da ferramenta GAPI, Plotka-Wasyłka (2018) indica que deve-se levar em consideração informações relacionadas a coleta, preservação, transporte e estocagem da amostra. Além disso, as informações relacionadas ao tipo de método empregado (direto ou indireto), escala de extração, uso de solventes e reagentes, bem como a necessidade de tratamentos adicionais são consideradas em uma primeira etapa. Em relação ao tipo de reagentes e solventes empregados durante a execução dos procedimentos analíticos, informações relacionadas a quantidade e a segurança destes produtos tanto ao operador como ao ambiente de trabalho são consideradas. Por fim, o GAPI faz uma análise referente ao caráter poluidor em termos de emissão de gases poluentes ao meio ambiente através da eficiência energética do método analítico e da quantidade de resíduos geradas ao meio ambiente (PŁOTKA-WASYLKA, 2018).

Neste contexto, é possível observar que esta última ferramenta tende a ser superior às demais, visto que leva em consideração 15 parâmetros importantes para a qualificação do grau de sustentabilidade de métodos analíticos. Além disso, os pictogramas gerados através das informações mencionadas anteriormente permitem uma boa interpretação dos resultados finais, sendo ideal para um entendimento rápido e fácil dos resultados obtidos.

Considerando as informações expostas nos itens abordados até aqui, é importante destacar que normalmente os métodos oficiais para controle de qualidade químico são laboriosos e complexos, envolvem a utilização de elevadas quantidades de reagentes e amostra, requerem muito tempo de execução, necessitando infraestrutura adequada e pessoal especializado. É importante ainda mencionar que estes métodos são muitas vezes inviáveis ao ponto de vista de aplicação em análise de rotina, pois não permitem o monitoramento contínuo durante processos industriais, tendo seu uso restrito em laboratórios. Neste contexto, a crescente demanda com relação à qualidade na indústria de alimentos nos últimos anos impulsionou o aumento no interesse pelo desenvolvimento de novos métodos de controle de qualidade capazes de garantir uma análise rápida, eficiente e de baixo custo. Desta forma, o emprego de métodos analíticos capazes de suprir essas necessidades, apresentando-se mais vantajosos em relação aos métodos convencionais são uma tendência em rotinas laboratoriais. Além disso, ganham destaque neste panorama quando estão de acordo com as bases da química analítica verde, quando buscam menor impacto ambiental (GAŁUSZKA *et al.*, 2013).

Diante disto, métodos analíticos que apresentem maiores vantagens em termos ambientais são de grande interesse. Desta forma, levando em consideração as desvantagens da maioria dos métodos oficiais, e o grande potencial da TIE já relatado na literatura, são propostos neste trabalho, métodos de análise química de parâmetros importantes usados para o controle de qualidade de óleos comestíveis, medicamentos e saneantes por entalpiometria no infravermelho. O presente trabalho propõe o uso de métodos analíticos em escala miniaturizada e com o emprego de um único frasco de reação como forma de integração de processos. Com a combinação da TIE com microdispositivos adequados, o calor liberado pelas reações químicas foi explorado onde as desvantagens citadas acima foram minimizadas ou, até mesmo, eliminadas. Além disso, buscou-se no decorrer do desenvolvimento das aplicações, redução significativa no consumo energético, de reagentes, do tempo de análise e do tamanho da amostra utilizada, refletindo em menor impacto ambiental em comparação aos métodos oficiais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos métodos analíticos miniaturizados envolvendo termografia no infravermelho e frasco único de reação para controle de qualidade de alimentos, medicamentos

e saneantes empregados em indústrias de diversos ramos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para determinação do índice de saponificação em diferentes óleos vegetais e otimizá-lo em termos de massa de amostra utilizada, tempo de saponificação durante a etapa de preparo de amostra e em termos de velocidade de agitação e taxa de dispensação durante a etapa de determinação
- Desenvolver um método analítico para determinação da uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril e otimizá-lo durante a etapa de determinação em termos de razão entre os reagentes, velocidade de agitação e taxa de dispensação.
- Desenvolver um método analítico para determinação do teor de cloro ativo em saneantes utilizados em indústrias de ramo farmacêutico e de alimentos e otimizá-lo durante a etapa de determinação em termos de velocidade de agitação e taxa de dispensação.
- Aplicar os métodos propostos para diferentes amostras e avaliar a exatidão e o impacto ambiental dos mesmos pela comparação dos resultados com os obtidos por métodos oficiais.
- Realizar uma avaliação comparativa entre os métodos oficiais e os métodos propostos em termos de sustentabilidade ambiental pela aplicação do GAPI.

4 ARTIGO 1:

**Miniaturized, High Throughput And Green Determination Of
Saponification Value Of Edible Oils Using Thermal Infrared Enthalpimetry**

Periódico: Analytical Methods (FI: 2,038, Estrato Qualis: A2)

Submetido em: 19 de março de 2018, Aceito em: 9 de junho de 2018.



Cite this: DOI: 10.1039/c8ay00597d

Miniaturized, high-throughput and green determination of the saponification value of edible oils using thermal infrared enthalpimetry

Flavia Michelin Dalla Nora,^a Alessandra Stangherlin Oliveira,^a Bruna Nichelle Lucas,^a Daniele de Freitas Ferreira,^a Fábio Andrei Duarte,^b Renius Oliveira Mello,^a Alexandre José Cichoski^a and Juliano Smanioto Barin^{a*}

Saponification value (SV) is one of the parameters used to evaluate the quality of edible oils, and it is determined by titration after heating the oil with KOH solution. This method is time-consuming, and requires a high amount of reagents and energy to perform the analysis. In the present study, the determination of SV is proposed using thermal infrared enthalpimetry (TIE) in a high-throughput and green way. Sample preparation and determination steps were performed in the same vessel (polypropylene microplate), which was adapted for the simultaneous preparation of 24 samples and determination of the remaining KOH by TIE. Optimization of parameters such as sample mass, heating time, stirring speed and dispensing rate was performed and the best conditions found were 120 mg, 5 h, 250 rpm and 0.57 mL s⁻¹, respectively. Subsequently, the SVs of canola, corn, olive, rice, soy and sunflower oils were determined by TIE and the results were compared with those obtained by AOAC 920.160; no statistical differences were found (Student's *t*-test, *p* > 0.05). A decrease in the sample mass and reagent consumption of up to 41 times was observed. Additionally, TIE allowed a sample throughput of at least two orders of magnitude higher than the conventional method, showing its feasibility for routine analysis. In addition, a reduction in energy consumption of 625 times was observed. Therefore, the proposed TIE method allowed the determination of the SVs of edible oils in a simple and high-throughput way in accordance with the principles of green analytical chemistry.

Received 19th March 2018
Accepted 9th June 2018

DOI: 10.1039/c8ay00597d
rsc.li/methods

1 Introduction

Edible oils are largely used for human consumption in crude and processed forms, and are composed mainly of triglycerides and free fatty acids. Several analytical methods have been used to evaluate the quality of oils by determining the acidity, iodine index and peroxide and saponification values (SVs), which offer information about raw and processed oils.^{1–4} SV represents the amount of KOH required for the saponification of 1 g of oil under the conditions specified, which is related to the average molecular weight (or chain length) of fatty acids present in the oil and can be used to identify adulteration.⁵

Conventionally, SV is determined by titration after boiling the sample under reflux with KOH in ethanolic solution for at least 30 min, as recommended by AOAC International.⁵ Other similar methods recommended by the American Oil Chemists' Society (AOCS) and Institute Adolfo Lutz (IAL, Brazil) are used,

but long analysis time and high energy and sample consumption are required.^{6,7} Therefore, the use of large amounts of chemicals, samples and energy are aspects of environmental concern related to these methods.⁸ In addition, these time-consuming methods require the higher focus of the analysts, the lack of which would impair the throughput and affect routine analysis.

Taking these aspects into account, studies have proposed alternative methods for SV determination aimed at minimizing these problems; for example, near-infrared spectroscopy^{9,10} and nuclear magnetic resonance¹¹ spectroscopy combined with chemometrics have been used. However, even though these methods are in accordance with some aspects of green analytical chemistry, they are characterized by the use of high cost instruments and several steps are involved in method development, impairing their use in routine analysis.

In this context, the development of methods that minimize the amount of reagents, sample and energy consumption is an important task for the improvement of routine analysis towards green analytical chemistry.^{8,12} Recently, a new analytical technique known as thermal infrared enthalpimetry (TIE) was developed as an alternative to classical titration methods. This technique combines infrared thermal imaging with

^aDepartamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: juliano@ufsm.br; Fax: +55-55-3220 9445; Tel: +55-55-3220 9445

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

enthalpimetric analysis and provides a fast, simple, inexpensive and high-throughput analysis.¹³ TIE is based on the determination of the difference in temperature caused by the addition of a stoichiometric excess of reagents, which enables an accurate determination of several analytes.^{13,14} The reaction was performed by a direct injection method, in which one aliquot of reagent in stoichiometric excess is added to the sample or reference solutions. For this purpose, disposable microplates and electronic multichannel pipettes were used. The analytical signals were obtained by the difference of temperature before and after reagent injection. Temperature variation was monitored by an infrared camera, which allowed the determination of the temperature of several wells simultaneously and without contact.¹³

A study using TIE was conducted to determine the acidity of vinegar, reaching a sample throughput one order of magnitude higher than the conventional method. In addition, the sample volume was minimized by 8.3-fold in relation to the conventional method, saving more than one order of magnitude of the requirement of energy.¹⁴ The alcoholic content of distilled beverages was also determined by TIE, using only one step for analysis by the simple addition of water to the beverages. In this study, the heat of dilution of ethanol with water was explored and a unique step (water addition on beverage) was required for the analysis. Using this green approach, energy consumption and analysis time were reduced by three orders of magnitude, making it possible to analyze 480 samples in the time in which only one sample would typically be analyzed by the conventional method.¹⁵ The simultaneous determination of the total acidity and salt content of pickled vegetables was proposed using TIE. A stoichiometric excess of NaOH and AgNO₃ was inserted in microplate wells for further sample addition. Based on the heat dissipated from the reactions, the total acidity and salt content were determined simultaneously, and the agreement ranged from 94% to 103%. Using the TIE method, an increase by 48-fold of the sample throughput was achieved, making it a suitable green alternative for use in routine analysis.¹⁶

Taking into account the features of TIE, a high-throughput and miniaturized determination of SVs was performed in this study. The same vessel was used for both the sample preparation and the determination steps, *i.e.*, a 24-well microplate. This integration of analytical operations using a single flask for all steps was proposed to decrease waste generation and time consumption for measurements. A special device was constructed to control evaporation during heating. The influence of the sample mass and time of heating was investigated. Parameters such as stirring speed and dispensing rate were evaluated for the determination of the residual KOH by TIE. Accuracy evaluation was performed by a comparison of the results obtained by the conventional method (AOAC 920.160) with the proposed method.

2 Experimental

2.1 Instrumentation

A long wave infrared camera (7.5–13.0 μm , FLIR E60 model, FLIR, USA) was used, providing images of 320 \times 240 pixels at a frame rate of 30 Hz. The software ResearchIR (FLIR, version

3.5) was used to evaluate the images. The reactions were carried out in disposable polypropylene 24-well microplates (Evergreen Scientific, USA) with an internal volume of 3.0 mL in each well. An electronic multichannel pipette (eight channels) with a volume from 0.050 to 1.200 mL (Pro Research 1200, Eppendorf, Germany) and a magnetic stirrer (Centauro, Brazil) were used for the reaction. A heating oven (DeLeo, Brazil) was used for oil saponification. An ultrathermostatic bath (SL 152/10 model, Solab, Brazil) was used for cooling and a heating plate (Centauro, Brazil) was used to boil the sample, as described in the conventional method (AOAC 920.160). Energy consumption was measured by a power meter (Fluxe 43B model, Fluke Corporation, Everett, USA).

2.2 Samples, reagents and standards

Samples of canola, corn, olive, rice, soy and sunflower oils from different manufacturers were purchased in a local market (Santa Maria city, RS, Brazil). Potassium hydroxide (Vetec, Brazil) standardized with sulfuric acid (Vetec, Brazil) was used to construct the calibration curve to determine the SV. Hydrochloric acid PA (Vetec, Brazil) was used to prepare the solution of the reagent in stoichiometric excess in TIE and also for the titration following the conventional method. Ethanol (99.8%, Dinâmica, Brazil) was previously dried with calcium oxide (Dinâmica, Brazil) and further filtered to prepare all solutions according to the method specified in AOAC 920.160.⁵

2.3 Optimization of sample preparation and TIE determination parameters

Sample mass and heating time were evaluated for the saponification step. Masses of 30, 45, 60, 90, 120 and 150 mg were evaluated in the sample preparation. The stirring speed and dispensing rate were evaluated for TIE measurements using an ethanolic solution 0.7 mol L⁻¹ KOH as the reference solution and an ethanolic solution 1.0 mol L⁻¹ HCl as the reagent in stoichiometric excess in the same proportion. Then, the heating time was evaluated over 1, 2, 3, 4 and 5 h. The stirring speed in the range of 50 to 350 rpm was evaluated, as was the dispensing rate of the multichannel pipette from 0.46 to 0.71 mL s⁻¹. All results were evaluated considering the relative standard deviation (RSD) of measurements and the accuracy of the proposed method based on the comparison of the results obtained with the AOAC 920.160 method.

2.4 TIE analysis

Samples were weighed directly in the microplate wells using a syringe. Then, the standardized KOH ethanolic solution (0.7 mol L⁻¹, 1.2 mL) was added for sample saponification. A polytetrafluoroethylene-covered magnetic stir bar (3.0 \times 6.5 mm) was used for homogenization. Aluminum foil was used to close the microplate after homogenization, and a device was constructed using two aluminum plates fixed with two screws to avoid the loss of solution by evaporation during heating (Fig. 1). This system was heated at 90 °C in an oven for up to 5 h, followed by a step of solvent evaporation for 30 min directly in the uncovered microplate. After evaporation, the microplates were

left undisturbed at room temperature and the residues were dissolved in 1.2 mL of ethanol, followed by the addition of stoichiometric excess of ethanolic HCl solution (1.0 mol L^{-1} , 1.2 mL) for the determination of the remaining potassium hydroxide (Fig. 2).

The temperatures of the reactions were monitored before, during and after HCl addition. An infrared camera was attached to a tripod at a distance of 40 cm from the microplates. An enthalpogram was plotted using the average of the data obtained for each well. A circle with 180 pixels was used in the software to monitor the reactions, as described in previous studies.^{13,14} The difference in temperature was calculated using the mean of the temperatures 2 s before and after the reaction, using the equation $\Delta T = T_f - T_i$, where T_f is the final temperature and T_i is the initial temperature. The temperature and relative humidity were corrected in the software for all measurements.¹³ The SVs were obtained based on the amount of KOH consumed by saponification based on a previous least-squares calibration curve constructed with reference solutions of KOH (ranging from 0.09 to 0.7 mol L^{-1}). Blanks were analyzed using purified water instead of KOH solutions in the wells, following the same procedure used for the reference solutions and samples.

2.5 Analysis by the conventional method

The SV was determined by the conventional method (Fig. 2) according to AOAC 920.160.⁵ Five grams of filtered oil was weighed into an Erlenmeyer flask and 50 mL of ethanolic 0.7 mol L^{-1} KOH was added. The flask was connected to a condensing unit and heated for 30 min until complete saponification of the oil. Subsequently, 0.5 mol L^{-1} HCl was used for titration using a phenolphthalein indicator. A blank was performed using the same volume of water instead of KOH solution.

3 Results and discussion

3.1 Evaluation of the influence of sample preparation and determination parameters

The influence of the sample mass and heating time during sample preparation, stirring speed, and dispensing rate during

the SV determination were investigated using sample D of olive oil. The evaluations were carried out using an ethanolic solution of 0.7 mol L^{-1} KOH and the results were compared in terms of the agreement with AOAC 920.160 and RSD data (Fig. 3).

According to Fig. 3A, statistical differences were not found in relation to the conventional method when different masses of the sample were used. However, the lowest RSD (1.7%) was achieved using a sample mass of 120 mg. This result was expected, since the use of a low sample mass increases the weighing error; for example, a sample mass of 30 mg provided an RSD value of 7.7%. On the contrary, when the sample mass was increased, there was a higher consumption of KOH. This resulted in a reduction in the amount of residual KOH and a decrease in the temperature from the reactions in TIE, which can also influence the RSD. In addition, the increase in the sample mass provided higher soap formation and impaired homogenization during the injection of the excess reagent, thus providing a higher RSD. The use of a sample mass of 150 mg resulted in an RSD of 3.5%. As a consequence, the sample mass was fixed at 120 mg for heating time-optimization. This amount of sample is more than 40 times lower in relation to the conventional method.

A heating time of 5 h provided the lowest RSD values (1.3%) because in shorter times, the precision of the results was impaired, showing a lack of uniformity between the replicates in such conditions. Fig. 3B shows that when 1 h was fixed as the heating time, an RSD value of 6.5% was obtained. On the contrary, when the heating time was higher, the RSD values decreased, which was in agreement with the conventional method since there was greater uniformity between replicates. However, when higher throughput is required, it is possible to use lower heating time if higher RSD values are acceptable. In this context, heating times of 1, 2, 3 and 4 h provided RSD values of 6.5, 7.0, 4.0 and 1.7%, respectively.

Considering a sample mass of 120 mg and heating time of 5 h, the stirring speed and dispensing rate were evaluated. The optimization of the stirring speed is very important, since the signal depends on the homogenization of the solutions. In this sense, this parameter was evaluated to provide accurate determination. The results (Fig. 3C) indicated that when a speed of 150 rpm was used, higher RSD (7.9%) was obtained, which can be attributed to the lack of homogeneity during the addition of the reagent in stoichiometric excess. High stirring speeds also provided higher RSD values, mainly because of the spilling of solutions from the wells. Hence, the speed of 250 rpm was optimum, which provided suitable RSD values (1.3%) in agreement with the conventional method.

In relation to the dispensing rate (Fig. 3D), the lowest deviations were found when a speed of 0.57 mL s^{-1} was used. Lower dispensing rates (0.46 and 0.50 mL s^{-1}) resulted in a relative increase in the SVs. This fact is related to the amount of time the pipette tips remain in front of the camera during the reactions, which influences the data acquisition and impairs the measurements. Faster dispensing rates (0.63 and 0.71 mL s^{-1}) increased the RSD values, mainly as a consequence of the fast dissipation of heat, reflecting in the variation of measurements. Thus, the conditions that provided the lowest deviations among

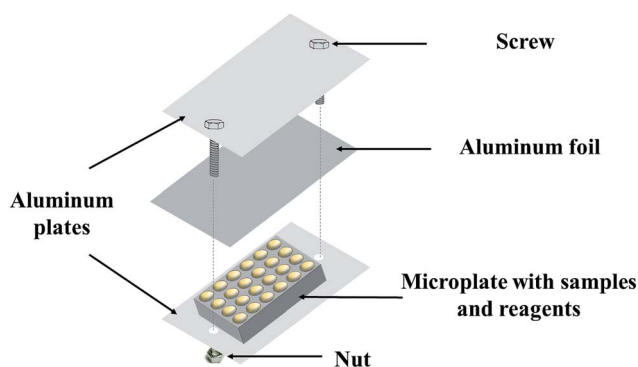


Fig. 1 Microplate device used for heating in an oven.

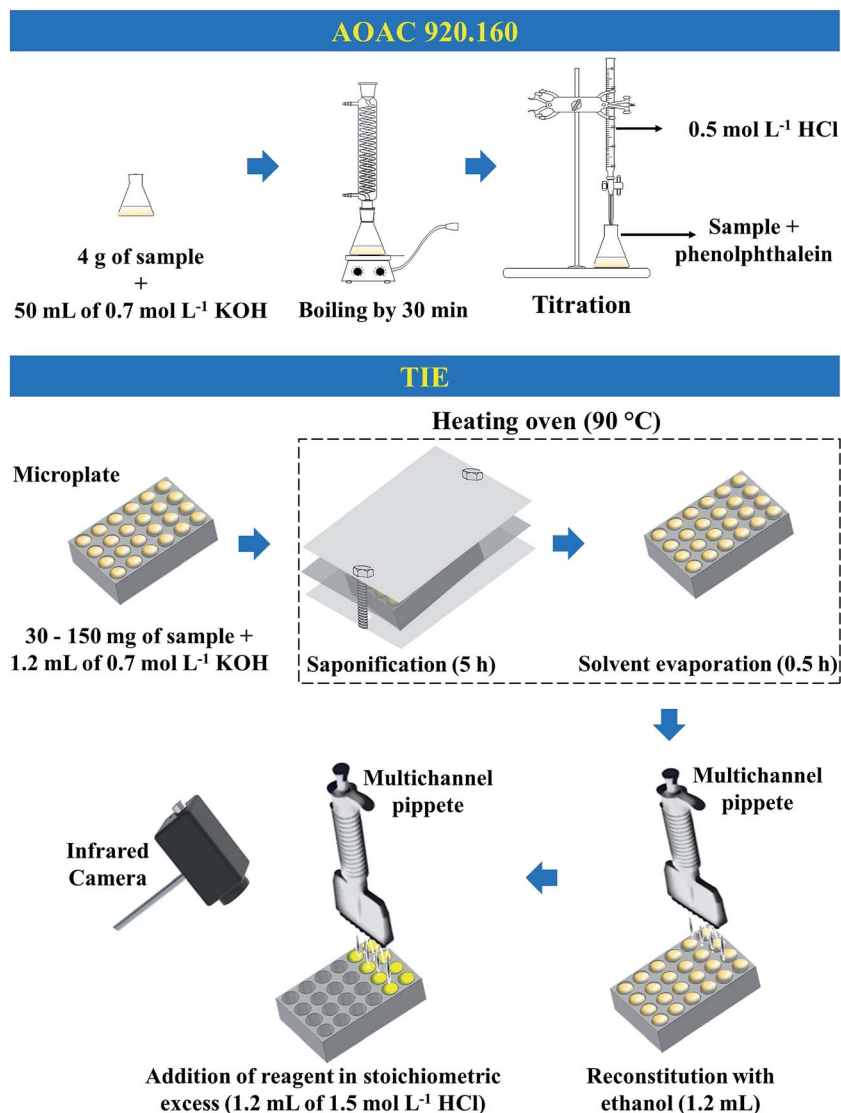


Fig. 2 Procedures used for SV determination in edible oils.

the measurements and suitable agreement with the conventional method were 120 mg, 5 h, 250 rpm and 0.57 mL s⁻¹ for the sample mass, heating time, stirring speed and dispensing rate, respectively. These conditions were chosen for the subsequent SV determination in edible oils.

3.2 SV determination

After TIE optimization, the method was applied to canola, corn, olive, rice, soy and sunflower oils for SV determination. The conventional method based on AOAC 920.160 was used to verify the accuracy of the proposed method. Table 1 shows that there were no significant differences between these methods (Student's *t*-test, $p > 0.05$) and the agreements obtained with the conventional method were suitable, ranging from 97.4% to 102.1% for SV determination. Considering these results (Table 1), the deviations obtained from TIE were slightly higher in comparison with the conventional method. This was attributed to the sample mass used, which was more than 40-fold smaller

in comparison with AOAC 920.160. This modest increase in deviations, however, did not impair the results since RSD values were lower than 2.9%, which is acceptable for routine analysis.

SV is related to the average weight of free fatty acids. The SV values obtained in the analyzed samples ranged from 171.7 ± 3.5 to 196.7 ± 4.4 mg KOH g⁻¹ of oil. It is important to mention that these data are in accordance with the literature.^{1,17}

3.3 Figures of merit

A comparison of the characteristics of the TIE method with the conventional method is shown in Table 2.

Based on the results, it was possible to highlight the reduction in the sample mass from 5 to 0.12 g using the TIE method. In addition, the mass of KOH, HCl, CaO and ethanol decreased by 41-, 2-, 14- and 14-fold, respectively, when TIE was applied for SV determination. A decrease in the use of reagents is well known to reflect in higher operator safety since there is less contact with a large amount of chemicals, decreasing the

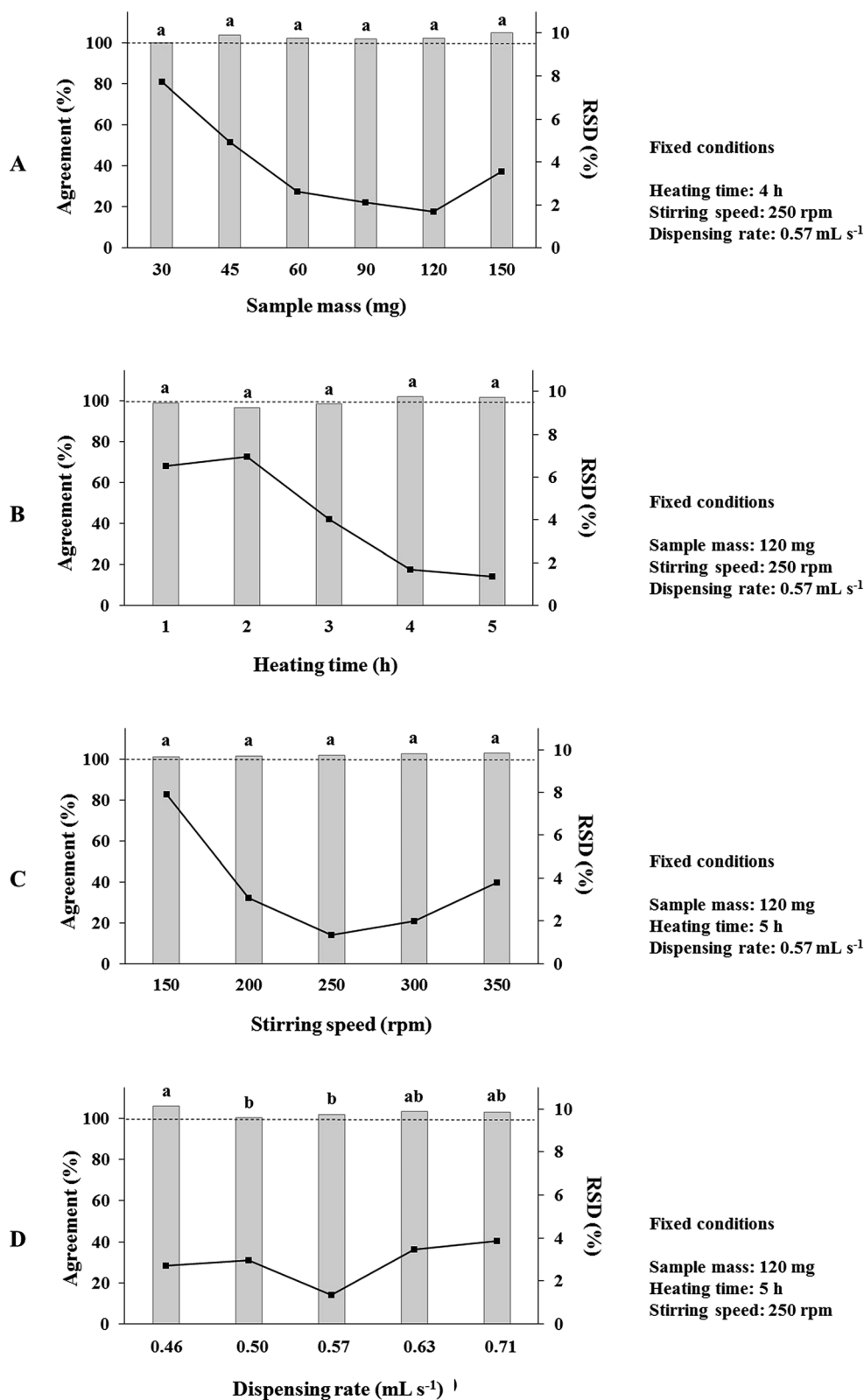


Fig. 3 Influence of the parameters related to sample preparation and determination steps in the TIE method: sample mass (A), heating time (B), stirring speed (C) and dispensing rate (D). Agreement values (gray columns, %) were obtained by the comparison of the results of TIE ($n = 10$) with the official method ($n = 3$, AOAC 920.160) using the olive oil sample D. The same letters indicate no statistical difference (Tukey test, $p > 0.05$).

Analytical Methods

Table 1 Results (mg KOH g⁻¹ of oil; mean \pm standard deviation) for saponification value of edible oils obtained by TIE ($n = 10$) and AOAC 920.160 ($n = 3$) methods

Oil type	Manufacturer	TIE	AOAC 920.160
Canola	A	172.9 \pm 4.2	177.5 \pm 2.1
	B	188.4 \pm 5.4	188.8 \pm 1.2
	C	171.7 \pm 3.5	175.1 \pm 2.0
	D	196.7 \pm 4.4	198.1 \pm 0.6
Corn	A	183.5 \pm 4.4	184.9 \pm 0.4
	B	187.3 \pm 3.8	186.0 \pm 1.2
	C	186.4 \pm 3.7	184.6 \pm 1.3
	D	178.0 \pm 2.8	175.3 \pm 1.9
Olive	A	183.8 \pm 4.3	180.1 \pm 1.9
	B	189.2 \pm 3.3	186.7 \pm 1.2
	C	181.3 \pm 3.4	179.6 \pm 1.7
	D	188.8 \pm 2.5	185.6 \pm 1.5
Rice	A	195.7 \pm 4.2	196.6 \pm 4.5
Soy	A	180.7 \pm 3.3	179.2 \pm 0.8
	B	184.1 \pm 3.3	180.7 \pm 1.7
	C	182.2 \pm 3.6	184.0 \pm 0.7
	D	184.5 \pm 3.7	182.3 \pm 0.3
Sunflower	A	181.7 \pm 3.4	181.5 \pm 0.8
	B	183.7 \pm 2.8	181.3 \pm 2.0
	C	180.5 \pm 4.4	178.0 \pm 2.5
	D	180.7 \pm 3.1	181.5 \pm 0.7

Table 2 Comparison of parameters of merit of TIE with AOAC 920.160 method for saponification value determination of edible oils

Parameters	TIE	AOAC 920.160
Mass of sample (g)	0.12	5.0
Reagent consumption (g per sample)		
Calcium oxide	0.16	2.25
Ethanol	2.80	39.45
Hydrochloric acid	0.04	0.08
Potassium hydroxide	0.05	2.00
Residue generation (g of chemicals per sample)	3.05	43.8
Time spent per run (h)	6 ^a	1 ^a
Sample throughput (samples per h)	180 ^b	1 ^c
Energy consumption (kWh per sample)	0.01 ^d	6.25 ^e

^a Considering one reactor per run (microplate or glassware).

^b Considering one hundred microplates in one oven each run.

^c Considering one distillation apparatus each run. ^d Energy consumed by oven, pipette, infrared camera and magnetic stirrer. ^e Energy consumed by heating plate and ultrathermostatic bath.

physical and health risks. Furthermore, the residue generation decreased by 15-fold (on average) using the proposed method, which is an important and significant feature.

Another important aspect of the TIE analysis is the possibility of determining the SV of four wells simultaneously and twenty four measurements in the same microplate, which provides a high throughput. Despite the 6 h required for each run, the proposed method allows the use of up to 100 microplates in an oven (or even more, depending on the size of the equipment). This finding can be considered to be one of the best advantages of the proposed method since it allows a sample throughput of 180 samples per hour over only one for

conventional method, showing the usefulness of the proposed TIE method for routine analysis.

Conventionally, the TIE method used disposable microplates, but it is possible to wash the plates and reuse the reactors for other samples.¹⁸ Another concern is the environmental impacts: the energy consumed for SV determination in one replicate by TIE was only 0.01 kWh, while the energy consumption for one replicate in the conventional method is 6.25 kWh per sample. Therefore, the proposed TIE method allowed a reduction in energy consumption by a factor of 625. This high amount of energy consumption in the conventional method is mainly related to the heating time since at least 30 min is required the saponification of each sample, which is performed in a heating plate.

Green analytical chemistry concepts have emerged as a great challenge for the development of analytical methods. The miniaturization of methods in analytical chemistry follows this principle because it is concerned with the environmental impact. As a consequence, the development of instrumentation and methodologies that reduce the negative impacts of the analysis has been a focus of several studies. Thus, the application of TIE for SV determination is in accordance with this practice. In the proposed method, the sample amount is reduced, the use of energy is minimized, the safety of the operator is increased, the amount of analytical waste is decreased, and the method accuracy is not compromised, making TIE a promising tool for application in routine analysis for edible oils.^{8,12} Considering the similarity of the procedure for SV determination of different oils, it is expected that the proposed TIE method could be adapted for evaluation of other vegetable oils.

4 Conclusions

The proposed method using TIE combined infrared thermal imaging with enthalpimetric analysis, allowing the effective SV determination of edible oils. The obtained results showed suitable agreement (ranging from 97.4% to 102.1%) with conventional methods in lesser time and higher throughput. Additionally, the proposed method enables the analysis in a single flask and saves energy and reagents, making this tool a reliable, easy-to-use and green alternative method for the routine analysis of oils.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (17/2551-0000979-7) for supporting this study.

References

- 1 İ. Sarıkaya, S. Bilgen and H. Akbaş, *Energy Sources, Part A*, 2016, **38**, 3514–3520.
- 2 M. M. Azam, A. Waris and N. M. Nahar, *Biomass Bioenergy*, 2005, **29**, 293–302.
- 3 M. Bockisch, in *Fats and Oils Handbook*, ed. M. Bockisch, AOCS Press, 1998, vol. 1, ch. 9, pp. 803–808.
- 4 M. Bockisch, in *Fats and Oils Handbook*, ed. M. Bockisch, AOCS Press, 1998, vol. 1, ch. 1, pp. 1–52.
- 5 AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 920.160, *Saponification number of oils and fats*, 2005.
- 6 AOCS, American Oil Chemists' Society, *Official Method Cd 3-25-Determination of saponification value*, American oil chemists' Society, 2013.
- 7 IAL, Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz, *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 1985.
- 8 A. Gałuszka, Z. Migaszewski and J. Namieśnik, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2013, **50**, 78–84.
- 9 H. Li, F. R. Van de Voort, J. Sedman and A. A. Ismail, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, **76**, 491–497.
- 10 Y. Endo, M. Tagiri-Endo and K. Kimura, *J. Food Sci.*, 2005, **70**, C127–C131.
- 11 C. Skiera, P. Steliopoulos, T. Kuballa, B. Diehl and U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **93**, 43–50.
- 12 W. R. Melchert, B. F. Reis and F. R. P. Rocha, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **714**, 8–19.
- 13 J. S. Barin, B. Tischer, A. S. Oliveira, R. Wagner, A. B. Costa and E. M. M. Flores, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 12065–12070.
- 14 B. Tischer, A. S. Oliveira, D. F. Ferreira, C. R. Menezes, F. A. Duarte, R. Wagner and J. S. Barin, *Food Chem.*, 2017, **215**, 17–21.
- 15 A. S. Oliveira, F. M. D. Dalla Nora, R. O. Mello, P. A. Mello, B. Tischer, A. B. Costa and J. S. Barin, *Talanta*, 2017, **171**, 335–340.
- 16 B. Tischer, A. S. Oliveira, A. B. Costa, A. J. Cichoski, M. T. Barcia, R. Wagner and J. S. Barin, *J. Food Compos. Anal.*, 2017, **63**, 34–37.
- 17 G. Zhang, Y. Ni, J. Churchill and S. Kokot, *Talanta*, 2006, **70**, 293–300.
- 18 A. S. Oliveira, C. A. Ballus, C. R. Menezes, R. Wagner, J. N. G. Paniz, B. Tischer, A. B. Costa and J. S. Barin, *Food Chem.*, 2018, **258**, 59–62.

5 MANUSCRITO 1:

A Novel Thermal Infrared Enthalpimetric Method for Fast, High-Throughput Determination of the Content Uniformity of Captopril Tablets

Manuscrito submetido para o periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society*

(Fator de Impacto: 1,198, Estrato Qualis: A2)

A Novel Thermal Infrared Enthalpimetric Method for Fast, High-Throughput Determination of the Content Uniformity of Captopril Tablets

Abstract

Content uniformity (CU) is often evaluated in the quality control of pharmaceutical dosage forms, and a novel method was proposed for CU determination using thermal infrared enthalpimetry (TIE). Captopril tablets were dissolved in 24-well microplates and the heat released from the reaction of captopril and I₂ was monitored with an infrared camera. To optimize the proposed method, the captopril/I₂ ratio, stirring speed, and dispensing rate were evaluated; the most suitable conditions were 1:1 (v/v), 250 rpm, and 0.57 mL s⁻¹, respectively. Interferences from tablet adjuvants (e.g., starch, cellulose, and lactose) were not observed. The results obtained by TIE did not differ statistically (Student's *t*-test, *p* > 0.05) from those obtained by the conventional method (UV spectrophotometry) described in pharmacopeia. The TIE method required 31 and 12 times less reagent and time, respectively. Therefore, the proposed method is suitable for routine analysis and agrees with the requirements of green analytical chemistry.

Keywords: active pharmaceutical ingredients, enthalpimetric analysis, content uniformity determination, green analytical chemistry, thermography

Introduction

Quality control of medicine is essential in the pharmaceutical industry, responsible for the quality and safety of the active pharmaceutical ingredients presented in different formulations. Captopril (1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]-L-proline) is an active pharmaceutical ingredient largely used for antihypertension due to its inhibitor effect on the angiotensin-converting enzyme.¹ Quality control of captopril is performed according to pharmacopeial methods, including the evaluation of content uniformity (CU).

The CU could be used to guarantee a suitable degree of uniformity in the quantity of drug present among dosage units of solutions, powder, granules, sterile solids, tablets, and hard capsules. According to the Brazilian Pharmacopoeia, the CU evaluation of captopril tablets is recommended in the respective monograph.² For this purpose, 10 solid-dosage forms are diluted in ethanolic solution with further spectrophotometric measurement at 212 nm for further calculation of acceptance value.² Other solvents can be used to dissolve the tablets, such as 0.1 mol L⁻¹ HCl for further spectrophotometric determination of captopril.³ In addition, CU can also be determined using high-performance liquid chromatography (HPLC), a method performed using reference solutions and samples, both diluted in the mobile phase and submitted to sonication for 5 min.^{4,5} Despite the widespread use of these methods for CU evaluation, some drawbacks, such as the time required and limited sample throughput, have impaired their use in routine.

Recently, thermal infrared enthalpimetry (TIE) was proposed as a new technique that uses an infrared camera to monitor differences in temperature of solutions for neutralization, precipitation, complexation and redox reactions. This technique allows the simultaneous evaluation of several microplate wells, to which reagents are added by a multichannel pipette. The heat released from reactions is measured and the difference of temperature before and after reaction is determined, which is proportional to the amount of analyte. This approach was

employed to determine calcium carbonate and ferrous sulfate in tablets and sodium chloride in physiologic sterile saline solution.⁶ The agreement of TIE with the conventional method ranged from 96% to 101%, showing good accuracy, with more than 20 times increased sample throughput in comparison to conventional titration. Other developed applications included the determination of vinegar acidity,⁷ content and acidity of pickled vegetable brine,⁸ alcohol content of distilled beverages and wines^{9,10} and saponification value in edible oils.¹¹ These studies achieved an increase in throughput and decreases in time, reagent consumption, and energy requirements.

Therefore, TIE is proposed as a simple and rapid method to determine CU in captopril tablets. Sample preparation and analysis were performed in the same reactor, avoiding excessive sample handling. The effect of adjuvants (starch, cellulose, and lactose) used in the captopril formulations and the influence of reagents ratio, stirring speed, and solution dispensing rate were evaluated in order to obtain the lowest measurement variation. The obtained results were compared with those from the conventional, pharmacopeial method.

Experimental

Samples and chemicals

Sample of captopril tablets (50 mg) from four different manufacturers (named 1, 2, 3, and 4) were purchased from a local market (Santa Maria, RS, Brazil). Sample 1 was used to optimize the analytical parameters. Hydroalcoholic solutions (1:1, v/v) were prepared using absolute ethanol (99.8%, Dinâmica, Brazil), and ultrapure water was obtained from the MilliQ system (Direct-Q 3 UV, 18.2 M Ω cm, Millipore Corp., USA). A reference solution of 0.25 mol L⁻¹ iodine was prepared in 30% (m/v) potassium iodide (99.0%, Vetec, Brazil) hydroalcoholic

solution using solid iodine (99.9%, Neon, Brazil). This solution was used as a reagent to stoichiometric excess in the TIE method. In order to determine the CU by TIE, a reference solution containing 50 mg of captopril in 1.2 mL was prepared using raw captopril of 99.8% purity.

Instrumentation

Reactions were carried out in a disposable, polystyrene, 24-well microplate (Nest Biotechnology, China), with each well having total volume 3.0 mL. All reagents were introduced into the reactors using an electronic multichannel pipette (Research Pro 1200, Eppendorf, Germany) with eight channels and volume ranging from 0.050 to 1.200 mL. A magnetic stirrer (Centaurus, Brazil) was used for stirring. A long-wave infrared camera (7.5–13.0 μm , 320 x 240 pixels, 30 Hz, FLIR E60 model, FLIR, USA) was used to simultaneously determine the temperature in the wells. Images were processed using ResearchIR software (FLIR, version 3.5). An ultrasonic bath (25 kHz, model D-78224, Elmasonic, Germany) was used to dissolve the tablets and a UV-Vis spectrophotometer (model 8453, Agilent, USA) was used at 212 nm to determine the CU of captopril tablets according to the Brazilian Pharmacopoeia method.²

Optimization of parameters for TIE analysis

The total amount of adjuvants used in the evaluated captopril formulations was around 150 mg.¹² Given the main adjuvants used in such formulations, the effects of starch, cellulose, and lactose were evaluated. To this end, 50, 100, and 150 mg of each adjuvant and a mix containing 50 mg of each were added to all wells, to which 1.2 mL solution containing 50 mg

of captopril was then added. The ΔT values obtained were compared to a reference solution (1.2 mL) containing 50 mg of captopril.

The ratio between captopril and iodine solution (from 0.50 to 1.50), stirring speed (from 100 to 300 rpm), and dispensing rate (from 0.46 to 0.71 mL s⁻¹) were evaluated in TIE measurement. For this purpose, a mix containing starch, cellulose, and lactose (150 mg) was previously added to each well. To these reactors, a reference solution (1.2 mL) was added, followed by 1.2 mL of 0.25 mol L⁻¹ I₂ solution as a reagent to stoichiometric excess. All parameters were compared using ΔT values.

The time required to disintegrate and dissolve tablets was then evaluated. Tablets were inserted into each well, followed by 1.2 mL of hydroalcoholic solution (1:1). The temperature variation was monitored under the addition of 0.25 mol L⁻¹ I₂ solution (1.2 mL) until the temperature remained constant. All results were evaluated using the relative standard deviation (RSD) of measurements (n = 10) and by comparing results with those obtained with captopril reference solution (n = 10).

Determination of CU by TIE

Tablets were inserted into each well using tweezers, and 1.2 mL of hydroalcoholic solution (1:1) was added. Wells were maintained under stirring for 16 min using a polytetrafluoroethylene-covered magnetic stir bar (3.0 × 6.5 mm). After dissolution, stoichiometric excess I₂ solution (0.25 mol L⁻¹, 1.2 mL) was added, as shown in Figure 1. The temperature was monitored by an infrared camera fixed at a distance of 40 cm from the microplates, and a circle covering 46.8% of the total well area was used to monitor the reactions, following previous work.⁹ The average of the temperature data was plotted to form an enthalpogram. Temperature variation was calculated using the equation $\Delta T = T_f - T_i$, where T_f is

the final temperature after the reaction and T_i is the initial temperature before the reaction. The T_f and T_i values were obtained by averaging the values from 2 s before and after the addition of reagent in stoichiometric excess.⁶ For all measurements, relative humidity and temperature were corrected in software.

Figure 1

In the same way, reference solution containing the same amount of captopril (50 mg) was evaluated. Content uniformity was determined based on temperature variations, using Equation 1:

$$\text{Captopril (mg)} = 50 \text{ mg} \times \frac{\Delta T_1}{\Delta T_2}$$

Equation 1.

where ΔT_1 is the difference in temperature for the sample solution ($^{\circ}\text{C}$) and ΔT_2 is the difference in temperature for the reference solution ($^{\circ}\text{C}$). Afterwards, the acceptance value was calculated based on the Brazilian Pharmacopoeia criteria.²

Determination of CU according to Brazilian Pharmacopoeia

Ten 50 mg captopril tablets were individually transferred to 50 mL volumetric flasks containing 5 mL of water. 25 mL of a hydroalcoholic solution (1:1) were added to each flask, which were sonicated for 15 min in the ultrasonic bath and mechanically agitated for 15 min. After the tablets dissolved, the content was filtered, and an aliquot of 0.5 mL was transferred to a 25 mL volumetric flask and completed with the same hydroalcoholic solution. The same procedure was performed for a reference solution containing 50 mg of captopril and blank

solution. Blanks, samples, and reference solutions were evaluated by UV-Vis spectrophotometer at 212 nm and the CU was determined. Then, the acceptance value (AV) was calculated according to the Brazilian Pharmacopoeia criteria.

Results and Discussion

Influence of adjuvants used in captopril tablets on TIE measurements

Prior to optimizing the parameters of the TIE measurements, a study regarding the main adjuvants used in captopril tablets was performed to evaluate the possible interference of the matrix during reactions. According to the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) database,¹² the main adjuvants used in captopril tablets are monohydrate lactose, microcrystalline cellulose, and pregelatinized starch. The average weight of the tablets was around 200 mg. Since the captopril samples weighed 50 mg, the influence of 150 mg of different adjuvants was evaluated: 50, 100, and 150 mg of each and a mix with 50 mg of each adjuvant (Figure 2).

According to the data (Figure 2), the temperature of all reactions ranged from 1.01 to 1.04 °C, with no significant differences (Tukey's test, $p > 0.05$), showing no effect of the matrix in determining captopril by the proposed method. All subsequent optimizations were thus carried out using 150 mg of starch.

Figure 2

Optimization of TIE parameters for analysis

Prior to captopril determination by TIE, optimization was performed to identify suitable conditions. First, the captopril/I₂ ratio was evaluated with a total volume of 2.4 mL. The highest temperature variation in the reactions was achieved with a ratio of 1:1 (v/v; Figure 3a), which could be associated with better homogenization. Using ratios lower and higher than 1:1 increased the standard deviation.

Figure 3

Since the solutions were homogenized using a magnetic stir bar, it is important to evaluate the stirring speed. For this optimization, captopril/I₂ solution ratio of 1:1 (v/v) was considered. As Figure 3b shows, there were no significant differences (Tukey's test, $p > 0.05$) in terms of the average; however, low stirring speeds gave high RSD values, probably as a consequence of inefficient homogenization. The most suitable results were achieved at 250 rpm stirring speed.

Last, the I₂ dispensing rate was evaluated. According to the results (Figure 3c), significant differences were identified only for 0.50 and 0.57 mL s⁻¹ (Tukey's test, $p > 0.05$). In terms of RSD values, the higher dispensing rate provided the highest variation in results, probably as a consequence of a loss of solution from wells. High variation among the measurements was also observed for lower dispensing rates (0.46 and 0.50 mL s⁻¹). This could be explained by the time the pipette tips remained in front of the camera, which impaired the measurement of temperature variation and consequently impacted the deviation of measurements. A dispensing rate of 0.57 mL s⁻¹ was chosen, taking into account the lower deviations and the average (1.00 ± 0.02 °C), which was very close to that of the reference

solution without adjuvants (1.01 ± 0.03 °C). Therefore, the parameters chosen for the determination of captopril were a captopril/I₂ ratio of 1:1 (v/v), stirring speed of 250 rpm, and dispensing rate of 0.57 mL s⁻¹.

Determination of captopril in tablets

Determination of CU by TIE is based on the reaction between captopril and iodine (Figure 4). After oxidation by I₂, captopril becomes captopril disulfide, the main impurity present in raw captopril material.^{13,14} Because the TIE method is based on this reaction, this impurity does not interfere, because only captopril and not the captopril disulfide reacts with iodine.

Figure 4

Given the compression process during the fabrication of captopril tablets, disintegration and dissolution are required prior to the determination to ensure total drug dissolution and determination. In this regard, 1.2 mL of hydroalcoholic solution was used to dissolve each tablet. Figure 5 shows the dissolution and disintegration profile. The tablets from manufacturers 1 and 3 dissolved in 4 min, while samples obtained from manufacturers 2 and 4 required more time for total dissolution, dissolving in 10 and 12 min, respectively. This distinct behavior could be explained by the different procedures and proportions of adjuvants each manufacturer used in fabricating the tablets, which affects the compression and consequently the disintegration and drug dissolution.

Figure 5

Considering these differences in dissolution time, all samples underwent 16 min of stirring. Captopril content was determined in the four commercial samples by the TIE method and compared with the results obtained by the conventional method.² As shown in Table 1, the proposed method was accurate, with no significant differences (Student's *t*-test, $p > 0.05$) for all samples evaluated between both methods. Regarding precision, lower values of RSD were achieved with the proposed method than with conventional determination, with influence on the acceptance values (Table 1).

Table 1

The requirements for dosage uniformity (according to Brazilian Pharmacopoea) were reached for all evaluated samples.² Acceptance values were calculated for all samples using both methods; for 10 units, their acceptance values were lower than 15.0, ensuring the consistency of dosage units without the requirement to analyze 20 more units. Since the proposed method yielded lower deviations among measurements, the acceptance values were lower than those when using conventional determination. Therefore, the effect of uncertainties from analytical method in the AV is reduced using TIE, which is an important benefit for CU evaluation.

Evaluation of environmental impacts

Routine chemical analysis in the chemical and pharmaceutical industries has environmental impacts. In this regard, the development and use of alternative technologies or methods which decrease the environmental impact is a trend. Some parameters related to environmental aspects were evaluated in order to compare the proposed method to conventional

captopril determination.^{15, 16}

The miniaturized, proposed method consumed 31 times less alcohol than conventional captopril determination. The conventional method required 12 times more energy than the TIE method. The proposed method does employ KI and I₂ as reagents, which are drawbacks compared to conventional CU determination. However, in terms of throughput, the TIE method allowed the determination of at least 24 replicates (considering only one microplate) in less than one-half hour.

Important to mention is that the use of microplates allowed the integration of analytical processes in the same vessel, minimizing random and systematic errors and impacting the precision of measurements. Thus, captopril dissolution and determination steps in the proposed method were made in the same reactor, which provided suitable accuracy and greater precision in the results compared with the conventional method.

Conclusions

The proposed TIE method allows the determination of the CU of 50 mg captopril tablets more quickly and more precisely than does the conventional pharmacopeial method. Results for CU were satisfactory, considering that all samples agreed with the requirements of the Brazilian Pharmacopoeia. Time, energy, and reagent consumption were reduced by more than 24, 11, and 31 times, respectively, in the proposed method, which could therefore be considered more environmentally friendly than the conventional method. In addition, the integration of processes allows measurements with lower deviations, resulting in lower acceptance values compared with those in the Brazilian Pharmacopoeia. In addition, advantages of the proposed TIE method, such as the reduction of steps for sample preparation and higher throughput, make it suitable for routine analysis.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES, CNPq and FAPERGS (17/2551-0000979-7) for supporting this study.

REFERÊNCIAS

1. Katzung, BG; Masters, SB; Trevor, AJ; *Basic & Clinical Pharmacology*, 12th ed, McGraw-Hill Medical, USA, 2007.
2. Brazilian Pharmacopeia - 5th Ed., Chapter 5.1.6 Determination of content uniformity. National Sanitary Surveillance Agency – ANVISA. Fiocruz, Brazil, 2010.
3. The Indian Pharmacopoeia, Govt. of India, Ministry of Health and Family Welfare. New Delhi: The Controller of Publication, India, 1996.
4. The United States Pharmacopeia. The National Formulary, USP 37/NF 32, The United States Pharmacopeial Convention, General chapter, Uniformity of dosage units, USA 2014.
5. Moreira, FL; Silva, EO; Bonfilio, R; Santos, OMM; Araujo, MB; *Curr Pharm Anal*, **2013** 139.
6. Barin, JS; Tischer, B; Oliveira, AS; Wagner, R; Costa, AB; Flores, EMM; *Anal Chem*, **2015** 12065.
7. Tischer, B; Oliveira, AS; Ferreira, DF; Menezes, CR; Duarte, FA; Wagner, R; Barin, JS, *Food Chem*, **2017** 17.
8. Tischer, B; Oliveira, AS; Costa, AB; Cichoski, AJ; Barcia, MT; Wagner, R; Barin, JS; *J Food Compost Anal*, **2017** 34.
9. Oliveira, AS; Dalla Nora, FM; Mello, RO; Mello, PA; Tischer, B; Costa, AB; Barin, JS; *Talanta*, **2017** 335.

10. Oliveira, AS; Ballus, CA; Menezes, CR; Wagner, R; Paniz, JNR; Tischer, B; Costa, AB; Barin, JS; *Food Chem*, **2018** 59.
11. Dalla Nora, FM; Oliveira, AS; Lucas, BN; Ferreira, DF; Duarte, FA; Mello, RO; Cichoski, AJ; Barin, AS; *Anal Methods* **2018** 1.
12. http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp, accessed in June 2017
13. Mahmoud, WMM; Kümmerer, K; *Chemosphere* **2012** 1170.
14. Nogueira, R; Wollinger, W; Silva, TE; Oliveira, LM; Rego, ECP; Barin, JS; Laporta, LV; Mesko, MF; Bittencourt, CF; Rodrigues, JM; Cunha, VS; Moreira, GF; *Braz J Pharm Sci* **2011** 251.
15. Gałuszka, A; Migaszewski, Z; Namieśnik, J; *Trends Analyt Chem* **2013** 78-84.
16. Melchert, WR; Reis, FB; Rocha, FRP; *Anal Chim Acta* **2012** 8.

Table 1. Results for content uniformity of captopril 50 mg tablets by TIE and conventional method described in Brazilian Pharmacopoea (Conv.). The acceptance value was calculated based on Brazilian Pharmacopoea parameters.² No significantly difference was observed between TIE and conventional method (Student's *t*-test, $p > 0.05$).

Tablets	Manufacturers							
	1		2		3		4	
	TIE	Conv.	TIE	Conv.	TIE	Conv.	TIE	Conv.
1	51.3	50.5	50.5	50.5	54.4	53.6	49.9	49.9
2	51.2	50.1	49.7	54.0	51.8	53.7	50.1	49.5
3	50.6	50.6	51.4	49.8	52.3	54.6	50.5	49.4
4	51.1	48.4	51.9	53.1	53.4	52.7	50.5	49.4
5	49.7	50.2	52.0	53.0	51.3	52.0	49.6	49.7
6	50.4	50.2	52.1	52.0	51.8	53.9	50.5	49.5
7	51.6	51.0	51.0	52.0	52.9	52.5	51.0	50.3
8	49.8	50.4	51.3	49.7	51.8	54.3	49.5	49.5
9	51.9	51.9	51.1	53.4	52.4	52.7	50.6	50.4
10	51.3	51.6	51.9	50.9	51.9	51.7	49.9	51.9
Mean	50.9	50.7	51.3	51.9	52.4	53.2	50.2	49.9
SD	0.7	0.8	0.8	1.5	0.9	1.0	0.5	0.8
RSD (%)	1.5	1.6	1.5	2.9	1.8	1.9	1.0	1.6
Acceptance value	3.8	3.8	4.8	9.5	7.2	9.7	2.3	3.8

Figure 1. Procedure used to determine captopril content in tablets by TIE method.

Figure 2. Effect of main adjuvants used in captopril tablets on TIE measurements ($n=10$); starch (S), cellulose (C) and lactose (L). Captopril amount of 50 mg in each well. Dashed line indicate the data relative to reference solution without adjuvants.

Figure 3. Influence of parameters on TIE: I. captopril/iodine solutions ratio, II. stirring speed, and III. dispensing rate. Same letters indicate no significant difference (Tukey test, $p > 0.05$).

Figure 4. Reaction between captopril and iodine explored in TIE method.

Figure 5. Profile of tablets dissolution from different manufacturers ($n=4$).

Figure 1.

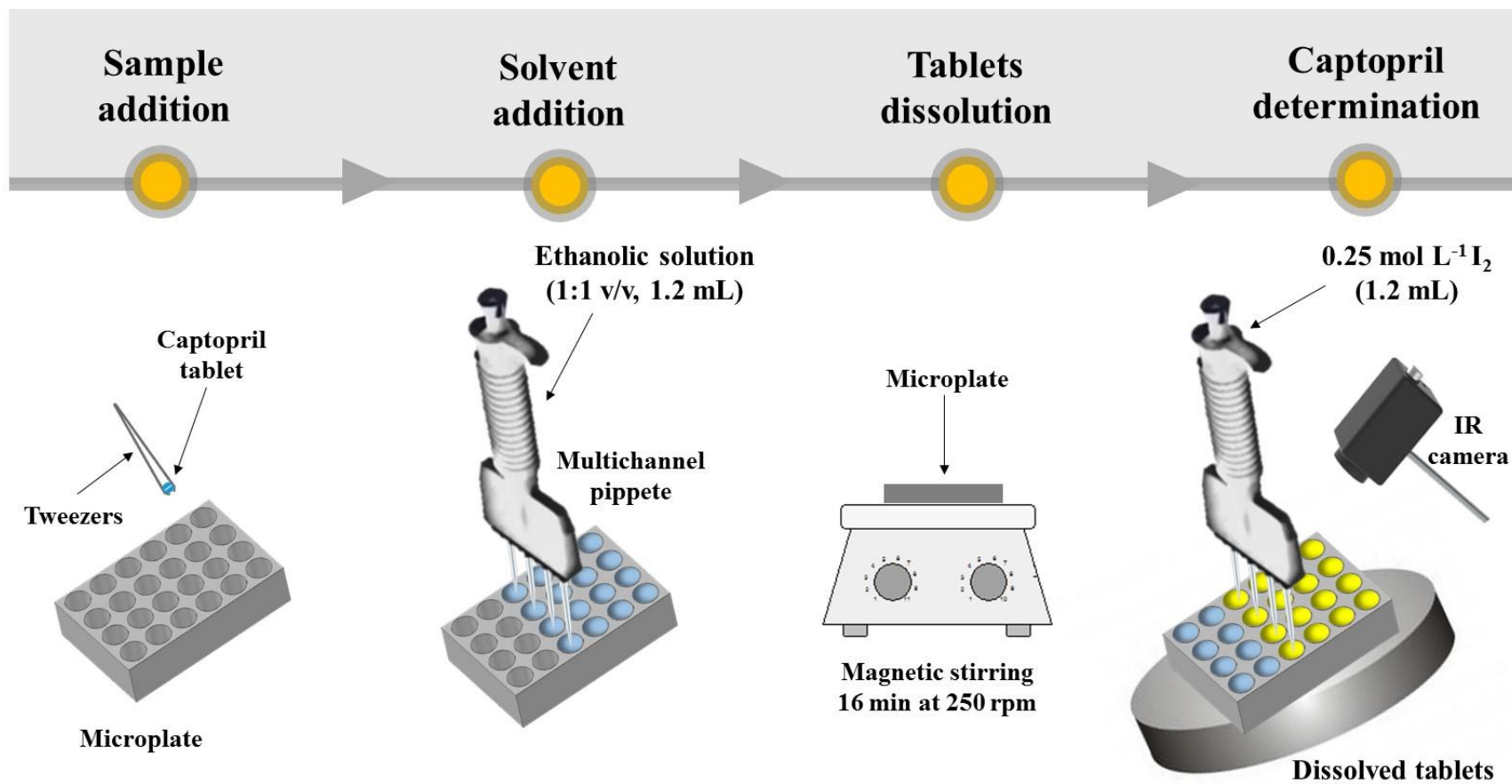


Figure 2.

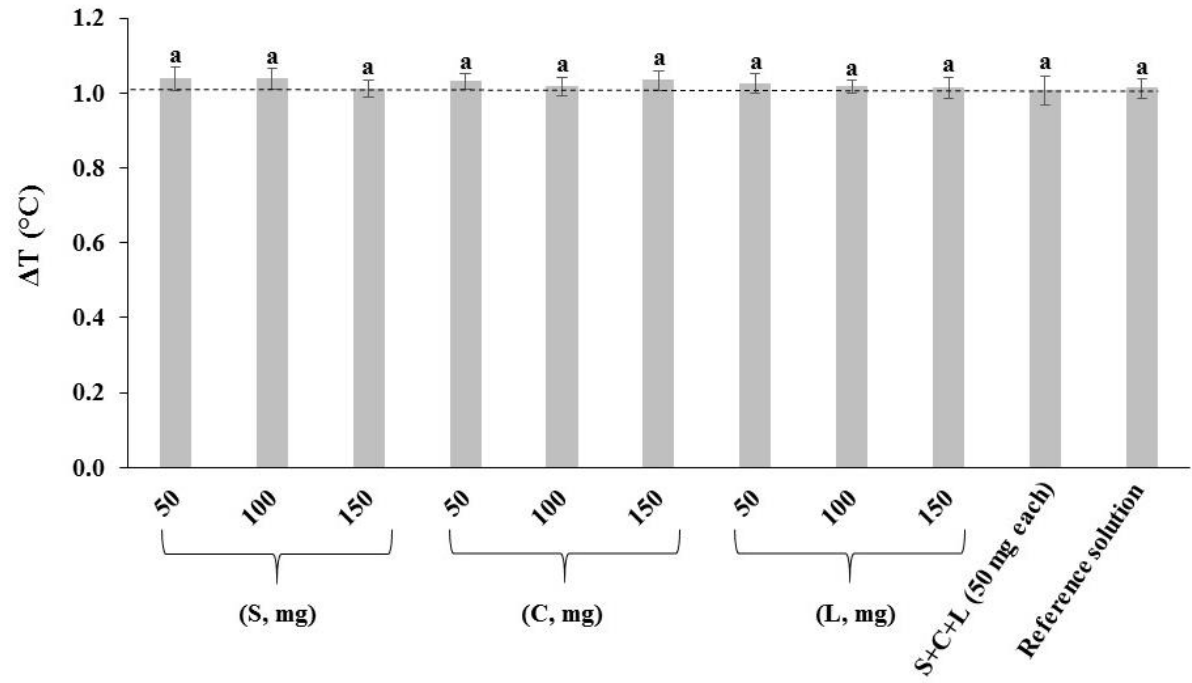


Figure 3.

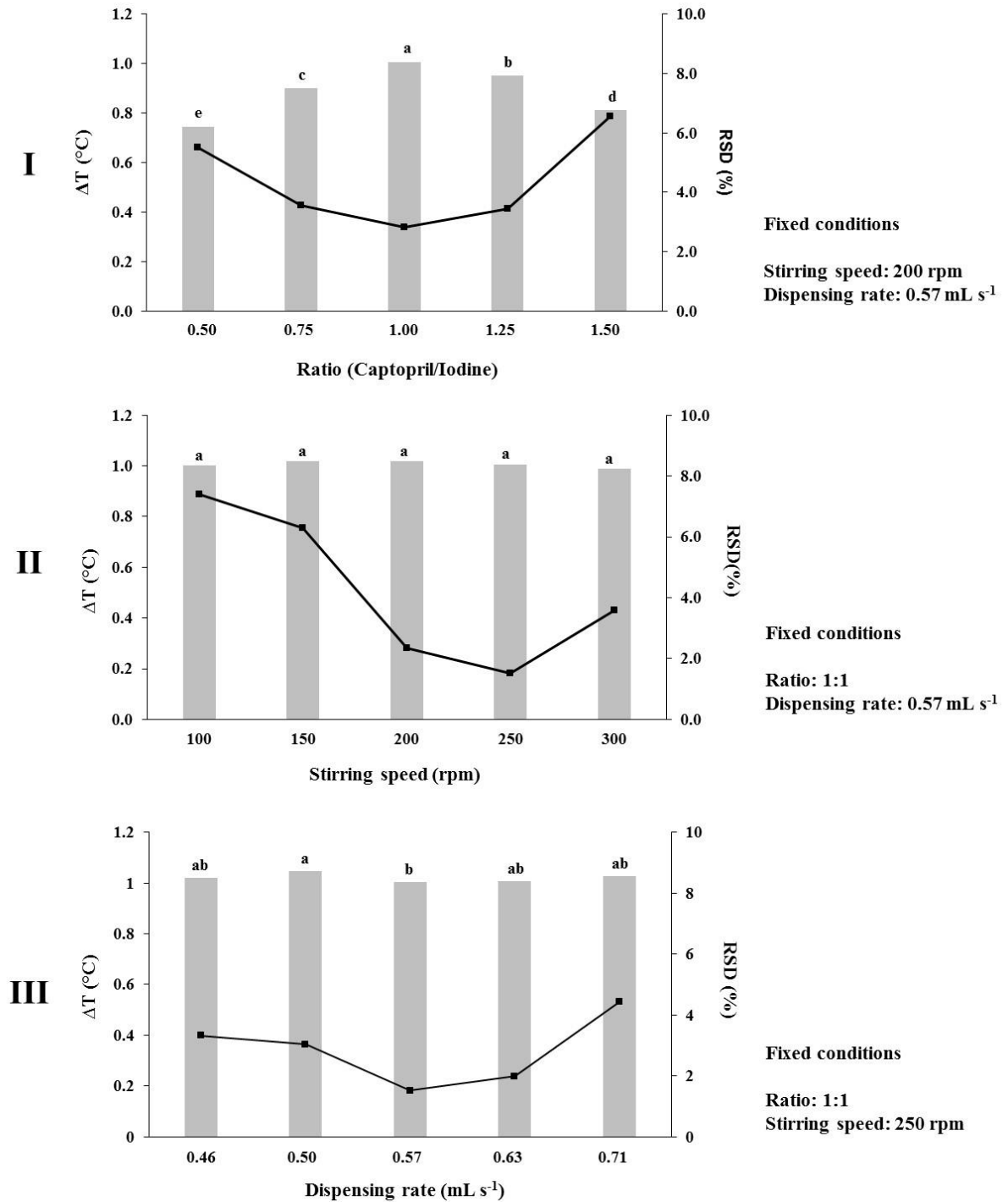


Figure 4.

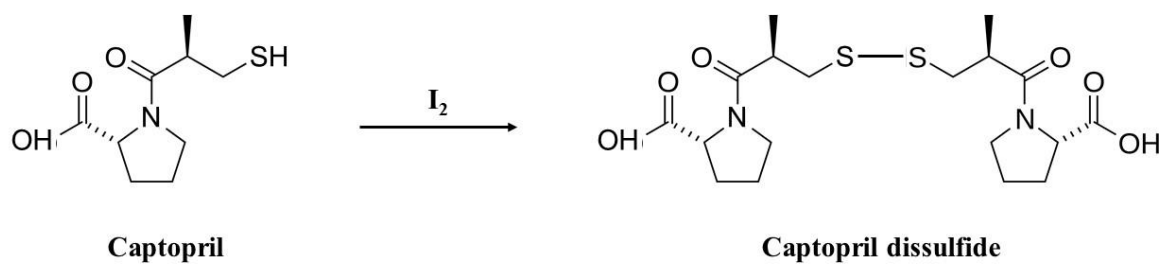
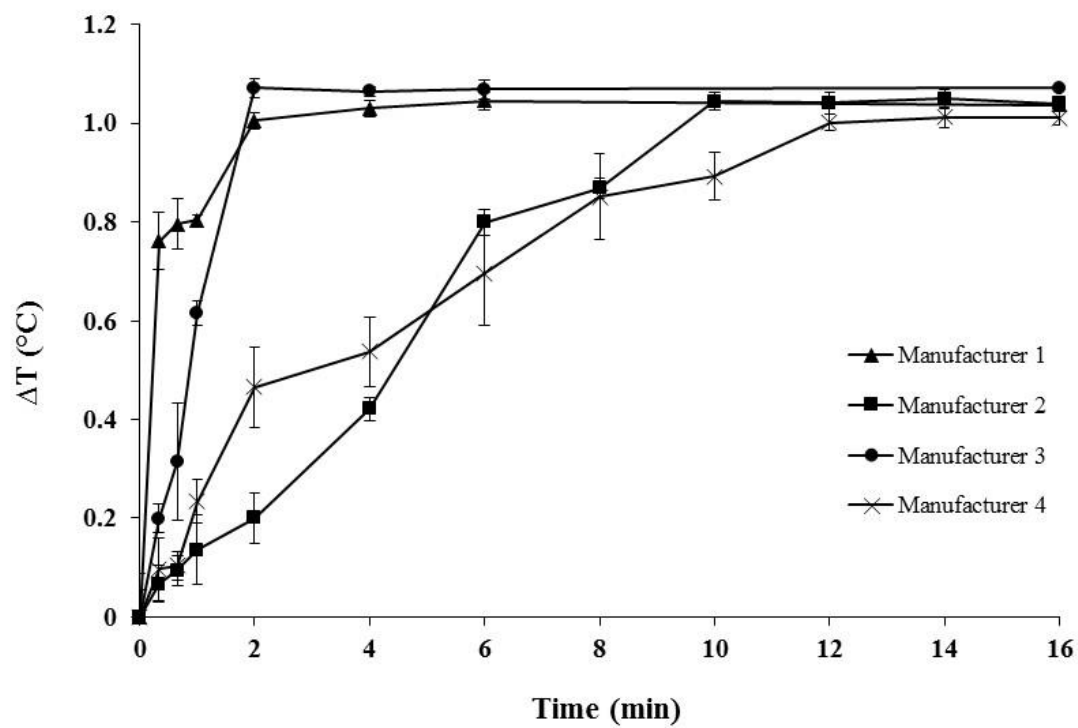


Figure 5.



6 MANUSCRITO 2:

**A green method for determination of active chlorine in bleaching solutions
by thermal infrared enthalpimetry**

Manuscrito a ser submetido para o periódico *Analytical Methods*

(Fator de Impacto: 2,038, Estrato Qualis: A2)

**A Green Method for Determination of Active Chlorine in Bleaching
Solutions by Thermal Infrared Enthalpimetry**

ABSTRACT

Conventionally, the determination of active chlorine is performed by iodometric titration, requiring a long time for analysis and high amount of reagents. Thermal infrared enthalpimetry (TIE) was used to develop an alternative method for active chlorine determination in commercial bleaching solutions, based on the heat released from the reaction of hypochlorite with H_2O_2 . The most suitable results were found for 5% H_2O_2 (v/v), stirring speed of 250 rpm, dispensing rate of 0.57 mL s^{-1} and 10 s after reaction for temperature reading. Agreement ranging from 98.2 to 103.2% were achieved in results of ten samples analyzed by TIE in comparison to those obtained by NBR 9425. In order to quantify the green aspects of the proposed method, the Green Analytical Procedure Index (GAPI) was performed. Based on the results, the proposed method allowed direct analysis and reduced the use of reagents in comparison to official method that requires the use of KI, acetic acid, starch and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. In the proposed method, on the other hand, the use of these reagents was avoided and only H_2O_2 solution was required as a greener reagent. The method miniaturization enables the reduction of the number of analytical operations and the possibility to perform all steps in the same reactor are features of the proposed TIE method. A high throughput (300 replicates per hour) was reached and only H_2O and O_2 were generated as residues, following the principles of the green analytical chemistry.

Keywords: active chlorine, thermal infrared enthalpimetry, quality control, green chemistry, thermography

1 Introduction

Chemical disinfectants based on chlorine have been widely used mainly due to their convenience and low cost.^{1, 2} Bleaching products based on chlorine are unstable due to the degradation of compounds that release Cl_2 during storage.³ The quality control of products with active chlorine is required in some countries and in Brazil its concentration in commercial formulations range from 2.0 to 2.5% (w/w).⁴

Commercial bleaching solutions are analyzed currently by iodometric titration method, which requires high amount of different reagents used in several steps for analysis, presenting low throughput.⁵ Alternative methods, such as colorimetric⁶⁻⁸, chemiluminescent⁹, potentiometric¹⁰, amperometric¹¹ and flow injection methods^{12, 13} could be used for active chlorine determination in several samples. Contrarily to the methods based on iodometric titration, the majority of instrumental methods were developed for the determination of active chlorine in low concentrations, as presented in drinking water. Methods based on the spectrometric determination were preferred to others, since the reagents consumption and successive dilutions are lower.^{12, 13} However, results can be impaired in terms of precision due to the lack of selectivity, since any substance that absorb radiation could cause interferences in the measurement.¹³

In general, official methods recommended for quality control use iodometric titrations for evaluation of bleaching solutions. They are laborious and spend high amounts of reagents and time that impaired their use for continuous monitoring during industrial processes. In addition, these analytical methods are related to their environmental impact and the development of alternative methods following the green analytical chemistry is desirable.¹⁴

The miniaturization of analytical methods is an alternative that enables chemical analysis using lower amounts of sample and reagents in comparison to conventional methods

leading to lower waste generation. On the other hand, the use of unique vessel to perform all analytical steps is an alternative to speed up analysis and also minimize the incidence of systematic and random errors.¹⁴

In this way, thermal infrared enthalpimetry (TIE) was used for the development of an alternative method embracing the features. TIE is a fast and ease of use and enables a noninvasive temperature monitoring of multiple reactions through the combination of disposable microplates, a multichannel pipette, an infrared camera and a software to data processing.¹⁵ The principle of this technique is the measurement of temperature variation of a reaction between an analyte in presence of a reagent in stoichiometric excess, which is added using a multichannel pipette and monitored through an infrared camera. This approach has been applied to quality control of food and medicines, based on neutralization, precipitation, redox and complexation reactions providing suitable results.¹⁵⁻¹⁸

Recently, this technique was applied for the determination of total, fixed and volatile acidities of vinegar leading to more precise results than conventional method.¹⁷ An alternative TIE method for alcoholic content determination was also proposed using only water as reagent to increase the temperature of solutions based on the heat of dissolution phenomenon. An agreement ranging from 99.2 to 100.8% with conventional method was achieved. In conventional alcoholic content determination a step of sample preparation is required, which was avoided in this work, providing a throughput 480 times higher in comparison to official method. In addition, the energy consumption decreased three thousand times, showing a good alternative for routine analysis.^{16, 18}

An alternative method to determine simultaneously total acidity and salt content in pickled vegetables using a TIE was proposed. In this approach, microplates were charged with a stoichiometric excess of NaOH and AgNO₃ with subsequently sample addition. Using the heat released from reactions, the total acidity and salt content was simultaneously determined

using a suitable calibration curves. An agreement of obtained results ranged from 94 to 103% was obtained in comparison with those obtained by conventional method. The use of TIE enabled the acidity and salt content measurements of 240 per hour, which in conventional titration require 2 days.¹⁹

Another application using TIE as an alternative method was proposed to determine the saponification value in edible oils. In this method, a step of sample preparation was performed in the same reactor used in determination step, allowing the integration of process. An agreement ranging from 97.4 to 102.1% was obtained even using 41 times lesser reagents and consuming 625 lesser energy in comparing of conventional method.²⁰

In this work is proposed an ease of use, rapid and green method for the determination of active chlorine in bleaching solutions by TIE. Sample dilution and determination steps were carried out in a single reactor avoiding excessive handling and improving the throughput. Temperature variation after addition of reagent in stoichiometric excess (H_2O_2) was monitored through an infrared camera and the active chlorine was determined using a calibration curve. The influence of H_2O_2 concentration, curve calibration range, stirring speed, dispensing rate and acquisition time of temperature data were evaluated in order to obtain suitable results. Results obtained by TIE were compared with those obtained by official method NBR 9425 in order to evaluate the proposed method.

2 Materials and methods

2.1 Instrumentation

The temperature was determined using a long wave infrared camera (7.5-13.0 μm , FLIR E60 model, FLIR, USA) which provides images of 320 x 240 pixels at frame rate of 30 Hz. Data processing was performed using software ResearchIR (FLIR, version 3.5). The

reactions in TIE method were carried out in disposable polystyrene 24-well microplates (Evergreen Scientific, USA) with internal volume of 3.0 mL in each well. The addition of solutions in the wells was performed with an electronic multichannel pipette (eight channels) with volume ranging from 0.050 to 1.200 mL (Research Pro 1200, Eppendorf, Germany). For homogenization, a magnetic stirrer (Centauro, Brazil) was used. The energy consumption of equipment was measured using a power meter (Fluxe 43B model, Fluke Corporation, Everett, USA) and the CO₂ emission was calculated considering 1 kWh of energy release 0.8 kg of CO₂.²¹

2.2 Samples, reagents and standards

Ten samples of hypochlorite solutions from different manufacturers with informed concentration range from 2.0 to 2.5% (w/v) were purchased in a local market (Santa Maria, RS, Brazil). Potassium iodide (Vetec, Brazil), glacial acetic acid (Vetec, Brazil) and a starch (Vetec, Brazil) solution (0.5%, w/v) were used for titration.²² A 0.1 mol L⁻¹ sodium thiosulfate solution (Vetec, Brazil) was previously standardized with potassium permanganate (Vetec, Brazil) solution and used to determine the active chlorine in conventional titration. In TIE determination, 50% H₂O₂ (w/w; Vetec, Brazil) was used to prepare solutions in several concentrations. Ultrapure water obtained from MilliQ system (Direct-Q 3 UV, 18.2 MΩ cm, Millipore Corp., USA) was used in both methods.

2.3 Optimization of TIE parameters

During H₂O₂ decomposition, the release of oxygen causes the formation of bubbles on the surface of the solution. Since the temperature of the bubble is different from the temperature

of the solution, the presence of these bubbles. However, as is known, the reaction between KI and hypochlorite does not present this drawback. In this sense, a comparison with both reactions in order to evaluate the presence of interferences during the data acquisition time was performed. This evaluation was performed from 6 to 12 s after 5% H₂O₂ and 30% KI. All results were evaluated considering the relative standard deviation (RSD) of measurements and the accuracy of the proposed method was performed based on the comparison of results obtained with NBR 9425 method.

2.4 TIE analysis

Samples and water were added (600 μ L of each one), directly in the microplate wells using a multichannel pipette. A polytetrafluoroethylene-covered magnetic stir bar (3.0 \times 6.5 mm) was added for homogenization followed by the addition of stoichiometric excess of H₂O₂ (w/w, 5%, 1.2 mL) for the determination of active chlorine. The procedure for TIE measurements was shown in Figure 1.

Figure 1

The temperature of reactions were monitored before, during and after H₂O₂ addition by infrared camera, which was attached to a tripod at 40 cm of distance from microplates. Using the average of data obtained for each well, an enthalpogram was plotted. In order to monitoring reactions, a circle with 180 pixels was used in the software.^{15, 17} The difference in temperature was calculated using the mean of 2 s before and after 10 s after the reaction and was obtained using the equation $\Delta T = T_f - T_i$, where T_f is the final temperature and T_i is the initial temperature. The temperature and relative humidity were corrected in the software for all measurements.¹⁵

A calibration curve ranging from 0.3 to 1.5% of HClO was constructed with reference solutions and used to determine the concentration of active chlorine in samples.

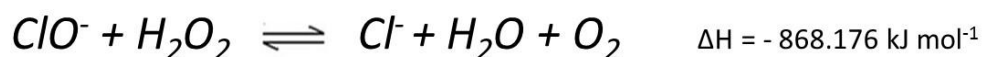
2.5 Analysis by official method

Active chlorine was determined by conventional method according to official method NBR 9425.⁵ For this, 5.0 ± 0.5 g of sample was weighed in a volumetric flask and diluted up to 100 mL with water. After, 10 mL of the this solution was transferred to an erlenmeyer flask and was added 30 mL of 5% KI (w/v) solution, 10 mL of glacial acid acetic and 1 mL of starch indicator solution. The flask containing all reagents was titrated using 0.1 mol L^{-1} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and the active chlorine content was calculated based on reaction stoichiometry.⁵

3 Results and Discussion

3.1 Evaluation of reaction of bleaching solutions with H_2O_2

The temperature increase resulted from the reaction of H_2O_2 and hypochlorite ion, generating chlorine, water and oxygen according the reaction shown in Equation 1.



Equation 1.

A reference solution of active chlorine (1.5%, w/v) was used and the excess of H_2O_2 was evaluated ranging from 0.2 to 50%. According to the results shown in Figure 2, it is possible to see an increase in the temperature variation, with the raise of H_2O_2 to 1%, which is explained on the stoichiometry reaction, since 1.5% HClO requires around 0.7% of H_2O_2 . No significant differences (Tukey test, $p > 0.05$) were observed in the concentration ranging from 1 to 10%

of H₂O₂, showing that the reagent used was in stoichiometric excess. However, when the concentration of H₂O₂ solution were higher than 20% (w/w) the effect of heat dilution was observed in the blank, providing significant difference in the increase of temperature. In this sense, the choice of the H₂O₂ concentration was made taking into account the stoichiometric excess, the absence of dilution heat and the best precision of results, which were achieved when 5% H₂O₂ was employed.

Figure 2

3.2 Parameters optimization of TIE method

Previously to the active chlorine determination by TIE, an optimization was performed to ensure low deviation among measurements. As already demonstrated TIE showed that stirring speed and dispensing rate have an impact in the results.^{16, 17} In this way, an optimization of these parameters was carried out using 1.2 mL of active chlorine (1.5%, w/v) as reference solution and the injection of 1.2 mL of 5% H₂O₂ as reagent in stoichiometric excess.

As shown in Figure 3-I, higher stirring speeds provided lower standard deviation. This behavior could be explained by the fact that oxygen formed during the reaction was removed faster with intense stirring, providing more homogeneous results. On the other hand, when the experiment was carried without stirring, higher deviations were obtained, which was related to the formation of stable bubbles in the solutions, impairing the precision and accuracy of the method. In the highest stirring speed (350 rpm), the lowest temperature variation was obtained, caused by the expulsion of solutions from the wells due to the high speed of stirrer bar. Then, a compromise condition (250 rpm) between the highest temperature variation with the lowest deviation was chosen as the condition for subsequent evaluations.

Figure 3

The dispensing rate was also evaluated and the highest temperature variation and the lowest deviation was achieved for 0.57 mL s^{-1} (Figure 3-II). This value is in accordance to the results found in similar works using TIE.^{16, 17} In these works, lower dispensing rates provided an increase in the standard deviation due to the time that tips remained in front of a camera, impairing data acquisition. On the other hand, when the dispensing rates were faster part of the solution was expelled from the wells, also impairing the of measurements. Therefore, the dispensing rate of 0.57 mL s^{-1} was selected for further measurements.

3.3 Evaluation on the data acquisition

The temperature monitored using the infrared camera is superficial, then any interference in the surface could provide inaccurate results. In the present work, TIE was used for the first time for monitoring reactions that release gases. In this sense, interferences could be observed in the measurements, since the presence of bubbles during temperature monitoring could impair the results. In preliminary experiments, the data acquisition was performed after 10 s of excess reagent addition, which are enough for total gases release from wells. Even that no bubbles were observed in the surface, an estimative on the lower and higher time for the data acquisition was necessary. In this way, a study using reaction between HClO and KI was performed. Iodine potassium (30%) was also evaluated as excess reagent, since there were not gases released from its reaction with hypochorite ion. Thus, active chlorine solutions in concentrations of 0.3, 0.9 and 1.5% were used when H_2O_2 was used as excess reagent and 0.5, 1.5 and 2.0% when 30% KI was used. These parameters were chosen considering the enthalpy values of reaction.

Temperature variation from the reaction among hypochlorite with excess of H₂O₂ and then KI is shown in Figure 4-I and 4-II, respectively. As can be observed, after the addition of H₂O₂ (Figure 4-I) the temperature variation was not stable due to the bubbles formation, which were afterwards released by stirring. This behavior was observed 6 s after the addition of reagent in stoichiometric excess, remaining without significant difference (Tukey test, $p > 0.05$) by the next 6 s. The same study was made for KI as excess reagent, which presented the temperature variation during all time evaluated. Therefore, this proves that in the evaluated times there were no heat loss from wells, which allows the data acquisition in the proposed method within 12 s after reagent addition. In this way, the data acquisition was performed in 10 s after excess reagent addition in the proposed method.

Figure 4

3.4 Determination of active chlorine in commercial hypochlorite solutions and accuracy evaluation of proposed method

After the parameters optimization, the proposed method was applied for the determination of active chlorine in commercial samples and the results were compared to those obtained by conventional titration according to NBR 9425.⁵ For TIE, the calibration curve used for active chlorine determination showed suitable linearity ($r^2 = 0.9936$) ranged from 0.3 to 1.5%. Considering this range, the concentrations presented by manufacturers were used to estimate the dilution of samples within this range. As shown in Table 1, all values obtained for the four commercial samples were in suitable agreement (from 98.2 to 103.2%) with conventional titration and no significant difference was observed (Student's t -test, $p > 0.05$). The variation of measurements of conventional method was lower than TIE, with RSD ranging

from 0.8 to 1.8% and 1.8 to 3.3%, respectively. These could be explained by the reduction in 16 times of the sample volume used for TIE in comparison to NBR 9425. An important aspect of the proposed method is the possibility in reuse of the microplates after washing for several samples, assuring the minimal material disposal.

Table 1

According to the standard requirements, active chlorine concentration in bleachings must be between 2.0 and 2.5%. In this sense, one sample presented values lower than this parameter. The other nine samples evaluated presented concentration higher than the maximum limit allowed and one present lower than 2 % of active chlorine, which are in disagreement with the Brazilian legislation.⁴

3.5 Green Analytical Procedure Index determination

A comparison of features and drawbacks of TIE and NBR 9425 was made based on the Green Analytical Procedure Index (GAPI) in terms of green analytical chemistry attributes. This tool was chosen due its capacity to provide much information in relation to other methods available to evaluate the greenness of protocols in the literature. GAPI is performed considering the entire analytical method, from sample collection to final determination, presenting itself as a complete tool for evaluation and comparison of methods. The all data considered for this evaluation were presented in Table 2.²³

Table 2

The results of the comparison between the AOAC method and the proposed method are shown in Figure 5. In the pictogram is possible to see that the proposed method allows the active chlorine determination in a greener way, taking into account the use and amount of solvents and reagents, compounds use and instrumentation security. In this sense, the choice of the proposed method for active chlorine determination in bleaching solutions should be used, which is more greener than conventional determination.

It is possible to highlight that TIE method avoids the use of many reagents normally used in conventional method. In the conventional analysis, KI, acetic acid, starch indicator, and $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1.5 g, 10.0 mL, 1.0 mL, 7.0 mL, respectively, which are required for one replicate) were used as reagents. They are all absent in TIE method. In relation to volume of sample, the proposed method reduced more than 16 times in relation to the NBR method. The only reagents used in the proposed method are water (50 times lower than conventional method) and 5% H_2O_2 , which are not required in the conventional analysis. The use of H_2O_2 as reagent, instead of the high amount of several reagents used in conventional method, is beneficial, since is used a low volume (1,2 mL, 5%) and the decomposition products are just water and oxygen.

Figure 5

The analysis by TIE requires the use of a multichannel pipette, magnetic stirrer and an infrared camera, which spent 0.001 kWh per measurement generating 0.8 g of CO_2 for the environment. In contrast, conventional analysis does not employ any electrical equipment. The proposed method provided results of one replicate in 0.2 min, while it was required 5 min using conventional titration. Therefore, a higher throughput was observed for TIE reaching up to 300 replicates per hour. In the conventional method, only 12 replicates per hour could be performed.

4 Conclusions

Thermal infrared enthalpimetry was suitable for active chlorine determination using only H₂O₂ solution as reagent. The proposed integration process enables the active chlorine determination in bleaching with suitable precision (ranged from 1.8 to 3.3%) and accuracy (ranged from 98.2 to 103.2%) in comparison to the official method. The proposed method allows the analysis of 300 replicates in one hour while the conventional method enables only 12. The miniaturization of method along with the integration of processes provide environmental advantages, such as the removal of some reagents, and maintain the analytical performance. Taking into account the release of only water and oxygen by the reagents in the proposed method, it is possible to confirm that the proposed method is greener than conventional one, being a promising alternative for routine analysis.

Acknowledgment

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – 17/2551 – 0000979-7) for supporting this study.

References

1. K.Y. Park, S.Y. Choi, S.H. Lee, J.H. Kweon and J.-H. Song, *Environ. Pollut.*, 2016, **215**, 314-321.
2. W. Liu, D. Wei, Q. Liu and Y. Du, *Chemosphere*, 2016, **154**, 491-498.
3. M. McFadden, J. Loconsole, A. J. Schockling, R. Nerenberg and J. P. Pavissich, *Sci. Total Environ.*, 2017, **599–600**, 533-539.

4. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *RDC n° 109 de 06/09/16*, Ministério da Saúde, 2016.
5. ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, *NBR 9425- Hipoclorito de sódio - Determinação de cloro ativo pelo método volumétrico*, 2005.
6. J. G. March, M. Gual and B. M. Simonet, *Talanta*, 2002, **58**, 995-1001.
7. L. Moberg and B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **407**, 127-133.
8. A. Chaurasia and K. K. Verma, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1995, **351**, 335-337.
9. J. Ballesta Claver, M. C. Valencia Mirón and L. F. Capitán-Vallvey, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **522**, 267-273.
10. A. P. Soldatkin, D. V. Gorchkov, C. Martelet and N. Jaffrezic-Renault, *Sens. Actuators B: Chem.*, 1997, **43**, 99-104.
11. S. Thiagarajan, Z.Y. Wu and S.M. Chen, *J. Electroanal. Chem.*, 2011, **661**, 322-328.
12. J. G. March and B. M. Simonet, *Talanta*, 2007, **73**, 232-236.
13. N. O. Soto, B. Horstkotte, J. G. March, P. L. L. Alba, L. L. Martínez and V. C. Martín, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **611**, 182-186.
14. A. Gałuszka, Z. Migaszewski and J. Namieśnik, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2013, **50**, 78-84.
15. J. S. Barin, B. Tischer, A. S. Oliveira, R. Wagner, A. B. Costa and E. M. M. Flores, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 12065-12070.
16. A. S. Oliveira, F. M. Dalla Nora, R. O. Mello, P. A. Mello, B. Tischer, A. B. Costa and J. S. Barin, *Talanta*, 2017, **171**, 335-340.
17. B. Tischer, A. S. Oliveira, D. F. Ferreira, C. R. Menezes, F. A. Duarte, R. Wagner and J. S. Barin, *Food Chem.*, 2017, **215**, 17-21.
18. A. S. Oliveira, C. A. Ballus, C. R. Menezes, R. Wagner, J. N. G. Paniz, B. Tischer, A. B. Costa and J. S. Barin, *Food Chem.*, 2018, **258**, 59-62.

19. B. Tischer, A. S. Oliveira, A. B. Costa, A. J. Cichoski, M. T. Barcia, R. Wagner and J. S. Barin, *J. Food Compos. Anal.*, 2017, **63**, 34-37.
20. F. M. Dalla Nora, A. S. Oliveira, B. N. Lucas, D. F. Ferreira, F. A. Duarte, R. O. Mello, A. J. Cichoski and J. S. Barin, *Anal. Methods*, 2018.
21. M.T. Golmakani and M. Moayyedi, *Food Sci Nutr*, 2015, **3**, 506-518.
22. T. Morita and R. M. V. Assumpção, *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação*, Edgard Blücher, 1995.
23. J. Płotka-Wasyłka, *Talanta*, 2018, **181**, 204-209.

Table 1. Results for active chlorine (% w/v) in bleaching commercial solutions obtained by TIE (n=20) and NBR 9425 (n=3). No significantly difference was observed for between methods for all samples (Student's *t*-test, $p > 0.05$)

Manufacturers	Active chlorine (% w/v)	
	TIE	NBR 9425
1	2.64 ± 0.05	2.62 ± 0.02
2	2.50 ± 0.07	2.52 ± 0.02
3	2.79 ± 0.06	2.78 ± 0.02
4	2.47 ± 0.05	2.46 ± 0.04
5	2.27 ± 0.04	2.25 ± 0.04
6	2.33 ± 0.08	2.36 ± 0.02
7	1.59 ± 0.04	1.54 ± 0.02
8	2.63 ± 0.07	2.64 ± 0.02
9	2.59 ± 0.04	2.55 ± 0.04
10	2.24 ± 0.04	2.28 ± 0.02

Table 2. Green Analytical Procedure Index parameters for analytical procedures for determination of active chlorine in bleaching solutions by NBR 9425 and TIE method.

Category	TIE	NBR 9425
Sample preparation		
Collection	-	-
Preservation	-	-
Transport	-	-
Storage	Store the sample at room temperature and without light.	Store the sample at room temperature and without light.
Type of method: direct or indirect	Dissolution and determination in the same reactor	Require a previous dilution with water
Scale of sample preparation	-	-
Solvents/reagents used	Green solvents/reagents used	Non green solvents/reagents used
Additional treatments	None	None
Reagent and solvents		
Amount	0.6 mL of water	100 mL of water
	0.6 mL of sample	5 g (4.8 mL) of sample
Health hazard	1.2 mL H ₂ O ₂ 5%	30 mL of KI 5% (1.5g)
		10 mL of acetic acid
		1 mL of starch indicator
Safety hazard	Total: 2.4 mL	7 mL of Na ₂ S ₂ O ₃ 0.1 mol L ⁻¹ (0.01 g)
	Green solvents	Total: 152.8 mL + 1.51 g
	Low flammability or instability.	Non-green solvents
		Low flammability or instability
Instrumentation		
Energy	0.001 kWh	0 kWh
Occupational hazard	Hermetic sealing of analytical process	Emission of vapours to the atmosphere
Waste	2.4 mL	152.8 mL + 1.51 g
Waste treatment	Recycling	Require passivation
QUANTIFICATION	Yes	Yes

Figure 1. Procedures used for active chlorine determination in bleaching commercial solutions.

Figure 2. Influence of concentration of H₂O₂ (% w/w) in sample and blank temperature variation ($n=8$). Temperature variation (gray columns, °C) (Tukey test, $p > 0.05$).

Figure 3. Influence of some parameters on TIE measurements: I. stirring speed, II. dispensing rate. T (Tukey test, $p > 0.05$).

Figure 4. Evaluation of the data acquisition time for HClO determination by TIE using different solutions in stoichiometric excess: I. 5% (w/w) H₂O₂ and II. 30% (w/v) KI.

Figure 5. GAPI assessment of green profile of the NBR 9425 and TIE method for determining active chlorine in bleaching samples. Colors of green, yellow and red represents the characteristics of good, regular and bad in relation to green analytical chemistry and white are related to not applicable. 1. Sample collection, preservation, transport and storage; 2. Sample preparation; 3. Reagents and compounds used; 4. Instrumentation; 5. General method type.

Figure 1

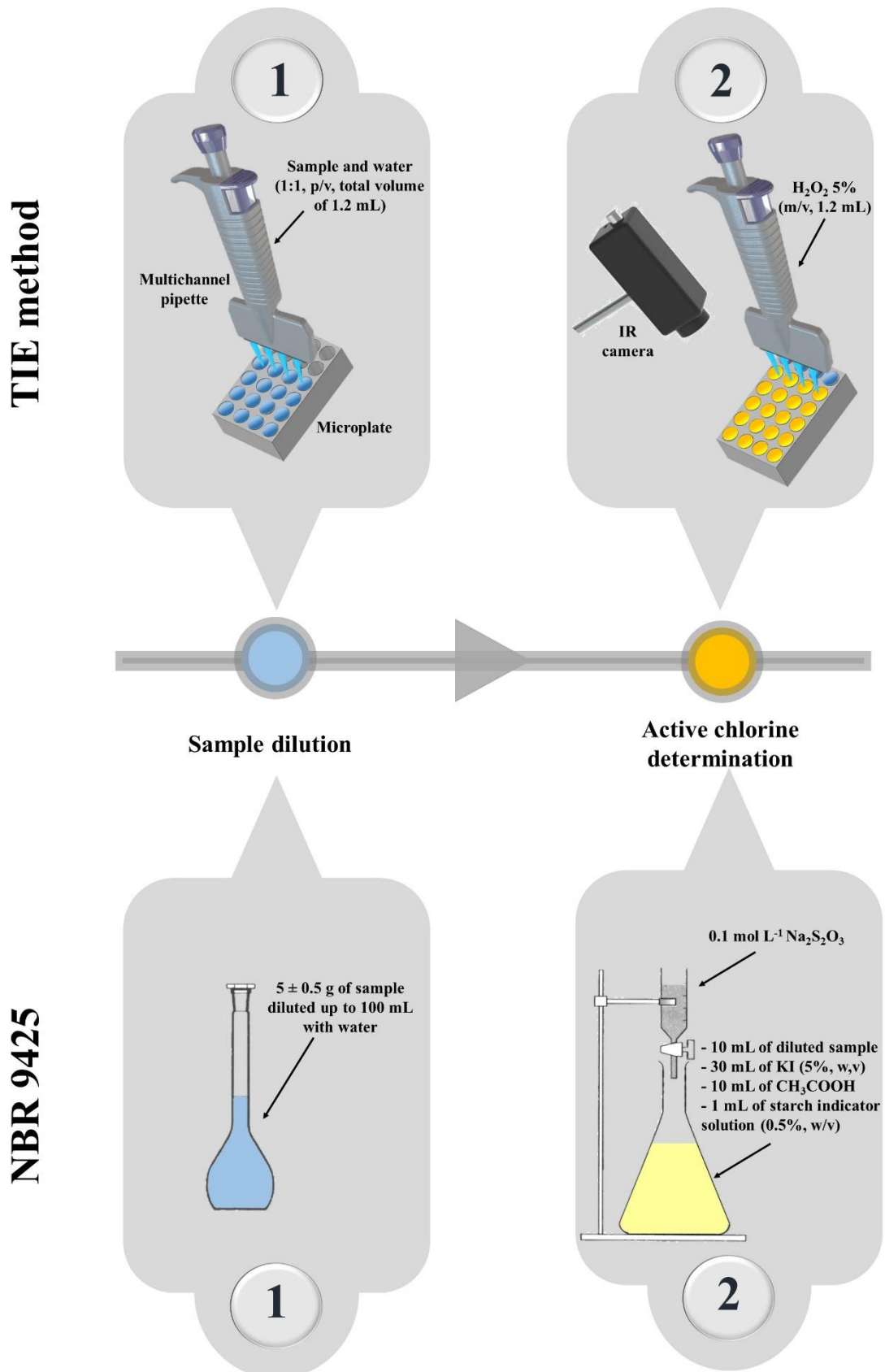


Figure 2

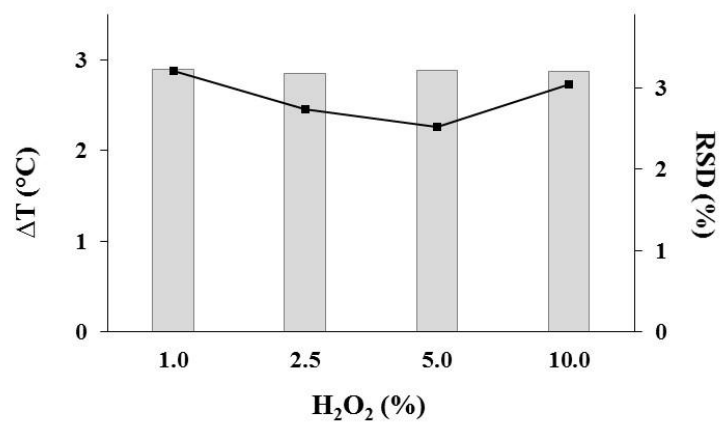


Figure 3

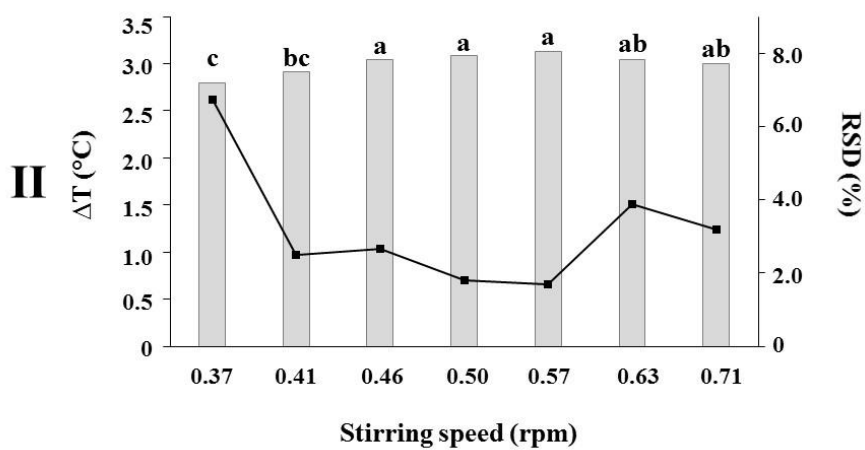
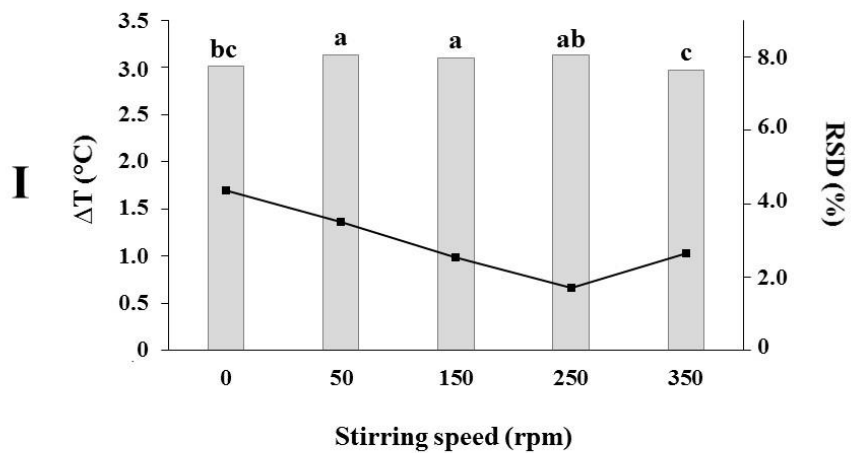


Figure 4

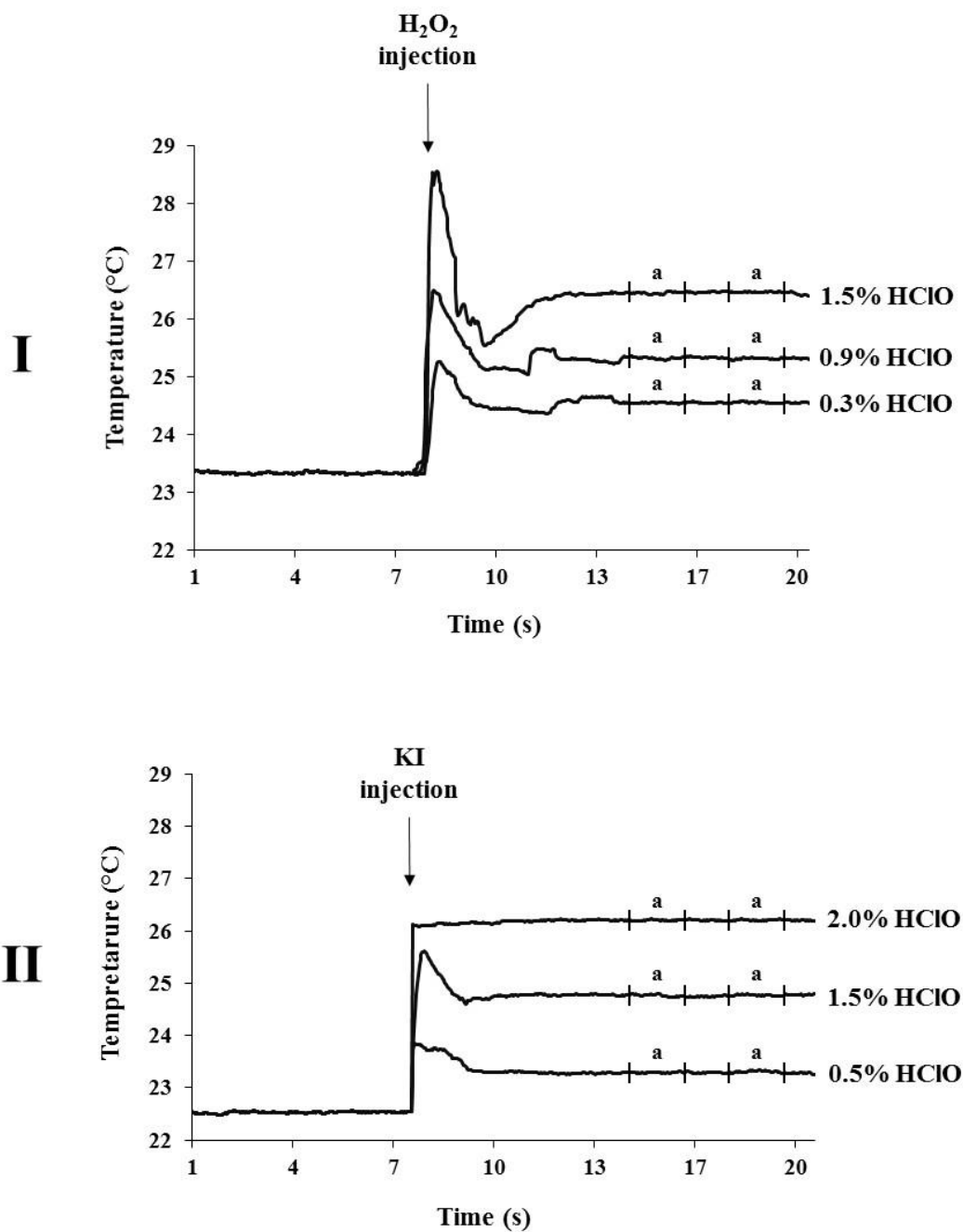
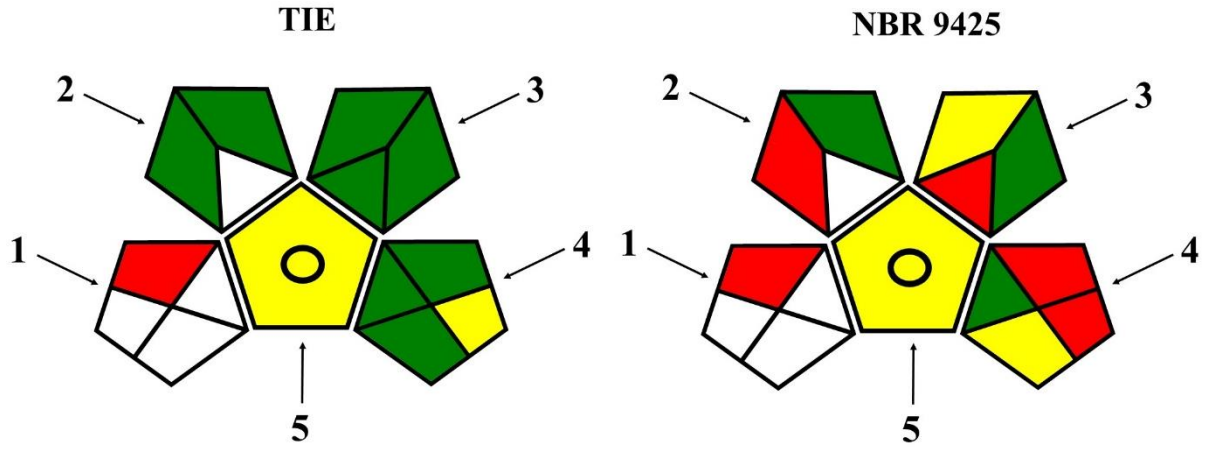


Figure 5



7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos no artigo 1, publicado no periódico *Analytical Methods* em 2018, intitulado “*Miniaturized, High Throughput and Green Determination of the Saponification Value of Edible Oils Using Thermal Infrared Enthalpimetry*”; no manuscrito 2 submetido ao periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society*, intitulado “*Fast, High Throughput Determination of Content Uniformity of Captopril Tablets by Thermal Infrared Enthalpimetry*” e no manuscrito 3, intitulado “*A Green Method for Determination of Active Chlorine in Bleaching Solutions by Thermal Infrared Enthalpimetry*”, que está em fase de elaboração anteriormente à etapa de submissão.

De maneira geral, todos os estudos desenvolvidos na tese de doutorado se mostraram vantajosos em comparação aos métodos convencionais de análise. É importante destacar que os métodos desenvolvidos tiveram um grande impacto positivo quando relacionados aos aspectos ambientais. Em termos de redução no uso de reagentes, foi alcançada uma redução de 41 vezes na quantidade de reagentes químicos utilizados durante a análise do índice de saponificação em amostras de óleo vegetal. Ainda neste contexto, uma diminuição significativa do uso de produtos químicos e de água na ordem de 31 e 50 vezes, respectivamente, foi obtida na determinação da uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril e de cloro ativo em amostras de saneantes. Em virtude da diminuição dos reagentes utilizados, a quantidade de resíduos gerada diminuiu cerca de 15 e 31 vezes para os métodos desenvolvidos para a determinação do índice de saponificação e a da uniformidade de conteúdo, respectivamente. Entretanto, na determinação do teor de cloro ativo em amostras e hipoclorito de sódio, foi necessário o uso de 1,2 mL de H₂O₂ 5% durante as análises, o qual não era necessário durante a determinação pelo método convencional. Desta forma, tendo em vista os produtos de degradação do H₂O₂, durante a determinação de cloro ativo nas amostras, houve a geração somente de água e oxigênio no final do processo, mostrando-se ambientalmente correto.

De acordo com as bases da química analítica verde, não somente a questão relacionada com a diminuição da geração de resíduos ao meio ambiente é importante durante o desenvolvimento de processos ou métodos analíticos. Outro ponto bastante importante está relacionado com a redução do consumo de energia durante a análise química, no caso de métodos analíticos. Como é sabido, a principal fonte de geração de energia ainda é baseada na queima de combustíveis fósseis, acarretando grande liberação de CO₂ para a atmosfera. Com isso, a poluição ambiental é aumentada, causando sérios problemas relacionados ao aquecimento global e desequilíbrios ambientais (VACCARO, 2016; KÜMMERER, 2017).

Neste sentido, os métodos desenvolvidos se mostraram ambientalmente corretos em relação a este parâmetro, tendo em vista que a quantidade de energia requerida foi reduzida em 625 vezes para a determinação do índice de saponificação e em 12 vezes para a determinação da uniformidade de conteúdo de comprimidos de captopril em comparação aos métodos oficiais de análise. No entanto, quando o método desenvolvido para determinação do teor de cloro ativo em saneantes é aplicado, este apresenta um gasto energético de 0,001 kWh, acarretando a liberação de 0,8 g de CO₂ ao meio ambiente. Isso não ocorre quando o método oficial de análise é empregado, tendo em vista que o mesmo não requer o uso de nenhum tipo de equipamento elétrico. Portanto, em termos de requerimentos de energia, o método desenvolvido apresenta-se com leve desvantagem quando comparado ao método oficial de análise.

Um dos pontos positivos relacionado ao método de determinação do teor de cloro ativo em saneantes está relacionado com a frequência de análise. Enquanto 12 amostras são analisadas em uma hora pelo método convencional, quando é feita a determinação por TIE, é possível analisar 300 amostras no mesmo período de tempo, demonstrando uma frequência de análise 25 vezes maior em comparação ao método de referência. Ainda neste contexto, os métodos de análise por TIE para a determinação do índice de saponificação e de uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril apresentaram, respectivamente, frequência de análise 300 e 24 vezes maior em comparação aos métodos oficiais. Isso demonstra que, em rotina laboratorial, os métodos propostos são extremamente mais vantajosos, tendo em vista que possibilita o controle de qualidade com maior eficiência. Além disso, como a frequência de análise é elevada, é possível realizar o controle do processo em tempos diferentes, a fim de diagnosticar possíveis falhas no processamento.

A química verde indica que quanto menores forem as quantidades de amostra utilizadas para uma análise química, mais ambientalmente correto é considerado o método desenvolvido. Isso se deve ao fato de que menores quantidades de reagentes geram menos resíduos. Neste contexto, somente o método de uniformidade de conteúdo não atendeu a este requisito, devido a análise exigir que seja empregada um comprimido por análise a fim de avaliar o conteúdo de princípio ativo por dose e, então inferir na questão de homogeneidade de um lote. No entanto, foi alcançada uma redução de 41 e 16 vezes na quantidade de amostra utilizada para a análise do índice de saponificação e de cloro ativo, respectivamente. Isso demonstra que ambos os métodos estão de acordo com o princípio de economia de átomos durante a análise, prevenindo de forma direta a redução da geração de resíduos ao meio ambiente (ANASTAS & EGHBALI, 2010; GALUSZKA *et al.*, 2013; KÜMMERER, 2017).

Para a realização de todas as análises propostas neste estudo é necessário uma câmera de infravermelho, de um software adequado e de uma micropipeta multicanal, dentre outros equipamentos. Diante disto, o maior investimento a ser feito está relacionado com a aquisição da câmera, a qual atualmente está disponível em diversos modelos com uma faixa bastante ampla de custo de aquisição. Mesmo assim, o custo do investimento apresenta retorno rápido em virtude da diminuição da quantidade de energia elétrica, tamanho da amostra e quantidade de reagentes empregados em todas as aplicações, o que torna os métodos desenvolvidos mais viáveis do ponto de vista econômico. Com isso, métodos simples, fáceis, mais ambientalmente corretos e com menores custos podem ser desenvolvidos.

Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que em termos de exatidão, todos os métodos desenvolvidos apresentaram-se adequados. Concordâncias compreendidas entre 97,4 a 102,1%, 99,6 a 101,9% e 99,2 a 100,8 % quando os métodos desenvolvidos pela TIE foram empregados para a determinação do índice de saponificação em óleos vegetais, uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril e do teor de cloro ativo em saneantes, respectivamente. Ainda neste contexto, pôde-se verificar que os métodos propostos apresentaram uma leve diminuição da precisão dos resultados com exceção da análise de uniformidade de conteúdo, tendo em vista que as análises volumétricas empregaram quantidade de amostra substancialmente maior. No entanto, mesmo com esta leve diminuição na precisão dos resultados, não há prejuízos na análise já que os valores de RSD se mantiveram na faixa de 1,3 a 2,9% e 1,8 a 2,8% nas determinações do índice de saponificação e do teor de cloro ativo respectivamente. Em contraste, para a análise de uniformidade de conteúdo nos comprimidos de captopril, foi verificado uma melhora na precisão dos resultados. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que a mesma quantidade de amostra foi utilizada em ambos os métodos de análise, o que demonstra que a TIE é mais precisa quando a quantidade de analito é a mesma. Os valores de RSD obtidos durante a determinação da uniformidade de conteúdo por TIE estiveram compreendidos entre 1,0 e 1,5% e, quando o método indicado pela Farmacopéia Brasileira foi utilizado, estes se mantiveram entre 1,6 e 2,9%. Estes valores de RSD refletem diretamente na obtenção de valores de aceitação diferentes, o que muitas vezes demanda novas análises para verificar se o lote de medicamentos será ou não aprovado. Neste quesito, em ambos os métodos utilizados na análise, os resultados remeteram a aceitação dos lotes de medicamentos submetidos ao teste. No entanto, em virtude da TIE apresentar maior exatidão, alguns lotes podem por vezes necessitarem de uma segunda análise quando submetidos ao método oficial, o que provavelmente não será necessário empregando o método desenvolvido.

Com o emprego dos métodos desenvolvidos por TIE para controle de qualidade, é possível automatizar as análises de uniformidade de conteúdo, teor de cloro ativo e determinação do índice de saponificação de forma fácil e rápida. Além disso, o método de índice de saponificação mostrou a viabilidade do uso dos mesmos microdispositivos (microplacas) para preparo de amostra e determinação dos analitos, o que reflete em métodos que mesmo miniaturizados apresentam adequada exatidão e precisão. Além disso, como os microreatores empregados são dispostos em microplacas, é possível a determinação simultânea de 24 amostras em uma mesma placa, o que reflete diretamente em uma maior frequência de análise sem perda da qualidade dos resultados obtidos.

A TIE já foi aplicada como método de controle de qualidade para diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e químicos, sendo que em todas as aplicações mostrou-se adequada em termos analíticos e sempre atendendo os princípios básicos da química analítica verde (BARIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; TISCHER *et al.*, 2017; TISCHER *et al.*, 2017; DALLA NORA, *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Novas abordagens da TIE com o objetivo de diminuir a incidência de erros provenientes do ambiente durante as análises devem fazer parte de estudos posteriores, a fim de tornar a técnica mais robusta e com melhores condições de exatidão e precisão. No entanto, a questão relacionada à escolha das reações ainda deve seguir a lógica da escolha por reações seletivas, uma vez que os reagentes empregados como excesso reagem com substâncias de uma classe, normalmente não sendo seletivas a um único analito na matriz. Além disso, outra limitação da técnica está relacionada com a perda de calor para o meio, visto que os sistemas usados são abertos, permitindo tanto a perda de matéria quanto de calor. Devido a isso, novos reatores capazes de diminuir a perda de calor devem ser estudados com o objetivo de agregar maior sensibilidade à técnica. O emprego da TIE para controle de reações lentas também é outra limitação da TIE, visto que durante reações lentas, a diferença de temperatura é obtida durante um longo período, o que é prejudicial em virtude da perda de calor do sistema para a vizinhança.

Mesmo sendo uma técnica que permite o controle de qualidade de diversos tipos de amostras empregando quantidades de reagentes bastante menores aos métodos convencionais, torna-se ainda necessário o desenvolvimento estudos que diminuam a quantidade de reagentes ainda mais, garantindo um caráter ainda mais sustentável do método. Além disso, uma das principais limitações da TIE está relacionada com a sensibilidade, uma vez que baixas variações de temperatura são difíceis de serem monitoradas. Esta limitação pode ser contornada empregando câmeras de infravermelho com alta resolução, que permitem a determinação de

baixas variações de temperatura, permitindo a análise de substâncias em concentrações relativamente baixas ou que apresentem entalpia de reação baixa.

Em suma, de acordo com os resultados apresentados nos manuscritos, é possível observar que a TIE é uma alternativa adequada para a determinação do índice de saponificação em amostras de óleo comestível, determinação de uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril e do teor de cloro ativo em soluções de hipoclorito de sódio. Em todos os métodos propostos, o impacto ambiental é menor quando comparado aos métodos oficiais, possibilitando a análise química com menor geração de resíduos químicos e menor gasto energético, estando de acordo com as principais bases da química analítica verde. Além disso, com a integração de processos alcançada pelo uso do frasco único de reação, uma elevada frequência analítica foi obtida. Desta forma, o emprego dos métodos miniaturizados na TIE, aliado a utilização de um único frasco de reação, garante métodos com adequada exatidão e precisão, os quais são uma boa alternativa para aplicação em análises de rotina na indústria de alimentos, farmacêutica e de saneantes.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, é possível observar que a TIE apresentou-se como uma alternativa adequada para a determinação do índice de saponificação em amostras de óleo comestível, determinação de uniformidade de conteúdo em comprimidos de captopril e do teor de cloro ativo em soluções de hipoclorito de sódio. Em todos os métodos propostos, o impacto ambiental é menor quando comparado aos métodos oficiais, possibilitando a análise química com menor geração de resíduos químicos e menor gasto energético, estando de acordo com as principais bases da química analítica verde. Além disso, com a integração de processos alcançada pelo uso do frasco único de reação nos métodos propostos, uma elevada frequência analítica foi obtida em todos os métodos. Desta forma, o emprego dos métodos miniaturizados por TIE aliado a utilização de um único frasco reacional garantem métodos com adequada exatidão e precisão, simples, rápidos e com custo relativamente baixo de implementação. Neste sentido, a TIE pode ser considerada uma ferramenta viável frente aos métodos oficiais de análise para aplicação em rotinas laboratoriais de controle de qualidade tanto na indústria de alimentos, farmacêutica e de saneantes.

REFERÊNCIAS

- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. New York: Oxford University Press, 1998. 152 p.
- ATKINS, P.; PAULA, J. **Atkins' physical chemistry**. Oxford: OUP Oxford, 2010. 972 p.
- BARIN, J. S.; TISCHER, B.; STANGHERLIN, A. O.; WAGNER, R.; COSTA, A. B.; FLORES, E. M. M.; Infrared thermal imaging: a tool for simple, simultaneous, and high-throughput enthalpimetric analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 12065-12070, 2015.
- BOUDEVILLE, P.; BURGOT, J.L. Direct injection enthalpimetry and differential kinetic analysis-analytical and calorimetric possibilities. **Thermochemica Acta**, v. 204, n. 1, p. 89-97, 1992.
- CINELLI, M.; COLES, S. R.; KIRWAN, K. Analysis of the potentials of multi criteria decision analysis methods to conduct sustainability assessment. **Ecological Indicators**, v. 46, p. 138-148, 2014.
- CUIBUS, L.; GIRÁLDEZ, A. C.; FITO, P. J.; FABBRI, A. Application of infrared thermography and dielectric spectroscopy for controlling freezing process of raw potato. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 24, p. 80-87, 2014.
- DALLA NORA, F. M.; STANGHERLIN, A. O.; LUCAS, B. N.; FREITAS, D. F.; DUARTE, F. A.; MELLO, E. O.; CICHOSKI, A. J.; BARIN, J. S. Miniaturized, high-throughput and green determination of the saponification value of edible oils using thermal infrared enthalpimetry. **Analytical Methods**, 2018.
- ELDIN, A. B.; ISMAIEL, O. A.; HASSAN, W. E.; Green analytical chemistry: Opportunities for pharmaceutical quality control. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 861-871, 2016.
- EPA. National Service Center for Environmental Publications. **Cycle Life Assessment: Principle and Practice**, Reston. 2006.
- FAN, Y. V.; VARBANOV, P. S.; KLEMES, J. J.; NEMET, A. Process efficiency optimisation and integration for cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 177-183, 2018.
- FEKETE, G.; DORSEY-HALL, J.; HARRIS, J.; HENRY, N.; JOSEPH, L.; THOMPSON, T. **Office of Pollution Prevention and Toxics, The Presidential Green Chemistry Challenge, Award Recipients, 1996–2009**, US Environmental Protection Agency, Washington, 2009.
- FERREIRA, D. F. **Análise rápida da acidez de bebidas em dispositivos de papel empregando entalpimetria no infravermelho**. 2016, 125 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

- FITZPATRICK, D. E.; LEY, S. V. Engineering chemistry: integrating batch and flow reactions on a single, automated reactor platform. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 629-635, 2016.
- FOSTER, A. M.; KETTERINGHAM, L. P.; SWAIN, M. J.; KONDJAYAN, A.; HAVET, M.; ROUAUD, O.; EVANS, J. A. Design and development of apparatus to provide repeatable surface temperature–time treatments on inoculated food samples. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 1, p. 7-18, 2006.
- GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.
- GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61-72, 2012.
- GOWEN, A. A.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; MCDONNELL, K.; O'DONNELL, C. P. Applications of thermal imaging in food quality and safety assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 4, p. 190-200, 2010.
- GRIME, J. K. Enthalpimetry - a change of emphasis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 22-28, 1981.
- HAQ, N.; IQBAL, M.; ALANAZI, F. K.; ALSARRA, I. A.; SHAKEEL, F. Applying green analytical chemistry for rapid analysis of drugs: Adding health to pharmaceutical industry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 1, p. S777-S785, 2017.
- HAYASHI, Y. Pot economy and one-pot synthesis. **Chemical Science**, v. 7, n. 2, p. 866-880, 2016. .
- HOLST, G. C. **Testing and evaluation of infrared imaging systems**. JCD Publishing, 2008. 392 p.
- KEITH, L. H.; GRON, L. U.; YOUNG, J. L. Green Analytical Methodologies. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2695-2708, 2007.
- KLEMEŠ, J. J.; VARBANOV, P. S.; KRAVANJA, Z. Recent developments in process integration. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 10, p. 2037-2053, 2013.
- KÜMMERER, K. Sustainable Chemistry: A Future Guiding Principle. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 52, p. 16420-16421, 2017.
- LIU, F.; MAITÉ, A.; OLIVEIRA, V. K.; CLACENS, J.; CAMPO, F.; JÉRÔME, F. Combination of Pd/C and Amberlyst-15 in a single reactor for the acid/hydrogenating catalytic conversion of carbohydrates to 5-hydroxy-2,5-hexanedione. **Green Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 4110-4114, 2014.

MASINO, F.; CHINNICI, F.; FRANCHINI, G. C.; ULRICI, A.; ANTONELLI, A. A study of the relationships among acidity, sugar and furanic compound concentrations in set of casks for Aceto Balsamico Tradizionale of Reggio Emilia by multivariate techniques. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 673-679, 2005.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8-19, 2012.

MORRIS, A. S.; LANGARI, R. Chapter 14 - Temperature measurement. In: **Measurement and instrumentation**. Boston: Academic Press, p.347-396, 2012.

NAJIB, F. M.; ZEWAR, S.; ABDULLA, A. M. A new sensor for thermometric titrations. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 141-148, 2007.

NG, E. Y. K. A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 48, n. 5, p. 849-859, 2009.

NOTT, K. P.; HALL, L. D. Advances in temperature validation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 11, p. 366-374, 1999.

OLIVEIRA, W. A.; PASQUINI, C. Determination of ethanol using flow injection enthalpimetry. **Analyst**, v. 113, n. 2, p. 359-360, 1988.

OLIVEIRA, A. S.; BALLUS, C. A.; MENEZES, C. R.; WAGNER, R.; PANIZ, J. N. G.; TISCHER, B.; COSTA, A. B.; BARIN, J. S.; Green and fast determination of the alcoholic content of wines using thermal infrared enthalpimetry. **Food Chemistry**, v. 258, p. 59-62, 2018.

OLIVEIRA, A. S.; DALLA NORA, F. M.; MELLO, R. O.; MELLO, P. A.; TISCHER, B.; COSTA, A. B.; BARIN, J. S. One-Shot, reagent-free determination of the alcoholic content of distilled beverages by thermal infrared enthalpimetry. **Talanta**, v. 171, p. 335-340, 2017.

PARR, M. K.; SCHMIDT, A. H. Life cycle management of analytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 506-517, 2018.

PENA-PEREIRA, F.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIESNIK, J. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. **Green Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 3687-3705, 2015.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204-209, 2018.

PRIESTLEY, P. T.; SEBBORN, W. S.; SELMAN, R. F. W. Continuous-flow enthalpimetry. **Analyst**, v. 90, n. 1075, p. 589-593, 1965.

RAYNIE, D.; DRIVER, J. Green assessment of chemical methods, in: **Proceedings of the 13th Annual Green Chemistry and Engineering Conference**, Maryland. **Anais...** 2009.

STAHL, J. W. Nomenclature of thermometric and enthalpimetric methods in chemical analysis, **Pure and Applied Chemistry**, 66 , 2487-2492., 1994.

SUSZYŃSKI, Z.; ZARZYCKI, P. K. New approach for sensitive photothermal detection of C60 and C70 fullerenes on micro-thin-layer chromatographic plates. **Analytica Chimica Acta**, v. 863, p. 70-77, 2015.

TISCHER, B.; OLIVEIRA, A. S.; COSTA, A. B.; CICHOSKI, A. J.; BARCIA, M. T.; WAGNER, R.; BARIN, J. S. Rapid and simultaneous determination of acidity and salt content of pickled vegetable brine by using thermal infrared enthalpimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 34-37, 2017.

TISCHER, B.; OLIVEIRA, A. S.; FERREIRA, D. F.; MENEZES, C. R.; DUARTE, F. A.; WAGNER, R.; BARIN, J. S. Rapid microplate, green method for high-throughput evaluation of vinegar acidity using thermal infrared enthalpimetry. **Food Chemistry**, v. 215, p. 17-21, 2017.

TOBISZEWSKI, M.; MARĆ, M.; GAŁUSZKA, A.; NAMIEŚNIK, J. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10928, 2015.

VACCARO, L. Green chemistry. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2763-2765, 2016.

WANG, S.; TANG, J.; SUN, T.; MITCHAM, E. J.; KORAL, T.; BIRLA, S. L. Considerations in design of commercial radio frequency treatments for postharvest pest control in in-shell walnuts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 2, p. 304-312, 2006.

WASILEWSKI, J. C.; PEI, P. T. S.; JORDAN, J. Direct enthalpimetry: a new thermochemical approach to quantitative analysis. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 11, p. 2131-2133, 1964.

WIECEK, B. Review on thermal image processing for passive and active thermography, In: **27th Annual Conference of Engineering in Medicine and Biology**, Shanghai, China. 2005.