

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

Daniele de Freitas Ferreira

ANÁLISE RÁPIDA DA ACIDEZ DE BEBIDAS EM MICROPLACAS DE  
PAPEL EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO

Santa Maria, RS  
2016

**Daniele de Freitas Ferreira**

**ANÁLISE RÁPIDA DA ACIDEZ DE BEBIDAS EM MICROPLACAS DE PAPEL  
EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Freitas Ferreira, Daniele  
ANÁLISE RÁPIDA DA ACIDEZ DE BEBIDAS EM MICROPLACAS DE  
PAPEL EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO /  
Daniele Freitas Ferreira.-2016.  
57 p.; 30cm

Orientador: Juliano Smanioto Barin  
Coorientador: Roger Wagner  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

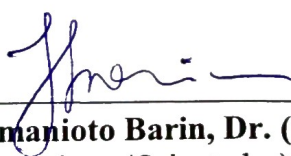
1. Termografia no Infravermelho 2. Entalpimetria 3.  
Dispositivos de Papel 4. Acidez 5. Química Verde I.  
Smanioto Barin, Juliano II. Wagner, Roger III. Título.

**Daniele de Freitas Ferreira**

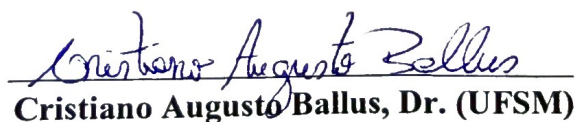
**ANÁLISE RÁPIDA DA ACIDEZ DE BEBIDAS EM MICROPLACAS DE PAPEL  
EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

**Aprovado em 11 de março de 2016:**



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



**Cristiano Augusto Ballus, Dr. (UFSM)**



**Éder Lisandro de Moraes Flores, Dr. (UTFPR)**

## DEDICATÓRIA

*À minha querida avó Norma (in memoriam), por ter sido sempre meu maior exemplo, por nunca ter medido esforços para estar ao meu lado, me protegendo e me proporcionando momentos únicos de amor e ensinamentos, os quais me guiam e me fortalecem para seguir em busca dos meus objetivos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pelo aprendizado e oportunidade de crescimento profissional, possibilitando a minha titulação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano S. Barin, pela orientação e dedicação, por ter confiado em meu trabalho e pela paciência e apoio durante este período. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram crescimento tanto profissional quanto pessoal.

Ao Prof Dr. Roger pelo auxílio na elaboração deste trabalho, disponibilidade e pelos ensinamentos transmitidos a mim desde a graduação.

À toda equipe do LAQIA que me auxiliou, em especial aos professores Érico M. M. Flores e Cezar A. Bizzi, pela disponibilidade dos equipamentos e pela ajuda durante os experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Bruna Tischer, Alessandra, Bruna Nichelle, Flávia, Maurício e Sandra pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimentos e auxílio durante as análises.

Às minhas colegas Mariana M, Raquel e Mariane B. pela amizade, auxílio, momentos de descontração e apoio.

À todos colegas de NTA pela ótima convivência,

À minha mãe e meus irmãos, pelo carinho, compreensão e apoio, sempre mostrando o melhor caminho e incentivando-me a vencer os obstáculos.

Ao meu namorado Amilton pelo amor, cumplicidade e incansável apoio e paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado me alegrando e dando força em todos os momentos.

A todos que de alguma maneira, colaboraram para realização deste trabalho.

À Deus por ter me guiado e iluminado meus caminhos.

## RESUMO

### ANÁLISE RÁPIDA DA ACIDEZ DE BEBIDAS EM MICROPLACAS DE PAPEL EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO

AUTORA: Daniele de Freitas Ferreira

ORIENTADOR: Juliano Smanioto Barin

Os dispositivos de papel vêm recebendo um elevado destaque no cenário das análises químicas, devido às características atraentes como baixo custo, facilidade de uso e fabricação, baixo consumo e descarte de reagentes, elevada área superficial, portabilidade e biodegradabilidade. Desta forma, como uma alternativa para avaliação de acidez em bebidas, este trabalho propõe uma combinação inédita através do emprego de microplacas de papel e da entalpimetria no infravermelho (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*), perfazendo um método analítico rápido e eficiente para a determinação da acidez de bebidas de acordo com os princípios da química verde. Para tanto, foi realizada a determinação de acidez total em amostra de refrigerante e acidez total, fixa e volátil em vinho tinto, branco e espumante, com comparação com o método convencional de titulação. O sistema proposto foi organizado com o uso de microplacas de papel fabricadas pelo método de impressão em jato de cera, uma câmera infravermelho utilizada para o monitoramento da temperatura e uma pipeta multicanal para adição dos reagentes. Primeiramente, foi observado que as condições de pipetagem bem como das medidas de temperatura no tratamento dos dados podem influenciar diretamente na variação dos resultados. Comparado ao método convencional de titulação a TIE em plataforma de papel apresentou resultados promissores, com boas concordâncias (variando de 96 a 104%) para todas as amostras avaliadas. Além disso, observou-se que este permite obter uma maior frequência de análises que pode chegar à 480 amostras h<sup>-1</sup> para acidez fixa. Uma redução expressiva no consumo de amostra e reagentes foi observada, com um consumo de energia até 60 vezes menor em relação ao método convencional. Assim, o sistema proposto neste trabalho apresentou um bom desempenho, podendo ser considerado uma alternativa rápida, confiável e barata para análise de acidez de acordo com os requisitos para aplicação em análises de rotina de acordo com a química verde.

**Palavras-chave:** Termografia no Infravermelho. Entalpimetria. Dispositivos de Papel. Acidez. Química Verde.

## ABSTRACT

### RAPID ANALYSIS OF BEVERAGE ACIDITY ON MICROPLATE PAPER USING THERMAL INFRARED ENTHALPIMETRY

AUTHOR: Daniele de Freitas Ferreira

ADVISOR: Juliano Smanioto Barin

The paper devices are receiving high emphasis in chemical analysis due to the attractive features as low cost, facility of use and fabrication, low consumption of reagents and easy disposal, high surface area, portability and biodegradability. In this way, as an alternative for acidity evaluation in beverages, this work proposes an unprecedented combination of paper microplates and thermal infrared enthalpimetry (TIE), allowing a rapid and effective analytical method for determination of acidity in beverages according to the principles of green chemistry. Therefore, it was performed the determination of total acidity in soft drink samples and total, fixed and volatile in red, white and sparkling wine with comparison of results with conventional titration method. The proposed system was performed by the use of a microplates paper fabricated by the wax printing method, an infrared camera for temperature monitoring and a multichannel pipette for reagent addition. Firstly, it was observed that the conditions of pipette as well as the temperature measurement in data processing could directly influence the deviation of the results. Compared to conventional titration method the TIE in paper platform presented desirable results, with good agreement (from 96 to 104%) for all evaluated samples. Moreover, it was observed that it provided a higher sample throughput that reached 480 samples  $\text{h}^{-1}$  for fixed acidity. A significant reduction in the sample and reagent consumption was observed, with energy consumption up to 60 times lower in relation to conventional method. Thus, the proposed system in this work presented a good performance, and it could be considered a rapid, reliable and inexpensive to acidity analysis in routine following the principles of green chemistry.

**Keywords:** Infrared Thermography. Enthalpimetry. Paper Devices. Acidity. Green Chemistry.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DIE</b>	Entalpimetria por injeção direta (do inglês <i>Direct Injection Enthalpimetry</i> )
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (do inglês, <i>Enzyme-LinkedImmuno absorbent Assay</i> )
<b>FPA</b>	Matriz de plano focal (do inglês <i>Focal Plane Array</i> )
<b>μPADs</b>	Dispositivos microfluídicos à base de papel (do <i>inglês Microfluidic paper-based analytical device</i> )
<b>OIV</b>	Organização internacional da uva e do vinho (do francês <i>Organisation Internationale de La Vigne et du Vin</i> )
<b>TI</b>	Termografia no infravermelho
<b>TIE</b>	Entalpimetria no infravermelho térmico (do inglês <i>Thermal Infrared Enthalpimetry</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1 BEBIDAS ALCÓOLICAS E NÃO ALCÓOLICAS .....	13
<b>2.1.1 Refrigerantes</b> .....	14
<b>2.1.2 Vinho</b> .....	16
2.2 TERMOGRAFIA NO INFRAVERMELHO .....	18
2.3 ENTALPIMETRIA .....	22
2.3.1 Métodos entalpimétricos clássicos .....	23
2.3.2 Entalpia no infravermelho térmico .....	24
2.4 DISPOSITIVOS DE PAPEL .....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 AMOSTRAS E REAGENTES .....	30
3.2 INSTRUMENTAÇÃO .....	30
3.3 ANÁLISE DE ACIDEZ POR TÉCNICAS CONVENCIONAIS .....	31
<b>3.3.1 Determinação de acidez em refrigerante</b> .....	31
<b>3.3.2 Determinação de acidez em vinhos</b> .....	31
3.4 ANÁLISES DE ACIDEZ POR ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO TÉRMICO .....	32
3.4.1 Fabricação das microplacas de papel .....	32
3.4.2 Otimização das condições experimentais .....	33
3.4.3 Determinação de acidez das bebidas .....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
4.1 AJUSTE DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS .....	36
4.2 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM REFRIGERANTE .....	40
4.3 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM VINHOS .....	43
4.4 PARÂMETROS DE MÉRITO DA TIE EM DISPOSITIVOS DE PAPEL .....	47
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

A tendência global da química caminha cada vez mais em direção à química verde, que permite o desenvolvimento de novos processos ambientalmente mais sustentáveis, tanto em nível laboratorial quanto industrial (CLARK, 1999; TOBISZEWSK e NAMIEŚNIK, 2015). Dessa forma, a química verde tem buscado a minimização do consumo de energia, do uso e do descarte de reagentes e materiais, com aumento crescente da utilização de fontes renováveis e recicláveis (CLARK, 1999). Na química analítica a mesma tendência é observada, sendo associada, também, a necessidade da integração de etapas de análise, aumento da segurança do operador e a miniaturização e automação dos métodos utilizados (GALUSZKA et al., 2013). Nesse contexto, nos últimos anos, foi desenvolvida uma ferramenta capaz de satisfazer os requisitos estabelecidos pela química analítica verde, através dos chamados dispositivos à base de papel, também conhecidos como tecnologia *lab-on-paper* (SONGJAROEN et al., 2011). Estes apresentam diversas vantagens, pois além de oferecerem uma plataforma sustentável de análise, proporcionam maior flexibilidade, portabilidade, rapidez, baixo custo, redução significativa da quantidade de amostras e reagentes e fabricação simples (COSTA et al., 2014).

Os dispositivos analíticos de papel baseiam-se, geralmente, na formação de zonas hidrofílicas isoladas, através do depósito de uma camada hidrofóbica sobre o papel (CARRILHO et al., 2009b). Um dos métodos mais utilizados para este fim é a impressão com jato de cera, onde a mesma é depositada sobre o papel, com posterior derretimento em chapa de aquecimento, de forma a permear pelo papel e formar barreiras hidrofóbicas (CARRILHO et al., 2009a; SONGJAROEN et al., 2011). Por meio destas tecnologias, os dispositivos de papel podem ser considerados uma alternativa satisfatória às microplacas de plástico, pois permitem realizar análises mais rápidas, baratas e com emprego de menores quantidades de amostras e reagentes. Quando os métodos de análise necessitam de etapas de concentração do analito, essas etapas podem ser efetuadas de maneira até 20 vezes mais rápidas, devido a maior razão superfície/volume dos dispositivos de papel (MARTINEZ, et al., 2010; VAHER e KALJURAND, 2012).

Apesar das vantagens associadas à utilização dos dispositivos de papel, os métodos de análise recomendados nos compêndios oficiais de controle de qualidade de alimentos, em geral, não empregam tais sistemas e não seguem os princípios verdes da atualidade (IAL, 2004). Um exemplo disso são as análises físico-químicas realizadas no controle de qualidade da indústria de alimentos, que consomem grande volume de reagentes, gerando quantidades significativas de resíduos. Na produção de diversos alimentos e bebidas, análises como a acidez são essenciais para o monitoramento da qualidade e sanidade do produto. No entanto, a realização destas análises ocorre por meio de titulação, um método demorado, que requer atenção constante do analista e que apresenta consumo de reagente relativamente elevado, prejudicando a aplicação em análises de rotina (IAL, 2014; VENTURINI, 2010; KARITA e KANETA, 2014).

Com base nisso, um novo método foi desenvolvido com o propósito de realizar análises de acordo com a química analítica verde de forma simples, rápida e econômica, a partir do uso de dispositivos de papel. Contudo, ao invés da utilização de métodos de detecção comumente usados nesses dispositivos (p. ex., detecção colorimétrica, eletroquímica, fluorescência e quimioluminescência) (NERY e KUBOTA, 2013), foi empregada a entalpietria no infravermelho térmico (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*). A TIE foi introduzida recentemente na literatura, sendo desenvolvida com o intuito de realizar análises entalpimétricas de modo rápido, simples e sem contato, através do emprego de uma câmera infravermelho. Nessa técnica as mesmas reações de titulação (neutralização, precipitação, complexação e oxirredução) podem ser utilizadas, porém com algumas vantagens associadas como rapidez, detecção simultânea de múltiplas reações e elevada frequência de análises, permitindo um aumento de até 20 vezes na frequência de análise (BARIN et al., 2015). Essas vantagens podem ser ainda maiores se limitações relacionadas aos reatores empregados (p. ex., microplacas de poliestireno de 24 poços com volume interno de 3,0 mL), tais como consumo de amostra (p. ex., cerca de 1,2 mL de amostra) e reagentes forem minimizados, e se o descarte das microplacas for simplificado.

Considerando as vantagens da TIE e a praticidade dos dispositivos de papel em análises químicas, o presente trabalho propõe a associação de ambas tecnologias.

Dessa forma, um novo método de detecção para os dispositivos de papel, assim como um novo reator para a TIE são propostos nesse trabalho. Sendo assim, através do sistema proposto foi executada a determinação de acidez de bebidas alcoólicas e não alcoólicas de maneira a permitir a miniaturização da análise, com redução significativa no consumo de amostra e solvente, além de empregar dispositivos biodegradáveis e facilitar o processo de pré-concentração dos analitos, quando necessário. Deste modo, o uso do sistema de análise empregado neste trabalho pode ser uma alternativa atrativa para análises química de alimentos, sendo uma estratégia inovadora e que não compreende nenhum tipo de aplicação reportado na literatura.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 BEBIDAS ALCÓOLICAS E NÃO ALCÓOLICAS**

No Brasil, dentre as bebidas de maior produção, encontram-se os refrigerantes e as cervejas que, juntos, compreendem 75% da produção total de bebidas no país. Recentemente, o Brasil ocupou a terceira posição na lista dos maiores consumidores mundiais destas bebidas (CERVIERI JUNIOR, et al., 2014). Conforme os dados do Sistema de Controle de Produção de Bebidas, no ano de 2015 a produção nacional de refrigerante foi de 15,8 bilhões de litros (MINISTÉRIO DA FAZENDA, 2016). Dentre as bebidas alcoólicas, além da cerveja, o vinho vem sendo bastante consumido no país, sendo que em 2014 a produção foi de aproximadamente 250 milhões de litros, sendo 208 milhões destinados à produção de vinho de mesa e 41 milhões para vinhos finos. Desta forma, pode-se dizer que a vitivinicultura brasileira também apresenta importância econômica, embora a produção ocorra em determinadas regiões do país, onde o estado do Rio Grande do Sul concentra em torno de 90% da produção nacional, sendo predominantemente representada por pequenas propriedades caracterizadas pela produção familiar (MELLO, 2015).

Desta forma, devido à grande quantidade de bebidas produzidas no país, pode-se dizer que há uma forte demanda de métodos analíticos rápidos, simples e de baixo custo para o controle da qualidade desses produtos. Assim, antes da apresentação das principais técnicas analíticas abordadas nesse trabalho, uma breve revisão é apresentada com relação às principais características das bebidas avaliadas, os refrigerantes e os vinhos.

### **2.1.1 Refrigerantes**

De acordo com a legislação brasileira, bebidas não alcoólicas são caracterizadas por possuírem concentração de álcool etílico menor que 0,5% em volume (MAPA, 1994). Dentre estas, encontram-se os refrigerantes, que podem ser definidos como bebidas gaseificadas, obtidas pela adição de suco ou de extrato vegetal em água potável, além de açúcar e obrigatoriamente saturado com dióxido de carbono puro (MAPA, 1998).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes os sabores mais consumidos pela população são cola, guaraná, limão, laranja e uva (ABIR, 2008). De acordo com os padrões de identidade e qualidade de bebidas, os refrigerantes a base de frutas devem, obrigatoriamente, conter suco natural ou o concentrado da respectiva fruta, em quantidades mínimas estabelecidas na legislação (MAPA, 1998). Dos refrigerantes de frutas, aqueles de laranja, tangerina e uva devem conter, no mínimo, 10% em volume do respectivo suco na sua concentração natural. Já os refrigerantes fabricados a base de limão, devem conter, no mínimo, 2,5% em volume de suco (MAPA, 1998).

A base do refrigerante é formada por ingredientes de uso obrigatório, tais como água, suco ou extrato vegetal e açúcar, além do dióxido de carbono. Outras matérias-primas que também podem ser adicionadas são os chamados aditivos, como acidulantes, aromas, corantes, conservantes e antioxidantes (MAPA, 2009). Considerado uma bebida de baixo valor nutricional, o valor energético do refrigerante provém, basicamente, do açúcar, o segundo ingrediente em maior quantidade depois

da água, representando cerca de 8 a 12% do produto final. Para tanto, sacarose é mais comumente utilizada, sendo adicionada para promoção do gosto doce, realçar o sabor da bebida e balancear a acidez, além de ajudar na estabilização do CO<sub>2</sub> (VENTURINI, 2010).

Uma das características mais importantes do refrigerante é a sua acidez, pois apresenta um importante papel na qualidade sensorial do produto, sendo necessário encontrar o balanço adequado com a doçura. A incorporação dos acidulantes nas bebidas permitem intensificar o gosto ácido, sabor e aroma, além de atuarem no controle do pH impedindo deterioração microbológica do produto. O ácido cítrico é o acidulante mais utilizado na indústria de alimentos, por ser um ácido orgânico naturalmente encontrado em frutas cítricas, altamente solúvel em água e apresentar baixo custo. Este ácido pode ser considerado um aditivo multifuncional, pois além de servir de acidulante, também atua como flavorizante, tamponante e sequestrante (VENTURINI, 2010; ASHURST, 2005).

Algumas análises de rotina devem ser realizadas durante a produção do refrigerante, visando garantir os padrões de identidade e qualidade da bebida. Dessa forma, os principais parâmetros físico-químicos de controle de qualidade do produto final são a acidez e °Brix (VENTURINI, 2010). Com base nos parâmetros estabelecidos pela legislação, os refrigerantes de laranja e limão devem apresentar acidez titulável de, no mínimo, 0,100 g e 0,125 g de ácido cítrico por 100 ml, respectivamente (MAPA, 1998).

O método convencional utilizado para a determinação de acidez total é a titulação com hidróxido de sódio, um procedimento considerado confiável, de fácil execução e baixo custo. No entanto, a titulação é um método demorado e susceptível a erro do analista na detecção do ponto exato de viragem, principalmente em baixas concentrações (IAL, 2004; OLIVEIRA, 2010). Apesar da importância da determinação da acidez em refrigerantes há poucos estudos na literatura visando o desenvolvimento de novos métodos. Por exemplo, Staden e colaboradores (2002) propõem a automação da técnica convencional, por meio da titulação por injeção sequencial, uma

alternativa sensível e rápida para avaliação de acidez total em refrigerante, permitindo uma frequência maior de análise.

### 2.1.2 Vinho

Segundo a Organização internacional da uva e do vinho (OIV - do francês *Organisation Internationale de La Vigne et du Vin*), a produção de vinho se dá, principalmente, no continente europeu, sendo a França e a Itália os países responsáveis pela maior parte da produção mundial (OIV, 2005). Entretanto, como já foi mencionado anteriormente, a produção de vinho também é uma atividade importante no território brasileiro, principalmente no sul do país. A produção de vinho no Brasil desenvolveu-se primeiramente com base nas uvas americanas para produção de vinhos de mesa, os quais são caracterizados pelo aroma típico e sabor suave e adocicado, o que faz com que estes sejam apreciados por uma grande parte dos consumidores brasileiros. Mais recentemente, com a modernização das vinícolas, iniciou-se a produção dos vinhos finos, que são mais competitivos no mercado devido ao seu maior valor agregado (GUERRA, 2009).

Entende-se por vinho a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto da uva sã, fresca e madura, contendo teor alcoólico de 8,6 a 14% em volume (MAPA, 1988). Existem, basicamente, três tipos de vinhos - tinto, rosado e branco, que podem ser classificados como vinhos de mesa, finos, espumantes, licorosos ou compostos. Os vinhos de mesa e finos são diferenciados com relação à variedade de uva, sendo o de mesa proveniente de uvas americanas e híbridas e os vinhos finos são exclusivamente elaborados com uvas de variedades europeias (*Vitis vinifera* L.) (MAPA, 1988). Com relação aos espumantes, estes são definidos como o vinho cujo anidrido carbônico é obtido exclusivamente de uma segunda fermentação alcoólica, em garrafa ou em recipientes grandes, com pressão mínima de 4 atm. Já o espumante moscatel diferencia-se por apresentar a fermentação em recipiente fechado, exclusivamente do mosto de uva branca moscatel (MAPA, 1988).



O vinho é considerado uma matriz muito complexa, composta por inúmeras substâncias orgânicas e inorgânicas, além de água, álcool e açúcar. Os ácidos orgânicos fazem parte dos compostos de maior importância na qualidade final do vinho, uma vez que estes apresentam influência sobre os aspectos sensoriais de aroma, sabor e cor, sendo importantes, também, para a estabilidade e controle microbiológico da bebida (LASIKA, 2013). Sabe-se que as uvas maduras apresentam predominantemente os ácidos tartárico e málico e, em menor quantidade, ácido cítrico. Adicionalmente, durante as etapas de fermentação, também são produzidos ácido acético, láctico e succínico (MATO et al., 2005; ZERAVIK et al., 2016). O teor de ácido tartárico é considerado um parâmetro crítico de controle na estabilização do vinho, pois este permite a detecção de alterações indesejáveis no produto (MATO et al., 2005).

Sendo assim, torna-se evidente a importância da avaliação dos ácidos orgânicos para o controle da acidez durante todas as etapas do processo de vinificação (ZERAVIK et al., 2016). No vinho existem, basicamente, dois tipos de acidez que podem ser controladas, a acidez total e a acidez volátil. A última é obtida pela diferença entre a acidez total e a acidez fixa, que está relacionada com todos os ácidos não voláteis, especialmente os ácidos tartárico e málico. No vinho, a acidez volátil é representada principalmente pelo ácido acético, que permite inferir a sanidade do produto. Desta forma, pode-se inferir que a acidez total é a combinação da acidez fixa e volátil, ou seja, é um parâmetro que representa todos os ácidos presentes no vinho (JACKSON, 2008). A legislação determina que os vinhos de mesa devem conter no máximo 130 mEq/L de acidez total e 20 mEq/L de acidez volátil. Valores de acidez volátil maiores indicam contaminação microbiana no produto (MAPA, 1988).

A determinação da acidez total em vinho é realizada pelo método convencional de titulação com hidróxido de sódio, com uso do indicador fenolftaleína (IAL, 2004). Porém, para amostras coloridas o uso deste método fica limitado, devido à dificuldade na detecção do ponto final. Este método também apresenta desvantagem por ser demorado e consumir grande volume de amostra e reagentes (TÔRRES et al., 2011; VAHL et al., 2013). Com base nisso, vários métodos analíticos foram desenvolvidos para avaliação da acidez em vinho, como a titulação potenciométrica com eletrodo de

cobre (ZAKHAROVA et al., 2011), medida voltamétrica com microeletrodos (BALDO et al., 1993), método baseado em imagem digital (TÔRRES et al., 2011) e análise por injeção em fluxo potenciométrica (VAHL et al., 2013). Estes são capazes de superar algumas limitações dos métodos convencionais, como rapidez e simplicidade, no entanto, ainda apresentam elevado custo e consumo de reagentes.

## 2.2 TERMOGRAFIA NO INFRAVERMELHO

Diversos processos físicos e reações químicas apresentam trocas de calor, levando a variações de entalpia com valores característicos. Deste modo, em muitos casos, a medida de temperatura pode ser considerada uma informação relevante para a avaliação desses processos. No entanto, os instrumentos mais utilizados para este fim, como termômetros, termistores, termorresistências e termopares, são ferramentas que necessitam estabelecer contato com o material avaliado, além de fornecem apenas a temperatura média de uma determinada região da reação, o que torna impossível verificar a distribuição da temperatura no meio analisado (VADIVAMBAL e JAYAS, 2011). Nas últimas décadas, o emprego da termografia no infravermelho (TI) vêm crescendo abruptamente, uma vez que esta ferramenta permite o mapeamento de temperatura de um objeto de modo não invasivo e não destrutivo (VADIVAMBAL e JAYAS, 2011; BAGAVATHIAPPAN et al., 2013).

A TI é uma técnica versátil capaz de realizar a medição da temperatura superficial de objetos por meio da conversão da radiação emitida em imagens sem estabelecer contato com a amostra. Esta técnica se baseia no princípio de que qualquer objeto com temperatura superior ao zero absoluto (0 K ou  $-273,15^{\circ}\text{C}$ ) emite radiação infravermelha, devido à agitação de seus átomos e moléculas (GOWEN et al., 2010; VADIVAMBAL e JAYAS, 2011). A energia emitida por um determinado objeto está diretamente relacionada com a sua temperatura, portanto, temperaturas mais elevadas promovem maior intensidade de radiação infravermelha emitida (USAMENTIAGA et al., 2014). A radiação infravermelha encontra-se localizada entre a região do visível e da radiação micro-ondas do espectro eletromagnético, com comprimento de onda definido

entre 0,78 e 1.000  $\mu\text{m}$  (VADIVAMBAL e JAYAS, 2011). A região do infravermelho pode ser dividida em diferentes faixas: infravermelho próximo (0,75-3 $\mu\text{m}$ ), médio (3-6 $\mu\text{m}$ ), distante (6-15 $\mu\text{m}$ ) e extremo (15–100  $\mu\text{m}$ ) (MEOLA e CARLOMAGNO, 2004). Entretanto, as regiões do próximo e médio são as mais comumente empregadas para termografia, principalmente pela transparência da atmosfera à radiação infravermelha nestas regiões (USAMENTIAGA et al., 2014). Tipicamente, os sistemas de TI são capazes de medir temperaturas que variam de -20 a 1500 °C, no entanto, para temperatura ambiente, o infravermelho distante apresenta maior sensibilidade, enquanto o próximo é melhor em temperaturas elevadas. Assim, torna-se necessário escolher o sistema mais adequado para cada tipo de aplicação (GOWEN et al., 2010).

O parâmetro considerado de maior importância na calibração para medidas de temperatura por sistemas de infravermelho é a emissividade ( $\epsilon$ ) (USAMENTIAGA et al., 2014). Esta propriedade é definida como a razão da energia emitida por um objeto real pela energia emitida por um corpo negro (objeto ideal), sob mesmas condições de temperatura. O corpo negro é caracterizado como um objeto que absorve toda radiação eletromagnética incidida sobre ele, com  $\epsilon = 1$ , no entanto, estes corpos negros perfeitos não existem naturalmente, os objetos reais absorvem apenas uma parte da radiação incidida sendo o restante refletida e transmitida, resultando em  $\epsilon < 1$  (USAMENTIAGA et al., 2014; COSTA, et al., 2013; BAGAVATHIAPPAN et al., 2013; USAMENTIAGA et al., 2014). Outros fatores que podem interferir na medida da temperatura são as condições atmosféricas, tais como umidade relativa, temperatura ambiente e fluxo de ar ao redor do objeto. Portanto, é importante que as medidas sejam realizadas em ambiente controlado (GOWEN et al., 2010)

As câmeras de imagem infravermelha são dispositivos fáceis de manusear e com capacidade para efetuar medidas altamente precisas de temperaturas superficiais. Dentre os itens que compõem este tipo de câmera, a parte considerada de maior importância é o detector, responsável por converter a energia emitida pelo objeto em sinal elétrico (MEOLA e CARLOMAGNO, 2004; ROGALSKI, 2002). O sinal elétrico recebido pelo detector é processado e transformado em uma imagem termográfica, na qual são atribuídas cores específicas para cada nível de radiação, de forma a tornar a

interpretação das imagens mais fáceis. Os detectores das câmeras infravermelho são, geralmente, uma matriz de plano focal (FPA, do inglês *focal plane array*), que apresentam pixels do tamanho de micrômetros e resolução que varia geralmente de 160 x 120 pixels a 1024 x 1024 pixels. Além disso, a maioria destes dispositivos é capaz de obter imagens em uma taxa de aquisição na faixa de 10 a 100 quadros por segundo, mas existem câmeras no mercado que podem operar na faixa de kHz (USAMENTIAGA et al., 2014, FLIR, 2013).

As tecnologias dos detectores FPA podem ser divididas em dois tipos: térmicos e quânticos (ROGALSKI, 2002). O tipo mais comum dos detectores térmicos é o microbolômetro, no qual a radiação é absorvida gerando um aumento na temperatura e alterações nas suas propriedades físicas, que dão origem a um potencial elétrico. Este tipo de detector é amplamente empregado, geralmente mais barato e apresenta resposta mais ampla frente ao espectro de infravermelho. Entretanto, o microbolômetro é menos sensível e mais lento para aquisição de imagens (VADIVAMBAL e JAYAS, 2011). Já os detectores quânticos permitem obter resposta mais rápida, sendo sua operação baseada na mudança do estado eletrônico dos elétrons em uma estrutura cristalina, que ocorre pela interação com a radiação incidente. Estes apresentam alta sensibilidade e resolução, sendo capazes de detectar diferenças menores que 0,1 °C, porém, para isso, é necessário resfriamento, tornando o dispositivo mais caro e de menor portabilidade (ROGALSKI, 2002).

As imagens termográficas podem ser obtidas, basicamente, por meio de dois tipos de termografia, passiva e ativa. A termografia passiva refere-se à radiação captada sem aplicação de nenhuma energia externa no objeto alvo. A informação obtida por meio desta permite descrever as propriedades térmicas da superfície, sendo usado amplamente para controle de qualidade e monitoramento de processos (BAGAVATHIAPPAN et al., 2013). Por outro lado, a termografia ativa necessita da aplicação de uma energia externa (p. ex., radiação eletromagnética, ultrassom), que promove um rápido aquecimento ou resfriamento da superfície antes da captura da imagem. Como a propagação da temperatura é dependente das propriedades térmicas do material, este tipo de termografia é empregada, principalmente, em testes não

destrutivos, para verificar contrastes relevantes de temperatura, possibilitando detectar anomalias em materiais, inclusive subsuperficiais (GOWEN et al., 2010; USAMENTIAGA et al., 2014).

As câmeras de infravermelho foram desenvolvidas, primeiramente, para uso militar dos Estados Unidos durante a Segunda Guerra Mundial (MEOLA E CARLOMAGNO, 2004). Contudo, devido ao seu aperfeiçoamento, principalmente com relação às ferramentas de informática associadas a imagens digitalizadas de alta resolução, a TI vem se mostrando uma ferramenta eficaz para diversas áreas, incluindo medicina, engenharia civil, artes, vigilância, farmácia, veterinária e agricultura (MEOLA e CARLOMAGNO, 2004; GOWEN et al., 2010; VADIVAMBAL e JAYAS, 2011; ROBERTO e SOUZA, 2004; RING e AMMER, 2012; MEOLA, 2007). A aplicação da TI na área de alimentos ainda é incipiente, mas tem se mostrado como uma excelente ferramenta no monitoramento da temperatura de alimentos durante o processo de secagem, tanto convencional quanto por micro-ondas (TRAFFANO-SCHIFFO et al., 2014.; CUCCURULLO et al., 2012; FITO, et al., 2004). Esta ferramenta também é utilizada na avaliação da qualidade de alimentos pós-colheita, pois permite detectar injúrias em frutas e vegetais (VARITH et al., 2003; VAN LINDEN et al., 2003). Além disso, a TI pode ser empregada na detecção de objetos estranhos (SENNI, et al., 2014), infestações por insetos (MANICKAVASAGAN et al., 2008) e contaminação microbológica em alimentos (HAHN, et al., 2006; STOLL et al., 2008). A TI também vem sendo útil na identificação de defeitos em embalagens (LIU e DIAS et al., 2002) e no controle de climatização durante o armazenamento (GEYER et al., 2004).

No ramo da química, mesmo que a maioria das reações apresentem relação com fenômenos térmicos, a técnica de TI ainda encontra-se muito pouco explorada. Dentre as limitadas aplicações reportadas na literatura, a maioria está relacionada com síntese, catálise química e termodinâmica (LOSKYLL et al., 2012; CHARBONNEAU e OGILVIE, 2005; TRAFFANO-SCHIFFO, et al., 2014). Mais recentemente alguns estudos mostraram que a aplicação da TI no monitoramento de análises entálpimétricas pode também ser uma ferramenta útil na química analítica, permitindo obter resultados quantitativos de maneira simples, rápida e com elevada frequência de análise

(ROMANO, et al., 2015; BARIN et al., 2015; COSTA et al., 2015). Portanto, a seguir são discutidos os métodos entalpimétricos clássicos e a nova proposta empregando TI, de forma a permitir a identificação das principais vantagens e limitações associadas a cada técnica.

### 2.3 ENTALPIMETRIA

O termo entalpia é definido como a energia liberada por reagentes quando os mesmos dão origem aos produtos, ou seja, a variação da entalpia está relacionada com a quantidade de calor produzida por uma reação química, (USBERCO e SALVADOR, 2006). A entalpimetria ou análise entalpimétrica pertence à uma subárea da calorimetria, tendo como ênfase a determinação da quantidade de uma espécie química envolvida na reação em determinado período de tempo (GRIME, 1981). Conforme a IUPAC a entalpimetria é definida como a designação genérica para uma família de métodos analíticos em que a variação de entalpia de uma reação química é medida, direta ou indiretamente, a fim de realizar uma determinação quantitativa de um reagente ou catalisador. A análise entalpimétrica pode ser realizada pelos seguintes procedimentos clássicos, titulação termométrica, entalpimetria por injeção direta (DIE - do inglês *direct injection enthalpimetry*) e entalpimetria por injeção de fluxo (GRIME, 1981) conforme mostra a Figura 1. A seguir, uma breve descrição dos métodos mais utilizados é efetuada.

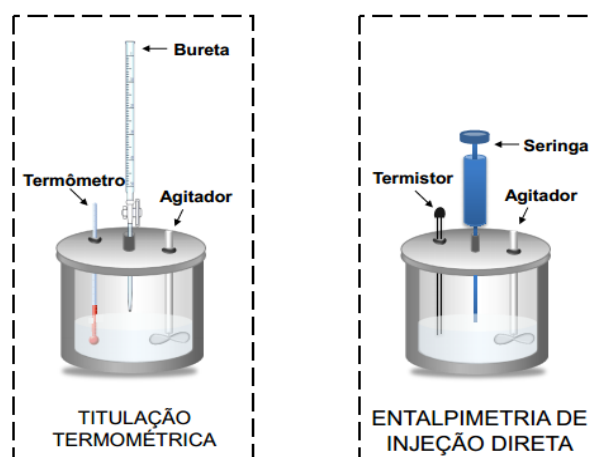


Figura 1. Ilustração dos principais métodos convencionais de análise entalpimétrica: A) titulação termométrica; B) Entalpimetria por injeção direta.

### 2.3.1 Métodos entalpimétricos clássicos

A titulação termométrica é um método analítico caracterizado pela adição contínua de um titulante sobre uma solução em condições adiabáticas. Deste modo, a variação da entalpia da reação resulta na mudança de temperatura da solução (positiva ou negativa), podendo indicar o ponto final da mesma. Este método é reconhecido por sua simplicidade, tendo como único pré-requisito a necessidade de que o reagente interaja instantaneamente com o analito e a estequiometria da reação seja conhecida (STAHL, 1994; GRIME, 1981).

A titulação termométrica foi a técnica entalpimétrica mais empregada até 1964, quando o método de entalpietria por injeção direta (DIE) foi introduzido, e diversos desenvolvimentos na instrumentação foram realizados a fim de aprimorar e difundir as análises entalpietricas (WASILEWSK et al., 1964). A DIE consiste na adição de um pequeno volume de um reagente em excesso estequiométrico na solução da amostra em um calorímetro. Deste modo, a variação da entalpia resultante da reação é medida e diretamente relacionada com a quantidade do analito (STAHL, 1994). Este método apresentava algumas limitações, como o uso de termômetros de mercúrio e falta de sensibilidade. Em 1953, Linde, Rogers e Hume implementaram o termistor como sensor de temperatura, o qual apresentava maior sensibilidade, capacidade calorífica desprezível e respostas mais rápidas. Deste modo, o método DIE tornou-se mais viável para análises quantitativas (WASILEWSKI et al., 1964).

Com o decorrer dos anos, surgiu a necessidade de desenvolvimento de análises mais rápidas e precisas, portanto a automação dos procedimentos analíticos mostrou ser uma alternativa adequada. Esse importante avanço na química analítica atingiu a análise entalpimétrica, sendo desenvolvida a entalpietria por injeção de fluxo, termo utilizado para descrever diversos métodos que consistem na adição da amostra em um fluxo de líquido contínuo com medida transiente da temperatura proveniente de uma reação química (STAHL, 1994). A entalpietria por injeção de fluxo é caracterizada por ser um processo simples, de baixo custo e com operação relativamente fácil, sendo proposta em 1965 (PRIESTLEY et al., 1965).

Essa evolução dos métodos entalpimétricos se deu a partir da necessidade em simplificar a instrumentação e aumentar a produtividade das análises para permitir o uso em problemas analíticos de rotina. O maior avanço ocorreu com o desenvolvimento de um sofisticado calorímetro adiabático, sendo o instrumento comercial mais utilizado o calorímetro isoperibol, o qual minimiza a troca de calor através do isolamento, permitindo assim a medição da mudança de temperatura de uma pequena transferência de calor a partir da célula reacional para o meio (GRIME, 1981). Embora os métodos entalpimétricos tenham passado por várias modificações e avanços, estes ainda não podem ser considerados alternativas adequadas para análises de rotina, pois apresentam uma frequência de análises baixa e elevado custo, fazendo com que os métodos entalpimétricos fossem caindo em desuso (GRIME, 1980; BARIN et al., 2015).

### **2.3.2 Entalpimetria no infravermelho térmico**

Uma nova abordagem para a DIE foi recentemente desenvolvida por Barin e colaboradores (2015), a qual foi denominada como entalpimetria no infravermelho térmico (TIE – do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*). A TIE é um método simples e rápido, que permite realizar o monitoramento não invasivo da temperatura de múltiplas reações, por meio da combinação de microplacas descartáveis e uma câmera de infravermelho, conforme mostrado na Figura 2. A execução da técnica TIE ocorre de modo que, com uso de uma pipeta multicanal, a amostra é primeiramente inserida na placa seguida pela injeção do reagente em excesso estequiométrico. Assim, o sinal analítico é obtido através da medida de temperatura antes e após a reação ocorrer.



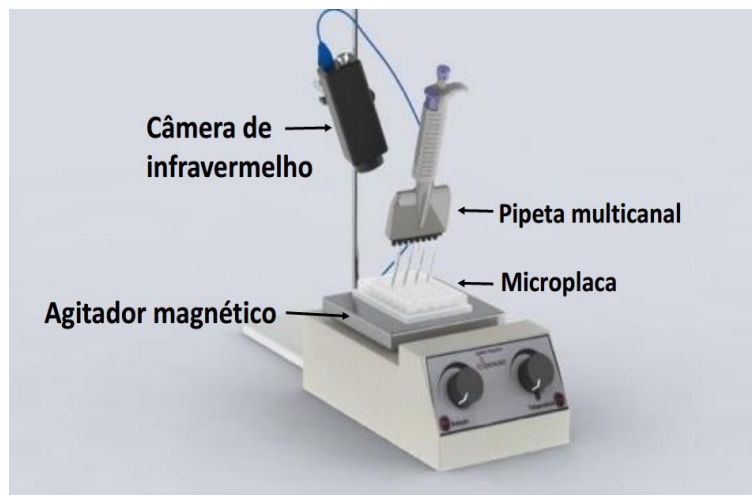


Figura 2. Arranjo experimental utilizado para análise por termografia no infravermelho (TIE).

O método proposto mostrou resultados promissores, podendo ser uma alternativa viável para reações de neutralização, precipitação, complexação e oxirredução, tendo em vista que os resultados obtidos apresentaram uma boa concordância com os métodos oficiais de titulação. De acordo com os autores, a TIE proporciona algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, como menor volume de reagentes e amostras e a possibilidade de uso de um maior número de replicatas, o que resulta em baixo desvio padrão. Os sinais analíticos podem ser obtidos rapidamente na TIE (cerca de 10 s) para várias amostras simultaneamente, pois é necessária uma única etapa de operação-injeção simultânea de reagente em excesso estequiométrico, possibilitando analisar um grande número de amostras por um curto período de tempo. Essa característica da TIE faz com que seja possível a análise de milhares de amostras em uma hora, sendo um método promissor para aplicação em rotina.

Apesar deste estudo preliminar já ter demonstrado que a TIE apresenta diversas características e benefícios importantes para a análise química, ainda se faz necessário superar alguns desafios, tornando este um método ainda mais aplicável para análises químicas. Considerando o volume total utilizado nas microplacas, este é significativamente menor do que o empregado pela titulação convencional, no entanto, como na TIE a medida de temperatura é apenas superficial, a redução do volume pode ser ainda maior, evitando desperdício de amostra e reduzindo a geração de resíduos.

Além disso, menores volumes podem facilitar etapas de pré-concentração, as quais são de extrema importância na quantificação de analitos em baixas concentrações. Outro importante aspecto que deve ser levado em consideração é a incompatibilidade do poliestireno das microplacas com determinados reagentes e sua difícil degradação no meio ambiente (BARIN et al., 2015; THERMO FISHER, 2015; GALUSZKA et al., 2013). Dessa forma, os dispositivos de papel podem ser considerados reatores promissores para uso na TIE e uma breve discussão acerca de suas principais características foi efetuada a seguir.

## 2.4 DISPOSITIVOS DE PAPEL

Nos últimos anos, a necessidade de efetuar as análises químicas de acordo com os conceitos modernos de consumo mínimo de reagentes, redução de custos e tempo de análise e melhora na portabilidade dos dispositivos analíticos tem aumentado significativamente (GALUSZKA et al., 2013). Nesse sentido, uma importante contribuição foi introduzida na literatura a partir do ano de 2007, através da utilização de dispositivos de análise fabricados em papel, primeiramente projetados com a finalidade de fornecer capacidade analítica de baixo custo para países em desenvolvimento. A Figura 3 apresenta alguns exemplos de dispositivos de papel (MARTINEZ et al., 2007).

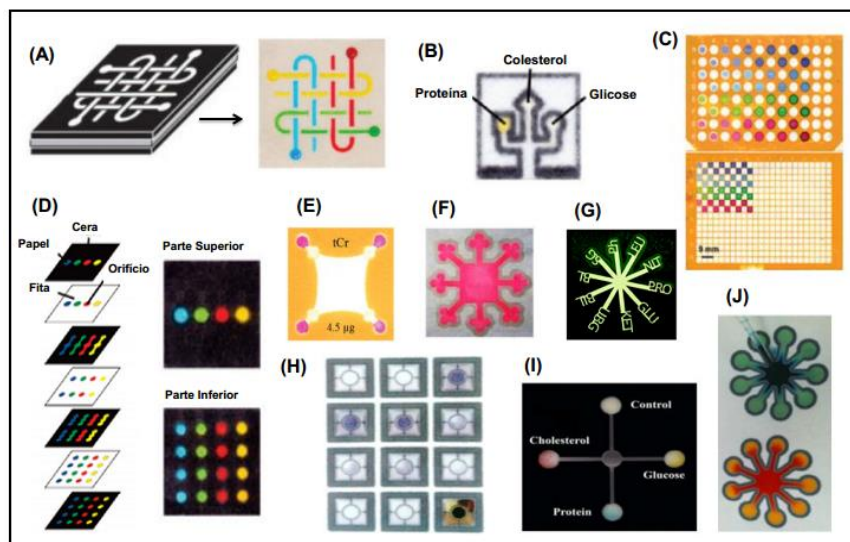


Figura 3. Exemplos de dispositivos de papel. A) Microfluídicos 3D; B) Impressão de cera para fluidos biológicos; C) Placas de papel com fotolitografia; D) Placa 3D com impressão de cera; E) Dispositivo para

detecção de metais cera; F) Cera de carimbo G) Impressão em jato de tinta H) Dispositivo para detecção de iodato; I) Dispositivo multizonas com impressão em toner; J) Dispositivo para ensaios clínicos fabricado por fotolitografia.

Estes dispositivos podem ser considerados uma tecnologia atrativa para inúmeras aplicações, principalmente por ser uma plataforma de análise simples, barata, fácil, portátil e descartável. A sua fabricação é baseada na padronização do papel com aplicação de barreiras hidrofóbicas sobre o papel hidrofílico, por meio de diferentes métodos (MARTINEZ et al., 2010). Dos suportes analíticos fabricados de papel, encontram-se basicamente os dispositivos microfluídicos à base de papel ( $\mu$ PADs – do inglês *microfluidic paper-based analytical device*) e as placas do tipo “ELISA” à base de papel. Os sistemas  $\mu$ PADs combinam algumas das capacidades dos dispositivos microfluídicos convencionais com a simplicidade dos diagnósticos por fita-teste. Estes são dispositivos portáteis com foco principalmente em ensaios biológicos, permitindo obter diagnósticos rápidos e com menor custo, sendo necessário apenas pequeno volume de fluido e pouco ou nenhum equipamento, uma vez que o movimento do líquido é controlado por capilaridade (MARTINEZ et al., 2010; COSTA et al., 2014).

Como uma alternativa mais barata para as placas convencionais de poliestireno utilizadas de testes ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immuno absorbent Assay*), foram também desenvolvidas as placas baseadas em papel. As microplacas convencionais requerem para cada ensaio uma quantidade relativamente grande de reagente e amostra, além do instrumento necessário para quantificação ser de alto custo (CHENG et al., 2010). Já as microplacas de papel oferecem sensibilidade e especificidade semelhante às microplacas do tipo ELISA, porém com o baixo custo e conveniência do papel (MARTINEZ, 2010). Sua fabricação ocorre a partir do depósito da barreira hidrofóbica no papel de modo que sejam formadas barreiras circulares, nas mesmas proporções dos poços das placas convencionais (CHENG et al, 2010).

As principais vantagens das microplacas de papel com relação àquelas poliméricas estão relacionadas com rapidez, praticidade, baixo custo dos ensaios, flexibilidade de *design*, pequenas quantidades de reagentes e amostras (podendo chegar a menos que 20  $\mu$ L no total) e menor impacto ambiental relacionado a produção

e descarte do dispositivo (CARRILHO et al., 2009b). Outro aspecto importante destes dispositivos é a elevada razão superfície-volume, o que facilita e acelera em até 20 vezes o processo de concentração por evaporação, resultando em melhores limites de detecção (MARTINEZ et al., 2010).

Em geral, plataformas de papel apresentam baixo custo, elevada biodegradabilidade e elevada razão superfície/volume. Além disso, permitem imobilizar o reagente de forma ativa entre as redes de fibra do papel, permitem o transporte espontâneo do fluido através dos poros do papel por meio da ação de capilaridade, e podem ser empregados tanto para ensaios hidrofílicos quanto hidrofóbicos (CATE et al., 2015). No entanto, esses dispositivos apresentam algumas limitações, pois estão suscetíveis às condições ambientais, que podem afetar negativamente os resultados. Por exemplo, a taxa de evaporação do solvente depende da umidade relativa e temperatura do ambiente (CHENG et al., 2010). O papel cromatográfico (Whatman No.1) é o mais amplamente empregado para fins analítico, uma vez que é produzida empregando celulose de elevada pureza, além de apresentar superfície lisa e homogênea que é produzida de maneira reprodutível, com biocompatibilidade e custo relativamente reduzido (MARTINEZ et al., 2011; CARRILHO et al., 2009a).

Por esta ser uma tecnologia atrativa para diversas aplicações, diferentes técnicas de fabricação de dispositivos de papel estão sendo propostas na literatura, entre elas a fotolitografia, impressão com cera, serigrafia, impressão à laser, tratamento com plasma, corte à laser e plotagem mecânica (MARTINEZ, et al., 2010; CATE, et al., 2015). A fabricação dos dispositivos em substrato de papel se baseia na necessidade da aplicação de uma barreira hidrofóbica sobre o papel hidrofílico (COSTA et al., 2014). Os primeiros dispositivos microfluídicos de papel foram desenvolvidos utilizando o método de fotolitografia, o qual consiste em utilização de uma fotoresina hidrofóbica e luz ultravioleta para a construção das barreiras necessárias no papel. Este método apresenta algumas desvantagens como grande uso de solventes, equipamentos de alto custo e etapas complicadas na fabricação (SONGJAROEN et al., 2011).

Uma das tecnologias consideradas mais promissoras em termos de custo e facilidade de implementação é a impressão com jato de cera, onde primeiramente

ocorre a impressão da cera sólida sobre a superfície do papel, seguida do aquecimento em placa de aquecimento ou estufa, causando o derretimento da cera com difusão vertical entre os poros do papel, originando a uma barreira hidrofóbica completa (CARRILHO et al., 2009b; SONGJAROEN et al., 2011). Esta é uma técnica barata, simples, capaz de preservar o material, não utiliza solventes tóxicos, envolve poucas etapas de preparo e permite produzir um volume grande de dispositivos em um único lote. No entanto, é difícil produzir padrões exatos de desenhos com alta resolução, devido ao espalhamento da cera. Além disso, esta pode apresentar baixa reprodutibilidade no processo de fabricação (CARRILHO, 2009b; SONGJAROEN, et al., 2011).

Métodos ópticos e eletroquímicos são os mais utilizados para detecção em dispositivos de papel, pois estes permitem manter a simplicidade e portabilidade dos sistemas. Os detectores eletroquímicos são bastante empregados devido sua sensibilidade, portabilidade e baixo custo, porém sua aplicação é limitada uma vez que não permite a detecção de todas as substâncias em amostras complexas (RATTANARAT et al., 2014). Assim, o método colorimétrico vem sendo o mais comumente empregado, sendo simples, barato e rápido. A detecção está baseada na intensidade de cor causada por determinada reação química entre o analito e o reagente, utilizando scanners, câmeras fotográficas e celulares para determinação, o que possibilita a realização das análises fora do ambiente de laboratório (COLTRO et al., 2014). No entanto, os ensaios colorimétricos apresentam desvantagens, como a heterogeneidade na distribuição da coloração na zona de detecção do papel e susceptibilidade as variações na iluminação ambiente e qualidade da imagem dos equipamentos de leitura, dificultando a avaliação correta dos resultados (NERY e KUBOTA, 2013; ABE et al., 2008).

Ambos os sistemas de detecção, colorimétrico e eletroquímico, apresentam suas aplicações direcionadas principalmente para aplicações bioanalíticas, a fim de adquirir diagnósticos mais rápidos para diferentes doenças. Porém, o uso principalmente das microplacas não está limitado apenas a estas aplicações. Existem alguns estudos com o emprego destes dispositivos para outros fins, como no controle de qualidade na

detecção de metais (SALMAN et al., 2012; RATTANARAT et al., 2014), bactérias patogênicas de origem alimentar (JOKERST et al., 2012), na determinação de compostos bioativos em plantas (VAHER et al., 2014) e polifenóis e flavonóides em vinhos (VAHER e KALJURAND, 2012). Sendo assim, devido às diversas características positivas que estes dispositivos podem fornecer, sobretudo por se encaixarem nos novos princípios da química verde, torna-se importante realização de mais estudos envolvendo novos princípios de detecção e aplicações na área de alimentos.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAS E REAGENTES**

As amostras de refrigerantes de laranja e limão bem como os vinhos, tinto, branco e espumante, de três marcas diferentes foram obtidas no mercado local. Na determinação de acidez em refrigerante, para construção da curva foi utilizado ácido cítrico e sacarose (Synth, Brasil). Já para a construção da curva de calibração para determinação da acidez de vinhos a solução de referência utilizada foi ácido tartárico (Vetec, Brasil). Em ambos os casos, hidróxido de sódio (Dinâmica Brasil) foi utilizado como reagente em excesso. A padronização do ácido tartárico foi feita utilizando ácido oxálico (Vetec, Brasil) e o hidróxido de sódio com biftalato de potássio (Vetec, Brasil) . Para o preparo de todas as soluções foi utilizado água destilada. Na fabricação das placas foi utilizado papel filtro qualitativo (60 × 60 cm, 14 µm de porosidade, gramatura 80 g/m<sup>2</sup>, J. Prolab, Brasil), papel cromatográfico Whatman (No.1, 20 × 20 cm ) e bastão de cera preta (Xerox, EUA) para impressão.

#### **3.2 INSTRUMENTAÇÃO**

Para o monitoramento de temperatura para TIE foi utilizada uma câmera de infravermelho (8,5 - 13,0 µm, modelo FLIR E60, FLIR, Wilsonville, EUA), que fornece

imagens com 320 × 240 pixels a uma taxa de aquisição de imagens de 30 Hz. As imagens foram registradas e processadas com uso do software ResearchIR (FLIR). Na fabricação das microplacas de papel foi utilizado uma impressora com jato de cera sólida (ColorQube, 8870, Xerox, EUA), e estufa (MA 033/100, Marconi, Brasil). Uma pipeta eletrônica multicanal (8 canais, 15 a 300 µL, Xplorer, Eppendorf, Alemanha) foi utilizada para adição dos reagentes e um agitador tipo vórtex (MS-X, Scilogex, EUA) foi empregado para homogeneização durante a reação por TIE. Para a descarbonatação das amostras de refrigerante e vinho espumante foi empregado um banho ultrassônico (25 a 45 kHz, TI-H-5, Elma, Alemanha). Para determinação de acidez total em vinho pelo método tradicional foi utilizado um potenciômetro com eletrodo de vidro combinado (DM-22, Digimed, Brasil) e para acidez fixa um banho ultra termostático (SL 152/10, Solab, Brasil) para volatilização da amostra. Para medir o consumo de energia foi utilizado um medidor de energia (43B, Fluke, EUA). As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc, EUA).

### 3.3 ANÁLISE DE ACIDEZ POR TÉCNICAS CONVENCIONAIS

#### 3.3.1 Determinação de acidez em refrigerante

Para as análises de acidez total de refrigerantes foram utilizadas amostras do sabor laranja e limão, de três marcas diferentes cada. As amostras foram previamente descarbonatadas em banho de ultrassom por 30 min a 25 kHz. A determinação de acidez foi feita por meio de titulação com hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> padronizado e fenolftaleína como indicador. Foram utilizados 5 mL de amostra e 50 mL de água destilada (IAL, 2004). As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em ácido cítrico (g/100 mL).

#### 3.3.2 Determinação de acidez em vinhos

As análises foram feitas com amostras de vinho branco, tinto e espumante, sendo cada uma de três marcas diferentes. Os vinhos tintos e brancos foram todos de mesa e seco, enquanto que os espumantes foram do tipo Brut. As amostras de espumante foram descarbonatadas em banho de ultrassom por 15 min a 25 kHz. A determinação de acidez total de vinho foi realizada com titulação potenciométrica utilizando hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  padronizado e 10 mL de amostra com 50 mL de água. A titulação foi realizada até atingir o pH de 8,2 (IAL, 2004).

Para a determinação de acidez fixa, foi adicionado 10 mL de cada amostra em cápsulas de porcelana seguido de aquecimento em banho-maria a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  para evaporação. O procedimento foi repetido três vezes com diferentes alíquotas das amostras, perfazendo um volume total de 30 mL de amostra. Posteriormente, o concentrado restante foi diluído em 50 mL de água destilada e submetido à titulação potenciométrica, sob mesmo procedimento descrito no item anterior (IAL, 2004). Todas as análises foram feitas em triplicatas e os resultados expressos em ácido tartárico (mEq/L). A acidez volátil foi obtida por diferença entre acidez total e fixa e foi expressa em ácido acético (mEq/L).

### 3.4 ANÁLISES DE ACIDEZ POR ENTALPIENTRIA NO INFRAVERMELHO TÉRMICO

#### 3.4.1 Fabricação das microplacas de papel

As placas foram configuradas sob as mesmas medidas das microplacas de poliestireno empregadas na TIE (24 poços, com 1,6 cm de diâmetro em cada poço). As placas foram projetadas para uma configuração de microplaca negativa, ou seja, as zonas de ensaio formam delimitadas com cera por toda a área do papel. Utilizando uma impressora de cera a imagem da placa foi impressa diretamente em uma folha papel filtro e, posteriormente, o papel impresso foi submetido ao aquecimento em estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, conforme mostrado na Figura 4. Para a realização das análises, as placas foram posicionadas sobre uma caixa de plástico, de mesmo tamanho que as placas, de maneira a evitar o contato direto da região analítica com a superfície da bancada.



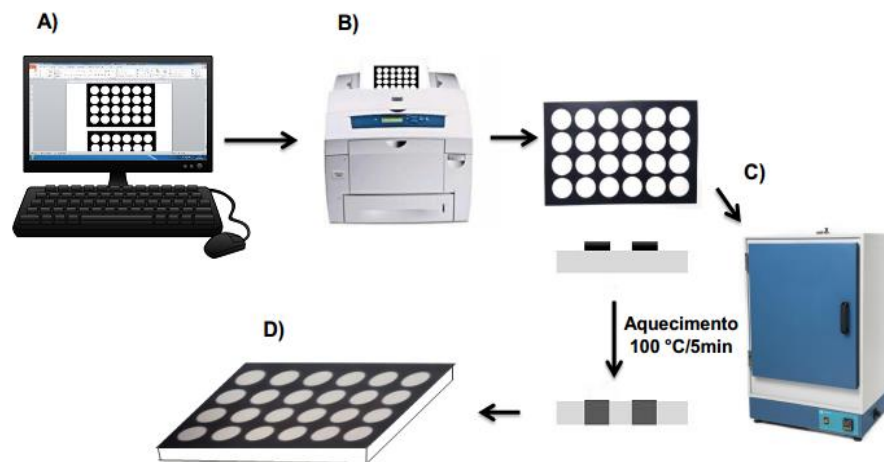


Figura 4. Representação esquemática da fabricação das microplacas de papel. A) Desenho do *layout* da placa; B) Impressão das placas; C) Derretimento da cera; D) Microplacas finalizadas e posicionadas sobre um suporte.

### 3.4.2 Otimização das condições experimentais

Para realização das análises por TIE em dispositivos de papel foram realizadas otimizações prévias com relação à pipetagem, como volume de reagente e velocidade de dispensação. Foram avaliados volumes entre 30 e 70  $\mu\text{L}$  e velocidades de dispensação entre 40 e 400  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Para avaliação dessas condições foi utilizado solução de ácido cítrico 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e hidróxido de sódio 2 mol  $\text{L}^{-1}$  como excesso. Além disso foi avaliada a influência da agitação, realizando a análise com e sem o uso de agitador tipo vórtex.

Posteriormente, avaliou-se a influência do tamanho da elipse na medida de temperatura da zona de detecção, em que foram verificados 61, 97, 129, 177, 221, 277, 349 pixels.

Todos os resultados foram avaliados com base no desvio padrão relativo obtido.

### 3.4.3 Determinação de acidez das bebidas

A determinação de acidez para ambas as amostras, refrigerante e vinho por TIE foi realizada empregando uma câmera infravermelho para o monitoramento da

temperatura. Em todas as determinações, a câmera foi posicionada a uma distância de 40 cm da placa, com auxílio de um tripé (Figura 5). A temperatura foi corrigida para temperatura ambiente, umidade relativa e emissividade (foi usado o valor de 0,95) como recomendado pelo fabricante da câmera.

A curva de calibração para as análises de refrigerante foi feita utilizando soluções de referência de ácido cítrico em concentração entre 0,03 e 0,20 mol L<sup>-1</sup> (n=24). A fim de eliminar a interferência da matriz, cuja composição apresenta em torno de 10% de açúcar, todas as soluções de referência foram preparadas contendo 10% de sacarose. Para análise de acidez em vinho a curva foi construída com soluções de referência de concentração entre 0,025 e 0,45 mol L<sup>-1</sup> de ácido tartárico (n=24).

Para determinação de acidez fixa em vinho, foram avaliadas diferentes temperaturas de evaporação (60, 70, 80, 90, 100 °C), sendo que 80 °C foi a temperatura mais adequada e escolhida para evaporação das amostras. Foi pipetado 50 µL de cada amostra na microplaca e submetida à evaporação em estufa à 80 °C por 10 min. Esse procedimento foi realizado três vezes, totalizando 150 µL. As placas contendo as amostras foram colocadas em dessecador até a realização da análise. Antes da determinação as amostras foram resuspendidas com 50 µL de água destilada.

Para ambas as amostras, tanto na determinação de acidez total quanto fixa as análises por TIE foram feitas empregando uma pipeta eletrônica multicanal, com velocidade de dispensação 200 µL s<sup>-1</sup> para os quatro canais utilizados. Primeiramente, 50 µL das amostras foram pipetadas diretamente sobre a placa seguido pela adição de 50 µL de hidróxido de sódio 2 mol L<sup>-1</sup>, seguido por agitação em vórtex por 2 s, em velocidade mínima, para melhorar a distribuição e homogeneização dos reagentes. Para realização do branco, ao invés da amostra, foi pipetada água destilada. A Figura 5 representa um esquema de análise pelo método proposto.



Figura 5. Arranjo experimental utilizado para análise por TIE empregando dispositivo de papel.

A temperatura de reação foi monitorada antes, durante e após a injeção do reagente em excesso. Por meio de um software foi efetuado a medida de temperatura nos 24 poços da placa. Uma circunferência com 180 pixels foi empregada para determinação da temperatura em cada poço. Foi utilizada a média da temperatura de 2 s antes e após adição do hidróxido de sódio, assim, a diferença de temperatura ( $\Delta T$ ) foi obtida através da equação  $\Delta T = T_f - T_i$ , onde  $T_f$  é a temperatura final e  $T_i$  temperatura inicial. A concentração do analito foi obtida através equação obtida da curva de calibração.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui demonstrados foram divididos em três partes para melhor compreensão. Primeiramente, são mostrados e discutidos os resultados acerca da etapa de ajuste das condições experimentais, seguido dos resultados da determinação de acidez em refrigerantes e vinhos, respectivamente. Por fim, uma comparação da TIE com o método convencional de titulação foi efetuada, de forma a permitir identificar as principais vantagens associadas ao método proposto.

#### 4.1 AJUSTE DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

O sistema foi adequado, primeiramente, com relação ao tipo de papel, condições de pipetagem e de medida de temperatura, com objetivo de reduzir os desvios das medidas antes de efetuar as análises das amostras de refrigerantes e de vinhos.

Assim, com a finalidade de avaliar a performance do papel a ser utilizado como reator foram avaliados os papéis cromatográfico (Whatman) e filtro, empregando solução padrão de ácido cítrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$ . Foi observado que o desvio padrão relativo (RSD) foi similar entre os papéis, com 0,57 e 0,72% para o papel filtro e Whatman, respectivamente. Os brancos analíticos também forneceram resultados similares e, deste modo, considerando o baixo custo e a boa precisão das medidas demonstrada pelo uso do papel filtro, este foi utilizado para as demais análises realizadas no presente trabalho. Cabe ressaltar que o custo do papel filtro é bastante inferior ao papel cromatográfico, o que torna o procedimento proposto ainda mais atraente para análises em rotina.

Além da escolha do papel, também foi avaliada a necessidade de homogeneização nas medições, efetuando-se as determinações com e sem agitação. Sendo assim, foi observado que a aplicação de agitação através de um agitador tipo vórtex após a injeção do reagente em excesso reduziu os desvios, de 1,65 para 0,78%. Portanto o uso do agitador permitiu melhorar significativamente a repetitividade, uma vez que este promove uma melhor mistura das soluções. Portanto, todas as análises subsequentes foram realizadas com agitação com vórtex.

Outro parâmetro avaliado foi o tempo de injeção do reagente em excesso. Quando a amostra é adicionada ao papel, devido ao baixo volume injetado e a elevada área superficial, ocorre uma queda de temperatura até que esta seja estabilizada, o que possivelmente tenha sido causado pela evaporação do solvente. Deste modo, após, foi padronizado o tempo de adição do reagente em excesso após 40 s da adição da amostra no dispositivo de papel, pois verificou-se que este seria um tempo suficiente para a execução do ensaio e para o sinal analítico se manter estável, conforme mostrado a figura 6.

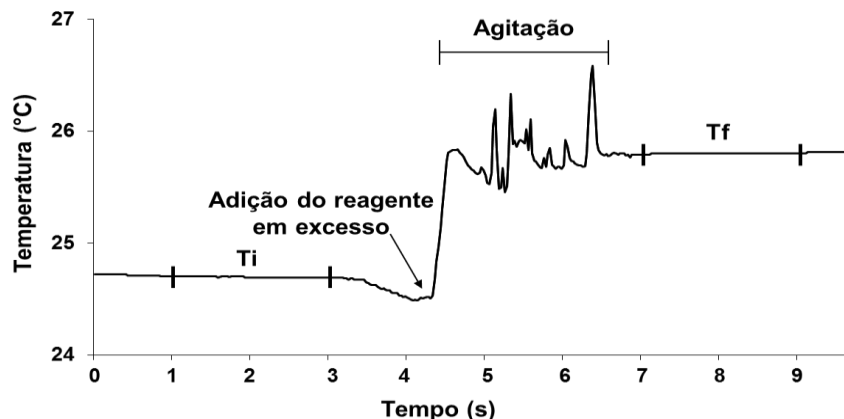


Figure 6. Sinal analítico obtido da reação de neutralização, sendo  $T_i$  a temperatura inicial e  $T_f$  a temperatura final.

Com relação à otimização das condições de pipetagem, foram avaliados diferentes volumes (30 - 70  $\mu\text{L}$ ) e velocidades de dispensação (40 - 400  $\mu\text{L s}^{-1}$ ). Como mostrado na Figura 7, foi possível verificar que as melhores condições avaliadas foram 50  $\mu\text{L}$  de volume e velocidade de dispensação de 200  $\mu\text{L s}^{-1}$ , uma vez que estes apresentaram menores desvios entre as medidas. Com a otimização foi possível observar que volumes muito baixos, como 30 e 40  $\mu\text{L}$  não preenchem completamente a zona de detecção, gerando resultados com desvios elevados. Por outro lado, o uso de volumes mais elevados também não foram adequados, devido à sobrecarga de solução nas zonas analíticas, que levou ao extravasamento de líquido através da placa. Portanto, o volume escolhido foi 50  $\mu\text{L}$ , pois apresentou RSD menor e uma mistura adequada dos reagentes.

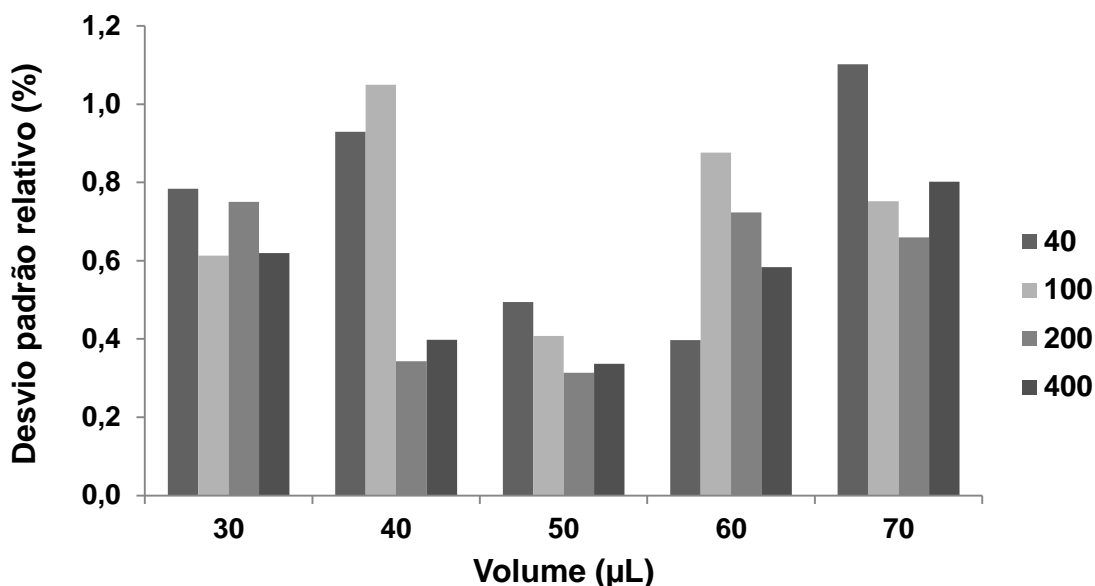


Figura 7. Resultados obtidos da otimização do volume e velocidade de dispensação (em  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) para determinação de acidez por TIE ( $n=24$ ). Reações realizadas com solução de referência de ácido cítrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$  como excesso.

Com relação à velocidade de dispensação, foi observado que a velocidade 6, a qual corresponde a  $200 \mu\text{L s}^{-1}$ , apresentou menor variação nos resultados, pois mostrou distribuição adequada das soluções na zona analítica. Considerando que as microplacas de papel são sistemas expostos ao ambiente e que as reações ocorrem instantaneamente com a adição do reagente em excesso, quando foram empregadas velocidades muito baixas de dispensação pode ter ocorrido perda de calor para o ambiente e uma homogeneização ineficiente. Por outro lado, velocidades muito elevadas, como aquela de  $400 \mu\text{L s}^{-1}$ , resultaram na projeção de líquidos para fora da zona de detecção e maiores desvios.

Além das condições de pipetagem, os parâmetros utilizados na TI podem ter influência nos resultados e, assim, foi avaliado o efeito das condições de medida de temperatura, como número de pixels utilizados e o efeito do número de repetições conforme mostrado na Figura 8 e 9. Deste modo, verificou-se em ambos parâmetros influência sobre os desvios das medições. Até 129 px, o RSD pode ser considerado baixo, mas a partir daí foi observado que quanto maior for o número de pixels utilizado, maior será o RSD. Isso ocorre porque uma vez que a solução começa a atingir a região

mais próxima à borda da zona analítica, ocorre contato com a cera e a dissipação de calor nessa região é maior, levando a maiores variações de temperatura. Deste modo, com base nos desvios obtidos não foi observado diferença significativa entre a medida de 61 e 97 px com RSD de 0,63 e 0,58%, respectivamente. No entanto, a área correspondente à 97 px pode ser considerada mais adequada por ser mais representativa, sendo utilizada nos experimentos subsequentes.

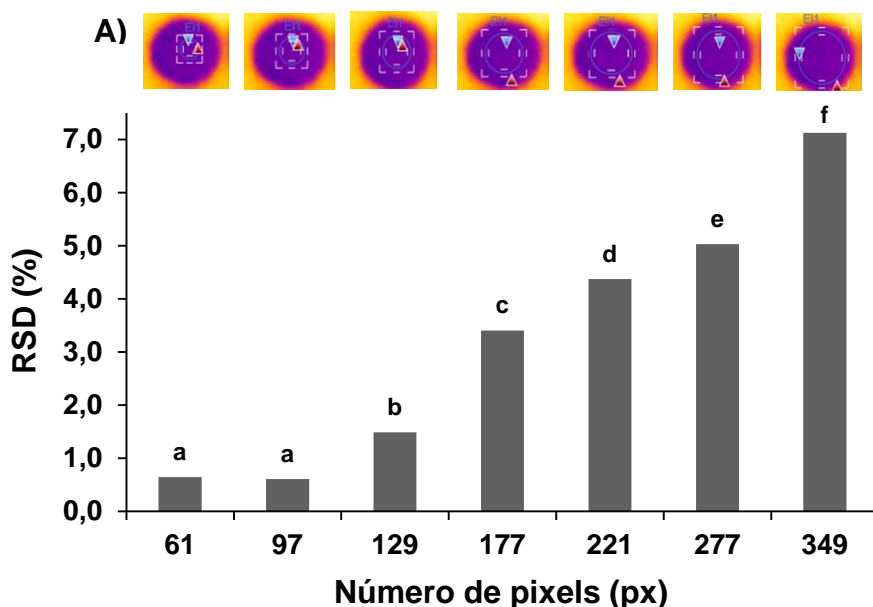


Figura 8. Avaliação do número de pixels utilizados na medida de temperatura. A) Imagem termométrica da área selecionada para avaliar a temperatura. Letras iguais indicam que não existe diferença significativa (Teste Tukey,  $p > 0,05$ ). Reações realizadas com solução de referência de ácido cítrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$  como excesso.

A partir da avaliação do número de replicatas, foi observado que ocorre uma redução significativa no RSD com o aumento do número de repetições (Figura 9). Para  $n=4$  o RSD foi de 1,19%, enquanto que para  $n=24$ , o RSD foi de 0,78%. Cabe ressaltar que essa diminuição no RSD pelo aumento do número de repetições era esperada, uma vez que essa diminuição segue uma relação proporcional à raiz quadrada de  $n$ . Sendo assim, devido a facilidade da realização de replicatas na TIE em dispositivos de papel, isso pode ser considerada uma vantagem frente ao método convencional, em que a dificuldade experimental faz com que as medidas sejam realizadas, normalmente, em triplicata.

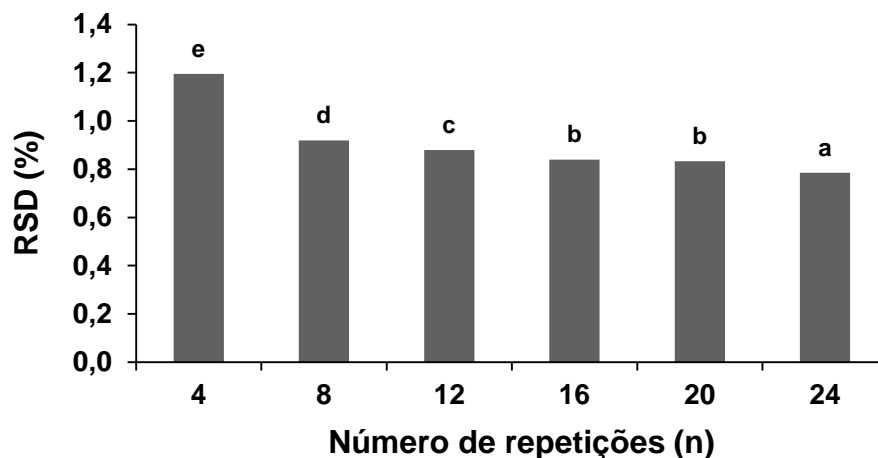


Figura 9. Avaliação do número de pixels utilizados na medida de temperatura. Letras iguais indicam que não existe diferença significativa (Teste Tukey,  $p > 0,05$ ). Reações realizadas com solução de referência de ácido cítrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$  como excesso.

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM REFRIGERANTE

A curva de calibração para a quantificação de acidez em refrigerante foi construída com soluções de referência de ácido cítrico em concentrações que variaram entre  $0,03$  e  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme mostrado na Figura 10. Primeiramente, a curva foi construída apenas com ácido cítrico, no entanto, esta não se adequou para a avaliação das amostras, pois os resultados mostraram-se insatisfatórios para quantificação. Devido ao refrigerante apresentar elevado teor de açúcar (em torno de 10%), foi construída uma curva de ácido cítrico em sacarose na mesma concentração de açúcar da bebida, a fim de simular a amostra e verificar possível interferência do açúcar. Deste modo, foi observado um aumento na temperatura da curva com adição de sacarose, com um incremento de aproximadamente  $0,65 \text{ }^\circ\text{C}$ . O aumento da temperatura na curva construída com sacarose pode ser explicado devido a reação exotérmica entre o açúcar e NaOH. Conforme Yang e Montgomery (2007), a sacarose em meio ácido pode sofrer o processo de inversão, dando origem a glicose e frutose, e estes monossacarídeos quando em contato com soluções alcalinas, como hidróxido de sódio, são degradados através de uma reação de redução, a qual resulta na liberação de calor. Deste modo, as análises de acidez foram realizadas através da curva com adição de sacarose,



simulando nas soluções de referência a composição majoritária da amostra. Ainda com relação à Figura 10, cabe ressaltar que a inclinação das curvas de calibração foram muito similares, indicando que o efeito de matriz não interfere na linearidade das mesmas, permitindo a quantificação da acidez da bebida.

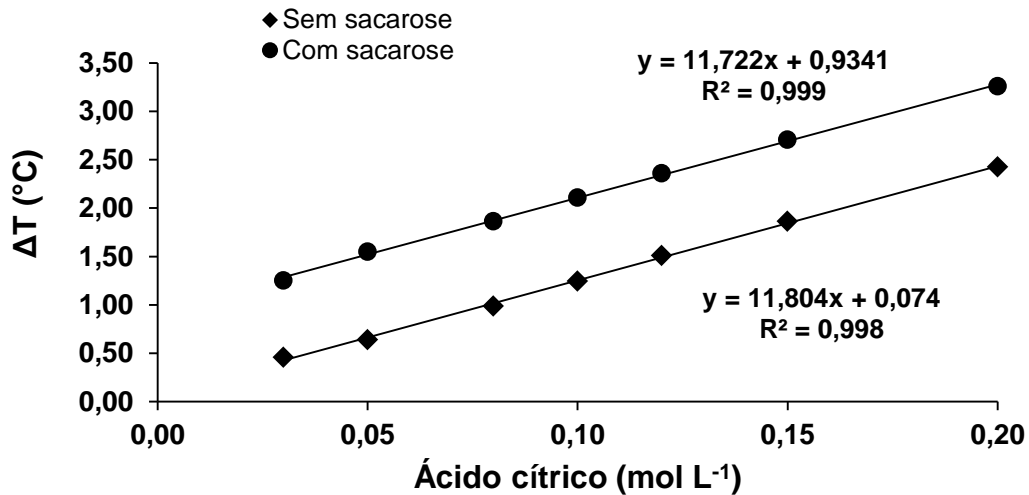


Figura 10. Curvas de calibração obtidas com solução de ácido cítrico, com e sem adição de sacarose (10% m/v) e NaOH 2 mol  $\text{L}^{-1}$  como excesso.

Como mostrado na Tabela 1, os resultados obtidos na determinação da acidez em refrigerante através do método proposto neste estudo apresentaram similaridade com o método convencional, com concordâncias entre 99 e 104%, sem apresentar diferença significativa entre as médias (Teste t de *Student*,  $p > 0,05$ ). Nenhuma etapa de pré-tratamento (p. ex., diluição) foi necessária, permitindo a realização da análise diretamente na amostra. A legislação brasileira determina que o refrigerante de limão e laranja deva apresentar no mínimo 0,125 e 0,100 g de ácido cítrico por 100 mL de bebida, respectivamente. Portanto, todas as amostras avaliadas encontram-se de acordo com a legislação (MAPA, 1998).

Tabela 1. Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) de acidez total para diferentes refrigerantes obtidos por TIE (n=24) e titulação (n=3).

Amostras		Acidez total (g/100 mL ácido cítrico)	
		Convencional	TIE
Limão	1	0,236 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>	0,238 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>
	2	0,242 $\pm$ 0,073 <sup>a</sup>	0,245 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>
	3	0,161 $\pm$ 0,080 <sup>a</sup>	0,162 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>
Laranja	1	0,194 $\pm$ 0,052 <sup>a</sup>	0,197 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>
	2	0,178 $\pm$ 0,051 <sup>a</sup>	0,177 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>
	3	0,287 $\pm$ 0,042 <sup>a</sup>	0,289 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>

\* Letras iguais na mesma linha significam que não houve diferença significativa (Teste t de *Student*,  $p > 0,05$ )

É importante destacar que todas as medidas de acidez obtidas através do método proposto apresentaram desvios menores comparados ao método convencional de titulação. Isso se deve, possivelmente, ao maior número de replicatas (n=24) empregado neste método e à simplificação e redução das etapas de análise, o que pode implicar na redução de erros do analista. Isso pode ser considerado um resultado importante, uma vez que os desvios entre as medições são parâmetros que contribuem fortemente para a incerteza dos resultados. Essa incerteza pode ser decisiva na tomada de decisões em processos produtivos, pois se o parâmetro avaliado estiver próximo ao limite permitido pela legislação, quanto menor for a incerteza associada à análise, maior será a segurança das ações a serem tomadas para corrigir/padronizar o produto.

Cabe destacar, também, que os desvios entre as medidas empregando dispositivos de papel foram ainda menores que a TIE executada em microplacas (com RSD que varia de 0,5 a 2,0%). Como a imagem termográfica retrata a temperatura da superfície do objeto em estudo, o uso dos dispositivos de papel permitiu a obtenção de uma melhor relação área superficial/volume, o que pode explicar essa diferença nos desvios observada em relação à TIE em microplacas. Além disso, no arranjo experimental aqui proposto, a solução contida no papel entra em contato somente com o ar atmosférico, ao contrário das microplacas, o que pode ter permitido uma menor

perda de calor durante a reação e a obtenção de maiores variações de temperatura. Por fim, por utilizar volumes cerca de 20 vezes menor, a TIE em dispositivos de papel pode ser efetuada de maneira mais rápida, com velocidades de dispensação e tempos de homogeneização menores, permitindo a obtenção de maiores variações de temperatura.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM VINHOS

Para a determinação da acidez em vinhos, a curva de calibração foi construída com soluções de referência de ácido tartárico em concentrações de 0,025 a 0,175 mol L<sup>-1</sup>, conforme mostrado na Figura 11. Foi observada uma boa linearidade na curva, com um aumento da temperatura proporcional ao aumento da concentração de ácido, além disso, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtido foi adequado.

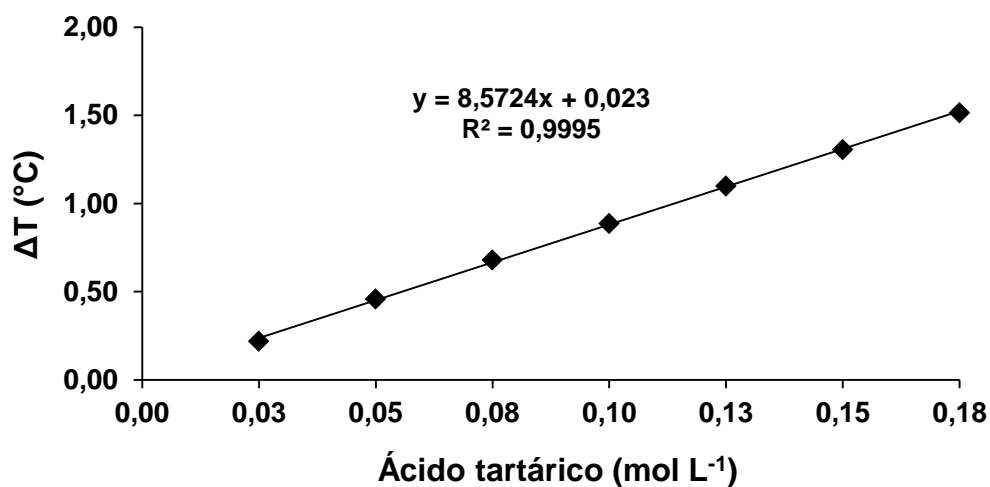


Figura 11. Curva de calibração obtida com soluções de referência de ácido tartárico (n=24) e NaOH 2 mol L<sup>-1</sup> como excesso.

Para a determinação da acidez fixa, em que a amostra foi concentrada por três vezes, foram avaliadas diferentes temperaturas, 60, 70, 80, 90 e 100 °C. Foi observada uma redução no tempo de secagem com aumento da variação de temperatura, com um tempo total de 50, 42, 30, 26 e 20 min, respectivamente, para as três etapas de concentração. No entanto, as temperaturas de 90 e 100 °C não se mostraram adequadas, pois temperaturas muito elevadas provocaram a deformação do suporte

plástico da placa e conseqüentemente do papel, prejudicando as medidas de temperatura. Desta forma, a temperatura escolhida para concentração das amostras foi de 80 °C. Assim, cabe ressaltar que a determinação da acidez fixa através do método TIE em dispositivos de papel possibilitou uma redução de 5 vezes no tempo de concentração, pois o método convencional dispendeu cerca de 150 min. Além disso, a secagem em estufa possibilitou a concentração simultânea de um número muito maior de amostras comparado ao banho, o que aumenta ainda mais a frequência de análises.

Na Figura 12 é mostrado que o número de etapas de concentração da amostra no papel apresenta um resultado linear de temperatura, indicando que para amostras com baixa acidez o procedimento pode ser aplicado aumentando-se o número de concentrações. Para a determinação da acidez fixa em que a amostra foi concentrada 3 vezes, esta etapa se mostrou uma ferramenta eficaz, permitindo a evaporação de maneira rápida da amostra. Como pode ser observado, a amostra pode ser concentrada mais vezes em papel, sem ocorrer perdas de analito no processo, uma vez que até 7 concentrações a amostra mostrou sinal proporcional de aumento da temperatura. Isso demonstra que por meio do processo de concentração, este sistema permite realizar a determinação quantitativa de analitos presentes em quantidades muito baixas.

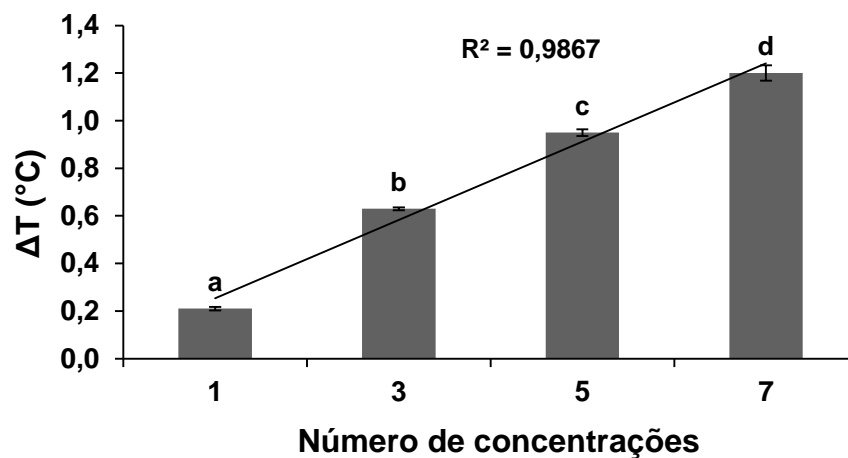


Figura 12. Avaliação da temperatura obtida em diferentes ciclos de concentração da amostra, visando a determinação da acidez fixa para amostra de vinho tinto.

Após a verificação da possibilidade de concentração das amostras de vinho nos dispositivos de papel, a determinação de acidez total, fixa e volátil foi efetuada. Para os três diferentes tipos de vinhos avaliados, pode-se observar boa concordância entre os métodos (entre 97 a 101% para acidez total, 100 a 104% para acidez fixa e 96 a 103% para acidez volátil), não havendo diferença significativa entre os valores obtidos por TIE e titulação convencional. Apesar dos diferentes vinhos analisados (branco, tinto e espumante) apresentarem diferença na sua composição, isso não interferiu no desempenho da análise, que apresentou resultados satisfatórios para todas as amostras, indicando, assim, que o método apresenta uma boa robustez. Conforme a legislação brasileira os vinho de mesa devem apresentar acidez total entre 55 e 130 mEq/L e acidez volátil de no máximo 20 mEq/L. Portanto, considerando estes valores, todas as amostras analisadas encontram-se de acordo com a legislação.

Para todas as amostras avaliadas foi observado uma redução nos desvios através do método TIE, indicando uma melhor precisão nos resultados obtidos. Cabe ressaltar que no caso da acidez fixa esta redução foi ainda mais relevante, perfazendo uma redução de cerca de uma ordem de magnitude. Isso se deve, principalmente, pelo fato de que o método proposto permite realizar as etapas de evaporação e determinação em um mesmo recipiente, sendo menos suscetível a erros e perdas de analito, ao contrário do método convencional, cujas etapas são executadas em diferentes recipientes. Além disso, da mesma maneira que para a acidez em

refrigerantes, os menores desvios também estão relacionados ao maior número de replicatas realizadas, ao menor tempo de dispensação e homogeneização assim como a boa razão superfície/volume dos dispositivos de papel.

Tabela 2. Resultados (média  $\pm$  desvio-padrão) de acidez total, fixa e volátil obtida de diferentes vinhos obtida por TIE (n=24) e titulação (n=3).

Tipo de vinho		Acidez total (mEq/L)		Acidez fixa (mEq/L)		Acidez volátil (mEq/L)	
		CONV	TIE	CONV	TIE	CONV	TIE
		Tinto	1	86,00 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	85,33 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	74,01 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	73,36 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	2	94,11 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	93,72 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	78,97 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	78,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	15,14 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	15,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	3	98,90 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	99,01 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	80,60 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	80,00 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	18,30 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	19,01 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Branco	1	70,33 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	70,80 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	54,03 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	54,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	16,30 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	16,78 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	2	90,03 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	89,33 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	70,67 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	70,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	19,37 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	18,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	3	86,94 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	86,54 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	77,53 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	77,00 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	9,41 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	9,55 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Espumante	1	85,00 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	85,20 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	72,00 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	72,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	13,00 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	12,53 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	2	68,67 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	68,32 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	54,67 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	54,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	14,00 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	13,65 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	3	80,93 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	80,40 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	68,00 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	67,27 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	12,93 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	13,13 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

\*Letras iguais na mesma linha significam que não houve diferença significativa (Teste t de *Student*,  $p > 0,05$ ).

#### 4.4 PARÂMETROS DE MÉRITO DA TIE EM DISPOSITIVOS DE PAPEL

A Tabela 3 apresenta uma comparação dos parâmetros de mérito de três métodos diferentes para determinação da acidez, TIE convencional (realizada em microplacas de poliestireno), TIE em dispositivos de papel e titulação convencional. Os resultados apresentados a respeito da TIE convencional foram baseados em dados de nosso laboratório e da literatura, estes não foram realizados neste estudo (BARIN et al., 2015).

Em geral, a TIE realizada em microplacas de papel apresentou resultados bastante satisfatórios, com maiores vantagens em todos os parâmetros avaliados em relação à titulação convencional. A partir da TIE em papel, foi possível obter uma redução no consumo de reagentes e amostras comparado aos demais métodos, empregando apenas 0,05 mL de amostra. Isso faz com que o gasto de amostra seja 200 vezes menor na TIE em dispositivos de papel em relação à titulação convencional. Além disso, uma redução no consumo de NaOH de aproximadamente uma ordem de magnitude foi possível, mostrando que o método proposto pode ser considerado um avanço no sentido da diminuição da quantidade de reagentes utilizados e resíduos gerados. Por fim, cabe ressaltar que os dispositivos de papel são biodegradáveis *per si* e são oriundos de fontes renováveis, reforçando ainda mais a adequação do método proposto junto aos princípios da química analítica verde.

Para a determinação da acidez fixa a etapa de concentração da amostra em papel mostrou ser muito mais rápida, reduzindo o tempo de 120 para 30 min, devido principalmente ao menor volume de amostra utilizada e elevada razão superfície/volume do papel. Além disso, a concentração em papel também se torna um processo mais adequado à rotina por ser executado em estufa, o que possibilita a concentração simultânea de cerca de 50 placas, o que equivale a 1200 amostras processados em ciclo de análise. No método convencional, no banho-maria, é possível concentrar apenas 3 amostras simultaneamente, o que demonstra a aderência do método proposto às atividades de rotina. Além da etapa de concentração, a determinação da acidez também foi mais rápida com o uso da TIE, onde a análise foi

realizada em apenas 3 min para 24 amostras. Devido ao menor tempo de análise da TIE, este apresentou elevada frequência de análise, permitindo a determinação de acidez fixa de 120 amostras  $h^{-1}$  e acidez total de 480 amostras  $h^{-1}$ .

Não obstante às vantagens elencadas anteriormente, o consumo de energia determinado para os três métodos indicou, novamente, a TIE em papel com os resultados mais favoráveis, com baixo consumo energético em ambas as determinações de acidez. Foi observado na TIE em papel um consumo de 0,001 kWh na determinação de acidez fixa e 0,0006 kWh para acidez total, enquanto que para a TIE convencional 0,66 kWh na acidez fixa e 0,001 kWh na acidez total foi necessário. Já para a titulação convencional, 0,036 kWh para determinação da acidez total e 15,87 kWh para a acidez fixa foram consumidos, mostrando claramente o impacto positivo do método proposto.

Com base nos resultados obtidos foi possível observar que o método proposto neste estudo através da combinação da TIE e das microplacas de papel apresentou boa adequação a química analítica verde, com consumo mínimo de reagentes e amostra, elevada frequência de análise, redução das etapas analíticas e baixo consumo de energia. O impacto ambiental deste método pode ser considerado baixo, pois a produção de resíduos através deste foi minimizada, além de serem utilizados reatores biodegradáveis.



Tabela 3. Comparação dos parâmetros de mérito na determinação de acidez total e fixa a partir da TIE em papel, TIE convencional e titulação.

Parâmetros	Acidez total			Acidez fixa		
	TIE em papel	TIE conv.	Titulação conv.	TIE em Papel	TIE conv.	Titulação conv.
Volume de amostra (mL)*	0,05	1,2	10	0,15	7	30
Consumo de reagente - NaOH (mg/amostra)*	4	96	30-90	4	96	15-23
Tempo gasto (min/amostra)*	3	3	10	33	123	130
Frequência de análise (amostras h <sup>-1</sup> )	480	480	18	120	36	1,5
Consumo de energia (KWh/amostra)	0,0006 <sup>a</sup>	0,0010 <sup>b</sup>	0,037 <sup>c</sup>	0,0011 <sup>ad</sup>	0,66 <sup>be</sup>	15,90 <sup>cd</sup>

\* Os cálculos foram realizados considerando apenas uma replicata.

<sup>a</sup>Considerando o consumo de uma pipeta multicanal, câmara IV e agitador tipo vórtex.

<sup>b</sup>Considerando o consumo de pipeta multicanal, câmara IF e agitador magnético.

<sup>c</sup> Considerando o consumo de um potenciômetro

<sup>d</sup> Considerando o consumo de uma estufa

<sup>e</sup> Considerando o consumo de banho termostático.

## 5 CONCLUSÃO

A combinação da TIE com as microplacas de papel pode ser considerada uma alternativa viável e rápida para a avaliação da acidez em bebidas, apresentando uma boa exatidão e precisão nos resultados. Cabe também ressaltar que a diferença na composição química das amostras avaliadas e a presença de cor intensa, como no caso do vinho tinto, não influenciou a performance do método, mostrando que este também apresenta boa robustez. O ajuste das condições de análise mostrou ser uma etapa importante para obter um melhor sinal analítico e precisão nos valores obtidos. Adicionalmente foi observado que a etapa de concentração apresentou resultados satisfatórios, demonstrando que este pode ser um método promissor para determinações quantitativas de analitos presentes em baixas concentrações. Com o método avaliado também tornou-se possível o emprego de menores quantidade de amostra e reagentes, além do baixo consumo de energia para obtenção de uma frequência analítica maior em relação ao método convencional. Neste contexto, pode se dizer que a TIE em papel atende satisfatoriamente as demandas da química analítica verde, sendo uma ferramenta importante para executar análise de controle de qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ABIR, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerante. Brasil bebidas não alcoólicas: consumo regional de 2008. Brasília: ABIR, 2015.
- ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 6928, 2008.
- ASHURST, P.R. 2005, *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juice*, 2a edição, Blackwell Publishing, Hereford, UK, 2005.
- BAGAVATHIAPPAN, S.; LAHIRI, B.B.; SARAVANAN, T.; PHILIP, J.; JAYAKUMAR, T. Infrared thermography for condition monitoring - A review. *Infrared Physics and Technology*, v. 60, p. 35–55, 2013.
- BALDO, M.A.; DANIELE, S.; MAZZOCCHIN, G.A. Voltammetry with microelectrodes in wine: determination of the total acidity. *Analytica Chimica Acta*, v. 272, p. 151–159, 1993.
- 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.
- BHAKTA, S. A.; BORBA, R.; TABA, M.; GARCIA, C.D.; CARRILHO, E. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemical Acta*, v. 809, p. 117–122, 2014.
- CARRILHO, E.; MARTINEZ, A.W.; WHITESIDES, G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 7091–7095, 2009a
- CARRILHO, E., PHILLIPS, S.T., VELLA, S.J., MARTINEZ, A.W., WHITESIDES, G.M. Paper microzone plates. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 5990–5998, 2009b.
- CERVIERI JÚNIOR, OSMAR.; TEIXEIRA JUNIOR, J. R.; GALINARI, R.; RAWET, E. L.; SILVEIRA, C. T. J. O Setor de Bebidas no Brasil. *BNDES Setorial*, v. 40, p. 93-129, set. 2014.
- CHARBONNEAU, V.; OGILVIE, W. W. High Throughput Screening Methods for Asymmetric Synthesis. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 2, p. 313–332, 2005.
- CATE, D.M.; ADKINS, J.A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C.S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, v. 87, p. 19–41, 2015.

CHENG, C.-M.; MARTINEZ, A.W.; GONG, J.; MACE, C.R.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; MIRICA, K.A.; WHITESIDES, G.M. Paper-Based ELISA. *Clinical Analytics*, v. 49, p. 4771–4774, 2010.

CLARK, J. H. Green chemistry : challenges and opportunities. *Green Chemistry*. v. 1, p. 1–8, 1999

FITO, P.J., ORTOLÁ, M.D., DE LOS REYES, R., FITO, P., DE LOS REYES, E., 2004. Control of citrus surface drying by image analysis of infrared thermography. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 287–290., 2004.

COSTA, A. B.; CRUZ, D. R. N, ALESSIO K. O.; GARCIA, A. D.; ROTHMUND, K.; CARVALHO, F. S.; BARIN, J. S.; TEDESCO, L. P. Aplicação da Termografia por Infravermelho para Titulações Termométricas. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, v. 2, p.196-201, 2015.

COSTA, J. M.; GRANT, O. M.; CHAVES, M. M. Thermography to explore plant-environment interactions. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 3937–3949, 2013.

COSTA, M.N.; VEIGAS, B., JACOB, J. M.; SANTOS, D. S.; GOMES, J.; BAPTISTA, P. V, MARTINS, R.; INÁCIO, J.; FORTUNATO, E. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. *Nanotechnology*, v. 25, 094006, 2014.

COLTRO, W.K. T.; JESUS, D. P.; SILVA, J.A.F., LAGO, C.L., CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. *Electrophoresis*, v. 31, p. 2487–2498, 2010.

COLTRO, W.K. T.; CHENG, C.-M.; CARRILHO, E.; JESUS, D.P. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. *Electrophoresis*, v. 35, p. 2309–2324, 2014

CREVILLEN, A. G.; HERVÁS, M.; LÓPEZ, M. A.; GONZÁLEZ, A. C.; ESCARPA, A. Real sample analysis on microfluidic devices. *Talanta*, v. 74, p. 342–357, 2007.

CUCCURULLO, G., GIORDANO, L., ALBANESE, D., CINQUANTA, L., DI MATTEO, M. Infrared thermography assisted control for apples microwave drying. *Journal of Food Engineering*, v. 112, p. 319–325, 2012.

FLIR. *The Ultimate Infrared Handbook for R&D Professionals*. In *The Ultimate Resource Guide for Using Infrared in the Research and Development Industry*. 2013

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78–84, 2013.

GEYER, S.; GOTTSCHALK, K.; HELLEBRAND, H. J.; SCHLAUDERER, R. Application of a thermal imaging measuring system to optimize the climate control of potato stores. *Agronomy Engineering Conference*, 12–16 September 2004, pp.1066–1067, Leuven, Belgium

GOWEN, A. A.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; MCDONNELL, K.; O'DONNELL C. P. Applications of thermal imaging in food quality and safety assessment. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 190-200, 2010.

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

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. *Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinhos, 2009.

HAHN, F., HERNÁNDEZ, G., ECHEVERRÍA, E., ROMANCHICK, E. Escherichia coli detection using thermal images. *Le Génie Des Biosystèmes Au Canada*, v.48, p. 7–13, 2006.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4. ed. São Paulo, 2004.

IUPAC - *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. Compiled by A. D. McNaught. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JACKSON, R. S. *Wine Science: Principles, Practice, Perception*. Third edition, Academic Press: London, UK, 2008

JOKERST, J. C.; ADKINS, J. A.; BISHA, B.; MENTELE, M. M.; GOODRIDGE, L. D.; HENRY, C. S. Development of a Paper-Based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens. *Analytical Chemistry*, v. 84, p. 2900–2907, 2012.

KARITA, S.; KANETA, T. Acid–base titrations using microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, v. 86 p.12108-12114, 2014

LASIK, M. The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: A review. *European Food Research and Technology*, v. 237, p. 843–850, 2013.

LINDEN, H. W.; ROGERS, L. B.; HUME, D. N. Some applications of enthalpimetric detection in flow injection analysis. *Analytical Chemistry*, v. 25, p. 2131-2133, 1953.

LOSKYLL, J.; STOEWEL, K.; MAIER, W. F. Infrared Thermography as a High-Throughput Tool in Catalysis Research. *ACS Combinatorial Science*, v. 14, p. 295-303, 2012.

MANICKAVASAGAN, A.; JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Thermal imaging to detect infestation by *Cryptolestes ferrugineus* inside wheat kernels. *Journal of Stored Products Research*.v. 44, p. 186–192, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Lei n. 7.678, de 08 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2794>. Acessado em: 25 de janeiro de 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20271>>. Acessado em: 27 de janeiro de 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 544, de 16 de novembro de 1998. Aprova os regulamentos técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade, para refresco, refrigerante. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1150>>. Acessado em: 27 de janeiro de 2016.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie - International Edition*. v. 46, p. 1318–1320, 2007

MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; WHITESIDES, G.M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, v. 82, p. 3–10, 2010

MARTINEZ, A. W. Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis*, v. 23, p. 2589–2592, 2011.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, v. 38, p. 1175-1188, 2005.

MEOLA, C. Infrared thermography for masonry structure. *Infrared Physics & Technology*, v. 49, p. 228–233, 2007.

MEOLA, C.; CARLOMAGNO, G.M. Recent advances in the use of infrared thermography. *Measurement Science and Technology*, v. 15, p. R27–R58, 2004.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2014. Embrapa Uva e Vinho: Comunicado Técnico. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1025934>> Acesso em: Janeiro de 2016

MINISTÉRIO DA FAZENDA. Sistema de Controle de Produção de Bebidas - SICOBE. Produção de cervejas e refrigerantes. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/pessoajuridica/bebidas/SistContrProdSicobe.htm>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2016.

NERY, E.W.; KUBOTA, L.T. Sensing approaches on paper-based devices: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, p. 7573–7595, 2013.

OIV. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Recueil des methods internationaux d'analyse des vins et des mouts. Caractéristiques chromatiques. 5 ed. v. 1. 2005.

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

RING, E. F. J.; AMMER, K. Infrared thermal imaging in medicine. *Physiological Measurement*, v. 3, p. 2013. R33-R46.

RATTANARAT, P.; DUNGCHAI, W.; CATE, D.; VOLCKENS, J.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C.S. Multilayer paper-based device for colorimetric and electrochemical quantification of metals. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 3555–3562, 2014.

ROBERTO, J.; SOUZA, B. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. *Journal of Animal Behavior and Biometeorology*. v. 2, p. 73–84, 2014.

ROGALSKI, A. Infrared detectors: an overview. *Infrared Physics and Technology*, v. 43, p. 187–210, 2002.

ROMANO, M.; PRADERE, C.; TOUTAIN, J.; BATSALE, J.C. Quantitative kinetics and enthalpy measurements of biphasic underflow chemical reactions using infrared thermography. *Experimental Thermal and Fluid Science*, v. 67, p. 14–17, 2015.

SALMAN, M.; ATHAR, M.; SHAFIQUE, U.; ANWAR, J.; REHMAN, R.; AMEER, S.; AZEEM, M. Micro-determination of arsenic in aqueous samples by image scanning and computational quantification. *Analytical Methods*, v. 4, 242-246, 2012

SONGJAROEN, T.; DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; LAIWATTANAPAISAL, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*, v. 85, p. 2587–2593, 2011.

STADEN, J. F.; MASHAMBA, M. G.; STEFAN, R. I. Determination of the total acidity in soft drink using potentiometric sequential injection titration. *Talanta*, v. 58, p. 1109-1114, 2002.

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

STOLL, M., SCHULTZ, H.R., BERKELMANN-LOEHNERTZ, B. Exploring the sensitivity of thermal imaging for *Plasmopara viticola* pathogen detection in grapevines under different water status. *Functional Plant Biology*, v. 35, p. 281–288., 2008.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Labwarechemical resistance table. 2015. Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D20480.pdf>>. Acessado em 26 de janeiro de 2015.

TRAFFANO-SCHIFFO, M. V., CASTRO-GIRÁLDEZ, M., FITO, P.J., BALAGUER, N. Thermodynamic model of meat drying by infrared thermography. *Journal of Food Engineering*, v. 128, p. 103–110, 2014.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. Scoring of solvents used in analytical laboratories by their toxicological and exposure hazards. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 120, p. 169–173, 2015.

TÔRRES, A.R.; DA SILVA LYRA, W.; ANDRADE, S. I. E.; ANDRADE, R. A. N., SILVA, E. C., ARAÚJO, M. C. U., GAIÃO, E. N. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator. *Talanta*, v. 84, p. 601–606, 2011.

USBERCO, J.; SALVADOR, E. *Química: volume único*. 7.ed., ref. São Paulo: Saraiva, 2006. 672 p.

USAMENTIAGA, R.; VENEGAS, P.; GUEREDIAGA, J.; VEGA, L.; MOLLEDA, J.; BULNES, F. Infrared Thermography for Temperature Measurement and Non-Destructive Testing. *Sensors*, v. 14, p. 12305–12348, 2014

VADIVAMBAL, R.; D. S. JAYAS. Applications of thermal imaging in agriculture and food industry. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, p. 186-199, 2011.



VAHER, M.; KALJURAND, M. The development of paper microzone-based green analytical chemistry methods for determining the quality of wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 404, p. 627-633, 2012

VAHER, M.; BORISSOVA, M.; SEIMAN, A.; AID, T.; KOLDE, H.; KAZARJAN, J.; KALJURAND, M. Automatic spot preparation and image processing of paper microzone-based assay for analysis of bioactive compounds in plant extracts. *Food Chemistry*, v. 143, p. 465-471, 2014.

VAHL, K.; KAHLERT, H.; VON MUHLEN, L.; ALBRECHT, A.; MEYER, G.; BEHNERT, J. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. *Talanta*, v. 111, p. 134–139, 2013.

VAN LINDEN, V.; VEREYCKEN, R.; BRAVO, C.; RAMON, H.; BAERDEMAEKER, J. Detection technique for tomato bruise damage by thermal imaging. *Acta Horticultururae (ISHS)*, v. 599, p. 389-394, 2003.

VARITH,J.; HYDE,G.M.; BARITELLE,A.L.; FELLMAN,J.K.; SATTABONGKOT, T. Non-contact bruise detection in apples by thermal imaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 4, p. 211–218, 2003.

VENTURINI FILHO, W. G. Tecnologia de bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia, v. 2, p. 211-225. São Paulo: Blucher, 2010.

WASILEWSKI, J. C.; PEI, P. T-S.; JORDAN, J. Direct Enthalpimetry.A New Thermochemical Approach to Quantitative Analysis. *Analytical Chemistry*, v. 36, p.2131–2133, 1964.

YANG, B. Y.; MONTGOMERY, R. Alkaline degradation of invert sugar from molasses.*Bioresource Technology*. v. 98, p. 3084-3089, 2007.

ZAKHAROVA, E. A., MOSKALEVA, M.L., AKENEEV, Y. A., MOISEEVA, E.S., SLEPCHENKO, G.B., PIKULA, N.P. Potentiometric determination of the total acidity and concentration of citric acid in wines. *Journal of Analytical Chemistry*. v. 66, p. 848–853, 2011.

ZERAVIK, J.; FOHLEROVA, Z.; MILOVANOVIC, M.; KUBESA, O.; ZEISBERGEROVA, M.; LACINA, K.; PETROVIC, A.; GLATZ, Z.; SKLADAL, P. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food Chemistry*, v. 194, p. 432–440, 2016.