

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KAROLINA CUNHA SCHLOSSER

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL EM MEDICAMENTOS
HOMEOPÁTICOS POR ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiiana

2018

KAROLINA CUNHA SCHLOSSER

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL EM MEDICAMENTOS
HOMEOPÁTICOS POR ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana
Ernestina Barcelos da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Juliano
Smanioto Barin

Uruguiana

2018

KAROLINA CUNHA SCHLOSSER

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL EM MEDICAMENTOS
HOMEOPÁTICOS POR ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Dissertação defendida e aprovada em: 27/04/2018

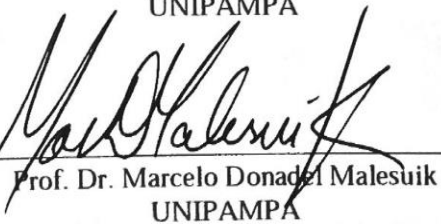
Banca examinadora:



Prof. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva
Orientadora
UNIPAMPA



Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin
UNIPAMPA



Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar saúde e força para nunca desistir dos meus sonhos.

A Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), a todo o corpo docente deste programa que auxiliaram no meu aprendizado e formação e ao LDCQ.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA) e ao Núcleo de Tecnologia dos Alimentos (NTA), pela possibilidade de execução desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo incentivo a pesquisa.

A minha querida orientadora Fabiana e meu co-orientador Juliano, que me acolheram no meio do caminho. Obrigada pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos e pela disponibilidade.

A minha família, meu porto seguro! Em especial aos meus avós José e Ana (*in memória*), pela criação, amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu namorado Adilmar que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis, para que nunca desistisse dos meus objetivos.

A todos os colegas de curso pelo companheirismo nas viagens, auxílio com atividades, trabalhos e pesquisa, em especial meu colega e amigo Ivan, que compartilhou comigo um ano de projeto de pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e me ajudaram na conclusão do presente estudo, muito obrigada!

RESUMO

Neste estudo, um método simples e rápido é proposto para determinação do teor de etanol em medicamentos homeopáticos por entalpiometria no infravermelho (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*). Amostras contendo uma faixa de concentração adequada de etanol foram formuladas a fim de obter representações do processo produtivo. Reagente (água purificada ou etanol absoluto) foi adicionado diretamente ao medicamento homeopático e o aumento da temperatura causado pelo calor de diluição foi monitorado usando uma câmera no infravermelho. O volume total, a velocidade de agitação e a taxa de dispensação da micropipeta foram os parâmetros estudados na otimização do método, que utilizou um planejamento experimental (DoE) para obtenção dos resultados usando um software de modelagem estatística. O método foi validado nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez. A faixa linear foi obtida de 4% (etanol, v/v) a 55% (etanol, v/v). O método proposto mostrou exatidão baseado na concordância com o método oficial e valor declarado. Assim, a TIE demonstrou-se uma boa alternativa para determinação de etanol em medicamentos homeopáticos apresentando ainda vantagens frente aos métodos convencionais, como baixo custo, análises mais rápidas e concordância com os princípios da química verde.

PALAVRAS-CHAVE: calor de diluição, determinação de etanol, infravermelho, medicamentos homeopáticos, termografia.

ABSTRACT

In this work, a simple and fast method is proposed for ethanol determination content in homeopathic medicines by thermal infrared entalpimetry (TIE). Samples containing appropriate alcohol concentration range were compounding in order to obtained representative manufacturing process. Reagent (purified water or absolute ethanol) was added directly into homeopathic medicine and temperature increase caused by heat of dilution was monitored using an infrared camera. Total volume, agitation speed and micropipette dispensing rate were the most significant parameters studied to method optimization. A design-of-experiments (DoE) was taken in the collection of the data, and the results were then modeled using statistical modeling software. The method was validated in the following parameters: selectivity, linearity, linear range, precision (repeatability and intermediate precision), limit of detection and quantification, accuracy and robustness. Linear range was obtained from 4% (ethanol, v/v) to 55% (ethanol, v/v). The method showed accuracy based on agreement with official method and declared value. Thus, the TIE it was demonstrated a good alternative for the determination of ethanol in homeopathic medicines, presenting advantages over the conventional methods, such as low cost, faster analysis and compliance with the principles of green chemistry.

KEYWORDS: dilution heat, ethanol determination, homeopathic medicines, infrared, termography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Arranjo experimental utilizado para análises de TIE.	22
FIGURA 2 - Processo de execução da análise de TIE e reação térmica observada através da câmera de infravermelho após injeção do reagente.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia gasosa
DoE	Planejamento de experimentos (do inglês, <i>Design of Experiments</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHFB	Formulário Homeopático da Farmacopeia Brasileira
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (do inglês, <i>Gas Chromatography Flame Ionization Detection</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantitation</i>)
NCCIH	<i>National Center for Complementary and Integrative Health</i>
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TIE	Entalpietria no infravermelho térmico (do inglês, <i>Thermal Infrared Enthalpimetry</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Medicamentos homeopáticos.....	13
3.2 Etanol.....	15
3.2.1 Etanol em formulações farmacêuticas líquidas de uso oral.....	16
3.3 Métodos para determinação de etanol.....	17
3.3.1 Método por destilação	18
3.3.2 Método por cromatografia gasosa	19
3.4 Entalpietria no infravermelho	20
4. MANUSCRITO	24
5. DISCUSSÃO GERAL	53
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

O etanol ou álcool etílico é uma substância comum, sendo amplamente empregada na indústria farmacêutica. É bastante utilizado como solvente, podendo também ser aplicado para aumentar a solubilidade de alguns componentes que são menos solúveis em água ou para a preservação da formulação, contra o desenvolvimento microbiano (CROWLEY, 2006).

Dentre os medicamentos que contém etanol em sua composição podemos citar os medicamentos homeopáticos. Preparados a partir de um ou mais insumos ativos derivados de ingredientes vegetais, animais ou minerais, que são submetidos a sucessivas diluições seguidas de sucussão com auxílio de uma solução hidroalcoólica (BRASIL, 2007).

Devido ao alto grau alcoólico que estas formulações apresentam, seu uso oral deve ser administrado com atenção, pois a ingestão inadequada do etanol pode causar hipoglicemia e efeitos no sistema nervoso central, como a descoordenação muscular. Além disso, a exposição na infância pode ter influência no desenvolvimento da criança, devendo haver cautela na adição de etanol em formulações homeopáticas destinadas a este público (HUZAR e WODNICKA, 2013).

Deste modo, analisar os medicamentos por meio de métodos analíticos acessíveis, que monitorem a qualidade da formulação através da quantificação de seus componentes, em particular àqueles que podem trazer riscos à saúde é essencial. Por sua vez, nos medicamentos homeopáticos a análise do etanol é imprescindível para o controle de qualidade, assegurando a administração segura e eficiente da formulação.

Na Farmacopeia Brasileira encontram-se descritos dois métodos para a determinação de etanol em medicamentos, o método por destilação e o método por cromatografia gasosa (CG). A técnica de destilação apresenta como principal problemática o tempo de análise, a necessidade de grandes quantidades de amostras e o uso de reagentes e solventes tóxicos, sendo um empecilho quando empregada para a análise de medicamentos. A análise por CG apresenta como principais inconvenientes o custo elevado de equipamento e a necessidade de estrutura laboratorial e analistas especializados (BRASIL, 2010).

Neste contexto, mostra-se importante o desenvolvimento de métodos de análise simples, rápidos, de baixo custo, sem uso de solventes tóxicos e com volume reduzido

de amostra, para emprego no controle de qualidade dos medicamentos disponíveis comercialmente. Assim, um novo método de análise denominado entalpimetria no infravermelho foi proposto por Barin e colaboradores (2015), no qual estas limitações são minimizadas. A técnica baseia-se na monitorização da variação de temperatura de uma reação química com auxílio de uma câmera infravermelha, a qual pode explorar dentre outros fenômenos o calor de diluição, podendo este ser utilizado para quantificar o etanol em diversos tipos de amostras (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O método proposto já mostrou resultados promissores, podendo ser uma opção viável para a determinação de acidez em amostras de alimentos (TISCHER *et al.*, 2017). Ademais, Oliveira e colaboradores (2017) empregaram o método para a determinação do teor alcoólico em bebidas destiladas, o qual apresentou um bom desempenho, com grande potencial para ser aplicado em análises de rotina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica utilizando o método de entalpimetria no infravermelho para a determinação de etanol em medicamentos homeopáticos.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais da análise pelo método proposto;
- Validar a metodologia proposta segundo parâmetros da ANVISA e INMETRO;
- Quantificar o teor de etanol por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama nos medicamentos homeopáticos;
- Avaliar a eficiência do método proposto comparando com os resultados obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Medicamentos homeopáticos

A homeopatia ou medicina homeopática é um sistema médico alternativo desenvolvido na Alemanha há mais de 200 anos pelo médico Samuel Hahnemann (NCCIH, 2015).

No Brasil, o regulamento que dispõe sobre a manipulação, receituário, industrialização e venda de produtos homeopáticos (Decreto n. 57477/65 e Portaria n. 17/66) entrou em vigor no ano de 1965, porém apenas em 2006 a Política Nacional de Assistência Farmacêutica e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares consolidaram a presença da homeopatia no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2011).

Em 2008, a homeopatia foi reconhecida como uma especialidade médica através do convênio firmado pelo Conselho Federal de Medicina, a Associação Médica Brasileira e a Comissão Nacional de Residência Médica. Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou e lançou recentemente a 1ª edição do Formulário Homeopático da Farmacopeia Brasileira (FHFB), buscando solidificar e ampliar a inserção da homeopatia na saúde pública (BRASIL, 2017).

Segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª edição (BRASIL, 2011), medicamento homeopático é “toda forma farmacêutica de dispensação ministrada segundo o princípio da semelhança e/ou da identidade, com finalidade curativa e/ou preventiva. É obtido pela técnica de dinamização e utilizado para uso interno ou externo”.

O "princípio da semelhança" a qual a homeopatia baseia-se utiliza medicamentos que causam sinais e sintomas similares (homeo) às doenças, estimulando uma ação ou reação secundária do organismo contra seus próprios distúrbios, diferentemente da medicina convencional (medicamentos alopáticos), na qual o "princípio dos contrários" é aplicado em boa parte da terapia, utilizando medicamentos com ação primária, contra os sinais e sintomas das doenças (TEIXEIRA, 2017).

Os medicamentos homeopáticos são derivados de substâncias que provêm de plantas, minerais ou animais, sendo o reino vegetal a maior fonte para a preparação destes medicamentos, utilizando-se da planta inteira ou de partes específicas. Para

diminuir a toxicidade, essas substâncias medicinais são diluídas (RELTON *et al.*, 2017). O medicamento acabado pode ser encontrado de diferentes formas, como grânulos de açúcar, géis, pomadas, cremes, comprimidos, gotas, dose única, entre outras (BRASIL, 2011).

Em seu processo de formulação, um ou mais insumos ativos podem ser utilizados. As técnicas de preparação envolvem a extração da droga com auxílio de líquido extrator, usualmente etanol a 96% (v/v) e suas diluições. Este preparado, denominado tintura-mãe é submetido a sucessivas diluições, seguida de agitação vigorosa e a potenciação do produto em diferentes graus. Para as formas líquidas, o etanol é utilizado como veículo para a dinamização do medicamento, normalmente apresentando uma graduação alcóolica final de 30% (v/v). Quando apresentado na forma de dose única, água purificada ou etanol até 5% (v/v) podem ser empregados como diluente (BRASIL, 2007).

Com o crescente uso de medicamentos homeopáticos, sua segurança e qualidade tornaram-se uma grande preocupação para autoridades de saúde e indústrias farmacêuticas. Em contrapartida, os requisitos e métodos para controle de qualidade destes medicamentos, essencialmente o medicamento acabado, são muito mais complexos do que para drogas químicas, visto que sua qualidade pode ser influenciada tanto pelo procedimento de produção quanto pela qualidade da matéria-prima. Diante disso, a *World Health Organization* (WHO) publicou um documento a fim de apoiar as autoridades reguladoras nacionais e fabricantes de medicamentos homeopáticos para garantir a segurança e a qualidade dos mesmos, implementando políticas, regulamentos e normas que já são utilizados para a medicina tradicional e identificando potenciais problemas de segurança relacionado à sua produção (WHO, 2009).

Uma grande dificuldade enfrentada no controle de qualidade de medicamentos homeopáticos é que estes são tipicamente administrados com alta diluição, e os insumos ativos até mesmo não são detectáveis ou quantificáveis nos produtos finais. Por este motivo, estes produtos não são alvo de preocupação em relação à segurança biológica. Entretanto, outros aspectos devem ser levados em consideração, como por exemplo, a frequente automedicação e deficiência de orientações de uso. Em função da natureza farmacológica e toxicológica, principalmente dos excipientes e dos diluentes, a avaliação dos riscos deve levar em conta a sua exposição global, uma vez que qualquer substância encontrada pode ser potencialmente tóxica após uma utilização a longo prazo

ou intensiva, tornando alguns componentes destes medicamentos, como o etanol que usualmente é empregado em altas concentrações, um risco à saúde. Desta forma, torna-se crucial o emprego correto destes excipientes na formulação e métodos adequados para determinação dos mesmos no produto acabado, a fim de garantir a qualidade do produto ao consumidor (WHO, 2009).

3.2 Etanol

O etanol ou álcool etílico é um líquido incolor, miscível em água e outros compostos orgânicos, inflamável, com ponto de fusão de $-114,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e de ebulição de $78,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresentando menor densidade que a água: $0,789\text{ g/mL}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (REIS, 2006).

Sua obtenção pode se dar de três maneiras: por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa, a qual é a mais comumente realizada (LIMA *et al.*, 2001). Na via fermentativa, o etanol é produzido a partir da fermentação de açúcares encontrados na cana de açúcar, beterraba, milho, trigo, sorgo, entre outros, normalmente por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que realiza a fermentação alcoólica. Sua produção envolve três etapas principais: a preparação da solução nutriente, a fermentação e a destilação (SILVA, 2007).

O etanol é amplamente utilizado pela indústria, sendo empregado na produção de bebidas alcoólicas, desinfetantes domésticos e hospitalares, álcool combustível e na gasolina como aditivo. Também é utilizado como solvente em tintas, produtos farmacêuticos, cosméticos, etc. (BENEDETTI *et al.*, 2015).

Em relação à ingestão do etanol, ela deve ocorrer de forma adequada, atentando para os limites recomendados, pois este é considerado uma substância psicodisléptica, ou seja, modifica a atividade mental normal, sendo capaz de provocar surtos psicóticos, alucinações e delírios quando utilizado de forma abusiva (BOGLIOLO, 2011). Além disso, pode causar intoxicações graves no organismo (WHO, 2015).

A determinação desta substância é de grande interesse, principalmente nas indústrias farmacêutica e de bebidas possibilitando, por exemplo, o monitoramento da formação de etanol para controle da fermentação, sua influência nas características sensoriais do produto como aroma e sabor e para análises de controle de qualidade (MATAIX e CASTRO, 2000).

3.2.1 Etanol em formulações farmacêuticas líquidas de uso oral

Em preparações orais líquidas, assim como em muitas outras preparações farmacêuticas, o etanol é frequentemente utilizado como solvente ou solvente auxiliar, aumentando a solubilidade de alguns ingredientes menos solúveis em água (FERREIRA, 2011). Entretanto, o emprego desta substância nos medicamentos de uso interno pode causar efeitos tóxicos agudos e crônicos, principalmente quando ingeridos por crianças (HUZAR e WODNICKA, 2013). Além disso, o etanol pode influenciar no desenvolvimento das crianças quando houver exposição pré-natal, tendo relatos de problemas como déficits de aprendizagem e memória, além de dificuldades no desenvolvimento social e emocional (JACOBSON e JACOBSON, 2002).

Segundo Little (2004), o etanol não pode ser considerado apenas um solvente. É uma substância metabolicamente ativa, que pode resultar em efeitos indesejados por intoxicações com dose excessiva acidental e toxicidade associada ao uso contínuo (FIOCCHI; RIVA e GIOVANNINI, 1999).

Essas informações levaram muitas agências internacionais, incluindo a WHO e a *Food and Drug Administration* (FDA), a restringir e/ou proibir o uso desta substância em alguns tipos de medicamentos, como xaropes e polivitamínicos de acordo com a faixa etária a que se destina (FDA, 2016; WHO, 2010).

A FDA recomenda a ausência de etanol em medicamentos destinados a crianças, e quando necessário, a quantidade não deve atingir concentração superior a 0,25g/L no sangue por dose. Ainda, a FDA e a WHO propõem limites de etanol em formulações farmacêuticas líquidas de venda livre menor que 0,5% para crianças com menos de 6 anos de idade, menor que 5% para crianças entre 6 e 12 anos e menor que 10% para crianças com mais de 12 anos. No entanto, estes limites não consideram a dose prescrita (FDA, 2016; WHO, 2010).

No Brasil, a presença do etanol está proibida nos estimulantes de apetite e crescimento, fortificantes, tônicos e complementos de ferro e fósforo desde 2001 (BRASIL, 2001). Além disso, polivitamínicos de uso pediátrico para crianças de até 12 anos, devem ter concentração máxima de etanol de 0,5% e as rotulações de bulas devem conter o alerta: “Contém 0,5% de etanol”. Os polivitamínicos de uso adulto podem apresentar concentração máxima de 2% de etanol em suas formulações e devem trazer

no rótulo, na bula e em materiais de divulgação a frase de advertência "Produto de uso exclusivo em adultos. O uso em crianças representa risco à saúde" (BRASIL, 2002).

Para os medicamentos homeopáticos, deve-se informar a composição qualitativa e quantitativa para os insumos ativos, conforme nomenclatura oficial, e qualitativa para os insumos inertes. Deve-se mencionar para os insumos ativos a potência/escala e, abaixo da composição a graduação alcoólica do produto final, para formulações líquidas (BRASIL, 2009).

Segundo o *National Center for Complementary and Integrative Health* (NCCIH, 2015), a FDA permite maiores níveis de etanol em medicamentos homeopáticos do que em medicamentos convencionais. Neste contexto, deve-se reconhecer que as fontes ou vias de administração adicionais deste diluente em alimentos/bebidas ou tratamentos concomitantes podem contribuir para a exposição diária total, tornando-se um possível risco à saúde do consumidor quando o medicamento não é administrado de maneira adequada ou na ausência de Boas Práticas de Fabricação e controle de qualidade, visto que muitos destes são fabricados em pequena escala (*pharmaceutical compounding*) (WHO, 2009). Por vezes, estes medicamentos são vistos como uma alternativa mais segura quando comparados aos medicamentos alopáticos devido ao alto grau de diluição do princípio ativo, porém como são vendidos como um hidroalcolato, com concentrações de etanol acima de 30%, não se pode considerar o etanol apenas como um insumo inerte (FIOCCHI; RIVA e GIOVANNINI, 1999). Chirumbolo e Bjorklund (2017) vêm estudando os possíveis problemas de toxicidade destes medicamentos em modelos *in vitro* e afirmam que o etanol presente nestas preparações pode representar uma grande preocupação devido à sua citotoxicidade, quando essas concentrações excedem a dose máxima tolerável de álcool.

3.3 Métodos para determinação de etanol

Há vários métodos descritos na literatura para a determinação de etanol, podendo estes ser físicos como a picnometria, químicos como o método do dicromato ou enzimáticos como os ensaios enzimáticos colorimétricos (REIS, 2006). Porém, em sua maioria possuem procedimentos de pré-tratamento complicados, como pesagens precisas ou destilação prévia, prolongando o tempo de análise e necessitando de grandes quantidades de amostra (WANG, 2003). Esses aspectos dificultam o emprego destas

técnicas em análises de rotina. Além disso, alguns ainda requerem o uso de reagentes tóxicos e outros como os métodos enzimáticos apresentam baixa estabilidade, reprodutibilidade e precisão (WANG, 2003).

Em formulações farmacêuticas, a determinação de etanol pode ser realizada por meio de dois métodos oficiais segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição: (a) o método por destilação, adequado para análise da maioria dos extratos fluidos e tinturas e (b) o método por cromatografia gasosa, indicado para as demais formas farmacêuticas (BRASIL, 2010). Porém, estes métodos são laboriosos necessitando de grande quantidade de amostra, extenso preparo da mesma, além de utilizarem reagentes tóxicos e exigirem instrumentação sofisticada e analistas especializados (MATAIX e CASTRO, 2000; BENEDETTI *et al.*, 2015). Não foram encontrados na literatura métodos envolvendo a determinação de etanol por outras técnicas amplamente utilizadas na análise de medicamentos, como por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência.

3.3.1 Método por destilação

A palavra destilação, derivada do latino *destillaire*, significa gotejar ou pingar, e é deste modo, em pequenas quantidades, que o líquido no qual se deseja separar é obtido pelo processo de destilação. Essa técnica de separação é baseada no fenômeno de equilíbrio líquido-vapor de misturas, sendo um processo bastante comum em algumas indústrias, consistindo no aquecimento e vaporização das substâncias para, em seguida, condensá-las e recolher a substância mais pura em outro compartimento (FERREIRA *et al.*, 2007).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira o método por destilação deve ser realizado com o auxílio de um balão destilador, com capacidade de duas a quatro vezes o volume do líquido a ser aquecido. Deve-se tomar precaução para minimizar a perda de etanol por evaporação e a velocidade de destilação deve permitir a obtenção de destilados límpidos (BRASIL, 2010).

Para líquidos com menos de 30% de etanol (declarados no rótulo) deve-se transferir no mínimo 35 mL da amostra para o balão. Adicionar mesma quantidade de água, destilar e coletar um volume cerca de 2 mL menor que o volume inicial da amostra. Adicionar água até obter o volume inicial e homogeneizar. Determinar a densidade do líquido a 20°C. Para àqueles com mais de 30% de álcool deve-se diluir a

amostra com volume de água duas vezes maior e coletar um volume aproximado de 2 mL menor que duas vezes o volume inicial da amostra. Completar com água a volume igual a duas vezes o volume inicial. A proporção de etanol, em volume, é igual à metade daquela do líquido examinado (BRASIL, 2010).

Esta técnica ainda exige tratamento especial para líquidos contendo ácidos e bases voláteis, glicerol, iodo ou outras substâncias voláteis como em elixires, tinturas e preparações similares que contem altas proporções destas substâncias, além de etanol e água. Nestes casos, as amostras devem ser tratadas antes do processo de destilação, demandando maior tempo de análise e a adição de diferentes reagentes, por vezes tóxicos, dependendo da formulação a ser analisada (BRASIL, 2010).

3.3.2 Método por cromatografia gasosa

Segundo a Farmacopeia Brasileira, a cromatografia gasosa é:

Uma técnica de separação cromatográfica baseada na diferença de distribuição de espécies de uma mistura entre duas fases não miscíveis, na qual a fase móvel é um gás de arraste que se move através da fase estacionária contida em uma coluna. CG está baseada no mecanismo de adsorção, distribuição de massa ou exclusão por tamanho. É aplicada a substâncias e seus derivados que se volatilizam sob as temperaturas empregadas, e é utilizada para identificação, testes de pureza e determinação quantitativa (BRASIL, 2010).

A maioria dos estudos que utilizam a cromatografia para análise a realizam por meio de CG unidimensional, pois esta técnica possui vantagens, como a alta resolução e sensibilidade, permitindo a identificação de um grande número de analitos. Ainda, a capacidade de acoplamento de CG com diferentes tipos de detectores à torna aplicável a diversos produtos à base de etanol (WISNIEWSKA et al., 2015).

Segundo Wang et al. (2003), o método de CG é o mais adequado e rápido para determinação de etanol em bebidas, bem como para amostras nas quais as quantidades são menores, como em xaropes, devido a grande sensibilidade do método, o qual possui também a vantagem de necessitar de pequenas quantidades de amostra.

A cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography flame ionization detection*) é bastante empregada para análises quantitativas. O FID é um detector frequentemente utilizado devido a sua ampla disponibilidade e custo relativamente baixo para sistemas de cromatografia,

podendo ser uma opção para a determinação do etanol em amostras farmacêuticas (WISNIEWSKA *et al.*, 2015).

Em geral, o método de CG está amplamente difundido e é bastante empregado para diversas análises quantitativas e qualitativas, porém é uma técnica que normalmente envolve custo elevado, a necessidade de estrutura laboratorial e analistas especializados, uso de reagentes tóxicos como gases ou agentes derivatizantes, além de dispenderem muito tempo para análise e interpretação dos resultados, o que limita seu uso em atividades de rotina.

Na Farmacopeia Brasileira podemos encontrar a descrição do método de CG para a determinação de etanol, a qual preconiza que deva ser realizada com coluna de 2mx4mm carregada com macrogol (polietilenoglicol) 400 a 20% em sílica cromatográfica calcinada. A coluna deve ser mantida em 100°C, já o injetor deve ser equipado com filtro para sólidos e mantido à 160°C. Como condutor usar gás inerte, como hélio, fluindo com vazão de cerca de 60 mL/minuto. O volume de amostra deve ser de 25 mL. Não é apontado o tipo de injetor e de detector recomendado (BRASIL, 2010).

Um aspecto desfavorável no emprego da CG para a quantificação de etanol em amostras com elevado teor alcoólico é o preparo de amostra, que necessita de destilação ou alto grau de diluição, aumentando a possibilidade de erro dos resultados (WANG, 2003).

3.4 Entalpietria no infravermelho

Definida inicialmente como um subconjunto do campo da calorimetria, a entalpietria ou análise entalpiétrica é a designação genérica para uma família de métodos analíticos capazes de medir, direta ou indiretamente, a variação de entalpia de uma reação química, a fim de quantificar um reagente ou catalisador. Essa técnica é geralmente realizada com pelo menos um reagente no estado líquido ou em solução aquosa (GRIME, 1981; STAHL, 1994).

Segundo Grime (1981), a entalpietria surgiu no início dos anos 1900 e sofreu grande evolução devido à necessidade de simplificar a instrumentação e de aumentar a produtividade, permitindo a aplicação das técnicas entalpiétricas para a resolução de problemas analíticos de rotina.

De acordo com Stahl (1994), as principais técnicas de entalpiometria são a entalpiometria por injeção direta, titulação termométrica, titulação calorimétrica, entalpiometria por injeção em fluxo e entalpiometria por fluxo contínuo. Dentre estas, a titulação termométrica foi a técnica mais utilizada até 1962, quando a entalpiometria por injeção direta foi introduzida e desenvolvimentos na instrumentação foram realizados a fim de aprimorar e ampliar sua utilização (WASILEWSKI et al., 1964).

A entalpiometria por injeção direta (DIE, do inglês *direct injection enthalpimetry*) é um método analítico no qual um reagente estequiometricamente em excesso em relação à espécie que se deseja determinar é adicionado à amostra. A variação de temperatura da reação resultante é medida e diretamente relacionada com a quantidade do reagente limitante. Esta técnica apresenta vantagens quando comparada às demais, como a simplicidade e rapidez, entretanto, maiores quantidades de reagente são utilizados devido à necessidade de adição da solução em excesso estequiométrico (WASILEWSKI et al., 1964).

Atualmente, apesar de haver a disponibilidade de instrumentação, essas técnicas foram sendo substituídas, provavelmente devido ao custo elevado de dispositivos de microcalorimetria e à baixa reprodutividade, limitando seu uso em análises de rotina (BARIN *et al.*, 2015).

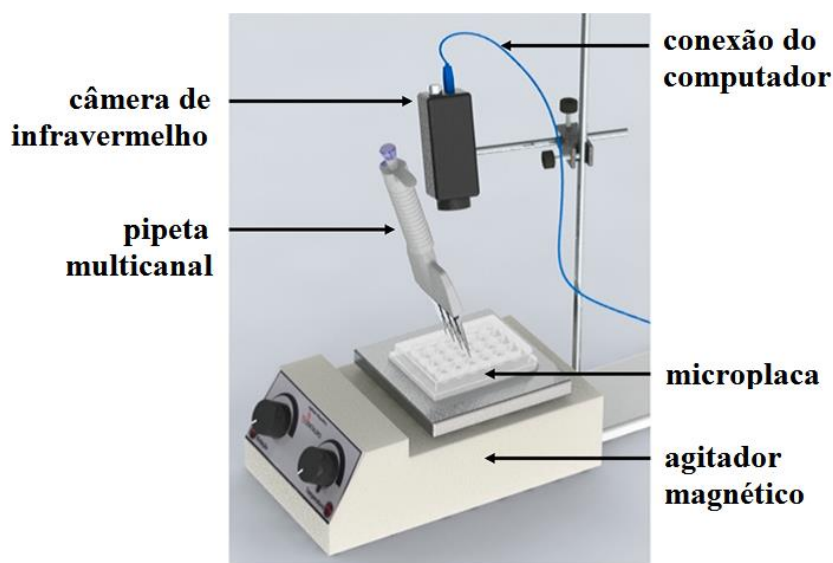
A termografia no infravermelho por sua vez, vem revolucionando o campo da medição de temperatura, pois é um método não invasivo, permitindo o monitoramento da temperatura de um objeto sem contato e com rápido tempo de resposta, o que não é possível com outros sensores de temperatura (HORNACK, 2002). Esta técnica pode ser empregada para determinar a temperatura superficial de objetos utilizando equipamento capaz de converter a radiação térmica, que possui comprimentos de onda na faixa invisível ao olho humano, em imagens visuais detalhadas do perfil de temperatura, as quais podem ser utilizadas para análises qualitativas e quantitativas (SILVA 2007; SOUZA, 2010).

A termografia no infravermelho utiliza câmeras térmicas que não requerem uma fonte de iluminação, ao contrário de outros sistemas de imagem, e podem ser operadas em temperatura ambiente. Imagens e vídeos podem ser facilmente gravados e processados com auxílio do software do próprio aparelho para obter valores de temperatura, facilitando o emprego desta técnica em vários campos. Além disso, a velocidade de aquisição de imagens é elevada, podendo chegar à kHz, tornando a

técnica especialmente adequada para explorar mudanças de temperatura (BARIN *et al.*, 2015; CUIBUS *et al.*, 2014).

Em 2015, Barin e colaboradores desenvolveram uma nova abordagem para a entalpimetria por injeção direta, a qual foi denominada como Entalpimetria no Infravermelho Térmico (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*) sendo utilizada em aplicações de titulação, utilizando reações de neutralização, redox, precipitação e complexação. Caracterizada como um método simples, rápido e não invasivo esta técnica realiza o monitoramento da temperatura de múltiplas reações por meio de uma câmera de infravermelho, microplacas descartáveis, pipeta multicanal para a adição dos reagentes e um agitador magnético para auxílio da homogeneização, como pode ser observado na figura 1.

FIGURA 1 - Arranjo experimental utilizado para análises de TIE.



Fonte: Barin *et al.* (2015).

Para a execução do método, a pipeta multicanal é utilizada para inserir simultaneamente a amostra nos poços da microplaca e, em seguida, a injeção do reagente em excesso estequiométrico com o mesmo dispositivo. Os sinais analíticos são obtidos rapidamente (cerca de 10s), e a média de temperatura (ΔT) é determinada com o uso do software da câmera, considerando uma taxa de aquisição de imagens de 30 Hz, e 180 pixels para monitoramento de cada reação. Os valores são obtidos da média da temperatura inicial e final, em um intervalo de 2s antes e 2s após a injeção. Cerca de

10.800 valores de temperatura são considerados para determinar a média de cada temperatura e a curva de calibração é construída usando soluções de referência (BARIN *et al.*, 2015). Na figura 2 é possível observar o processo de execução da análise e a reação ocorrida após a injeção do reagente na amostra.

FIGURA 2 - Processo de execução da análise de TIE e reação térmica observada através da câmera de infravermelho após injeção do reagente.



Fonte: OLIVEIRA *et al.* (2017) (adaptado).

De acordo com Barin *et al.* (2015), a TIE apresenta vantagens em relação a outros métodos, como o volume reduzido de reagentes e amostras, assim como a possibilidade de efetuar um maior número de replicatas, resultando em melhor precisão nos resultados. Além disso, é necessária apenas uma etapa de operação-injeção simultânea de reagente, possibilitando analisar um grande número de amostras por um curto período de tempo.

Vale ressaltar que nesta técnica não é necessário a preparação da amostra e em análises já realizadas não foram observadas interferências com relação à cor, turbidez ou outros componentes presentes na amostra (BARIN *et al.* 2015). Oliveira e colaboradores (2017) empregaram com sucesso a entalpiometria no infravermelho para a determinação do teor alcoólico de bebidas destiladas, assim como Tischer *et al.* (2017), que utilizaram a técnica para a determinação da acidez total, fixa e volátil de diferentes tipos de vinagres, ambos obtendo concordâncias adequadas com os métodos convencionais, demonstrando o potencial da TIE para sua aplicação em diferentes analitos e amostras.

4. MANUSCRITO

(Manuscrito formatado para submissão ao periódico *Journal of Food and Drug Analysis*)

Original Article

1
2
3
4
5 **GREEN METHOD FOR EVALUATION OF ETHANOL IN**
6 **HOMEOPHATIC MEDICINES USING TERMAL**
7 **INFRARED ENTHALPIMETRY**
8
9

10 Karolina Cunha Schlosser ^a, Fabiana Ernestina Barcelos da Silva ^a, Juliano Smanioto
11 Barin ^b
12
13

14 ^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do
15 Pampa, 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil.

16 ^b Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa
17 Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 ABSTRACT

34 In this work, a simple and fast method is proposed for ethanol determination content in
35 homeopathic medicines by thermal infrared entalpimetry (TIE). Samples containing
36 appropriate alcohol concentration range were compounding in order to obtained
37 representative manufacturing process. Reagent (purified water or absolute ethanol) was
38 added directly into homeopathic medicine and temperature increase caused by heat of
39 dilution was monitored using an infrared camera. Total volume, agitation speed and
40 micropipette dispensing rate were the most significant parameters studied to method
41 optimization. A design-of-experiments (DoE) was taken in the collection of the data,
42 and the results were then modeled using statistical modeling software. The method was
43 validated in the following parameters: selectivity, linearity, linear range, precision
44 (repeatability and intermediate precision), limit of detection and quantification,
45 accuracy and robustness. Linear range was obtained from 4% (ethanol, v/v) to 55%
46 (ethanol, v/v). The method showed accuracy based on agreement with official method
47 and declared value. The proposed method it was demonstrated a good alternative for the
48 determination of ethanol in homeopathic medicines. In addition, it presents low cost,
49 quick analysis and agreement with the principles of green chemistry.

50

51

52 **KEYWORDS:** dilution heat, ethanol determination, homeopathic medicines, infrared,
53 termography.

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66 ***1. Introduction***

67 Homeopathy is a complementary medical system developed in Germany more than 200
68 years by physician Samuel Hahnemann [1]. In the process of obtaining homeopathic
69 liquid formulations for internal use, the active ingredients are subjected to successive
70 dilutions and vigorous agitation with alcoholic solutions [2]. These alcoholic solutions
71 are used in different concentrations throughout the formulation process of homeopathic
72 medicine, with higher concentrations in the initial process (mother tincture),
73 intermediate concentrations for stock active input and ethanol at 30% or 5% (v/v) for
74 final product (oral drop solution or single-dose, respectively) [3]. This way, ethanol
75 used in these preparations should be considered as an active pharmaceutical ingredient
76 and submitted to quality control in final product as it may cause acute and chronic toxic
77 effects [4,5].

78 According to official homeopathic pharmacopoeias, ethanol is present in liquid
79 preparation of homeopathic medicine and therefore may be great concern because of its
80 cytotoxicity when these concentrations exceed the maximum tolerable dose of alcohol
81 [6]. In this context, adequate information and monitoring regarding of ethanol in these
82 preparations is fundamental, essentially when these pharmaceuticals are prescribed for
83 special populations such as children, pregnant women and elderly, or patients with
84 relevant medical history, including liver problems and alcoholism [7].

85 In the last years, homeopathic medicine has been focus of several studies regarding
86 consumption [8-10] and therapeutic action [11-14], however there are few studies
87 regarding quality control, especially the final product [15-19].

88 In general, the determination of ethanol in pharmaceutical formulations according to
89 official methods by distillation or gas chromatography (GC) requires considerable
90 analysis time, significant amounts of sample, sophisticated equipment and specialized

91 analysts [20]. Therefore, these methods are difficult to perform in routine analyzes,
92 especially for small-scale homeopathic medicines (pharmaceutical compounding).

93 Thus, the thermal infrared enthalpymetry (TIE) method has been proposed as alternative
94 to conventional methods for ethanol determination, characterized as a simple, fast and
95 high efficiency analysis, facilitating the implementation of routine analyzes [21]. The
96 technique is based on monitoring the temperature variation of a chemical reaction by
97 using an infrared camera. Oliveira et al. [22] employed the method for determination of
98 the alcoholic content of distilled beverages obtaining good agreement with conventional
99 method and Tischer et al. [23] also applied the method for determination of total, fixed
100 and volatile acidity in different samples of vinegars.

101 A relevant aspect for the development of new techniques is the reduction of use of toxic
102 reagents and wastes, dangerous to human health and/or the environment. Green
103 chemistry, in turn, has the objective of developing and implementing processes that
104 reduce or eliminate the use or generation of harmful substances, being currently quite
105 employed in laboratory research around the world, and guided by 12 principles, aiming
106 at safer chemistry to accidents prevention [24,25]. The proposed method contemplates
107 large part of green chemistry principles in addition to be considered a simple and
108 efficient technique and will bring with it the benefits nowadays required in the
109 development of new analytical methods.

110 Considering the above, the present work proposes a green analytical methodology using
111 TIE for the determination of ethanol in the different stages of homeopathic medicines
112 production, in which limitations such as time of analysis, sample volume, high cost,
113 among others, are minimized.

114

115

116 **2. *Material and methods***

117 **2.1. Instrumentation**

118 For the TIE analysis a long-wave infrared camera (7.5–13.0 μm , FLIR E60 model,
119 FLIR, Wilsonville, OR, USA) was used, which provided images of 320×240 pixels at a
120 frame rate of 30 Hz. Thermal images were processed using ResearchIR software
121 (version 3.5, FLIR). The reactions were performed in disposable polystyrene 48-well
122 microplates with internal volume of 1.6 mL (Nest Biotech, China). An electronic
123 multichannel pipette (8 channels, 0.050-1.2 mL, Pro Research 1200, Eppendorf,
124 Germany) was used to simultaneously inject reagent into wells. The homogenization of
125 solutions was performed using a polytetrafluoroethylene-covered stir bar (3.0 x 6.5 mm)
126 and a magnetic stirrer (Centauro, Atuba, Brazil).

127 Conventional analysis was performed using gas chromatography instrument equipped
128 with a flame ionization detector (GC-FID) Varian 3400 (Palo Alto, CA, USA).
129 Separation was achieved using a dimethyl polysiloxane DB-5 capillary column with the
130 following dimensions 30 m \times 0.32 mm ID, $\text{ft} = 0.25 \mu\text{m}$, (Agilent, Waldbronn,
131 Germany).

132

133 **2.2. Samples, standards, and reagents**

134 Homeopathic medicines samples with alcohol content at 5, 30, 70 and 95% (n=2) were
135 compounding as showed in Table 1. The variation of ethanol content was defined in
136 accordance with usual concentrations in homeopathic medicines, since lower
137 concentrations (5%) are used in single-dose homeopathic medicines, the intermediates
138 for liquid forms in oral drops (30%) and higher concentrations (70-95%) are used in the
139 preparation of mother tinctures. The active substance was chosen randomly in
140 accordance to traditional homeopathic medicines declared on National Formulary –

141 Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia, 2011 [3]. Absolute ethanol (LabSynth,
142 Diadema, Brazil) and purified water (obtained in a Milli-Q system Direct-Q 3 UV, 18.2
143 M Ω cm, Millipore Corp., USA) were used to prepare all reference solutions and as
144 reagents for heat formation in the TIE. Purified water was also used to dilute samples of
145 homeopathic medicines.

146

147 **2.3. Conventional analysis**

148 In order to compare the results of proposed method with official method recommended
149 by United States Pharmacopoeia, 2017 [20], ethanol content in the samples was
150 determined by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) with
151 modifications. The method was revalidated in accordance to Brazilian Health
152 Regulatory Agency (ANVISA) [26] in the following parameters: linearity, precision
153 (repeatability and intermediate precision) and accuracy (data not showed).

154 The samples were diluted in purified water to a concentration of 0.3% ethanol (v/v),
155 butyl alcohol was added as an internal standard at a concentration of 0.05%. An aliquot
156 of 0.4 μ L of the sample was injected into a split / splitless injector, operating in split
157 mode. The quantification was based in an external calibration curve with five
158 equidistant analytical points ranging from 0.05 to 0.75% of ethanol. The linear
159 correlation coefficient (r) of the calibration curve was determined.

160

161 **2.4. Analytical method development and optimization**

162 Reference solutions containing ethanol in range concentration of 4-12%, v/v (curve A)
163 and 30-55%, v/v (curve B) (curves shown in figure 4) were added to wells. A magnetic
164 stir bar was added to each well to improve homogenization. The plate was positioned in
165 front of camera and the reagent (water or ethanol depending on ethanol concentration

166 range) was injected. The temperature of the reaction was monitored before, during, and
167 after the reagent injection. Using the IR camera software, a circle of 180 pixels
168 (corresponding to 7.1 mm of diameter) was used to monitor the temperature of each
169 well, with temperatures average plotted to form an enthalpogram. The difference in
170 temperature (ΔT) was obtained from equation $\Delta T = T_f - T_i$, where T_f and T_i are the
171 final and initial temperatures, respectively, obtained using the mean of temperature
172 values of 2s after and 2s before the mixture of solutions [22]. Eight wells of the
173 microplate were used for each experiment ($n = 8$).

174 After the construction of the two calibration curves, the homeopathic samples were
175 evaluated repeating the analysis process. From the declared amount of ethanol in the
176 sample was added ethanol or purified water as reagent in order to obtain the dilution
177 heat reaction. For samples with declared alcoholic content greater than 25%, water was
178 added to obtain the ΔT (curve B). For formulations with less than 25% of declared
179 alcohol content, ethanol was added as reagent to obtain ΔT (curve A). The samples
180 containing 70 at 95% of ethanol were diluted (1:1) directly into the microplate,
181 presenting 35 and 47.5% of theoretical ethanol, respectively. This dilution procedure
182 was performed in order to working into linear range. Q-Test was used to identify and
183 exclude statistic outliers between the replicates, performed with 95% confidence level.

184

185 **2.5. Method optimization DoE and robustness**

186 Before the determination of the ethanol content in the samples by TIE, the method was
187 optimized using Design of Experiments (DoE) and response surface methodology. The
188 experiments were performed to evaluate the influence of total volume in the wells, the
189 stirring speed and the dispensing rate of multichannel pipette, with the dependent
190 variable being represented by the relative standard deviation (RSD) of the replicates of

191 each analysis ($n = 8$) of reference solution containing ethanol 40% (v/v). The design
192 consisting of eighteen experiments including four assays of central point. All
193 experiments were performed in randomized order to minimize the effects of
194 uncontrolled factors that may introduce biased responses. The values investigated in
195 each variable to obtain the response surfaces were: 360, 600, 950, 1300 and 1540 μL for
196 total volume; 50, 100, 175, 250 and 300 rpm for stirring speed; and 0.36, 0.41, 0.50,
197 0.63 and 0.71 mL s^{-1} (corresponding to levels 4, 5, 7, 9 and 10 respectively) for the
198 dispensing rate of pipette. The Table 2 showed the experiments performed for
199 experimental planning. Analysis of variance (ANOVA), determination of regression
200 coefficients and generation of response surfaces were performed by Statistica 7.0
201 software. Estimation of experimental error and measurement of validity of polynomial
202 models were obtained by repetition of experimental points and ANOVA was used to
203 obtain regression model. DoE and response surface methodology was also employed in
204 robustness evaluation of proposed method. The variations considered for robustness
205 were: total volume from 900 to 1100 μL , stirring from 150 to 200 rpm and dispensing
206 rate of pipette from 0.46 to 0.57 mL s^{-1} (corresponding to levels 6 and 8) with the
207 dependent variable being represented by the relative standard deviation (RSD) of the
208 replicates of each analysis ($n = 8$) of reference solution containing ethanol 40% (v/v).
209 Robustness testing was performed in order to obtain information about as small
210 variations could be affect the proposed method based on RSD obtained in experimental
211 design. This way, was possible to determine the robust domain (tolerable variations)
212 using response surfaces methodology.

213

214

215

216 2.6. Validation procedure

217 The method was validated according to ANVISA [26] and National Institute of
218 Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO) [27] specifications,
219 which provides that the following parameters be evaluated: selectivity, linearity, linear
220 range, precision (repeatability and intermediate precision), limit of detection (LOD),
221 limit of quantification (LOQ), accuracy and robustness.

222 Selectivity was studied in two forms: (a) analysis of ethanol solution 5% (v/v) added
223 glycerol solutions (1 to 5% v/v) to evaluate its possible interference in the quantification
224 of ethanol by TIE, since they have similar functional group and may be present in
225 mother tinctures from animal sources; and (b) analysis of a sample containing
226 homeopathic medicine prepared from the usual mother tincture (randomly selected) and
227 diluted without ethanol. In this situation, ΔT and enthalpogram were compared to those
228 of a reaction using only purified water (Student's t-test).

229 The linearity was studied in two distinct concentration ranges. Reference solutions were
230 prepared for the construction of each calibration curve, corresponding to 4, 6, 8, 10 and
231 12% ethanol (curve A), and 30, 35, 40, 45 and 55% ethanol (curve B) (curves shown in
232 Fig. 4). Eight replicates were used for each concentration of reference solutions. The
233 data were evaluated using analysis of variance (ANOVA) for three independent
234 calibration curves. The linearity was evaluated by linear regression analysis using least-
235 square regression method.

236 Repeatability was evaluated with same analyst and equipment, with eight replicates on
237 the same day analysis. Intermediate precision was evaluated with different analysts
238 using the same equipment on two different days and eight replicates per day, using the
239 homeopathic samples *Nux vômica* (curve a sample) and *Avena sativa* (curve b sample),
240 which were randomly selected. The accuracy was evaluated by comparing the values

241 obtained from TIE (in % found, based on amount taken) with those obtained by the
242 conventional method (Student's t-test).

243 The detection and quantitation limits (LOD and LOQ respectively) were based on the
244 mean concentration and standard deviation of ten blanks determination. The detection
245 limit and quantitation limit were expressed as $LOD = \bar{X} + 3.3\sigma$ and $LOQ = \bar{X} + 10\sigma$
246 (where \bar{X} = the mean concentration of blanks, σ = the standard deviation of the blanks).

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263 **3. Results and discussion**

264 **3.1. Optimization of TIE**

265 For the optimization of experimental parameters, the influence of the total volume in the
266 wells, the stirring speed for the homogenization and the dispensing rate of the
267 multichannel pipette were investigated by DoE.

268 The effects of the combinations of experimental parameters can be observed on the
269 response surfaces (Fig. 1). For the total volume vs. dispensing rate graph (Fig. 1A), the
270 best conditions were found with increasing volume and dispensing rate, since lower
271 volumes (<900 μL) presented worse analytical signals and, consequently, worse RSD
272 and low dispensing rates (<0.41 mL s^{-1}) impaired reaction formation due to slow release
273 of the reagent. Moreover, according to Oliveira et al. [22], dispensing rate $\leq 0.46 \text{ mL s}^{-1}$
274 increase the RSD due to the presence of the pipette tip in front of the camera during
275 mixing of solutions, impairing accurate temperature measurement. For total volume vs.
276 stirring speed (Fig. 1B), it was observed that very low (<100 rpm) stirring speeds may
277 impair efficient homogenization of solutions and stirring speeds above 250 rpm increase
278 RSD by overflow solutions. Therefore, higher volumes (>900 μL) combined at
279 intermediate stirring speeds (100-250 rpm) are recommended. In Fig. 1C, stirring speed
280 vs. dispensing rate graph showed lower RSD in intermediate region (central position).
281 The result obtained in Fig. 1C showed that parameters are dependent since high level of
282 one can be compensating the low level of the other. In accordance with exposed above,
283 was chosen 1000 μL for total volume, 0.5 mL s^{-1} for dispensing rate and 175 rpm for
284 stirring speed. The results agree with optimization parameters obtained in other studies
285 involving TIE [22,23].

286

287

288 3.2. Figures of merit

289 3.2.1. Selectivity

290 Selectivity was studied in two forms: (a) analysis of ethanol solution 5% (v/v) added
291 glycerol solutions (1 to 5% v/v) and (b) analysis of a sample containing homeopathic
292 medicine prepared from the usual mother tincture (randomly selected) and diluted
293 without ethanol. In the first study, the solutions with 5% ethanol added glycerol
294 maintained an analytical signal (ΔT) similar to solution without glycerol, demonstrating
295 that there was no interference of glycerol in quantification of ethanol at these
296 concentrations (Fig. 2).

297 In the second study, the analysis of homeopathic medicine diluted without ethanol
298 showed that matrix from the mother tincture is not detectable in the final product. In
299 Fig. 3 it is possible to observe the analytical signal of the sample analysis without
300 ethanol as solvent, through the enthalpogram generated by the camera software (time vs.
301 reaction temperature graph). The, ΔT of the reactions was 5.89 and 5.92 °C for
302 homeopathic medicine (without ethanol as solvent) and pure water, respectively,
303 presenting no statistically significant difference (Student's t-test).

304 This way, the proposed method was considered selective for ethanol determination in
305 homeopathic medicines, since no interferences of matrix present in the sample were
306 detected. It is noteworthy that this method does not require sample preparation and even
307 mother tinctures with more concentrated components did not present interference for
308 efficient determination of the ethanol content.

309

310 3.2.2. Linearity

311 Calibration curves of two concentration ranges are presented in Figure 4. A linear
312 response was observed in range 4 to 12% (Fig. 4A) and 30 to 55% (Fig. 4B) with good

313 coefficients of correlation ($r = 0.999$). According to ANOVA, the data showed
314 significant linear regression and no linearity deviation. The linear range was adequate
315 for this study, since comprises the concentration range of all productive process.

316

317 3.2.3. Precision (Repeatability and Intermediate Precision)

318 Precision was evaluated at two levels: (a) repeatability (intra-day, $n=8$) and (b)
319 intermediate precision (inter-day, 2 days). Results were expressed as RSD of the
320 measurement series (Table 3). For repeatability, samples with 5% ethanol showed RSD
321 values of 2.34 and 2.28% and samples containing $\geq 30\%$ ethanol showed RSD below
322 1%. Samples with lower ethanol content showed higher RSD, but these values were
323 considered in agree due to a substantially lower amount of analyte in the samples,
324 compared to the others concentrations. The intermediate precision was evaluated
325 performing a second study at the same conditions, using a homeopathic sample from
326 each calibration curve, randomly selected. The sample *Nux vomica* (curve A – ethanol
327 5%) obtained values of RSD of 2.28 and 2.73%, the *Avena sativa* (curve B - ethanol
328 70%) showed values of 0.12 and 0.21% on days 1 and 2 respectively, demonstrating
329 agreement between the two experiments independently of the analyst and day of
330 analysis under identical conditions. An important fact that should be emphasized is that
331 the proposed method presented deviations among the measures considerably smaller
332 than presented by the conventional method, as found by Barin et al. [21], demonstrating
333 the potential of the technique for the determination of ethanol in these samples.

334

335 3.2.4. Detection and Quantitation Limits

336 Limits of detection (LOD, $\bar{X} + 3.3\sigma$) and quantification (LOQ, $\bar{X} + 10\sigma$) were calculated
337 considering the mean and standard deviation of the blanks. For the curve A, values of

338 1.77% and 1.93% (v/v) of ethanol were obtained, respectively demonstrating that TIE
339 can be applied in the quantification of ethanol in single dose homeopathic formulations,
340 which normally present concentrations of 5.0% (v/v). As curve A showed a decreasing
341 profile, it is also important to establish the maximum concentration detected, which was
342 28.06% (v/v) ethanol. This value was obtained by the formula $LOD = 3.3\sigma / S$ (where σ
343 = the standard deviation of the blank replicates, S = the slope of the calibration curve),
344 and considered a reasonable signal to differentiate the temperature rise from noise.
345 Thus, to perform determination of ethanol in samples with alcohol content of 30.0% or
346 above, curve 2 is indicated. For curve B, the values were 19.55% for LOD and 19.58%
347 for LOQ, also presenting a sufficient LOQ value for quantification of ethanol in mother
348 tinctures and finished homeopathic medicines, which must have an alcohol content of
349 30.0% according to Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia [3].

350

351 3.2.5. Accuracy

352 To evaluate the accuracy, the proposed method was compared with the conventional
353 method (GC-FID) as showed in Table 4. Calculated Student's t-value (1.56) was lower
354 than the critical value of 1.98 (5% significance level), suggesting no difference between
355 proposed and conventional methods. Thus, the TIE method proved to have good
356 accuracy for quantification of ethanol in homeopathic medicines compared to GC-FID
357 method. However, it's worth pointing out that both methods showed worse % recovery
358 (when compared to declared value) for samples with minor ethanol concentration.

359

360 3.2.6. Robustness

361 Robustness was investigated using the DoE approach, considering smaller variations of
362 the conditions, to provide an indication of its reliability during routine use. The Fig. 5

363 shows the variations of the parameters evaluated and the RSD obtained. The results
364 indicated that there was no relevant difference in the variations studied, since the values
365 of RSD obtained did not exceed the value of 0.6% in the variation range considered for
366 the study. Therefore, it can be concluded that the TIE method developed is robust in the
367 ranges evaluated: total volume for 900 to 1100 μL (Fig. 5A), stirring speed for 150 to
368 200 rpm (Fig. 5B) and dispensing rate from 0.46 to 0.57 mL s^{-1} (Fig. 5C).

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388 **4. CONCLUSION**

389 The proposed method proved be a promising tool for ethanol determination in
390 homeopathic medicines and a good alternative for routine analysis, assisting in the
391 quality control of these medicines. In addition, it presents low cost, quick analysis and
392 agreement with the principles of green chemistry.

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419 **Table 1 - Homeopathic medicines samples.**

420

Samples	Active substance	Alcoholic content
01	<i>Matricaria chamomilla</i>	
02	<i>Nux vômica</i>	5%
03	<i>Atropa belladona</i>	
04	<i>Bryonia alba</i>	30%
05	<i>Arnica montana</i>	
06	<i>Avena sativa</i>	70%
07	<i>Chelidonium majus</i>	
08	<i>Passiflora incarnata</i>	95%

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444 **Table 2 - Experimental planning for optimization of TIE method (n = 8).**

445

Test	Total volume (μL)	Stirring speed (rpm)	Dispensing rate (mL s^{-1})
01^a	950	175	0.50
02	1540	175	0.50
03	950	50	0.50
04	950	300	0.50
05^a	950	175	0.50
06	600	250	0.41
07	1300	100	0.41
08	1300	250	0.41
09	600	100	0.63
10^a	950	175	0.50
11	1300	250	0.63
12	600	100	0.41
13	600	250	0.63
14	950	175	0.71
15	360	175	0.50
16	1300	100	0.63
17	950	175	0.36
18^a	950	175	0.50

446

^a Average parameter

447

448

449

450

451

452

453

454

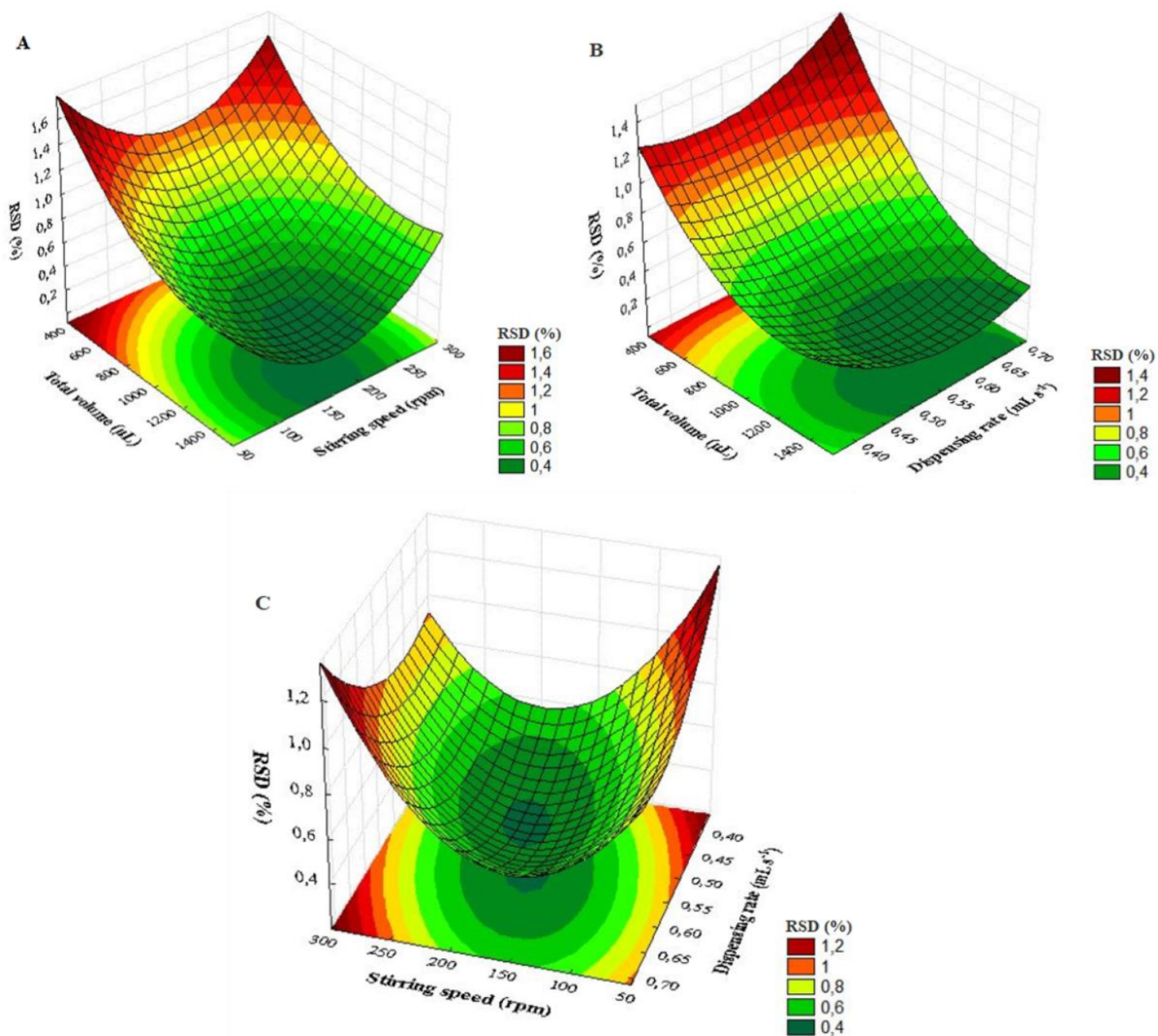
455

456

457

458

459



460

461 **Fig. 1 - Response surfaces obtained from experimental design to study the**
 462 **influence of some parameters on TIE. A) Total volume vs. dispensing rate; B)**
 463 **Total volume vs. stirring speed; and C) Stirring speed vs. dispensing rate.**

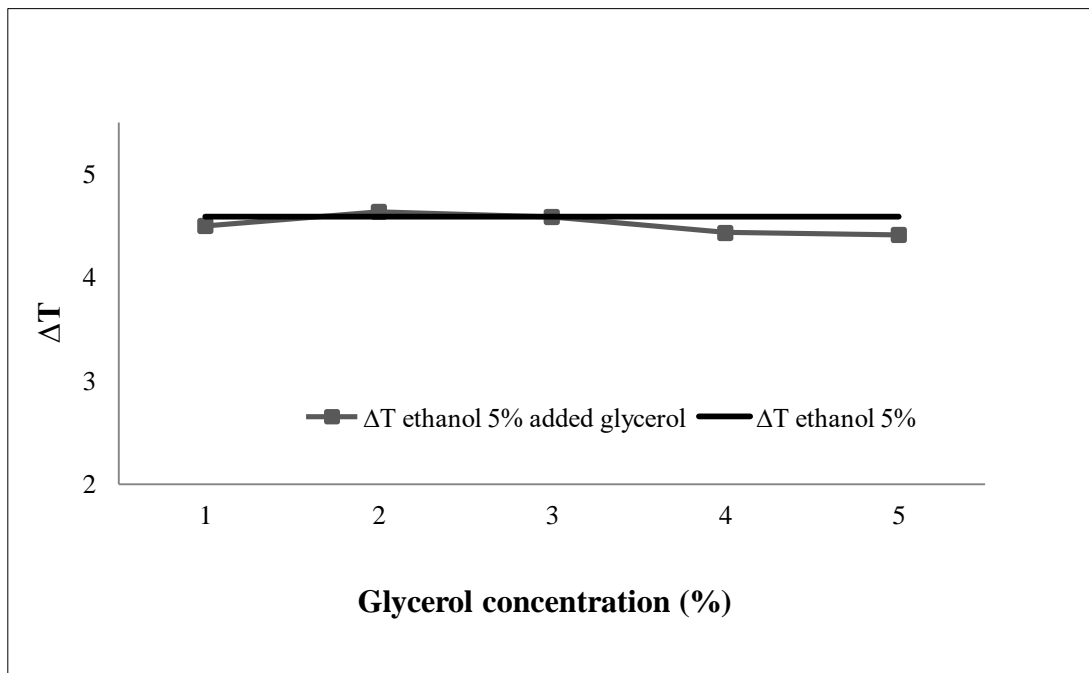
464

465

466

467

468



469

470 **Fig. 2 - Analysis of ethanol solution 5% (v/v) added glycerol (1 to 5% v/v).**

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

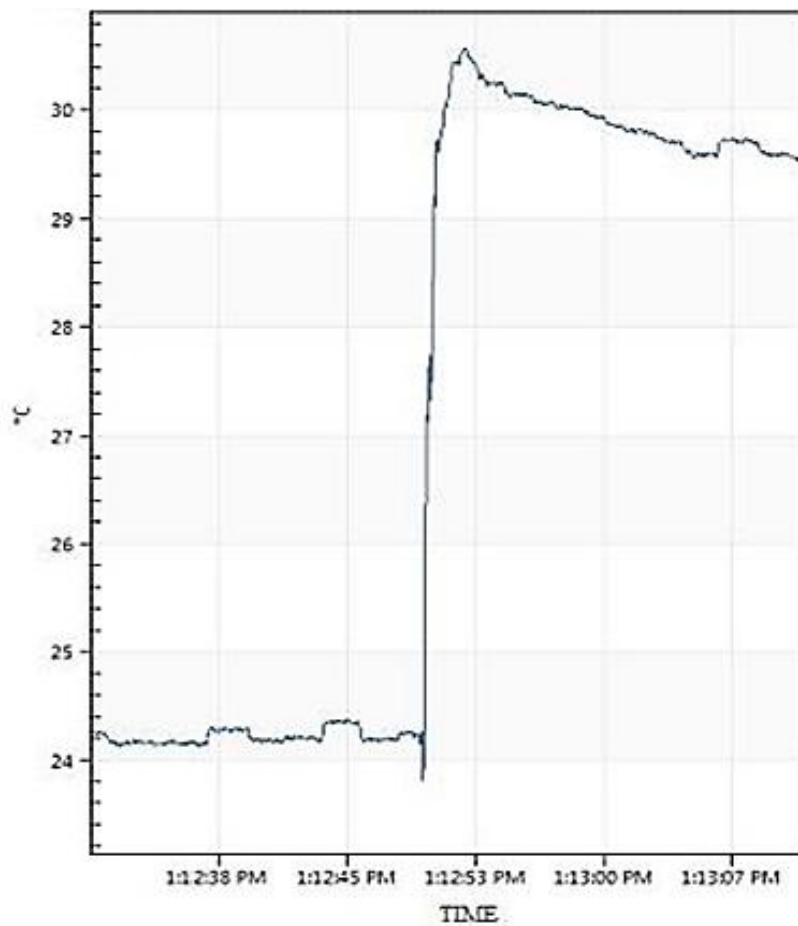
485

486

487

488

489



490

491 **Fig. 3 - Enthalpogram generated from the analysis of homeopathic medicine**
492 **without ethanol as solvent.**

493

494

495

496

497

498

499

500

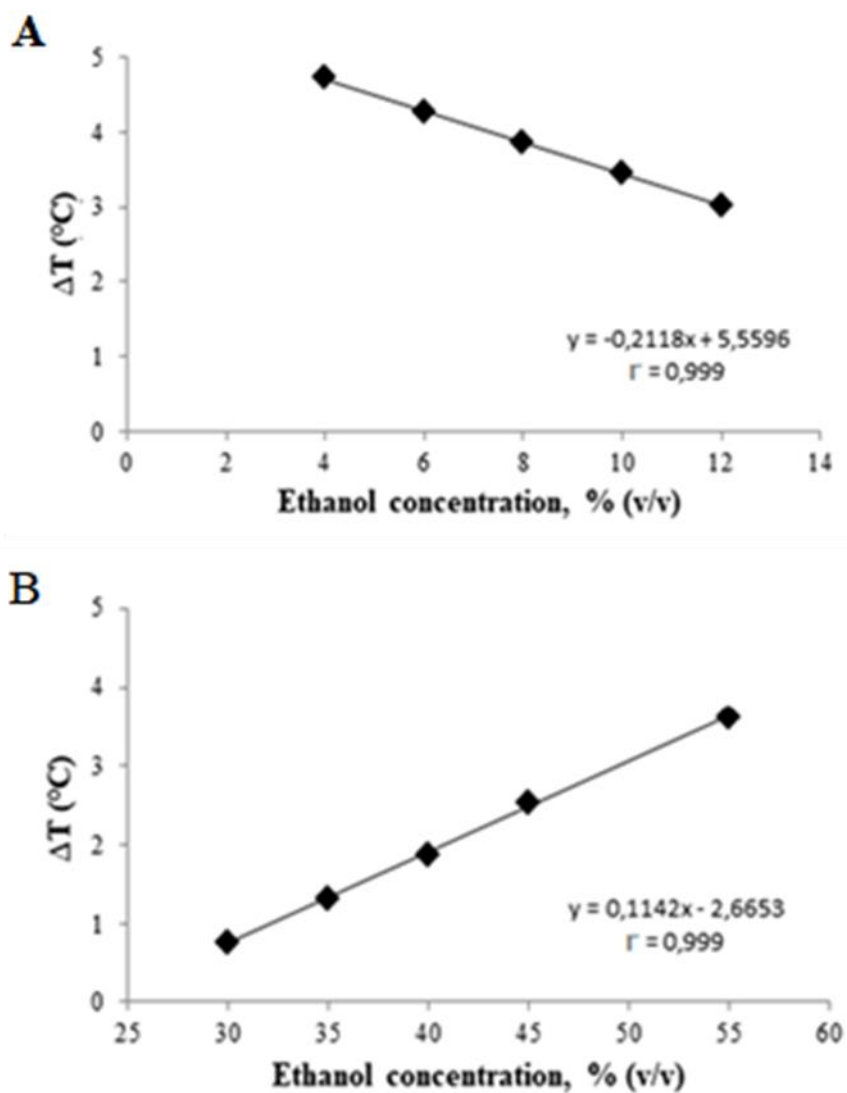
501

502

503

504

505



506

507 **Fig. 4 - Calibration curves obtained using hydroalcoholic reference solutions: A)**508 **4–12% (v/v) ethanol range and B) 30–55% (v/v) ethanol.**

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519 **Table 3 - Precision (repeatability and intermediate precision) evaluated by RSD**
 520 **(%) of homeopathic medicines samples (n = 8) analyzed by TIE.**

521

Samples	%RSD	
	Day 1 ^a	Day 2 ^b
Samples with 5% ethanol		
<i>Matricaria camomila</i>	2.34	
<i>Nux vômica</i>	2.28	2.73
Samples with 30% ethanol		
<i>Atropa beladona</i>	0.10	
<i>Bryonia alba</i>	0.07	
Samples with 70% ethanol		
<i>Arnica montana</i>	0.15	
<i>Avena sativa</i>	0.12	0.21
Samples with 95% ethanol		
<i>Chelidonium majus</i>	0.11	
<i>Passiflora incarnata</i>	0.28	

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

^a Repeatability^b Intermediate precision

543 **Table 4 - Ethanol content (%) in samples of homeopathic medicines (mean \pm**
 544 **standard deviation) using TIE (n = 8) and GC-FID (n = 3) methods.**

545

Samples homeopathics	Amount taken (% ethanol, v/v)	Proposed method		Conventional method	
		Amount Found (% ethanol, v/v)	% Found	Amount Found (% ethanol, v/v)	% Found
<i>Matricaria camomilla</i>	5.0	5.98 \pm 0.22	119.66 \pm 4.33	5.52 \pm 0.18	110.32 \pm 3.63
<i>Nux vômica</i>	5.0	6.15 \pm 0.14	123.02 \pm 2.89	5.37 \pm 0.24	107.34 \pm 4.65
<i>Atropa belladona</i>	30.0	28.85 \pm 0.03	96.16 \pm 0.11	29.33 \pm 1.04	97.77 \pm 3.46
<i>Bryonia alba</i>	30.0	28.88 \pm 0.03	96.25 \pm 0.10	29.27 \pm 2.30	97.57 \pm 7.67
<i>Arnica montana</i>	70.0	67.26 \pm 0.05	96.09 \pm 0.15	68.41 \pm 1.84	97.73 \pm 2.63
<i>Avena sativa</i>	70.0	68.02 \pm 0.04	97.17 \pm 0.12	68.80 \pm 1.12	98.28 \pm 1.61
<i>Chelidonium majus</i>	95.0	95.01 \pm 0.05	100.02 \pm 0.10	94.42 \pm 2.15	99.39 \pm 2.26
<i>Passiflora incarnata</i>	95.0	93.96 \pm 0.13	98.91 \pm 0.27	94.16 \pm 2.21	99.12 \pm 2.33

546 $\alpha = 0.05$

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

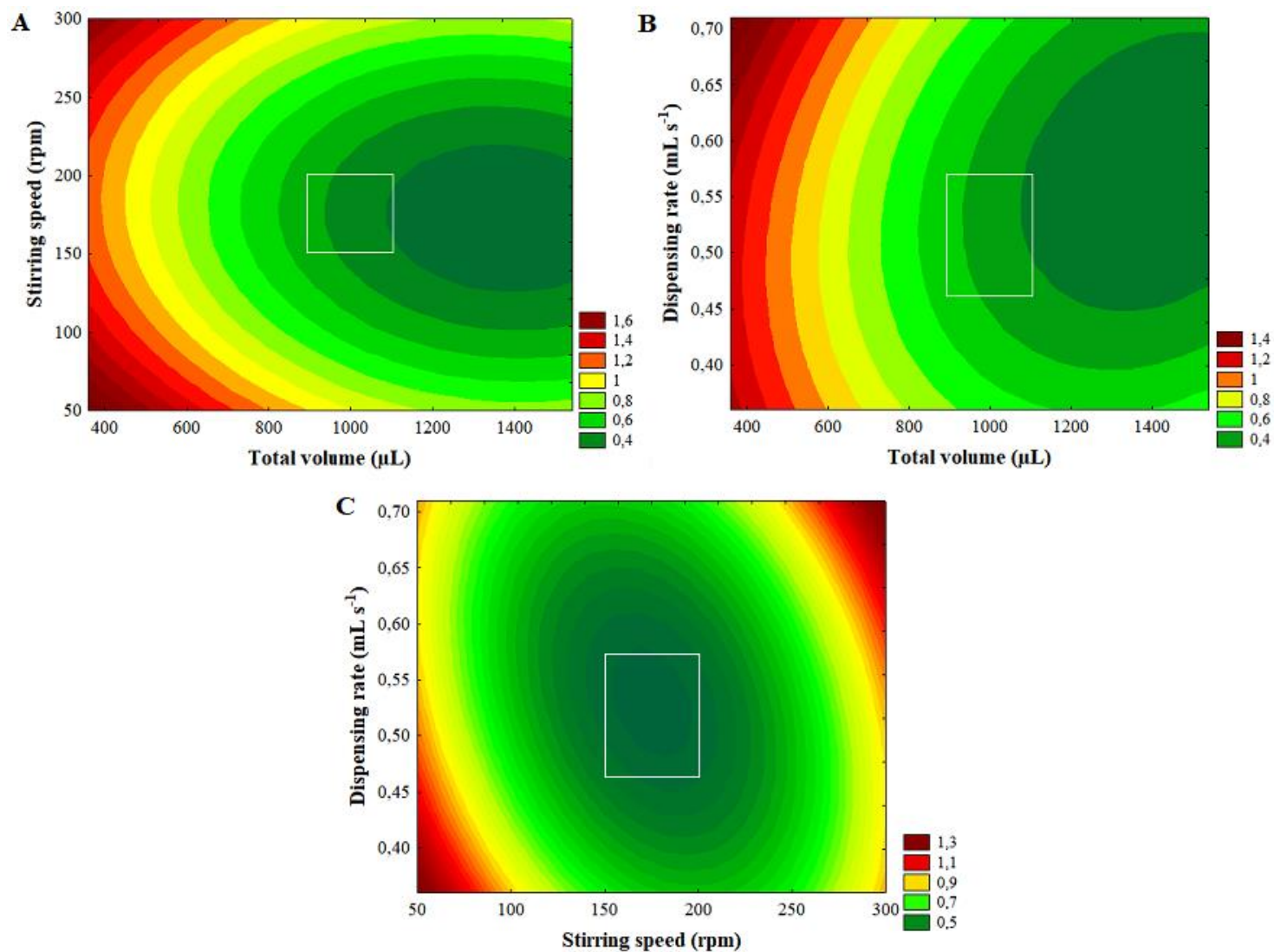
563

564

565

566

567



568

569 **Fig. 5 - Parameters evaluated and %RSD obtained in the robustness test.**

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580 **References**

- 581 [1] National Center for Complementary and Integrative Health: Homeopathy, 2015.
582 Available at <https://nccih.nih.gov/health/homeopathy>. Accessed May 12, 2018.
583
- 584 [2] Brazil. Resolução RDC nº. 26, de 30 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de
585 medicamentos dinamizados industrializados homeopáticos, antroposóficos e anti-
586 homotóxicos. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Available at
587 <http://www.cff.org.br>. Accessed February 09, 2018.
588
- 589 [3] Brazil. Farmacopeia Homeopática Brasileira. 3rd ed. Agência Nacional de
590 Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2011.
591
- 592 [4] Ferreira AO. Preparações orais líquidas: formulário, procedimento de preparo,
593 flavorização, estabilidade e conservação. 3rd ed. ver. and ext. São Paulo: Pharmabooks
594 editor; 2011.
595
- 596 [5] Huzar E, Wodnicka A. Determination of ethanol content in medicated syrups by
597 static headspace gas chromatography. *Acta Pol Pharm - Drug Research* 2013;70:41-9.
598
- 599 [6] Chirumbolo S, Bjørklund G. Homeopathic potencies of *Arnica montana* L. change
600 gene expression in a Tamm-Horsfall protein-1 cell line in vitro model: the role of
601 ethanol as a possible confounder and statistical bias. *J Integr Med* 2017;15:255–64.
602
- 603 [7] World Health Organization. Safety issues in the preparation of homeopathic
604 medicines. Geneva: World Health Organization; 2009.
605
- 606 [8] Clarke TC, Black LI, Stussman BJ, Barnes PM, Nahin RL. Trends in the use of
607 complementary health approaches among adults: United States, 2002–2012. *National*
608 *health statistics reports*, n. 79. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics;
609 2015.
610
- 611 [9] Relton C, Cooper K, Viksveen P, Fibert P, Thomas K. Prevalence of homeopathy
612 use by the general population worldwide: a systematic review. *Homeopathy*
613 2017;106:69-78.
614
- 615 [10] Waisse S. Private and institutionalised patients' use of homeopathy in the early
616 nineteenth century. *Homeopathy* 2017;106:250-9.
617
- 618 [11] Doehring C, Sundrum A. Efficacy of homeopathy in livestock. *Vet Rec* 2016;179.
619
- 620 [12] Mathie RT, Lloyd SM, Legg LA, Clausen J, Moss S, Davidson JRT, Ford I.
621 Randomised placebo-controlled trials of individualised homeopathic treatment:
622 systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2014;3.
623
- 624 [13] Shang A, Huwiler-Müntener K, Nartey L, Jüni P, Dörig S, Sterne JAC, Pewsner D,
625 Egger M. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? Comparative study
626 of placebo-controlled trials of homeopathy and allopathy. *Lancet* 2005;366:726–32.
627

- 628 [14] Unlu A, Kirca O, Ozdogan M. Homeopathy and câncer. *J Oncol Sci* 2017;3:77-80.
629
- 630 [15] Gorlowska K, Gorlowska J, Skibiński R, Komsta Ł. Chemometrics meets
631 homeopathy—an exploratory analysis of infrared spectra of homeopathic granules. *J*
632 *Pharm Biomed Anal* 2015;115:36-8.
633
- 634 [16] Holandino C, Oliveira AP, Homsani F, Paiva JP, Barbosa GM, Zanetti MRL,
635 Fernandes TB, Siqueira CM, Veiga VF, Abreu LCL, Marzotto M, Bernardi P, Bonamin
636 LV, Bellavite P, Rossi AL, Picciani PHS. Structural and thermal analyses of zinc and
637 lactose in homeopathic triturated systems. *Homeopathy* 2017;106:160-70.
638
- 639 [17] Jadhav HP, Chaudhari GG, Patil DD, Jadhav RB, Reddy NM, Shirkhedkar AA,
640 Goyal SN, Patil CR. Standardization of homeopathic mother tincture of *Toxicodendron*
641 *pubescens* and correlation of its flavonoid markers with the biological activity.
642 *Homeopathy* 2016;105:48-54.
643
- 644 [18] Ravishankara MN, Shrivastava N, Padh H, Rajani M. HPTLC Method for the
645 Estimation of Alkaloids of *Cinchona officinalis* Stem Bark and its Marketed
646 Formulations. *Planta Med* 2001;67:294-6.
647
- 648 [19] Tumir H, Bošnjir J, Vedrinar-Dragojević I, Dragun Z, Tomić S, Puntarić D.
649 Preliminary investigation of metal and metalloid contamination of homeopathic
650 products marketed in Croatia. *Homeopathy* 2010;99:183-8.
651
- 652 [20] United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 40th ed. NF 35th ed.
653 United States Pharmacopeial Convention; 2017.
654
- 655 [21] Barin JS, Tischer B, Oliveira AS, Wagner R, Costa AB, Flores EM. Infrared
656 thermal imaging: a tool for simple, simultaneous, and high-throughput enthalpimetric
657 analysis. *Anal Chem* 2015;87:12065–70.
658
- 659 [22] Oliveira AS, Dalla Nora FM, Mello RO, Mello PA, Tischer B, Costa AB, Barin JS.
660 One-Shot, reagent-free determination of the alcoholic content of distilled beverages by
661 thermal infrared enthalpimetry. *Talanta* 2017;171:335-40.
662
- 663 [23] Tischer B, Oliveira AS, Ferreira DF, Menezes CR, Duarte FA, Wagner R, Barin
664 JS. Rapid microplate green method for high-throughput acidity evaluation of vinegars
665 using thermal infrared enthalpimetry. *Food Chem* 2017;215:17-21.
666
- 667 [24] U.S. Environmental Protection Agency. Green Chemistry, 2009. Available at
668 <http://www.epa.gov/greenchemistry/index.html>. Accessed March 04, 2018.
669
- 670 [25] Anastas PT, Warner JC. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University
671 Press: New York; 1998.
672
- 673 [26] Brazil. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação**
674 **de métodos analíticos e dá outras providências**. ANVISA - Agência Nacional de
675 Vigilância Sanitária. Available at <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>.
676 Accessed August 17, 2017.

- 677 [27] Instituto Nacional De Metrologia, Normalização E Qualidade Industrial (Inmetro).
678 Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008; 2010.

5. DISCUSSÃO GERAL

A homeopatia é um ramo da medicina complementar e alternativa (CAM) que vem crescendo nas últimas décadas (KRIZOVA e BYMA, 2014). De acordo com o *National Health Interview Survey* (NHIS) realizado em 2012 nos Estados Unidos estimou-se que 5 milhões de adultos e 1 milhão de crianças usaram produtos homeopáticos no ano anterior, observando aumento gradativo comparado aos levantamentos anteriores (UNLU; KIRCA e OZDOGAN, 2017). No Brasil, a homeopatia faz parte do SUS desde 2006 e deve acompanhar este crescimento nos próximos anos, pois agências nacionais recentemente vêm buscando solidificar e ampliar a inserção da homeopatia na saúde pública (BRASIL, 2017).

Deste modo, garantir o controle de qualidade dos medicamentos homeopáticos mostra-se importante e o emprego de técnicas simples e rápidas pode auxiliar neste processo, assegurando a qualidade destas formulações. A metodologia desenvolvida neste estudo visa quantificar o teor de etanol dos medicamentos homeopáticos líquidos, em todas as etapas de produção (tintura mãe, insumo ativo de estoque e produto final), visto que esta substância encontra-se presente em grandes concentrações (BRASIL, 2011).

A técnica proposta denominada TIE é baseada nos princípios da química verde e mostra-se promissora, pois além de dispensar reagentes tóxicos caracteriza-se por sua simplicidade e rapidez, não necessitando de preparo de amostra, como por exemplo, destilação, pesagens precisas ou altas diluições. Além disso, o volume de amostra utilizado é inferior a de outros métodos convencionais, evitando o processamento de grandes volumes no laboratório, com consequente redução da geração de resíduos (BARIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Recentemente, a química verde vem sendo bastante requisitada, buscando auxiliar na redução dos problemas ambientais gerados pela emissão de poluentes nocivos (DINCER, 2012). A TIE mostrou-se de acordo com os princípios da química analítica verde, minimizando o impacto de tais análises no meio ambiente. Além disso, a TIE apresenta baixo custo e alto rendimento, possibilitando a análise de grande número de amostras em curto período de tempo. Segundo Oliveira *et al.*, (2017) a TIE permitiu a análise de 480 amostras em 1h, o que não é alcançado com outros métodos analíticos.

Durante seu desenvolvimento, a técnica foi otimizada utilizando planejamento experimental (DoE) a fim de avaliar os parâmetros volume total, velocidade de agitação do agitador magnético e taxa de dispensação da pipeta multicanal, verificando sua influência nas medições e possibilitando ajustar estes parâmetros de maneira a fornecer resultados com desvios padrão relativos (RSD%) mais baixos. A robustez foi avaliada baseada no mesmo desenho, porém considerando variações mais restritas nas condições. Assim, o DoE mostrou ser uma ferramenta útil para otimização dos parâmetros e, simultaneamente, avaliação da robustez do método já que demonstra a região onde são obtidos os menores desvios, baseado no gráfico de superfícies de resposta.

O método foi validado de acordo com ANVISA e INMETRO nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

A linearidade do método foi estudada com duas faixas de concentração distintas, visto que para quantificação de etanol em concentrações abaixo de 25% (v/v) (curva A) utiliza-se etanol como reagente para obtenção do sinal analítico, por meio da reação de calor de diluição e para quantificação de etanol em concentrações acima de 25% (v/v) (curva B) utiliza-se água purificada como reagente, portanto, uma curva para cada perfil foi construída.

O método proposto apresentou precisão baseado nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Cabe destacar que para as amostras com menor quantidade de etanol foram observados maiores valores de RSD, entretanto estes valores foram considerados adequados de acordo com a ampla faixa linear do método. Este aumento de desvio também foi observado na quantificação de etanol pelo método convencional.

Por meio da comparação dos percentuais encontrados (em relação ao valor considerado verdadeiro, ou seja, o teor de etanol de amostras manipuladas especificamente para o estudo) foi possível constatar que não houve diferença significativa nos resultados obtidos (Teste T de Student).

O documento “Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008, 2010)” do INMETRO foi utilizado para avaliar os limites de detecção e quantificação, pois demonstrou ser mais adequado devido ao perfil decrescente da curva A.

O método de TIE foi efetivo e uma boa alternativa para a determinação do teor de etanol de medicamentos homeopáticos em todas as etapas de produção (tinturas-mãe

– 95%; soluções de estoque – 70%; medicamento acabado em gotas – 30%; e medicamento acabado em dose única – 5%), simplificando as operações analíticas e facilitando sua utilização em análises de rotina, o que pode contribuir para o controle de qualidade destes medicamentos.

No entanto, esta técnica é bastante sensível à temperatura sendo imprescindível atingir o equilíbrio térmico entre a amostra e o reagente antes da reprodução da análise para obtenção de resultados corretos, devendo ser realizada preferencialmente em ambiente fechado, com temperatura controlada.

6. CONCLUSÃO

O método proposto foi otimizado e validado com sucesso, apresentando concordância com o método oficial para a determinação de etanol em medicamentos homeopáticos. A TIE mostrou-se uma ferramenta promissora e uma boa alternativa para análises de rotina, pois apresenta baixo custo, análises simples e rápidas e concordância com os princípios da química verde podendo ser facilmente empregada no controle de qualidade de medicamentos homeopáticos em todo seu processo de produção.

7. REFERÊNCIAS

APERS, S.; MEENEN, E. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Quality control of liquid herbal drug preparations: ethanol content and test on methanol and 2-propanol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 529-537, 2003.

BARIN, J. S.; TISCHER, B.; OLIVEIRA, A.S.; 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, p. 12065-12070, 2015.

BARREIRA, E. S. B. M. **Aplicação da termografia ao estudo do comportamento higrotérmico dos edifícios**. 2004. 196 f. Dissertação (Departamento de Engenharia Civil), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, 2004.

BATISTA, L. R. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de etanol em xaropes utilizando headspace e cromatografia gasosa multidimensional acoplada a espectrometria de massas (hs-mdgc-ms)**. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2015.

BENEDETTI, L. P. dos S.; SANTOS, V. B. dos.; SILVA, T. A.; BENEDETTI-FILHO, E.; MARTINS, V. L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image-based method employing a spottest for quantification of ethanol in drinks. **Anal. Methods**, v. 7, p. 4138–4144, 2015.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo - Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Gen, Guanabara Koogan, 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p.

BRASIL. **Farmacopeia Homeopática Brasileira**. 3. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 364p.

BRASIL. **Formulário Homeopático da Farmacopeia Brasileira**. 1. ed. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2017. 107p.

BRASIL. Resolução RDC nº. 26, de 30 de março de 2007. **Dispõe sobre o registro de medicamentos dinamizados industrializados homeopáticos, antroposóficos e anti-**

homotóxicos. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.cff.org.br>. Acesso em: 09 nov 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 47, de 8 de setembro de 2009. **Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde.** ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 mai 2017.

BRASIL. Resolução RE nº 543, de 19 de abril de 2001. **Proíbe a presença do etanol na composição de produtos estimulantes de apetite e crescimento, fortificantes, tônicos, complementos de ferro e fósforo.** Disponível em: <http://www.mpsp.mp.br>. Acesso em: 07 mai 2017.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 25 de janeiro de 2002. **Estabelece limite de álcool etílico em vitaminas e fortificantes.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jan. 2002. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br>. Acesso em: 07 mai 2017.

CHIRUMBOLO, S.; BJØRKLUND, G. Homeopathic potencies of *Arnica montana* L. change gene expression in a Tamm-Horsfall protein-1 cell line in vitro model: the role of ethanol as a possible confounder and statistical bias. **Journal of Integrative Medicine**, v. 15, p. 255–264, 2017.

CROWLEY, M. M. The Science and Practice of Pharmacy. TROY, D. B. In: **Remington**. 21. ed., p. 745, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2006.

DINCER, I. Green methods for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 1954-1971, 2012.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CFR - Code of Federal Regulations Title 21. **Over-the-counter drug products intended for oral ingestion that contain alcohol.** Department of Health and Human Services, v. 5, 2016. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov>. Acesso em: 17 mai 2017.

FERREIRA, A. de O. **Preparações orais líquidas: formulário, procedimento de preparo, flavorização, estabilidade e conservação.** 3. ed. ver. e ampl. São Paulo: Pharmabooks editora, 2011.

FERREIRA, M.; MORAIS, L. B.; NICHELE, T. Z.; DEL PINO, J. C. **Química orgânica: práticas pedagógicas para o ensino médio**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 90–91.

FIOCCHI, A.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Ethanol in medicines and other products intended for children: commentary on a medical paradox. **Nutrition Research**, Tarrytown, NY, v. 19, n. 3, p. 373-379, 1999.

GRIME, J. K. Enthalpimetry - a change of emphasis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 1, p. 22–28, 1981.

HORNAK, J. P. **Encyclopedia of imaging science and technology**, v. 1, New York: John Wiley & Sons Inc, 2002.

HUZAR, E.; WODNICKA, A. Determination of ethanol content in medicated syrups by static headspace gas chromatography. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 70. n. 1. p. 41-49, 2013.

JACOBSON, J. L.; JACOBSON, S. W. Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Child Development. **Alcohol Research & Health**, v. 26, n. 4, 2002.

KRIZOVA, E.; BYMA, S. The integration of homoeopathy into Czech Health Care – A 10-year follow-up. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 277-285, 2014.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 3.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43.

LITTLE, H. J. Alcohol is a drug: a cautionary note on its use as a drug solvent. **Psychopharmacology**, v. 171, p. 234–35, 2004.

LOUDON, I. A brief history of homeopathy. **Journal of the royal society of medicine**, v. 99, p. 607 – 610, 2006.

MATAIX, E.; CASTRO, M. D. L. Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection. **Talanta**, v.51, p.489-496, 2000.

NCCIH. National Center for Complementary and Integrative Health: Homeopathy. 2015. Disponível em: <https://nccih.nih.gov/health/homeopathy>. Acesso em: 28 nov 2017.

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.

RELTON, C.; COOPER, K., VIKSVEEN, P.; FIBERT, P.; THOMAS, K. Prevalence of homeopathy use by the general population worldwide: a systematic review. **Homeopathy**, v. 106, p. 69-78, 2017.

REIS, J. P. Z. Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Departamento de Alimentos e Nutrição. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2006.

SELVAN, P. S.; PRIYA, E. S. Determination of ethanol content in ayurvedic formulations kumaryasava and mustakarista by gas chromatography. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 1, p. 120-125, 2015.

SILVA, M. O. da. **Desenvolvimento de caracterização de eletrodos com base no níquel para a determinação de etanol**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2007.

SILVA, R. N. T. da. **Estudo da termografia por infravermelho: aplicações na engenharia e determinação de parâmetros termofísicos e geométricos de materiais**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

SOUZA, L. F. R. **Aplicação de termografia no estudo do isolamento térmico de edifícios**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro, 2010.

STAHL, J. W. Nomenclature of thermometric and enthalpimetric methods in chemical analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 2487-2492, 1994. Disponível em: <https://www.iupac.org/publications/pac/pdf/1994/pdf/6612x2487.pdf>. Acesso em: 17 mai 2017.

TEIXEIRA, M. Z. Therapeutic use of the rebound effect of modern drugs: “New homeopathic medicines”. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 2, p. 100-108, 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 acidity evaluation of vinegars using thermal infrared enthalpimetry. **Food Chemistry**, v. 215, p. 17-21, 2017.

UNLU, A.; KIRCA, O.; OZDOGAN, M. Homeopathy and câncer. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, p. 77-80, 2017.

WADHER, S. J.; PURANIK, M.; YEOLE, P. G.; LOKHANDE, C. S. Determination of ethanol in Abhayarishta by gas chromatography. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 1, p. 152-154, 2007.

WANG, M.; CHOONG, Y.; SU, N.; LEE, M. A Rapid Method for Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages Using Capillary Gas Chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 2, p. 133-140, 2003.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety issues in the preparation of homeopathic medicines**. Geneva: World Health Organization, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pharmaceutical excipients, overview including considerations for paediatric dosing**. Beijing, 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/prequal/trainingresources/pq>. Acesso em: 21 mai 2017. 51p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Alcohol**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/>. Acesso em: 10 ago 2017.

ANEXOS

**NORMAS DO PERIÓDICO *JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS*
(JFDA) PARA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO**

JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS (JFDA)
GUIDE FOR AUTHORS

Manuscript Preparation

Text should be typed double-spaced on one side of white A4 (297 × 210 mm) paper, with outer margins of 2.5 cm. A manuscript should include a title page, abstract, text, references, conflicts of interest statement (if any), acknowledgments (if any), and figures and tables as appropriate (Please do not insert figures and tables in the text. Figures and tables provided at the end of the text would be adequate). Each section of the manuscript should begin on a new page. Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript. Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references and tables should be numbered.

All pages must be numbered consecutively, beginning with the title page and including tables and figures. Lines in the abstract and text should be numbered consecutively from beginning to end in a separate column at the left.

Font type:

- Article title: bold 16-points Times New Roman fonts.
- Section headings: italics 14- points Times New Roman fonts.
- Main text: standard 12-point Times New Roman fonts
- Figure/table legends: standard 10- point Times New Roman fonts

Title Page

The title page should contain the following information (in order, from the top to bottom of the page):

- article category
- article title (the title of the manuscript should be explicit, descriptive and as brief as possible--no more than 20 words in length)
- names (spelled out in full) of all the authors*, and the institutions with which they are affiliated; indicate all affiliations with a superscripted lowercase letter after the author's

name and in front of the matching affiliation (*the name of each author should be written with the family name last, e.g., Wan-Lin Chang)

- corresponding author details (name, e-mail, mailing address, telephone and fax numbers)

Abstract and Keywords

An unstructured abstract (i.e., in one single paragraph with no subheadings), of no more than 500 words in length, and relevant keywords (no more than 5 words, in alphabetical order) are required for the following article categories: Review Articles, Original Articles, Case Reports, and Research Notes.

Keywords should be taken from the Medical Subject Headings (MeSH) list of Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Main Text

The text for Original Articles should be organized into the following sections: Introduction, Methods, Results, Discussion, Conflicts of Interest Statement (if any), Acknowledgments (if any), and References. Sections for Case Reports are: Introduction, Case Report, Discussion, Conflicts of Interest Statement (if any), Acknowledgments (if any), and References. Each section should begin on a new page.

Abbreviations

Where a term/definition will be continually referred to, it must be written in full when it first appears in the text, followed by the subsequent abbreviation in parentheses. Thereafter, the abbreviation may be used. An abbreviation should not be first defined in any section heading; if an abbreviation has previously been defined in the text, then the abbreviation may be used in a subsequent section heading. Restrict the number of abbreviations to those that are absolutely necessary.

Numbers

Numbers that begin a sentence or those that are less than 10 should be spelled out using letters. Centuries and decades should be spelled out, e.g., the Eighties or nineteenth

century. Laboratory parameters, time, temperature, length, area, mass, and volume should be expressed using digits.

Units

Système International (SI) units must be used, e.g., cm, mm, mL, kg, g, mg, ng, ppm, °C, min, h, mmHg.

Names of drugs, devices and other products

Use the Recommended International Nonproprietary Name (rINN) for medicinal substances, unless the specific trade name of a drug is directly relevant to the discussion. Generic drug names should appear in lowercase letters in the text. If a specific proprietary drug needs to be identified, the brand name may appear only once in the manuscript in parentheses following the generic name the first time the drug is mentioned in the text.

For devices and other products, the specific brand or trade name, the manufacturer and their location (city, state, country) should be provided the first time the device or product is mentioned in the text, for example, "...SPSS version 11 was used (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)". Thereafter, the generic term (if appropriate) should be used.

Statistical requirements

Statistical analysis is essential for all research papers except Case Reports. Use correct nomenclature of statistical methods (e.g., two sample test, not unpaired t test). Descriptive statistics should follow the scales used in data description. Inferential statistics are important for interpreting results and should be described in detail.

All p values should be presented to the third decimal place for accuracy. The smallest p value that should be expressed is $p < 0.001$, since additional zeros do not convey useful information; the largest p value that should be expressed is $p > 0.99$.

Conflicts of Interest Statement and/or Funding/Support Statement

Since it is difficult to distinguish between an actual conflict of interest and a perceived conflict of interest, the JFDA requires authors to disclose all and any potential conflicts of interest and let readers judge for themselves. Therefore, please ensure that you

provide information about any potential financial and non-financial conflicts of interest (see Section 2 for more information) in a concise paragraph after the main text.

All financial and material support for the research, work, writing and editorial assistance from internal or external agencies, including commercial companies, should be clearly and completely identified in a Funding/Support Statement.

Acknowledgments

After the Conflicts of Interest Statement and/or Funding/Support Statement, general acknowledgments for consultations and statistical analysis should be listed concisely, including the names of the individuals who were directly involved. Consent should be obtained from those individuals before their names are listed in this section. Those acknowledged should not include secretarial, clerical or technical staff whose participation was limited to the performance of their normal duties.

References

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct in-text citation.

In the main text, tables, figure legends

- References should be indicated by numbers in square brackets in line with the text, numbered consecutively in order of appearance, and placed before punctuation. [The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.]
- References cited in tables or figure legends should be included in sequence at the point where the table or figure is first mentioned in the main text.
- Do not cite abstracts unless they are the only available reference to an important concept.
- Do not cite uncompleted work or work that has not yet been accepted for publication (i.e., “unpublished observation”, “personal communication”) as references.

In the references list

- References should be compiled at the end of the manuscript according to the order of citation in the text.
- References should be limited to those cited in the text only.

- Journal references should include, in order, authors' surnames and initials, article title, abbreviated journal name, year, volume (without the issue number) and inclusive page numbers.
- The surnames and initials of all the authors should be included.
- Abbreviations for journal names should conform to those used in MEDLINE.
- If citing a website, provide the author information, article title, website address and the date you accessed the information.
- Reference to an article that is in press must state the journal name and, if possible, the year and volume.

Examples of the most common reference types are provided below. (Please pay particular attention to the formatting, word capitalization, spacing and style.)

Standard journal articles

[1] Hoog SL, Cheng Y, Elpers J, Dowsett SA. Duloxetine and pregnancy outcomes: Safety surveillance findings. *Int J Med Sci* 2013;10:413-9.

Journal supplement

[2] Iemoli E, Trabattoni D, Parisotto S, Borgonovo L, Toscano M, Rizzardini G, Clerici M, Ricci E, Fusi A, De Vecchi E, Piconi S, Drago L. Probiotics reduce gut microbial translocation and improve adult atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* 2012;46 Suppl:S33-40.

Journal article not in English but with English abstract

[3] Liu M, Liu Z. Overview of clinical study on traditional Chinese medicine invigorating spleen and stomach, promoting blood circulation and remove blood stasis in treatment of chronic atrophic gastritis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2012;37:3361-4.
[In Chinese, English abstract]

Book with edition

[4] Watson DG. *Pharmaceutical analysis*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 2012.

Book with editors

[5] Liu J, Peck G, editors. Chinese dietary therapy. London: Churchill Livingstone; 1995.

Book chapter in book with editor and edition

[6] Greaves M, Culligan DJ. Blood and bone marrow. In: Underwood JCE, editor. General and systematic pathology. 4th ed. London: Churchill Livingstone; 2004, p. 615–72.

Book series with editors

[7] Wilson JG, Fraser FC, editors. Handbook of teratology, vols. 1-4. New York: Plenum Press; 1977-1978.

Bulletin

[8] World Health Organization. World health report 2002: reducing risk, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002.

Electronic publications

[9] Duchin JS. Can preparedness for biological terrorism save us from pertussis? Arch Pediatr Adolesc Med 2004;158:106–7. Available at <http://archpedi.ama-assn.org/cgi/content/full/158/2/106>. Accessed June 12, 2004.

[10] Smeeth L, Iliffe S. Community screening for visual impairment in the elderly. Cochrane Database Syst Rev 2002(2):CD001054. doi:10.1002/14651858. CD1001054.

Theses

[11] Ayers AJ. Retention of resin restorations by means of enamel etching and by pins. MSD thesis, Indiana University, Indianapolis, 1971.

Website

[12] American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Wisdom teeth. Rosemont, IL: AAOMS, 2008. Available at http://www.aaoms.org/wisdom_teeth.php. Accessed November 15, 2008.

Company/manufacturer publication/pamphlet

[13] Eastman Kodak Company, Eastman Organic Chemicals. Catalog no. 49. Rochester, NY: Eastman Kodak; 1977, p. 2–3.

[dataset] [14] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Tables

Tables should supplement, not duplicate, the text. They should have a concise table heading, be self-explanatory, and numbered consecutively in the order of their citation in the text. Items requiring explanatory footnotes should be denoted using superscripted lowercase letters (a, b, c, etc.), with the footnotes arranged under the table in alphabetical order. Asterisks (*, **) are used only to indicate the probability level of tests of significance. Abbreviations used in the table must be defined and placed after the footnotes in alphabetical order. If you include a block of data or table from another source, whether published or unpublished, you must acknowledge the original source.

Figures

General guidelines

The number of figures should be restricted to the minimum necessary to support the textual material. Figures should have an informative figure legend and be numbered in the order of their citation in the text. All symbols and abbreviations should be defined in the figure legend in alphabetical order. Items requiring explanatory footnotes should follow the same style as that for tables.

Patient identification should be obscured. All lettering should be done professionally and should be in proportion to the drawing, graph or photograph. Photomicrographs must include an internal scale marker, and the legend should state the type of specimen, original magnification and stain.

Figures must be submitted as separate picture files at the correct resolution. The files should be named according to the figure number and format, e.g., “Fig1.tif”, “Fig2.jpg”.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-food-and-drug-analysis>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.