

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

Alessandra Stangherlin Oliveira

DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS
EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO

Santa Maria, RS
2016

Alessandra Stangherlin Oliveira

**DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS 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

Co-orientador: Prof. Dr. Roger Wagner

Santa Maria, RS
2016

Alessandra Stangherlin Oliveira

**DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS 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 09 de agosto de 2016:

Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr^a. Paola de Azevedo Mello (UFSM)

Prof. Dr. Adilson Ben da Costa (UNISC)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin, pela orientação neste trabalho, pela disponibilidade, pela confiança, pelo exemplo de profissionalismo, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e pela amizade.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Roger Wagner, pela amizade, disponibilidade e contribuição durante o desenvolvimento das atividades de mestrado.

Aos Prof. Drs. Adilson Ben da Costa e Paola de Azevedo Mello, pela participação na banca examinadora, e pelas contribuições feitas para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do NTA pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial aos meus colegas de grupo, que contribuíram e participaram diretamente deste trabalho, me ajudando em todos os momentos.

Ao Leonardo, que esteve sempre ao meu lado, pelo apoio, paciência e carinho, além da compreensão e incentivo nos momentos difíceis durante esta trajetória.

Em especial, agradeço a minha família e amigos, por estarem comigo em todos os desafios da vida. Aos meus maiores exemplos, meus pais Francisco e Eunice, por todo incentivo e suporte, mais do que educação formal que vocês me ofereceram e que sempre se esforçaram para que fosse a melhor, a formação humana foi a que de mais importante fizeram por mim. E ao meu pequeno Heitor, obrigada por todo amor, e por ter a pessoa que sou hoje.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS EMPREGANDO ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO

AUTORA: Alessandra Stangherlin Oliveira

ORIENTADOR: Juliano Smanioto Barin

As técnicas geralmente utilizadas para a determinação de etanol em bebidas alcoólicas requerem uma etapa prévia de destilação, apresentando limitações com relação ao tempo, ao consumo de energia e à elevada quantidade de amostra para a análise. A termografia no infravermelho é uma técnica que permite avaliar a distribuição da temperatura em um objeto em uma única imagem. Esta técnica pode ser combinada com análise entalpimétrica, que consiste na variação de entalpia de uma reação química, que é medida direta ou indiretamente. Uma nova abordagem é proposta neste estudo, para a realização de uma análise simples e rápida, sem o uso de reagentes tóxicos e sem necessidade de preparo de amostra, através da entalpimetria no infravermelho (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*). Desta forma, microplacas com 24 poços foram utilizadas como reatores, empregando pipeta multicanal para a adição de reagentes, e uma câmera no infravermelho para monitoramento da temperatura das reações. Assim, foi realizado neste estudo a determinação do teor alcoólico em bebidas destiladas e fermentadas, onde foi medida a variação de temperatura destas para a construção das curvas de calibração, através do calor de diluição. Uma prévia otimização dos parâmetros experimentais (volume total, velocidade de dispensação, velocidade de agitação, e proporção dos reagentes), foi realizada a fim de obter as melhores condições analíticas. Comparado ao método convencional de determinação do teor alcoólico (AOAC, 942.06), a TIE apresentou resultados promissores com boas concordâncias (variando de 99,4 a 100,9% para bebidas destiladas, e 97,7 a 105,0% para bebidas fermentadas) para todas as amostras avaliadas. Além disso, observou-se que há uma maior frequência de análise por TIE, que pode ser de até 480 amostras por hora. Desta forma, o método proposto neste trabalho apresentou um bom desempenho, com grande potencial para ser aplicado em análises de rotina, devido a sua simplicidade e rapidez, sendo uma importante ferramenta para a determinação de etanol em bebidas alcoólicas.

Palavras-chave: Bebidas destiladas, bebidas fermentadas, teor alcoólico, termografia, entalpimetria, infravermelho.

ABSTRACT

AUTHOR: Alessandra Stangherlin Oliveira

ADVISOR: Juliano Smanioto Barin

Methods used for ethanol determination in alcoholic beverages require a previous step of distillation, presenting some limitations as long time and high energy consumption as well as the use of high amount of sample for analysis. The infrared thermography enable monitoring temperature distribution of an object. This technique can be combined with the enthalpimetric analysis, monitoring the temperature of a chemical reaction by direct or indirect form. Considering these characteristics, a new approach is proposed in this work in order to perform a simple and fast analysis without the use of toxic reagents and avoiding sample preparation, by using thermal infrared enthalpimetry (TIE). In this sense, microplate devices with 24 wells as reactors and a multichannel pipette for reagents addition were used with temperature monitoring by means of an infrared camera. In this way, a study to determine the alcoholic content of distillates and fermented beverages was performed, using the temperature variation from the heat of dilution. In order to evaluate the proposed method, a previous optimization was performed evaluating some parameters as the total volume, the dispensing speed, the stirring speed and the proportion between solutions. The results obtained by the proposed TIE method were in agreement with those obtained by the conventional method used to determine the alcoholic content (AOAC, 942.06), ranging from 99.4 to 100.9 % and 97.7 to 105.0% for distilled and fermented beverages, respectively. In addition, this method provided a high sample throughput (up to 480 samples in one hour). In this sense, a good performance of the proposed method was observed, presenting a potential to be applied in routine analysis due its simplicity and rapidity, being an important tool for ethanol determination in alcoholic beverages.

Keywords: distilled beverages, fermented beverages, alcoholic content, termography, enthalpimetry, infrared.

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CE	Eletrofosere capilar (do inglês, <i>Capillary electrophoresis</i>)
DIE	Entalpipetria por injeção direta (do inglês, <i>Direct Injection Enthalpipetry</i>)
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês, <i>Flow Injection Analysis</i>)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GC	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (do inglês, <i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (do inglês, <i>Gas Chromatography Flame Ionization Detection</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-FID	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ionização em chama (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography Flame Ionization Detection</i>)
IAL	Instituto Adolfo Lutz
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantitation</i>)
NIR	Espectroscopia no infravermelho próximo (do inglês, <i>Near infrared Spectroscopy</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SIA	Análise por injeção sequencial (do inglês, <i>Sequential Injection analysis</i>)
TIE	Entalpipetria no infravermelho térmico (do inglês, <i>Thermal Infrared Enthalpipetry</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 BEBIDAS ALCÓOLICAS	10
2.1.1 Métodos para determinação de etanol em bebidas alcoólicas	13
2.1.1.1 Métodos oficiais	14
2.1.1.2 Métodos alternativos	17
2.3 ENTALPIMETRIA	22
2.4 CALOR DE DILUIÇÃO	27
3 DISCUSSÃO	31
4 DISCUSSÃO GERAL	72
5 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento crescente da indústria de alimentos e os requisitos de qualidade nos últimos anos levaram a um aumento do interesse por tecnologias novas e inovadoras, capazes de garantir análises rápidas e de baixo custo. Neste contexto, a determinação do teor de etanol é uma tarefa importante para a indústria de bebidas e diversos tipos de alimentos, assim como para os órgãos reguladores dessas atividades. O interesse na determinação do etanol surgiu do monitoramento de sua formação para controle da fermentação e da necessidade de verificação do limite legal de aceitação e influência do mesmo nas características sensoriais dos produtos (MATAIX e CASTRO, 2000). Além disso, o etanol vem sendo monitorado em função do importante efeito no crescimento das leveduras e, também, por razões econômicas, particularmente na relação entre as taxas impostas para álcool em diferentes países (YARITA et al., 2002).

A determinação de etanol é um parâmetro essencial em termos de qualidade e estabilidade das bebidas alcoólicas (AMERINE, 1980). Os métodos oficiais para a determinação de etanol em bebidas alcoólicas são laboriosos, envolvendo uma etapa prévia de destilação a fim de separar os compostos voláteis dos demais componentes da bebida, seguida geralmente da determinação da densidade do destilado através dos métodos de picnometria e densimetria (OJ, 2000). Estes métodos necessitam de laboratório com infra-estrutura adequada, pessoal e equipamentos especializados, além de grande quantidade de amostra (p. ex., 100 mL) para realização das análises. Desta forma, eles não permitem o monitoramento contínuo durante processos industriais e são inviáveis para uma rápida análise de rotina, dificultando sua disseminação no setor produtivo, especialmente entre pequenos produtores (ROCCHIA et al., 2006).

Assim, diversos métodos vêm sendo propostos para superar tais limitações, envolvendo métodos cromatográficos, amperométricos, espectroscópicos, entre outros. Alguns destes métodos alternativos foram publicados recentemente na literatura, o que indica que a determinação de etanol em bebidas alcoólicas ainda carece de novos desenvolvimentos (WANG, 2002; PISOSCHI, 2012; ROCCHIA, 2007).

Porém, mesmo que as análises possam ser feitas de maneira mais rápida, muitos dos métodos alternativos utilizados são laboriosos, empregam reagentes que podem ser

nocivos à saúde humana, e demandam elevado consumo energético. Assim, um novo método de análise por entalpiometria no infravermelho térmico (TIE, do inglês *Thermal Infrared Enthalpimetry*) foi proposto recentemente, onde tais problemas são minimizados ou, até mesmo, eliminados. A TIE foi desenvolvida com o intuito de fornecer análises entalpiométricas de modo rápido, simples e sem contato, através do emprego de uma câmera no infravermelho. Nessa técnica, as mesmas reações usadas na volumetria (neutralização, precipitação, complexação e redox) podem ser exploradas, porém com algumas vantagens associadas como rapidez e detecção simultânea de múltiplas reações, permitindo um aumento de até 20 vezes na frequência de análise (BARIN et al., 2015). Considerando as vantagens da TIE, é proposto neste trabalho um novo método de determinação de etanol em bebidas alcoólicas, onde foi explorado o calor liberado na diluição do etanol em água, através da utilização destas câmeras no infravermelho.

Desta forma, duas estratégias foram utilizadas: I) adição direta de água em bebidas destiladas, que apresentam maior teor alcoólico; II) adição direta de etanol em vinhos, que possuem menor teor alcoólico. Diversos parâmetros que influenciam na mistura das soluções e no processo de detecção foram estudados (p. ex. volume total, agitação, proporção entre as soluções, etc.) foram estudados, assim como a calibração. De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que o consumo energético foi reduzido significativamente, pois não é necessária a etapa prévia de destilação da amostra e os experimentos são conduzidos em temperatura e pressão ambientes, não havendo a utilização de equipamentos laboratoriais, com alto consumo de energia. Também podemos ressaltar que com o uso desta nova ferramenta o tempo de análise pode ser reduzido significativamente, pois a determinação de etanol pode ser realizada diretamente em uma única etapa, sem qualquer preparo da amostra, o que demonstra o potencial relativo a aplicações em rotina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BEBIDAS ALCÓOLICAS

Em nosso país, bebida alcoólica é definida como um produto refrescante, aperitivo ou estimulante, destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa e contendo mais de meio grau Gay-Lussac ($^{\circ}\text{GL}$, % v/v) de álcool etílico (AQUARONE, 2001). Segundo o MAPA, 2009, a bebida alcoólica deve apresentar graduação alcoólica entre 0,5 e 54% em volume a 20 $^{\circ}\text{C}$, sendo classificadas em três grandes grupos: fermentadas, destiladas e retificadas, conforme mostrado na Tabela 1. Todas são obtidas por fermentação, sendo as destiladas aquelas em que o mosto fermentado sofre algum processo de destilação. A bebida alcoólica retificada é obtida por processo de retificação do destilado alcoólico, pela diminuição do teor alcoólico por diluição ou pela padronização da própria bebida alcoólica retificada.

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares em etanol e CO_2 , catalisado por enzimas. Esse processo é realizado, principalmente, no citoplasma de leveduras, com o objetivo de obter energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas e, ainda, para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol tão somente um subproduto desse processo (LIMA et al., 2001). O etanol pode ser encontrado como constituinte de bebidas fermentadas, tais como cervejas, vinhos, licores, assim como em bebidas destiladas e derivadas, tais como vodca, tequila, uísque ou cachaça (ZARPELON, 2013). No plano sensorial, apresenta gosto levemente adocicado, auxiliando também no volume/estrutura da bebida. Além disso, é importante para a estabilidade química do vinho, atuando como solvente na extração de pigmentos e taninos durante a fermentação do vinho tinto e na dissolução de compostos voláteis (VENTURINI, 2010).

As bebidas fermentadas e não destiladas têm teor alcoólico menor do que as destiladas, sendo comum encontrar nos rótulos das bebidas o teor alcoólico expresso em $^{\circ}\text{GL}$, que indica a percentagem (em volume) de etanol na bebida. A cerveja (bebida fermentada e não destilada), por exemplo, contém uma percentagem de etanol que geralmente varia de 4 a 6 $^{\circ}\text{GL}$, enquanto o vinho contém de 8 a 12 $^{\circ}\text{GL}$ (FERREIRA et al., 2007).

A fermentação por si só, não produz bebidas com um teor de etanol maior que 12-15%, pois em concentrações elevadas as enzimas são desativadas. Para produzir

bebidas com maior teor alcoólico, a solução aquosa deve ser destilada. O uísque, tequila, cachaça e a vodca são produzidos dessa maneira (VENTURINI, 2010).

As bebidas destiladas podem ser elaboradas a partir de qualquer fonte que contenha etanol. Os destilados se classificam em função de sua matéria-prima e segundo o tipo de destilador empregado (VARNAM e SUTHERLAND, 1997). Todas as bebidas destiladas encontram-se entre 35 e 54 °GL de álcool etílico (AQUARONE, 2001). Cabe ressaltar que a elevada graduação alcoólica destas bebidas se deve à concentração do etanol proporcionada pelo processo de destilação, que ocorre após a fermentação prévia.

A destilação é a técnica de separação baseada no fenômeno de equilíbrio líquido-vapor de misturas. A palavra destilação deriva do verbo latino *destillare*, que significa gotejar ou pingar, e é precisamente assim, em pequenas quantidades, que o líquido (etanol) é obtido pelo processo de destilação. A destilação é um processo bastante comum em algumas indústrias e consiste em promover a vaporização das substâncias para, em seguida, condensá-las, recolhendo a substância mais pura em outro recipiente (FERREIRA et al., 2007). A matéria-prima básica das bebidas destiladas é o etanol de alta pureza, denominado álcool etílico potável de origem vegetal, que é um líquido retificado, contendo no mínimo 96% (v/v) de concentração alcoólica. Vodca é normalmente produzida mediante simples diluição com água deste álcool etílico potável, e o gin é obtido pela redestilação deste álcool etílico potável, na presença de bagas de zimbro (VENTURINI, 2010).

Tabela 1. Classificação e caracterização de bebidas alcoólicas conforme MAPA, 2009.

Bebida Alcoólica	Teor Alcoólico	Característica
Fermentadas		
Cerveja	3 a 7%	Fermentado alcoólico do mosto oriundo do malte de cevada, com adição de lúpulo
Vinho	8,6 a 14%	Fermentado alcoólico do mosto simples de uva sã, fresca e madura
Destiladas		
Cachaça	38 a 48%	Destilado do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar
Uísque	38 a 54%	Destilado alcoólico simples de cereais envelhecidos, parcialmente ou totalmente maltados
Tequila	36 a 54%	Destilado alcoólico simples de agave ou do mosto fermentado de agave
Retificadas		
Vodca	36 a 54%	Obtida de álcool etílico potável de origem agrícola ou de destilado alcoólico simples de origem agrícola retificado
Gim ou Gin	35 a 54%	Obtida pela redestilação de álcool etílico potável de origem agrícola, na presença de bagas de zimbro

2.1.1 Métodos para determinação de etanol em bebidas alcoólicas

Tendo em vista a importância da determinação do teor alcoólico de diversos tipos de bebidas, vários métodos estão disponíveis na literatura. Desta forma, neste texto foram classificados como oficiais, quando são recomendados em compêndios de referência para controle de qualidade, e também como alternativos, que compreendem novas estratégias descritas na literatura.

2.1.1.1 Métodos oficiais

Conforme a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005) e Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2004), os métodos mais comumente usados para determinação do teor alcoólico envolvem uma etapa prévia de destilação seguida da determinação de etanol por picnometria, densimetria e refratometria (Tabela 2).

O método oficial designado pela AOAC e pelo IAL mais utilizado para a determinação de álcool em vinhos e bebidas destiladas é a picnometria. Esse método consiste na determinação da densidade relativa do destilado em um picnômetro previamente calibrado em relação à massa da água pura a 20 °C. Para a realização deste ensaio, requer-se uma balança analítica de boa qualidade, colocada em um lugar sem vibrações e sem correntes de ar (AMERINE e OUGH, 1976). A picnometria apresenta como vantagens a boa precisão das medidas e a eliminação de padrão para comparação. Entretanto, o procedimento é trabalhoso, requerendo muito tempo para execução e atenção do analista para sua realização (VALLESI e HOWELL, 2002). Cabe ressaltar que a temperatura deve ser cuidadosamente controlada nesse método, pois qualquer variação desta pode afetar a medida da densidade, que varia cerca de 0,03% com a flutuação de apenas 1 °C (IAL, 2004).

Um outro método para a determinação do grau alcoólico consiste na avaliação da densidade relativa com densímetro. As diferentes escalas usadas pelos densímetros podem dar a leitura direta da densidade ou em °GL (alcoômetro), em que os graus referem-se à percentagem em volume de etanol em água. Os picnômetros e densímetros são os mais utilizados na determinação da densidade, por serem dispositivos de baixo custo e baixa complexidade.

Além da picnometria e densimetria, a AOAC sugere ainda a refratometria para a determinação de álcool por volume em cerveja, vinho e bebidas destiladas. A refratometria é um método físico, onde o índice de refração de uma solução varia regularmente com a concentração do soluto. Sendo assim, a quantidade de etanol na solução pode ser estimada através de seu índice de refração (AOAC, método 950.04). O índice de refração do etanol é diferente da água, por isso pode ser utilizado como um indicador do teor alcoólico. Além desses métodos a AOAC apresenta outros para a determinação de etanol em vinhos, como a oxidação por dicromato de potássio e a

cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography flame ionization detection*). Através de reações de oxidação, obtêm-se bons resultados com o uso do dicromato de potássio para oxidar etanol a ácido acético na presença de ácido sulfúrico. O dicromato de potássio é um agente oxidante forte, usado em solução ácida e que se reduz rapidamente ao sal de cromo (III) de coloração verde (VOGEL, 1992). Para oxidar completamente o etanol em ácido acético, requer-se uma concentração adequada de íons hidrogênio, evitando que o etanol se oxide a uma mistura de acetaldeído e ácido acético (AMERINE e OUGH, 1976).

Cabe ressaltar que a maioria dos métodos oficiais requer uma etapa prévia de destilação da amostra, que é a etapa que demanda maior atenção do analista e tempo para execução. Na Tabela 2 podemos observar, resumidamente, a descrição desses procedimentos.

Tabela 2. Descrição dos procedimentos de determinação de etanol descritos pela AOAC e IAL.

Método	Preparo das amostras	Determinação de etanol
Picnometria	Destilação de 100 mL de amostra	Determinação da densidade relativa do destilado com picnômetro previamente calibrado. Primeiramente, é necessário que este seja lavado com álcool, e, posteriormente, com éter, seguida de secagem ambiente
Densimetria	Destilação de 100 mL de amostra	Determinação da densidade relativa do destilado, com o uso de densímetros ou alcoômetros
Refratometria	Destilação de 100 mL de amostra	Determinação do índice de refração do destilado por meio de refratômetro
GC-FID*	Diluição 1:100 e padrão interno (0,2% v/v de propanol em água)	Injeção de três alíquotas de 1 µL, avaliação da relação entre as áreas dos picos do etanol e do propanol (padrão interno)
Oxidação com dicromato de potássio*	Destilação à vapor de 1-5 mL de amostra para obter a solução alcoólica em meio acidificado (H ₂ SO ₄), seguida da oxidação com solução conhecida de K ₂ Cr ₂ O ₇	O excesso de K ₂ Cr ₂ O ₇ é titulado até atingir coloração verde, com solução de Fe ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ . O teor de etanol é obtido calculando a diferença de volume do consumo de K ₂ Cr ₂ O ₇ entre a solução da amostra e a solução controle

*GC-FID e oxidação por dicromato são métodos descritos pela AOAC para aplicação somente em vinhos.

2.1.1.2 Métodos alternativos

Devido às limitações dos procedimentos de pré-tratamento, como o tempo dispendido para destilação da amostra e diversos processos de transferência de massa, os dois métodos mais populares, picnometria e densimetria, vêm sendo substituídos e diversas estratégias para determinação de etanol têm sido propostas. Assim, a determinação de etanol em bebidas alcoólicas pode ser realizada de várias maneiras, explorando propriedades físicas, ópticas e químicas das misturas hidroalcoólicas, utilizando, por exemplo, métodos enzimáticos com biosensores e também métodos potenciométricos, espectroscópicos e cromatográficos.

As técnicas de análise em fluxo combinados com métodos enzimáticos utilizando as enzimas álcool-oxidase ou álcool-desidrogenase têm sido largamente utilizados no desenvolvimento de biosensores para determinação de etanol. A principal vantagem relacionada com estes detectores amperométrico, é a sua melhor seletividade. No entanto, a utilização de biosensores é limitada, havendo necessidade de diluição de amostras de bebidas alcoólicas, devido à saturação das enzimas (PAIXÃO et al., 2002). Para os métodos com biosensores enzimáticos, são necessários pré-tratamentos prévios e imobilização das células de leveduras utilizadas para a detecção. Além disso, há diversas interferências, causadas por açúcares presentes na amostra, limitando seu uso em rotina (ROTARIU et al., 2004).

A espectroscopia Raman e eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) têm sido propostas para determinação de etanol em bebidas, mas não são populares devido aos instrumentos necessários serem dispendiosos e de operação relativamente complexa. Ainda, são necessários procedimentos de pré-tratamento, como destilação de amostras e pesagens precisas (BOYACI et al., 2012; OLIVER et al., 2014). Eletroforese capilar com detecção de condutividade sem contato foi utilizada para análises de bebidas como uísque, rum e conhaque. Porém, a determinação sofre interferência pela presença de pequenos traços de sais, sendo necessária uma etapa de dessalinização eletroforética integrada, através da aplicação de uma tensão elétrica de corrente contínua de 10 kV para o capilar com a zona de amostra injetada (TUMA e OPEKAR, 2015).

As técnicas espectroscópicas oferecem um método mais rápido e mais simples para a determinação do teor alcoólico. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared spectroscopy*) oferece possibilidades para a determinação direta de etanol em bebidas. No entanto, em todos os casos, atenção especial tem de ser dada para a presença de açúcares na amostra e a presença de outros álcoois, levando a interferências e a uma baixa precisão (GALLIGNANI et al., 1994). A metodologia por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), incluiu a determinação do etanol com clorofórmio, apresentando resultados de acordo com aqueles obtidos por GC-FID (GALLIGNANI et al., 2005).

A maioria dos estudos empregando cromatografia são realizados por meio de GC unidimensional, pois esta técnica possui muitas vantagens, tais como a alta resolução e sensibilidade, permitindo a identificação de um grande número de analitos. Além disso, a possibilidade de acoplamento de GC com diferentes detectores, torna esta técnica aplicável a uma ampla gama de produtos à base de álcool. O FID é o detector mais comumente usado devido a sua ampla disponibilidade e custo relativamente baixo para sistemas de cromatografia (WISNIEWSKA et al., 2015). Em alguns estudos utilizando GC-FID, não foi necessário fazer a pré-destilação da amostra e nem diluição, permitindo a determinação simultânea de vários álcoois (WANG et al., 2003). Porém, técnicas cromatográficas envolvem custo elevado, necessidade de estrutura laboratorial e analistas especializados, além de dispenderem muito tempo para análise e interpretação dos resultados, o que limita seu uso em atividades de rotina.

Um método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*) também foi desenvolvido, onde os resultados obtidos indicaram uma determinação precisa de etanol em bebidas alcoólicas. Porém, foi necessário realizar o preparo de amostra, como diluição das amostras em água, além da presença de interferências na detecção de outros compostos orgânicos, além do etanol (YARITA et al., 2002).

Para espectrofotometria, a determinação de etanol é feita após a separação do etanol de outras matrizes por destilação e oxidação química com dicromato de potássio, seguido por detecção espectrofotométrica do Cr(III) produzido ou o Cr(VI) restante. No entanto, o dicromato é uma substância que apresenta toxicidade elevada, por isso, é de

interesse reduzir a sua quantidade nos resíduos laboratoriais (MATAIX e CASTRO, 2000). Um método colorimétrico envolvendo análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*) empregando nitrato cérico de amônio e ácido nítrico como reagentes para determinação de etanol foi proposto, apresentando uma seletividade elevada e toxicidade insignificante em comparação com dicromato. Porém, mesmo assim, o método proposto utiliza reagentes que necessitam de descarte especial (PINYOU et al., 2011).

Um sistema de injeção em fluxo baseado na medição do efeito *Schlieren* foi usado a fim de desenvolver uma metodologia simples e rápida para a quantificação de etanol em diferentes tipos de bebidas alcoólicas (VIDIGAL e RANGEL, 2015). Os resultados obtidos pelo método desenvolvido apresentaram boa concordância com os obtidos pelo método de referência. Porém, há necessidade de desgaseificação e diluição das amostras. Substâncias como açúcares e proteínas geraram interferências, e assim, modificações na metodologia foram necessárias para possibilitar a análise. Na Tabela 3, as principais características dos métodos alternativos são destacadas, considerados os trabalhos publicados a partir do ano 2000.

Tabela 3. Características principais dos métodos alternativos disponíveis na literatura.

(Continua)

Bebida	Método	Preparo de amostra	Faixa de Trabalho	LOQ/LOD	RSD	Frequência de análise (det. h ⁻¹)
Cachaça, gim, vinho, vodca	FIA-Colorimetria (SANTOS et al., 2002)	Não há	5 - 30% (v/v)	2,5% (v/v)	3,4%	120
Pinga, saquê, rum, vinho	Amperometria (PAIXÃO et al., 2002)	Filtração em membrana de exclusão por tamanho a fim de minimizar possíveis interferentes	2 - 10% (v/v)	0,4% (v/v, LOD)	3%	120
Saquê, vinho, uísque	HPLC-FID (YARITA et al., 2002)	Diluição em água, de modo que a concentração esteja na faixa de 2% (v/v)	n.i.	n.i.	1%	n.i.
Cerveja, vinho, uísque	GC-FID (WANG et al., 2003)	Não há	10 - 500 mg mL ⁻¹	0.5 µg mL ⁻¹ (LOQ)	4%	n.i.
Gim, vodca, uísque	SIA-Espectrofotometria VIS (FLETCHER, 2003)	Diluição das bebidas destiladas a concentração de etanol em torno de 10% (v/v)	0 - 10% (v/v)	0,09% (v/v, LOD)	<1%	19
Cerveja, gim, rum, uísque, vinho	FTIR (GALLIGNANI et al., 2005)	Cerveja foi desgaseificada; bebidas destiladas foram diluídas com água deionizada; para vinhos não foi necessário nenhum preparo	até 15% (v/v)	0,1% (v/v, LOQ) 0,03% (v/v, LOD)	1,3%	25
Vodca e uísque	NIR e Espectroscopia Raman (NORDON et al., 2005)	Não há	9.9 - 61.7% (v/v)	n.i.	2,3% NIR 2,2% Raman	n. i.

n.i.: Não identificado

FIA: Análise por injeção em fluxo

HPLC-FID: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ionização em chama

GC-FID: Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama

SIA: Análise por injeção sequencial

FTIR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

NIR: Espectroscopia no infravermelho próximo

Tabela 3. Características principais dos métodos alternativos disponíveis na literatura.

Bebida	Método	Preparo de amostra	Faixa de Trabalho	LOQ/LOD	RSD	(Conclusão)
						Frequência de análise (det. h ⁻¹)
Vinho	FTIR (ROCCHIA et al., 2007)	Não há	9 - 16% (v/v)	n.i.	n.i.	n.i.
Cerveja, vinho, saquê	SIA-Espectrofotometria UV (VIDIGAL et al., 2008)	Cerveja foi filtrada, desgaseificada e diluída 400x; vinho foi diluído 350x e saquê 2500x	até 0,04% (v/v)	0,009% (v/v, LOQ) 0,003% (v/v, LOD)	1%	27
Vinho e vodca	Dispositivo microfluídico-Espectrofotometria VIS (LEI e CHEN, 2008)	Diluição, mantendo vazão de 50 µL/min para leitura	0 - 6%	n.i.	n.i.	n.i.
Cerveja, uísque, vinho, vodca	Amperometria (PISOSCHI et al., 2012)	Diluição em solução de fosfato 0,1 mol L ⁻¹ para ajuste em pH 7,0	10 - 80 mM	9,50 mM (LOQ) 2,85 mM (LOD)	2,5%	n.i.
Gim, vodca, uísque	Espectroscopia Raman (BOYACI et al., 2012)	Mistura da amostra com acetoneitrila na proporção de 10:1 (v/v)	0 - 7 M	3,7 mM (LOQ) 1,2 mM (LOD)	4,2%	n.i.
Vinho	SIA-Espectrofotometria UV (PAIS et al., 2013)	Apenas para vinho do porto foi necessária a diluição da amostra	até 25% (v/v)	0,3% (v/v, LOQ) 0,004% (v/v, LOD)	<3,5%	21
Vodca	CE-Espectrofotometria UV (OLIVER et al., 2014)	Não há	117 - 1850 mg L ⁻¹	117 mg L ⁻¹ (LOQ) 34,9 mg L ⁻¹ (LOD)	2 - 10%	n.i.
Vinho	GC-FID (ZHANG et al., 2015)	Não há	0 - 16% (v/v)	1,23% (v/v, LOQ)	1%	n.i.

n.i.: Não identificado

FTIR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

NIR: Espectroscopia no infravermelho próximo

SIA: Análise por injeção sequencial

CE-Espectrofotometria UV: Eletroforese capilar com detecção por espectrofotometria no ultravioleta

GC-FID: Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama

2.3 ENTALPIMETRIA

Entalpia ou análise entalpimétrica é um subconjunto do campo da calorimetria que evoluiu a partir da necessidade de aumentar a produtividade e simplificar instrumentos, por meio da aplicação de técnicas calorimétricas em análises de rotina (GRIME, 1981). De acordo com a IUPAC, análise entalpimétrica é a designação genérica para uma família de métodos de análise, na qual 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. Nesta técnica, normalmente, ao menos um reagente encontra-se em solução aquosa ou na forma líquida. As principais técnicas de análise entalpimétrica são a titulação termométrica, a entalpia por injeção direta (DIE, do inglês *direct injection enthalpimetry*) e a entalpia por injeção em fluxo (GRIME, 1981).

Os métodos entalpimétricos de análise, de uma maneira geral, tiveram um grande avanço após a difusão do uso do termistor como sensor térmico. Desde então, quase todo fenômeno térmico envolvendo e liberação ou absorção de calor, pôde ser utilizado na análise termométrica desta espécie. Na maioria dos casos, o fenômeno é uma reação química (WASILEWSKI et al., 1964).

Através da entalpia por injeção em fluxo, obtém-se um sinal transiente de variação de temperatura, cuja magnitude é proporcional à concentração do analito. Uma vantagem desse método é a possibilidade de trabalho em condições em que há diferença de temperatura entre a solução do reagente e da amostra. Termistores colocados em cada um dos fluidos detectam a diferença de temperatura e permitem a sua correção. Todavia, esses métodos apresentaram baixa sensibilidade, sendo usados para concentrações relativamente altas. Além disso, o consumo de reagentes e amostra são relativamente altos (próximos de 10 mL) (PRIESTLEY, et al., 1965).

A titulação termométrica consiste na adição de uma solução reagente em um frasco adiabático, que contém a solução da espécie a ser determinada. Pode-se anotar a temperatura após cada adição conhecida do reagente ou seguir a sua variação com o uso de um registrador. Ao se esgotar a reação com o analito, não ocorre mais mudança na temperatura da solução, o que indica o ponto final da titulação. O conhecimento da

concentração de reagente e da reação que esse promove com a espécie a ser determinada, leva ao conhecimento da sua concentração.

A titulação termométrica foi a técnica entalpimétrica mais empregada até 1964, quando o método de entalpimetria por injeção direta (DIE) foi introduzido, e diversos desenvolvimentos na instrumentação foram realizados a fim de aprimorar e difundir as análises entalpimétricas (WASILEWSKI et al., 1964). A DIE, conforme mostrado na Figura 1, é uma técnica baseada na medição de variação de temperatura, ocorrida após a adição rápida de um pequeno volume de reagente estequiometricamente em excesso em relação à espécie que se deseja determinar (WASILEWSKI et al., 1964). Em relação às demais técnicas entalpimétricas, a DIE apresenta algumas vantagens com a simplicidade, rapidez e a possibilidade de executar a análise em apenas uma etapa. Entretanto, este método utiliza maiores quantidades de reagentes, devido à necessidade de adição da solução em excesso estequiométrico. No entanto, apesar de hoje em dia haver a disponibilidade de instrumentos comerciais para este fim, essas técnicas foram substituídas e quase desapareceram da literatura, provavelmente devido ao custo elevado de dispositivos de microcalorimetria e baixa reprodutividade, limitando o seu uso para análises de rotina e levando a utilização de outros métodos analíticos (BARIN et al., 2015).

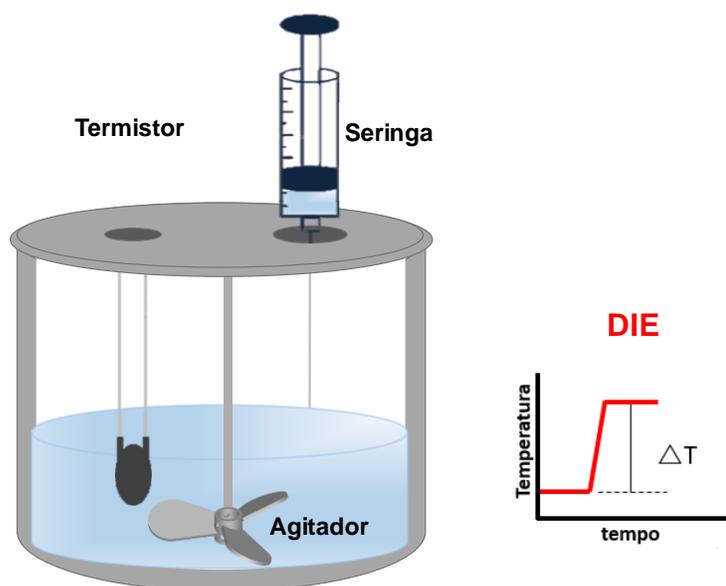


Figura 1. Ilustração do método entalpimétrico por injeção direta (DIE) convencional.

A medição de temperatura é um aspecto importante em qualquer processo industrial e a termografia no infravermelho tem revolucionado o conceito de medição de temperatura. A termografia no infravermelho é uma técnica não invasiva, permitindo o monitoramento da temperatura de um objeto sem contato e com rápido tempo de resposta, o que não é possível com outros sensores de temperatura (HORNAK, 2002). O processo é feito por meio da conversão da energia emitida pela superfície de materiais em imagens de distribuição de calor. A imagem é obtida pelos detectores sensíveis ao infravermelho, que captam a radiação térmica e a convertem em sinais elétricos. Esses sinais são normalmente proporcionais ao fluxo de radiação, por isso são amplificados, lidos e processados por meio de softwares e transformados em imagens termográficas ou termogramas. (SALES, 2008). Além disso, a velocidade de aquisição de imagens é elevada, podendo chegar à kHz, o que torna esta técnica especialmente adequada para explorar mudanças de temperatura (CUIBUS et al., 2014).

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, pipeta multicanal para a adição dos reagentes e uma câmera no infravermelho para monitoramento de temperatura da reação, conforme mostrado na Figura 2. A execução da 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 com o mesmo dispositivo. Os sinais analíticos podem ser obtidos rapidamente na TIE (cerca de 10 s), e a média de temperatura (ΔT) é determinada com o uso do software da câmera, considerando uma taxa de aquisição de imagens de 30 Hz, e 180 pixels para monitoramento de cada reação. Os valores são obtidos da média da temperatura inicial e final, em um intervalo de 2 s antes e 2 s após a injeção, respectivamente. Cerca de 10.800 valores de temperatura são considerados para determinar a média de cada temperatura e a curva de calibração é construída usando soluções de referência.

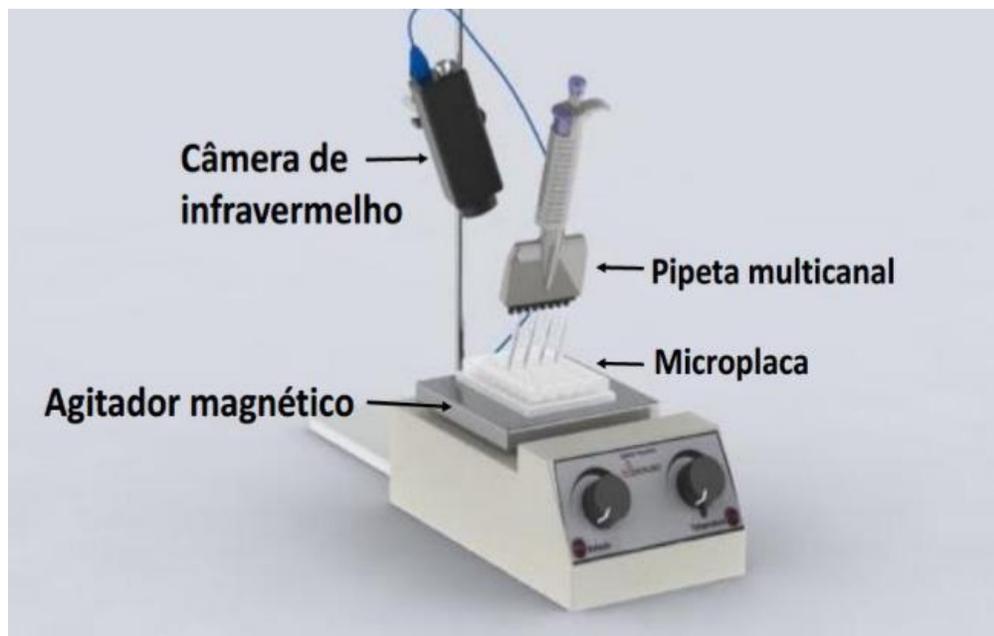


Figura 2. Arranjo experimental utilizado para análise por TIE (BARIN et al., 2015).

O método proposto mostrou resultados promissores, podendo ser uma alternativa viável para reações de neutralização, precipitação, complexação e redox, apresentando uma boa concordância (entre 96 e 101%) com os métodos oficiais de titulação, para amostras farmacêuticas (soro fisiológico, sulfato ferroso e comprimidos de carbonato de cálcio) e de alimentos (vinagres). De acordo com os autores, a TIE apresenta algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, como o uso de menor volume de reagentes e amostras, assim como a possibilidade de efetuar um maior número de replicatas, o que resulta em uma melhor precisão nos resultados. Com a TIE 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 (24 amostras por minuto ou 1140 amostras por hora), além disso, não é observada interferência na determinação com relação a cor, turbidez ou outros componentes presentes na amostra. Cabe ressaltar que o calor liberado na reação não causa interferências em poços vizinhos.

Uma alternativa para a determinação de acidez total em refrigerantes, bem como acidez total, fixa e volátil em vinho tinto, branco e espumante, foi proposta por Ferreira (2016) empregando a TIE e dispositivos de papel (filtro) como microplacas. Estes dispositivos de papel foram fabricados pelo método de impressão em jato de cera,

simulando uma microplaca convencional, tendo como características baixo custo, facilidade de uso e fabricação, elevada área superficial, portabilidade e biodegradabilidade. Comparado ao método convencional de titulação a TIE em dispositivo 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 excelente frequência de análises, que pode chegar à 480 amostras por hora para acidez total, e 120 amostras por hora para acidez fixa. Para a determinação da acidez fixa a etapa de concentração da amostra em papel mostrou ser muito mais rápida, reduzindo o tempo em até 4 vezes com relação ao método convencional devido, principalmente, ao menor volume de amostra utilizada e elevada razão superfície/volume do papel. A partir da TIE em papel foi possível obter uma redução no consumo de reagentes e amostras, sendo 200 vezes menor em relação à titulação convencional. Além disso, o consumo de energia também foi reduzido em até 60 vezes. Desta forma, foi possível obter um método analítico rápido e eficiente para a determinação da acidez de bebidas, onde o impacto ambiental deste método é considerado baixo, pois a produção de resíduos foi minimizada, além de serem utilizados reatores biodegradáveis, estando de acordo com os princípios da química analítica verde.

Tischer et al. (2017), determinaram acidez total, fixa e volátil de seis tipos de vinagres (arroz, balsâmico, maçã, vinho branco e vinho tinto) através da TIE, utilizando microplacas de poliestireno para realizar a análise entalpimétrica. Este método é caracterizado por sua rapidez, permitindo as etapas de preparação e determinação da acidez em uma mesma microplaca, evitando o excessivo manuseio da amostra (Figura 3). Além disso, a TIE não sofreu interferências com relação a coloração do vinagre, pois a reação não é monitorada pela mudança de cor, como pela titulação convencional, e sim pela variação de temperatura. Os resultados mostraram concordância com o método convencional para os diferentes tipos de vinagres, com uma precisão de 1,7 e 2,4% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente. O método proposto forneceu resultados rápidos para quatro amostras simultâneas, obtendo uma frequência de análise de 480 amostras por hora, além de reduzir consideravelmente o consumo de reagentes em cerca de quatro vezes, e o consumo energético em até dez vezes. Em relação aos resultados obtidos, é importante salientar que foram obtidas concordâncias adequadas

(de 93 a 108%) com o método convencional, mostrando-se uma alternativa promissora para o controle de qualidade deste produto aliando rapidez e facilidade de execução, demonstrando sua aplicabilidade em análises de rotina.

Estes estudos mostram o potencial da TIE e a possível aplicação desta técnica para outros analitos e amostras. Porém, nenhuma aplicação da TIE foi proposta visando explorar outros fenômenos térmicos, tais como aqueles observados no calor de diluição.

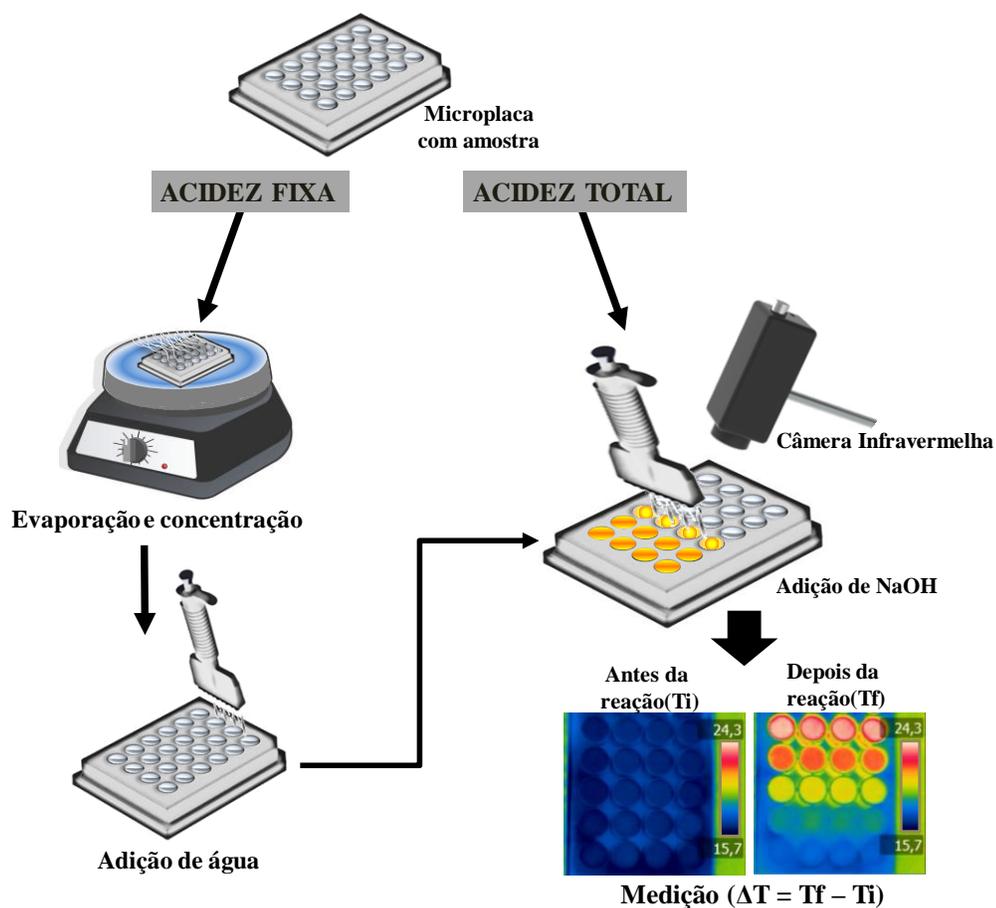


Figura 3. Procedimentos usados para a determinação de acidez em vinagres por TIE. Acidez volátil foi obtido pela diferença entre acidez fixa e total (TISCHER et al., 2017).

2.4 CALOR DE DILUIÇÃO

O processo de diluição de substâncias em um solvente geralmente vem acompanhado de um efeito térmico devido à interação entre as moléculas. A adição de solvente a uma solução de uma dada concentração produz uma solução mais diluída

(diluição) que é, via de regra, acompanhado de uma absorção ou liberação de calor. O calor de diluição pode ser calculado a partir do calor integral da solução original e da solução diluída final, em uma simples aplicação da lei de Hess (NETZ e ORTEGA, 2008). O termo calor de mistura, pode ser definido como a mudança de entalpia por mol de mistura, onde os componentes puros são misturados em temperatura e pressão constantes (LAMA e BENJAMIN, 1965). A dissolução do etanol em água é caracterizada como um processo exotérmico em toda a sua faixa de concentração (PEETERS e HUYSKENS, 1993). Cada molécula de etanol contém uma hidroxila, que formará ligações hidrogênio com a água, na qual um átomo de hidrogênio fica entre dois átomos pequenos, fortemente eletronegativos, que têm pares isolados de elétrons, no caso principalmente oxigênio. A molécula de água cede o átomo de hidrogênio, e o etanol, um átomo de oxigênio, que cede o par isolado de elétrons. Esta mistura caracteriza-se como exotérmica (LARKIN, 1975).

O calor de mistura entre água e etanol foi determinado a 0 e 25 °C à 1 atm, e a variação de entalpia foi verificada em um calorímetro conforme a fração molar da solução hidroalcoólica (Figura 4) (MAKAROVA, 1970). Os dados de entalpia foram obtidos pela sucessiva adição de pequenas quantidades de soluto, partindo de uma solução de composição conhecida.

Podemos observar na Figura 4 que os valores obtidos são característicos de processos exotérmicos, e a entalpia da reação diminui à medida que a quantidade de água é aumentada. Isso provavelmente indica que o número total de ligações de hidrogênio diminui nestas condições. A temperatura pode, também, exercer influência em parâmetros experimentais ou diretamente sobre o calor de diluição, tendo comportamentos diferentes de acordo com a temperatura dos líquidos (Figura 4). Este comportamento pode ser explicado devido a influência da temperatura das trocas de calor entre os líquidos com o recipiente e com a vizinhança. Cabe ressaltar que diferenças térmicas pequenas entre a temperatura dos líquidos e do ambiente levam a resultados mais precisos (PASQUINI, 1981).

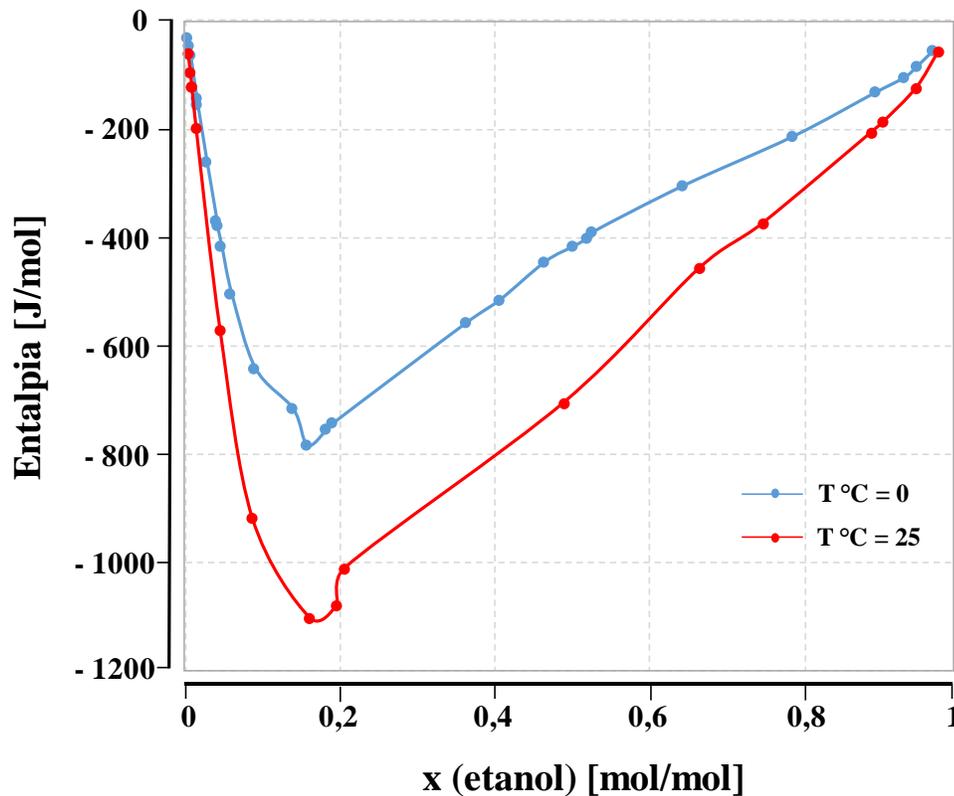


Figura 4. Gráfico da relação entre a fração molar de soluções hidroalcoólicas com a variação de entalpia. Adaptado de MAKAROVA, 1970; MAKAROVA, 1971.

O uso do calor de diluição para propósitos analíticos teve uma de suas primeiras aplicações no começo do século passado. Richmond e Merreywether (1917) determinaram a concentração de ácido sulfúrico, baseado no calor de diluição deste ácido em água. O método proposto é simples, onde foram exploradas variações de temperatura provenientes da diluição de 5 mL de H_2SO_4 em 400 g de água, com o uso de um termômetro de mercúrio, no interior de um frasco de Dewar. Apesar de ser um método rápido, os termômetros utilizados necessitavam de padronização e as correções apropriadas eram aplicadas. O frasco de Dewar pode fornecer bons resultados para medidas rápidas, nas quais as trocas de calor com o meio ambiente são pequenas. Porém, certos cuidados devem ser tomados quando se trabalha com líquidos muito voláteis e de baixo calor de diluição, pois em tais circunstâncias, a evaporação ou condensação dos vapores poderá ocorrer, como consequência da alteração da composição da solução (PASQUINI, 1981).

Métodos entalpimétricos automáticos de determinação de etanol em vinhos secos e outras bebidas alcoólicas foram descritos por Tep e Brun (1978), e Dupont (1978), respectivamente. Nesses métodos foi explorado o resfriamento proveniente da variação de entalpia do fenômeno endotérmico de diluição de uma solução concentrada de perclorato de sódio pela amostra que contém etanol. Cerca de 20 determinações por hora foram efetuadas. Precisões da ordem de 0,025 e 0,013% foram registradas. Porém, o instrumento utilizado é bastante complexo, exigindo um banho termostatizado com precisão de 0,01 °C e amostrador automático. O consumo de reagentes é alto, chegando a 2,5 mL de uma solução a 790 g/L de perclorato de sódio por determinação.

Oliveira e Pasquini (1984; 1988), demonstraram a possibilidade de se efetuar determinações de misturas água-etanol em diferentes faixas de concentração usando o calor de diluição em água. Os métodos são fundamentados nos princípios da DIE e entalpietria de injeção em fluxo, respectivamente. Pela DIE, foi determinada a quantidade de água presente em amostras de combustíveis, onde estes resultados foram comparados com o método por picnometria, obtendo uma concordância entre 98,7 a 100,4%. Porém, desvantagens como baixa praticidade pelo uso de frasco de Dewar e termistores, além de grande volume de amostra (50 mL) foram relatadas (OLIVEIRA e PASQUINI, 1984). Por entalpietria de injeção em fluxo, foi determinada a quantidade de etanol em vinhos e bebidas destiladas, através da adição de água, obtendo uma precisão de 0,03 – 0,1% e uma frequência de análise de 110 amostras por hora. No entanto, há a necessidade de destilação destas bebidas, para que se encaixem na faixa selecionada como mais precisa, além de que, com a destilação, interferentes normalmente presentes em vinhos, como glicose, frutose, e os ácidos málico e tartárico, que interferem no sinal analítico obtido, são eliminados (OLIVEIRA e PASQUINI, 1988).

3 DISCUSSÃO

Neste item estão descritos, na forma de manuscritos, os experimentos que foram feitos com base no enfoque do trabalho. O primeiro manuscrito consiste na determinação de etanol em bebidas destiladas, e no segundo estão os resultados referentes a determinação de etanol em vinhos.

**Manuscrito 1: A Reagent Free Direct Analysis of Alcoholic
Content of Distilled Beverages by Thermal Infrared
Enthalpimetry**

1 **A Reagent Free Direct Analysis of Alcoholic Content of**
2 **Distilled Beverages by Thermal Infrared Enthalpimetry**

3

4

5

(Manuscrito formatado para submissão ao periódico *Talanta*)

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19 **ABSTRACT**

20 In this work, a simple and fast method for the determination of alcoholic content of
21 distilled beverages by thermal infrared enthalpimetry (TIE) is proposed. Purified water
22 was added directly to beverages and the temperature increase caused by the heat of
23 dilution was monitored by using an infrared camera. A calibration curve was constructed
24 with hydroalcoholic reference solutions in order to determine the alcoholic content of
25 vodka, whisky and cachaça samples. The influence of the total volume in the reactor, the
26 stirring speed, the dispensing rate and the ratio between hydroalcoholic solutions and
27 water were evaluated to reach an optimum mixing and provide low variation among
28 measurements. The best conditions were 2.4 mL, 200 rpm, 0.57 mL s⁻¹ and 1.0:1.0 for
29 these parameters, respectively. For accuracy evaluation, the determination of alcoholic
30 content was also performed by conventional method (AOAC method 942.06,
31 pycnometry) and agreement ranged from 99.4 to 100.9%. No sample preparation (e.g.,
32 dilution, distillation) was required even for different beverages, decreasing the time for
33 analysis in at least one order of magnitude with a reduction in energy consumption of
34 almost three thousand times. According to these features and also to the high sample
35 throughput (up to 480 samples per hour), the proposed method could be considered as
36 suitable for routine analysis and in accordance with green analytical chemistry principles.

37

38 *Keywords:* spirits, alcoholic content, enthalpimetry, infrared thermal imaging,
39 thermography, green chemistry.

40

41 1. INTRODUCTION

42 Alcoholic content of beverages is a parameter often used for quality control during
43 production and also to verify the standard of products commercialized [1]. Distilled
44 beverages are classified according to the raw material used as well as the kind of distiller
45 employed and must contain alcoholic contents between 36 to 54 °GL [2]. According to
46 the Association of Official Analytical Chemists[3], the most used methods for alcoholic
47 content determination in distilled beverages are based on a previous distillation step
48 followed by the determination of ethanol by picnometry (standard method 942.06),
49 densimetry (standard method 982.10) or refractometry (standard method 950.06). These
50 official methods presented some features as low complexity and the use of low cost
51 apparatus, but they are time consuming and require constant attention, leading to low
52 throughput.

53 Alternative methods have been proposed for alcoholic content determination of
54 beverages, as gas chromatography (GC) [4, 5], which provide high resolution and
55 sensitivity for analysis. However, these methods demand specialized analysts and
56 instrumentation in the most cases a pre-treatment of samples is required. High
57 performance liquid chromatography (HPLC) has been also used for this purpose, but
58 some organic compounds from samples can cause interferences in the determination [6].
59 Other alternative methods based on Raman spectroscopy and the use of enzyme-based
60 biosensors have been proposed, but again some interferences from sample matrix could
61 impair the determination [7, 8]. A flow injection system based on the Schlieren effect was
62 also proposed for determination of alcoholic content in a simple and fast way, but the
63 presence of sugar and proteins lead to some interferences [9]. Therefore, the
64 determination of ethanol in distilled beverages remains a challenging activity for routine
65 analysis, and the development of robust, easy-to-use and fast methods is still required.

66 Thermal infrared enthalpimetry (TIE) was introduced recently in the literature as
67 an alternative to conventional titration methods for quality control of food and
68 pharmaceuticals [10, 11]. This technique consisted on the monitoring of the enthalpy
69 variation during a chemical reaction using an infrared camera. Samples were introduced
70 in disposable microplates with direct addition of a reagent in stoichiometric excess under
71 stirring. In this way, the analysis could be performed in a unique step and around 10 s
72 were enough to obtain analytical signals for four replicates. Several advantages were
73 reported for this method as the non-invasive temperature measurement, the fast response
74 time and the high throughput. In addition, the equipment used for analysis and data
75 treatment is very simple and it was possible to perform simultaneous analysis of several
76 samples [10]. Neutralization, redox, precipitation and complexing reactions were
77 explored, allowing the determination of acidity, iron, chloride and calcium in food and
78 pharmaceuticals. Recently, Tischer et al. reported the use of TIE for a high throughput
79 analysis of acidities (volatile, fixed and total acidity values) of vinegars [11]. Sample
80 preparation (evaporation of vinegar for fixed acidity evaluation) and determination steps
81 were performed in each well of microplate, avoiding sample handling and improving the
82 precision in analysis [11].

83 A new method for fast analysis of ethanol in distilled beverages using TIE is
84 proposed exploring the phenomenon of heat of dilution of alcoholic samples with water.
85 For this purpose, purified water was added directly to beverage under stirring, with the
86 determination of temperature before and after mixture. In this way, no sample preparation
87 or reagents were required allowing the analysis in a single step. The influence of total
88 volume of solution inside the vessel, ratio of solutions, stirring speed and dispensing rate
89 were evaluated. The linear range for calibration was studied and the results for cachaça,
90 vodka and whisky samples were compared with those from AOAC method.

91 2. EXPERIMENTAL

92 2.1 Samples, standards and reagents

93 Samples of vodka, whisky and cachaça from different manufacturers were
94 purchased in local market. Absolute ethanol (Dinâmica, Brazil) was used for preparation
95 of reference solutions for construction of the calibration curve. Distilled and deionized
96 water was further purified on a Milli-Q system (Direct-Q 3 UV, 18.2 MΩ·cm, Millipore
97 Corp., Bedford, MA), and this was used to prepare all solutions as well as to provide
98 temperature rise by means of heat of dilution of alcoholic solutions. Antifoam
99 polydimethylsiloxane (2%, m/v, Ultralub, Brazil) was used for distillation of samples by
100 the conventional method.

101

102 2.2 Instrumentation

103 A long wave infrared camera (8.5-13.0 μm, FLIR E60 model, FLIR, USA), which
104 provided images of 320x240 pixels at frame rate of 30 Hz was used. Images were
105 processed using ResearchIR software (FLIR). The reactions were performed in
106 disposable polystyrene 24-well microplates with internal volume of 3.0 mL (Nest
107 Biotechnology, China). Electronic multichannel pipette (8 channels, 0.050 to 1.2 mL, Pro
108 Research 1200, Eppendorf, Hamburg, Germany) was used for simultaneous injection of
109 water in hydroalcoholic solutions in four wells. A magnetic stirrer (Centauro, Brazil) was
110 used to homogenize solutions. For the determination of alcoholic content according to
111 official method, an analytical balance (Shimadzu, A1Y220 model, Japan), a Liebig
112 apparatus for distillation, an ultrathermostatic bath (Solab, SL 152/10, Brazil) and a
113 borosilicate glass pycnometer (25 ± 0.001 mL) were used. Energy consumption was
114 measured by a power meter (Fluker 43B model, Fluke Corporation, Everett, WA, USA).

115

116 **2.3 Analysis by conventional method**

117 The determination of alcoholic content was performed according to method
118 942.06 of AOAC (2005) using a Liebig distillation apparatus (Figure 1). Five drops of
119 antifoaming were added to assure a suitable distillation. Afterwards, the liquid was
120 transferred to the pycnometer. The relative density of the distillate was determined at 20
121 °C and this value was converted according to the table 913.06 of AOAC (2005) for the
122 alcoholic content.

123

124 **2.4 TIE analysis**

125 Hydroalcoholic solutions (from 5 to 60% of ethanol, v/v) were added in wells with
126 further addition of water, as showed in Figure 1. A polytetrafluoroethylene covered
127 magnetic stir bar (1.5x3.5 mm) was added in each well to improve homogenization. The
128 temperature of reaction was monitored before, during and after injection of water. Using
129 the software of camera, a circle with 180 pixels was used for monitoring the temperature
130 of each well and the average of these temperatures was plotted forming an enthalpogram
131 [10]. The difference of temperature (ΔT) was obtained from equation $\Delta T = T_f - T_i$, where
132 T_f and T_i are the final and initial temperatures, respectively [10]. These temperatures were
133 obtained using the mean of temperature values obtained from 2 s before and after the
134 mixture of solutions. The 24 wells of microplate were used in all experiments ($n=24$).

135 Before the determination of alcoholic content of distilled beverages by TIE, a
136 previous optimization was performed. The total volume of the solution in each well, the
137 stirring speed and the water dispensing rate were evaluated, as well as the ratio of
138 hydroalcoholic solutions and water. Initially, the total volume in the well was evaluated

139 considering the same volume of hydroalcoholic solutions and water (1.0:1.0 ratio) in the
140 range between 1.4 and 2.4 mL, with dispensing rate of the electronic pipette set at level
141 8. The stirring speed was 150 rpm during this experiment. Afterwards, the stirring speed
142 was evaluated in the range of 100 to 350 rpm, taking into account the total volume
143 previously established. The dispensing rate of electronic pipette was evaluated in the
144 range of levels 5 to 10 (corresponding to 0.41; 0.46; 0.50; 0.57; 0.63 and 0.71 mL s⁻¹
145 respectively). Finally, the ratio of hydroalcoholic solutions to water was evaluated from
146 1.0:1.0 to 1.7:1.0. For all experiments, hydroalcoholic solutions with 40% (v/v) of ethanol
147 were used and the variation of temperature (ΔT) and the relative standard deviation (RSD)
148 among measurements were considered for evaluation of results.

149 Parameters of merit were evaluated, as working range, limit of detection (LOD)
150 and limit of quantification (LOQ) [12]. The data were evaluated using analysis of variance
151 (ANOVA) followed by Tukey test ($p \leq 0.05$) using 5.1 Software Statistica 5.1 (Statsoft,
152 2004, EUA). The working range was evaluated using reference solutions and the outliers
153 were evaluated using a F-test of residues from the curve [13]. Blanks were performed
154 using purified water instead hydroalcoholic solutions in the wells and following the same
155 procedure used for reference solutions and samples.

156

157 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

158

159 **3.1 Optimization of dilution for TIE analysis**

160 Before the determination of alcoholic content of distilled beverages, a previous
161 optimization was performed, where the influence of total volume in wells, stirring speed
162 of homogenization, dispensing rate of multichannel pipette, and ethanol/water ratio was

163 evaluated. Considering the similar ethanol content of samples, a previous optimization
164 was performed using a reference solution containing 40% (v/v) of ethanol. The results
165 obtained are shown in Figure 2.

166 Based on these results, it was possible to see the effect of experimental parameters
167 on the RSD and ΔT values. For total volume, the best condition was found when highest
168 volume was used, with higher ΔT and lower RSD. The volume was not increased even
169 more due to difficulties in stirring and the formation of bubbles, which impaired the
170 measurement of temperature. Stirring is a very important parameter for TIE analysis,
171 because an efficient homogenization ensure a reproducible and rapid release of heat. The
172 ideal stirring process is the one which assures the homogeneity of the mixture, avoiding
173 evaporation and increasing the signal to noise ratio. In this sense, according the Figure 2,
174 stirring speed up to 200 rpm allowed suitable homogenization, but for higher stirring
175 speeds samples were lost by overflow. The dispensing rate is another important parameter
176 for TIE. For lower dispensing rates (0.41 and 0.46 mL s⁻¹), the obtained signal (ΔT , °C)
177 was low and the RSD was high due the presence of the pipette tip in front of the camera
178 during mixing of solutions, impairing the accurate measurement of temperature. Problems
179 were also observed for faster dispensing rates (0.63 and 0.71 mL s⁻¹) due to the fast
180 dissipation of heat, causing problems related to the precision and the accuracy of
181 measurements. However, for intermediate dispensing rates (0.5 and 0.57 mL s⁻¹) higher
182 temperatures and lower RSD values were obtained, and the rate of 0.57 mL s⁻¹ was
183 chosen.

184 The ratio between hydroalcoholic solution and water was evaluated. The
185 dissolution of ethanol in water is an exothermic process in the whole concentration range,
186 which occurs probably due to decrease of the total number of hydrogen bonds for the
187 mixture in relation to the pure solvent [14]. In general, excess enthalpies are highly

188 influenced by the fluid structure and the number of hydrogen bonds formed, therefore,
189 the proportion of two substances could influence the heat released in these mixtures [15].
190 The best condition was the ratio 1.0:1.0; when this ratio was increased, the RSD of
191 measurements was increased probably due to the lack of homogenization in such
192 conditions. In addition, the amount of water is reduced in higher ratios leading to lower
193 heat generation by dilution. In this sense, the experiments were performed using 2.4 mL
194 as total volume, 200 rpm as stirring speed, 0.57 mL s^{-1} as dispensing rate and 1.0:1.0 ratio
195 between hydroalcoholic solution and water.

196

197 **3.2 Determination of alcoholic content of distilled beverages**

198 The calibration curves obtained with reference solutions are shown in Figure 3.
199 The calibration curve obtained followed a polynomial fit by using reference solutions
200 from 5 to 60% (v/v, Figure 3a). For reference solutions below 25% ethanol the
201 temperature change was low and followed a non-linear behavior. However, the samples
202 evaluated presented ethanol concentration far from this region, therefore, these solutions
203 were not considered for construction of calibration curve and a linear response was
204 observed ranging from 25 to 60% (v/v) ethanol (Figure 3 b). This behavior is in
205 accordance with other studies, which reported the same profile for heat of dilution of
206 ethanol and water [16, 17]. Therefore, the working range was established for solutions
207 containing from 25 to 60% (v/v) of ethanol, showing a calibration curve with a suitable
208 linearity.

209 In order to evaluate the accuracy of the proposed method a comparison with
210 standard method (AOAC 942.06, pycnometry) was performed. The obtained results using
211 TIE and the official method are shown in Table 1. Based on these results, a good

212 agreement of results of the proposed with the official method was obtained, ranging from
213 99.4% to 100.9% for vodka, whisky and cachaça, respectively. The deviations of
214 measurements were lower for conventional method in relation to TIE, with RSD ranging
215 from 0.2 to 0.7% and 0.7 to 1.1%, respectively. These results demonstrated that direct
216 determination of ethanol by TIE method allowed low variation of results, considering that
217 several compounds are present together with ethanol and water, and no sample
218 preparation was performed. For conventional method, the distillation step separate
219 ethanol and water from other non-volatile compounds of beverage, avoiding interference
220 on measurements. According to the literature [4, 6-9], the alternative methods provided
221 RSD ranging from 1.0 to 4.6%. These alternatives methods were proposed without a
222 previous distillation, but using dilution [6, 7, 9] and internal standards [8] approaches to
223 avoid interferences from matrix. Therefore, the proposed TIE method could be considered
224 as a robust alternative to conventional method, providing lower deviations among
225 measurements in comparison to other alternative methods reported in literature. It is
226 important to highlight that the possibility of direct analysis using TIE lead also to other
227 benefits for routine analysis, as a tremendous reduction in the time for analysis with high
228 impact in sample throughput. For example, the time spent in TIE to perform 24 replicates
229 is only 3 min, which is 75 times lower than the official method (considering 3 replicates).

230

231 **3.3 Figures of merit**

232 The calibration curve used to determine the alcoholic content of samples shown a
233 good linearity ($R^2=0.9995$) in the range of 25 and 60% (v/v) of ethanol. The limits of
234 detection (LOD, 3σ) and quantification (LOQ, 10σ) were calculated considering the
235 average of blank and they were 18.74% and 21.53% (v/v) ethanol, respectively. The LOQ

236 obtained was enough for evaluation of distilled beverages studied, which should present
237 minimum alcoholic content of 36% according to Brazilian legislation [2].

238 A comparison of the features and the drawbacks of TIE and AOAC 943.06
239 methods are shown in Table 2. Based on those results, it was possible to highlight the
240 reduction of volume of reagents and sample amount by using TIE, being necessary the
241 use of only purified water as reagent to determine the alcoholic content of beverages. The
242 contactless measurement of temperature is another important feature of TIE, because
243 there was no need of cleaning the devices for temperature measurement among the
244 determinations that is more suitable for routine analysis. Another important advantage of
245 TIE in comparison to method conventional is the simplicity of operations, and only an
246 unique step of reagent addition (purified water) was required. Therefore,
247 the use of a previous distillation was avoided with elimination of the use of reagents (e.g.,
248 antifoam). It is important to highlight that TIE could be used for evaluation of reactions
249 without the interference of other components from the matrix. Thus, it is expected that
250 TIE could be used for other distilled beverages not covered in this study.

251 The proposed TIE method allowed the analysis of 480 samples in 1 h, while for
252 the conventional method it was not possible to determine even one sample in such time.
253 Taking into account the energy consumption of both methods, is important to mention the
254 high expenditure of the official method, which consumed 2940 more energy. Therefore,
255 the use of TIE could be considered as an important alternative to perform the
256 determination of alcoholic content of distilled beverages in a green and easy-to-use way,
257 simplifying analytical operations and the impact of such analysis on the environment.

258

259 **4. CONCLUSIONS**

260 The proposed TIE method was a promising alternative to the conventional method
261 for alcoholic content determination of distilled beverages. Some advantages can be
262 highlighted as the possibility to determine the alcoholic content using only water as
263 reagent, the elimination of sample preparation step and the reduction of time for analysis
264 in 480 times. In addition, is possible to mention that the amount energy consumption is
265 reduced drastically (three orders of magnitude) in comparison with the conventional
266 method. Taking account all advantages of the proposed method, it was possible to
267 conclude that it is a suitable alternative for routine analysis comprising the green
268 analytical chemistry features.

269 **Table 1** Results (mean \pm standard deviation) of alcoholic content of distilled beverages
 270 using TIE ($n=24$) and conventional AOAC 943.06 ($n=3$) methods.

Alcoholic beverages	Manufacturer	TIE	CONV
Vodka	A	37.07 \pm 0.33	36.83 \pm 0.15
	B	37.76 \pm 0.28	37.53 \pm 0.12
	C	38.26 \pm 0.28	37.83 \pm 0.06
Whisky	A	39.41 \pm 0.34	39.07 \pm 0.12
	B	39.86 \pm 0.34	39.73 \pm 0.12
	C	39.81 \pm 0.36	39.63 \pm 0.06
Cachaça	A	38.91 \pm 0.34	38.77 \pm 0.06
	B	39.08 \pm 0.42	39.33 \pm 0.12
	C	38.87 \pm 0.41	38.80 \pm 0.26

*Values informed in the label: vodka A (37.5%), B (38.0%) and C (38.5%); whisky A, B, C (40.0%);
 cachaça A, B, C (39.0%).

271

272

273 **Table 2** Comparison of parameterd of TIE with those from conventional method (AOAC
 274 943.06) for determination of alcoholic content of distilled beverages.

Parameters	TIE	CONV
Volume of sample (mL)	1.2	100
Reagent consumption (mL)	-	1 ^a
Time spent per run (min)	3	75
Samples throughput (samples per h)	480	0.8
Energy consumption (kWh)	0.001 ^b	2.94 ^c

^apolydimethylsiloxane (2%, m/v).

^benergy consumed by pipette, infrared camera and magnetic stirrer.

^cenergy consumed by water bath and ultrathermostatic bath.

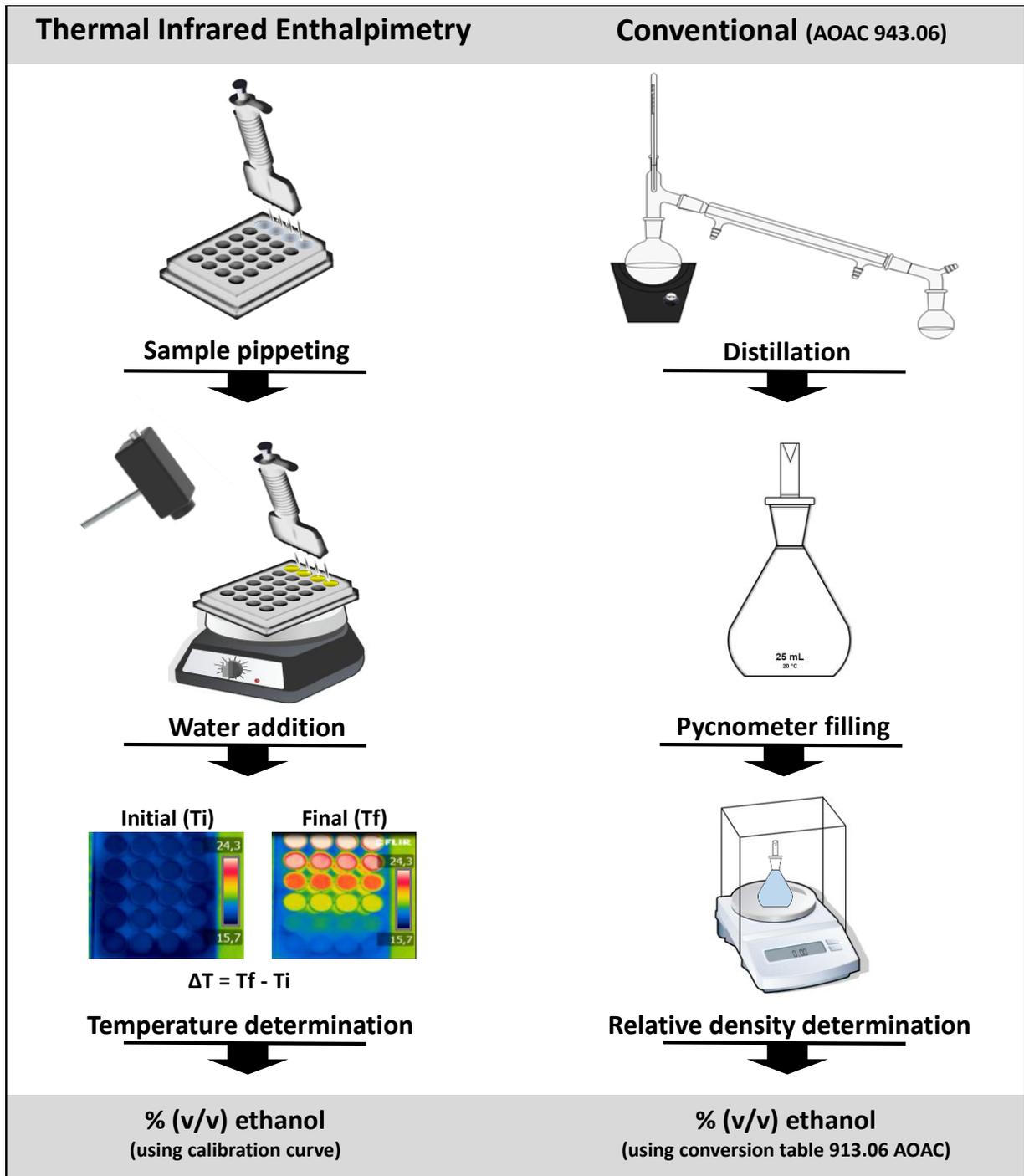
276 **Figure captions**

277 **Figure 1.** Procedures used for determination of alcoholic content of distilled beverages.

278 **Figure 2.** Influence of some parameters in TIE, a) total volume, b) stirring, c) dispensing,
279 d) ratio of solutions. Same letters indicate that data did not differ statistically (Tukey test,
280 $p \leq 0.05$).

281 **Figure 3.** Calibration curves obtained using hydroalcoholic reference solutions a) 5 –
282 60% (v/v) ethanol b) 25 – 60% (v/v) ethanol.

283 Figure 1.

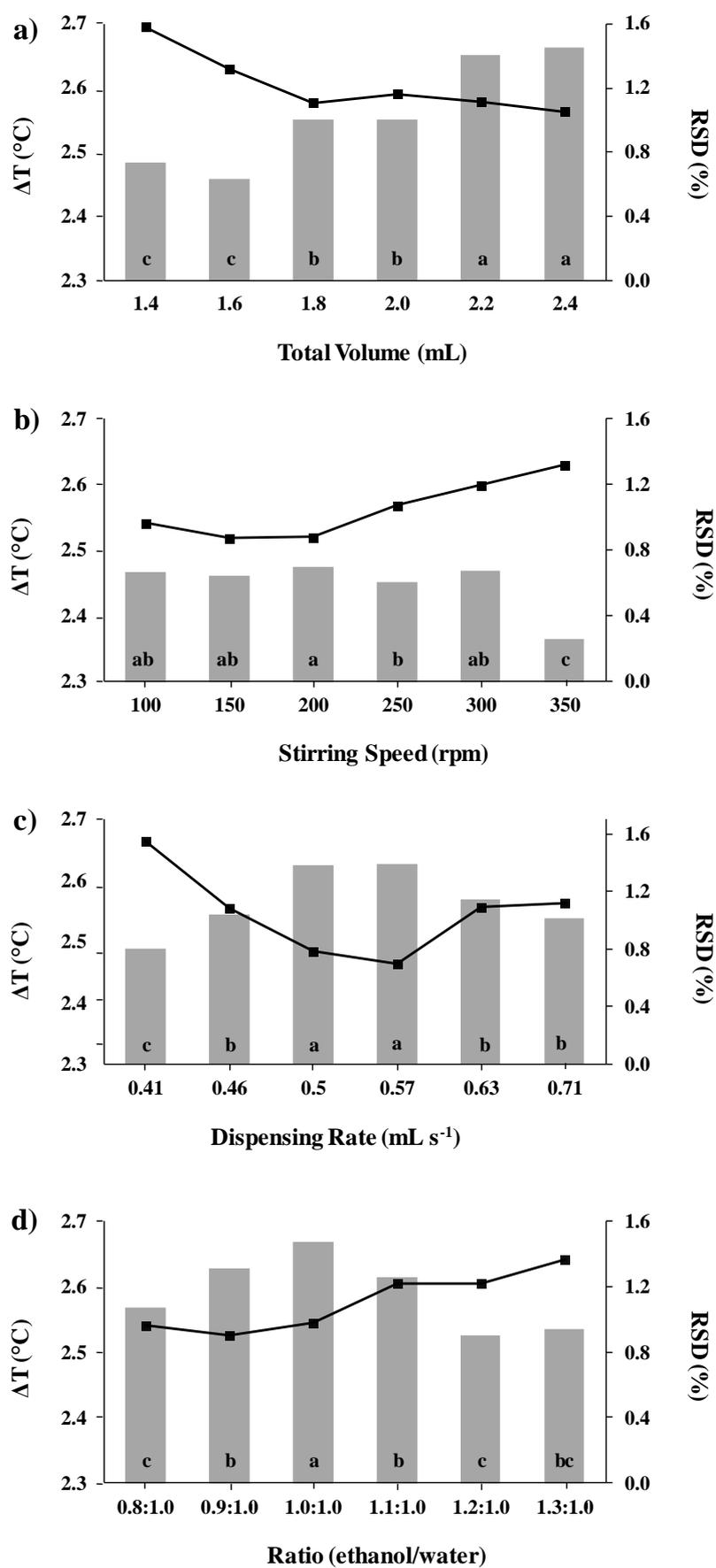


284

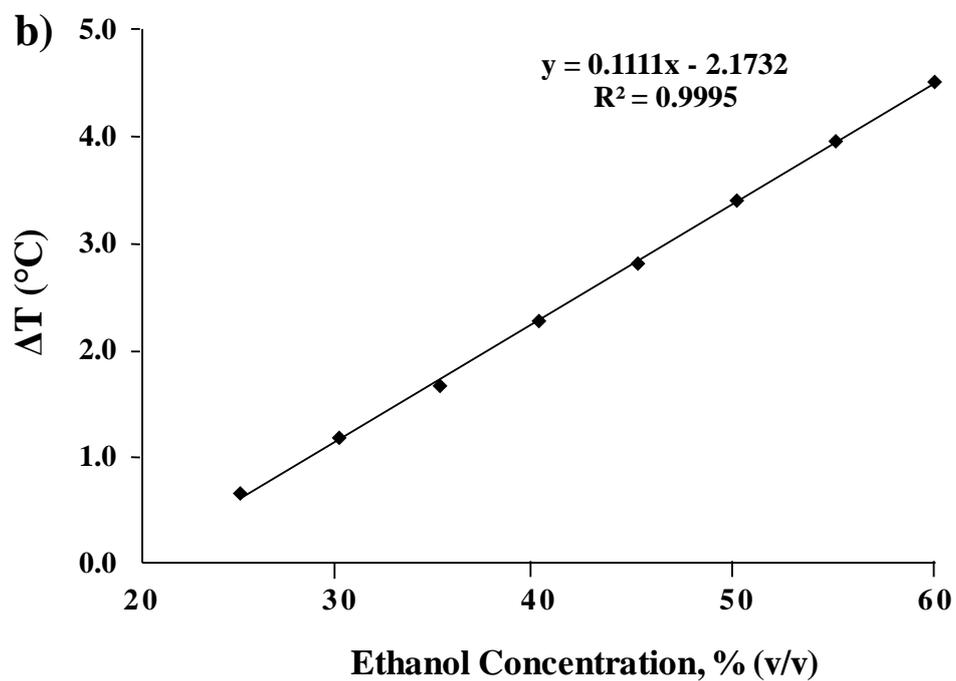
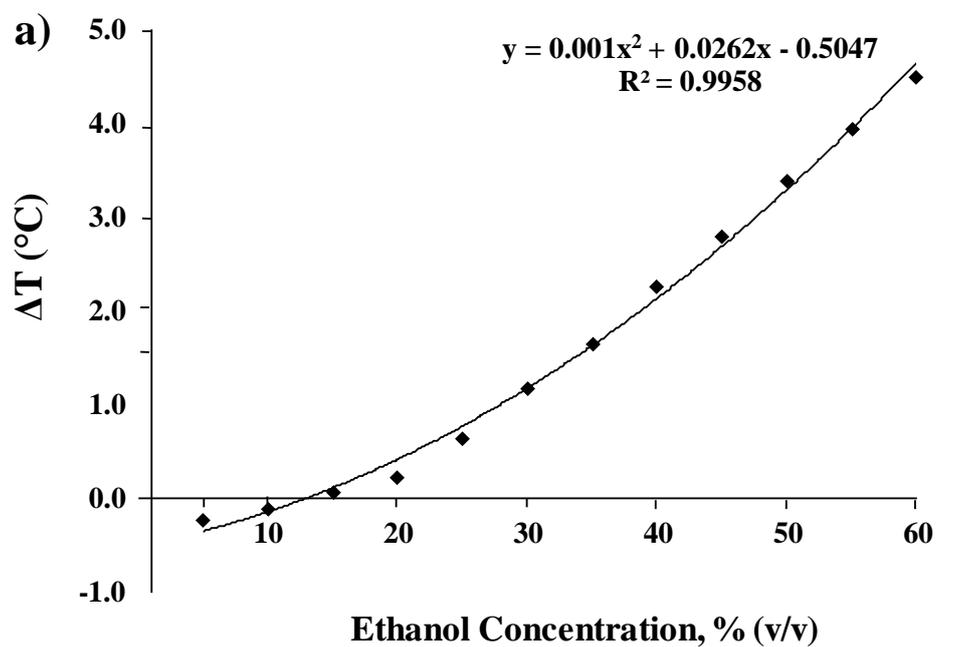
285

286

287 Figure 2.



289 Figure 3.



REFERENCES

- [1] S.S. Bozkurt, E. Merdivan, Y. Benibol, A fluorescent chemical sensor for ethanol determination in alcoholic beverages, *Microchimica Acta* 168(1) (2010) 141-145.
- [2] MAPA, Lei n. 8.918, que dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas, in: P.e.A. Ministério da Agricultura (Ed.) Brazil, 1994.
- [3] AOAC, Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists Maryland, Gaithersburg, 2005.
- [4] M.L.C. Wang, Y. M.; Su, N. W.; Lee, M. H. , A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography, *Journal of Food and Drug Analysis* 11 (2003) 133-140.
- [5] P. Wiśniewska, M. Śliwińska, T. Dymerski, W. Wardencki, J. Namieśnik, The analysis of vodka: a review paper, *Food Analytical Methods* 8(8) (2015) 2000-2010.
- [6] T. Yarita, R. Nakajima, S. Otsuka, T. Ihara, A. Takatsu, M. Shibukawa, Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography–flame ionization detection using pure water as mobile phase, *Journal of Chromatography A* 976(1–2) (2002) 387-391.
- [7] L. Rotariu, C. Bala, V. Magearu, New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages, *Analytica Chimica Acta* 513(1) (2004) 119-123.
- [8] I.H. Boyaci, H.E. Genis, B. Guven, U. Tamer, N. Alper, A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy* 43(8) (2012) 1171-1176.
- [9] S.S.M.P. Vidigal, A.O.S.S. Rangel, A reagentless flow injection system for the quantification of ethanol in beverages based on the Schlieren effect measurement, *Microchemical Journal* 121 (2015) 107-111.
- [10] J.S. Barin, B. Tischer, A.S. Oliveira, R. Wagner, A.B. Costa, E.M. Flores, Infrared thermal imaging: a tool for simple, simultaneous, and high-throughput enthalpimetric analysis, *Analytical Chemistry* 87(24) (2015) 12065-12070.
- [11] B. Tischer, A.S. Oliveira, D.d.F. Ferreira, C.R. Menezes, F.A. Duarte, R. Wagner, J.S. Barin, Rapid microplate, green method for high-throughput evaluation of vinegar acidity using thermal infrared enthalpimetry, *Food Chemistry* 215 (2017) 17-21.
- [12] Eurachem, The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. (2nd ed.). Available from: <http://www.eurachem.org>, 2014.
- [13] N.R. Draper, H. Smith, Applied Regression Analysis, 2 ed., New York, 1981.
- [14] D. Peeters, P. Huyskens, Endothermicity or exothermicity of water/alcohol mixtures, *Journal of Molecular Structure* 300 (1993) 539-550.
- [15] W.A. Fouad, L. Wang, A. Haghmoradi, D. Asthagiri, W.G. Chapman, Understanding the thermodynamics of hydrogen bonding in alcohol-containing mixtures: coss-association, *The Journal of Physical Chemistry B* 120(13) (2016) 3388-3402.

[16] J.A. Boyne, A.G. Williamson, Enthalpies of mixing of ethanol and water at 25/sup 0/C, Journal of Chemical and Engineering Data (1967) 218.

[17] W.A. de Oliveira, C. Pasquini, Determination of ethanol using flow injection enthalpimetry, Analyst 113(2) (1988) 359-360.

**Manuscrito 2: Rapid Single Step Determination of
Alcoholic Content of Wines Using Thermal Infrared
Enthalpimetry**

1 **Rapid Single Step Determination of Alcoholic Content of**
2 **Wines Using Thermal Infrared Enthalpimetry**

3

4

5

(Manuscrito formatado para submissão ao periódico *Microchemical Journal*)

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20 **ABSTRACT**

21 An innovative use of thermal infrared enthalpimetry (TIE) is proposed to determine
22 alcoholic content of wine samples. Absolute ethanol was added directly on wines and the
23 temperature rise caused by the heat of dilution was monitored using an infrared camera.
24 Analytical signals were obtained in only 10 s for four samples simultaneously, and a
25 calibration curve was constructed with hydroalcoholic solutions in order to determine the
26 alcoholic content of red and white wines. A linear calibration curve was obtained from
27 3.0 to 18.0% (v/v) ethanol ($R^2=0.9991$). The results showed agreement with conventional
28 method (AOAC method, 942.06, pycnometry), and organic compounds as sugars did not
29 interfere in the determinations. The proposed method provided fast results, with a
30 throughput of 480 samples per hour and negligible energy consumption (0.001 kWh).
31 Therefore, the proposed TIE method could be considered as a suitable alternative for
32 routine analysis fulfilling the requirements of the green analytical chemistry.

33

34 *Keywords:* wine, fermented beverages, infrared thermal imaging, enthalpimetry, ethanol,
35 green analytical chemistry

36 1. INTRODUCTION

37 Wine is a complex beverage composed by a mixture of ethanol, water and several
38 organic compounds, such as tartaric and malic acids, sugars and esters of fat acids, which
39 provide its characteristic flavor [1, 2]. Ethanol is formed during the fermentation and it
40 contributes for important organoleptic characteristics and also to maintain the stability of
41 wines due to its inhibitory action on microorganisms [3]. Therefore, the alcoholic content
42 of wines is a very important parameter for quality control and the determination of ethanol
43 is routinely performed in wineries.

44 The determination of ethanol is generally carried out according to the official
45 methods, which recommend a previous distillation step to separate ethanol from
46 beverage. After distillation, the determination of ethanol could be performed by gas
47 chromatography, picnometry, densitometry or refratometry or even by redox titration
48 using potassium dichromate [4]. In spite of the usefulness of such methods, the
49 methodology is laborious, requiring attention of analyst during all analysis and
50 consuming long time to be performed. In addition, the use of high amount of samples, the
51 low throughput and the high consumption of energy for sample preparation have
52 impairing these methods for routine applications.

53 In this sense, some alternative methods for the determination of alcoholic content
54 of wines have been proposed. Among them, it is possible to highlight the use of enzymatic
55 biosensors [5] and flow injection systems [6-8] for the development of fast and simple
56 methods. A flow injection system using ceric ammonium nitrate and nitric acid to
57 determine ethanol by colorimetry was proposed [8]. Other methods were proposed using
58 GC-FID for simultaneous determination of several alcohols without a previous distillation
59 step [9-11]. The use of spectroscopic techniques (NIR, FT-MIR) allowed a fast and simple
60 tool for direct alcoholic content determination. However, the presence of dissolved sugars

61 can cause some interferences, leading to results with low precision and problems in
62 accuracy [12, 13]. Despite the improvements generally observed in the time for analysis,
63 these methods require a pre-treatment as incubation, cells standstill and sample dilution,
64 limiting their use.

65 A fast and high throughput analytical technique was developed recently
66 combining the features of infrared thermal imaging with enthalpimetric analysis [14]. The
67 proposed thermal infrared enthalpimetry (TIE) method was performed using disposable
68 microplates as reactors, a multichannel pipette for direct injection of reagents and an
69 infrared camera for simultaneous monitoring of the temperature change of solutions from
70 multiple wells [14]. Several reactions were explored, as neutralization, redox,
71 precipitation and complexation, and only 10 s were enough to obtain analytical signals
72 from four wells simultaneously. The results presented good agreement with those from
73 titration methods, allowing the determination of calcium, iron and chloride in
74 pharmaceuticals and also the total acidity of vinegars [15]. Tischer et al. expanded the
75 application of TIE for vinegar quality control and performed the determination of total,
76 fixed and volatile acidities [15]. In this work, sample preparation and determination steps
77 were performed in the same microplate, avoiding excessive sample handling and reaching
78 a throughput of almost five hundred samples per hour, which is at least twenty times
79 higher than the conventional methods. The energy consumption was another important
80 feature of TIE, with a reduction in one order of magnitude in relation to conventional
81 methods [15].

82 The heat of dilution of mixtures between ethanol and water was used for the
83 determination of alcoholic content of distilled beverages by TIE [16]. This reagentless
84 method was performed by simple addition of water on beverages, without the need of any
85 previous treatment of samples. In this way, the analytical operations were reduced to only

86 one step, which is a tremendous simplification in comparison to the official methods,
87 which required a previous distillation for sample preparation [4]. Some advantages as the
88 decrease of sample amount and reagents used, improvement of sample throughput and
89 the possibility to perform a high number of replicates when compared to official methods
90 were reported. Despite the good results presented for the determination of alcoholic
91 content of distilled beverages, the same approach could not be used for beverages with
92 lower ethanol content, which are below the detection limit reached (18.7%, v/v ethanol)
93 [16]. Therefore, in this work ethanol was added to different kinds of wines to allow the
94 indirect determination of alcoholic content according to the heat released by dilution of
95 the water from such beverages. In this sense, the samples were inserted in the microplate
96 and ethanol was added using a multichannel pipette and the temperature change was
97 recorded by an infrared camera. The influence of total volume of solution inside the well,
98 ratio of solutions, stirring speed and dispensing rate were studied in order to reach lower
99 deviations among measurements. The linear range for calibration was studied and the
100 accuracy was evaluated by comparison with AOAC method (942.06, pycnometry).

101

102 **2. EXPERIMENTAL**

103

104 **2.1 Samples and reagents**

105 Samples of red and white wines (dry and sweet) from different manufacturers
106 were purchased in local market. Absolute ethanol (Dinâmica, Brazil) was used for
107 preparation of reference solutions used for construction of the calibration curve.
108 Deionized water was further purified on a Milli-Q system (Direct-Q 3 UV, 18.2 M Ω ·cm,
109 Millipore Corp., Bedford, MA) and it was used to prepare reference solutions. Antifoam

110 polydimethylsiloxane (2%, m/v, Ultralub, Brazil) was used for distillation by the
111 conventional method. Sucrose (Dinâmica, Brazil) was used to evaluate interferences of
112 organic compounds on measurements.

113

114 **2.2 Instrumentation**

115 A long wave infrared camera (8.5-13.0 μm , FLIR E60 model, FLIR, USA), which
116 provided images of 320x240 pixels at a frame rate of 30 Hz was used. Images were
117 processed using ResearchIR software (FLIR). The reactions were performed in
118 disposable polystyrene 24-well microplates, with each well having an internal volume of
119 3.0 mL (Nest Biotechnology, China). Electronic multichannel pipette (8 channels, 0.050
120 to 1.2 mL, Pro Research 1200, Eppendorf, Hamburg, Germany) was used for
121 simultaneous injection of ethanol and a magnetic stirrer (Centauro, Brazil) was used to
122 homogenize solutions. For the determination of alcoholic content according to official
123 method, an analytical balance (Shimadzu, A1Y220 model, Japan), a Liebig apparatus
124 distillation, an ultrathermostatic bath (Solab, SL 152/10, Brazil) and a borosilicate glass
125 pycnometer (25 ± 0.001 mL) were used. Energy consumption was measured by a power
126 meter (Fluker 43B model, Fluke Corporation, Everett, WA, USA).

127

128 **2.3 Analysis by conventional method**

129 The determination of alcoholic content was performed according to the method
130 942.06 of AOAC, using a Liebig distillation apparatus. To avoid foam formation 5 drops
131 of polydimethylsiloxane were added to assure a controlled distillation. After distillation,
132 the liquid was transferred to the pycnometer and the relative density of the distillate was

133 determined at 20 °C with conversion to the alcoholic content according to the table 913.06
134 of AOAC.

135

136 **2.4 TIE analysis**

137 Hydroalcoholic solutions (from 3.0 to 18.0%, v/v, 1.2 mL) or samples (1.2 mL)
138 were added in wells followed by addition of ethanol (1.2 mL) A polytetrafluoroethylene
139 covered magnetic stir bar (1.5 x 3.5 mm) was added in each well to improve
140 homogenization. The temperature of reaction was monitored before, during and after
141 injection of ethanol. Using the software of camera, a circle with 180 pixels was used for
142 monitoring the temperature of each well and the average of these temperatures was plotted
143 forming an enthalpogram. The difference of temperature (ΔT) was obtained from equation
144 $\Delta T = T_f - T_i$, where T_f and T_i are the final and initial temperatures, respectively. These
145 temperatures were obtained using the mean of temperature values obtained from 2 s
146 before and after the mixture of solutions. Afterwards, a least squares calibration curve
147 was constructed using reference solutions and the concentration of ethanol was obtained
148 using this equation. The 24 wells of microplate were used for each concentration of
149 reference solutions or samples in all experiments ($n=24$).

150

151 **2.5 Optimization of mixture for TIE analysis**

152 Before the determination of alcoholic content of wines by TIE, a previous
153 optimization of mixture was performed considering the total volume of the solution in
154 each well, the magnetic stirring and dispensing rate of electronic pipette as well as the
155 ratio of reagents. Initially, the total volume was evaluated considering the same volume
156 of hydroalcoholic solutions and ethanol (1.0:1.0 ratio) in the range of 1.4 and 2.4 mL with

157 the dispensing rate of the electronic pipette set at level 8 (corresponding to 1.9 s for
158 dispensing 1.2 mL of ethanol) and stirring speed of 150 rpm. Afterwards, the stirring and
159 the dispensing rate of electronic pipette were evaluated using the parameters obtained
160 from previous experiments. Finally, the ratio of reagents (from 1.0:1.0 to 1.7:1.0 of
161 hydroalcoholic solution to ethanol) were optimized. For all experiments, hydroalcoholic
162 solutions with 10% (v/v) of ethanol were used. The difference of temperature and the
163 relative standard deviation (RSD) among measurements were considered for evaluation
164 of these parameters.

165 A solution containing 10% (v/v) ethanol and 4.0 g L⁻¹ of sucrose was also prepared
166 for the evaluation of interference of sugar in the determination of ethanol by TIE. This
167 concentration of sucrose was chosen considering that sweet wine could be prepared with
168 a sugar content above 2.1 g L⁻¹ according to Brazilian legislation [17]. Therefore, a higher
169 value was considered to verify the extent of interference and cover a wide range of brands
170 available in the market.

171

172 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

173

174 **3.1 Optimization of parameters for TIE analysis**

175 Some of parameters that affect TIE performance as the total volume, stirring and
176 dispensing rate and ratio of ethanol to hydroalcoholic solutions were evaluated (Figure 2)
177 A reference solution containing 10% (v/v) of ethanol was used and based on the results
178 obtained, it was possible to conclude that the RSD values were lower when higher ΔT
179 values were obtained. For the evaluation of total volume in the well the best conditions
180 were obtained when high volumes were used (Figure 1a). In this way, the total volume

181 was fixed in 2.4 mL for subsequent evaluations. In TIE analysis is important to assure a
182 complete mixture of solutions and the stirring speed was evaluated (Figure 1b). The 200
183 rpm was chosen due to lowest RSD of measurements and this value was used for further
184 experiments. The dispensing rate of ethanol was also evaluated and when higher values
185 were used (0.63 and 0.71 mL s⁻¹), high RSD values combined with lower temperature rise
186 were observed (Figure 1c). This could be explained because the liquid in the well can be
187 projected outside during injection of ethanol and the heat dissipation is fast, leading to
188 more deviation in measurements. For low values (0.41 and 0.46 mL s⁻¹) of dispensing rate
189 the tips of pipetting device remain in front of the camera during the video recording,
190 causing deviation on rate temperature measurement with higher RSD values. Using an
191 intermediate dispensing rate lower RSD values could be obtained and 0.57 mL s⁻¹ was
192 chosen for further experiments.

193 Finally, the ratio of the hydroalcoholic solution/ethanol was evaluated (Figure 1d).
194 When higher volumes of hydroalcoholic solution were used an increase in the superficial
195 temperature was observed, while at the bottom the solution remains colder, requiring
196 more time to homogenize the solutions, leading to higher RSD values. In this sense, the
197 ratio of 1.0:1.0 hydroalcoholic solution to ethanol was chosen.

198

199 **3.2 Determination of alcoholic content of wines**

200 It is known that the presence of sugars affect the results in the determination of
201 alcoholic content of wines by the conventional and some alternative methods [12, 13]. In
202 this sense, before the evaluation of alcoholic content of wines a study was conducted to
203 evaluate this interference on TIE by using a solution containing 10% (v/v) ethanol and 4
204 g L⁻¹ of sucrose. This concentration of sugar was chosen based on the Brazilian official

205 legislation, which specifies that sweet wine can have more than 2.1 g L^{-1} [17]. However,
206 there is no maximum value recommended for sugars, and therefore a higher concentration
207 was used. The ΔT obtained for solution containing sucrose was $3.72 \pm 0.07 \text{ }^\circ\text{C}$ whereas
208 for hydroalcoholic solution without sucrose was $3.74 \pm 0.07 \text{ }^\circ\text{C}$. Thus, no difference was
209 observed when both solutions were analyzed by TIE, showing similar variation of
210 temperature. In this sense, it was possible to conclude that the interference of sugars it not
211 significant in the conditions evaluated, making TIE a robust method and suitable for
212 analysis of both dry and sweet wines.

213 The results obtained by the proposed method using TIE were compared with
214 conventional approach as shown in Table 1. Good agreement between TIE and the
215 conventional method was observed, ranging from 97.7 to 104.95.

216

217 The deviations of measurements were slightly higher for TIE method in relation
218 to conventional, with RSD ranging from 1.4 to 2.0% and 0.6 to 1.8%, respectively. These
219 results demonstrated that direct determination of ethanol by TIE method allowed low
220 variation of results, considering that several compounds (e.g., sugars, organic acids) are
221 present in wines, and no sample preparation was performed. For conventional method,
222 the distillation step separate ethanol and water from other non-volatile compounds of
223 beverage in order to avoid interferences on measurements. Nevertheless, only 3 min were
224 enough to perform twenty-four replicates in TIE, while 50 min were need to perform only
225 one replicate by the conventional method, which is an important feature for routine
226 applications. Moreover, there was no need of any sample preparation in TIE, allowing the
227 direct analysis and the consequent integration or elimination of some analytical steps,
228 which also contributes to lower deviations.

229

230 3.3 Figures of merit and others parameters

231 The calibration curve (Figure 2) used to determine the alcoholic content in the
232 wine samples presented a suitable linearity ($R^2=0.9991$) in the range of 3 and 18% (v/v)
233 ethanol. The limits of detection (LOD, 3σ) and quantification (LOQ, 10σ) were calculated
234 considering the average of blank and they were 0.58% and 1.05%, respectively. As the
235 curve presented a decreasing profile, it is important to establish also the maximum
236 concentration detected, which was 24.4% (v/v) ethanol. This value was obtained
237 considering a reasonable signal to ratio enough to differentiate the temperature rise from
238 noise, which was equivalent to 0.19 °C. Thus, to perform determination of ethanol in
239 beverages with higher alcoholic content, the TIE method proposed by Oliveira and Barin
240 is recommended [16].

241 A comparison between TIE and conventional method was performed and the
242 results are shown in Table 2. It was possible to see that TIE provided better results
243 practically in all parameters in relation to the conventional method. A reduction of more
244 than eighty times on the volume of sample for analysis was reached and the time required
245 to determine the alcoholic content in wines was significantly decreased. Time consuming
246 operations as cleaning and drying of glass devices were avoided, improving the easy-to-
247 use of the method. As a consequence, a significant increase in the throughput was
248 observed, presenting an analytical frequency of 480 samples h^{-1} . It is important to
249 mention that the proposed TIE method is in accordance with aspects of green chemistry
250 [18], reducing the amount and the toxicity of analytical wastes. The safety aspects should
251 be also considered for a proper evaluation of an analytical method, and the proposed
252 method provided safer measurements, because there are no steps involving heating in the
253 TIE method and glass devices were not used, minimizing the risks for operators.

254

255 **5. CONCLUSIONS**

256 The proposed TIE method could be considered as a good alternative to the
257 conventional method, providing a faster, simpler and safer analysis method for alcoholic
258 content of wines. No interferences of organic compounds from matrix, as sugars, were
259 observed and the determination could be performed in a single step without any sample
260 preparation. The total volume of solution in the wells, stirring speed, dispensing rate and
261 ratio of hydroalcoholic solutions/ethanol influenced the temperature changes and the RSD
262 of measurements and optima values were established. Using TIE, a lower amount of sample
263 was required a sample throughput four hundred times higher was obtained. The energy
264 consumption was decreased in four orders of magnitude and the reduction of analytical
265 steps were important features of TIE, turning it a suitable alternative for routine analysis
266 fulfilling the requirements of the green analytical chemistry.

267 **Table 1.** Results (mean \pm standard deviation) for alcoholic content of wines (v/v) using
 268 TIE ($n=24$) and conventional ($n=3$) methods.

Wine type	Manufacturer	TIE	CONV
Red (Dry)	A	9.87 \pm 0.20	10.10 \pm 0.10
	B	10.27 \pm 0.19	9.90 \pm 0.06
	C	10.79 \pm 0.20	10.90 \pm 0.10
Red (Sweet)	A	11.20 \pm 0.20	10.90 \pm 0.15
	B	10.81 \pm 0.20	10.30 \pm 0.15
White (Dry)	A	11.25 \pm 0.17	11.10 \pm 0.06
	B	10.60 \pm 0.16	10.40 \pm 0.12
	C	11.03 \pm 0.15	10.80 \pm 0.06
White (Sweet)	A	10.20 \pm 0.21	10.00 \pm 0.12
	B	10.69 \pm 0.21	10.30 \pm 0.10

269 *Values informed in the label: dry red A (10.0%), B (10.5%), C (10.8%); sweet red A (11.0%) and B
 270 (10.5%); dry white A (11.0%), B (10.7%) and C (10.7%); sweet white A (10.5%) and B (10.5%).

271

272

273 **Table 2.** Comparison of TIE with conventional method (942.06, AOAC) for
 274 determination of alcoholic content of wines.

Parameters	TIE	CONV
Volume of sample (mL)	1.2	100
Reagent consumption (mL)	1.2 ^a	1 ^b
Time spent per run (min)	3	50
Sample throughput (samples per h)	480	1.2
Energy consumption (kWh)	0.001 ^c	2.94 ^d

^aethanol amount per sample.

^bpolydimethylsiloxane (2%, m/v).

^cenergy consumed by pipette, infrared camera and magnetic stirrer.

^denergy consumed by water bath and ultrathermostatic bath.

275

276

277

278

279

280

281

282 **Figure captions**

283

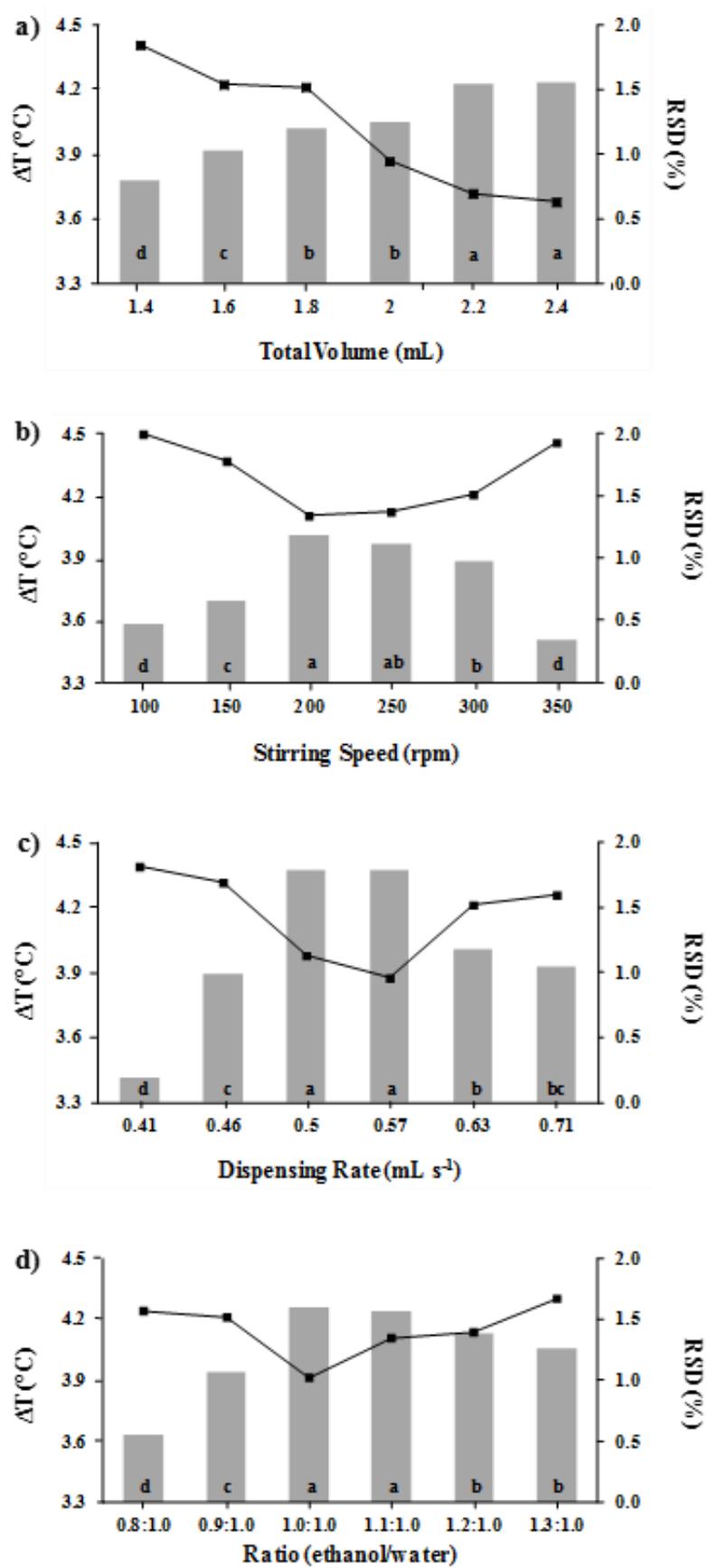
284 **Figure 1.** Influence of some parameters on RSD (%) and temperature changes (ΔT) of
285 measurements ($n=24$), a) total volume, b) stirring, c) dispensing, d) ratio of solutions.
286 Same letters indicate that data did not differ statistically (Tukey test, $p \leq 0.05$).

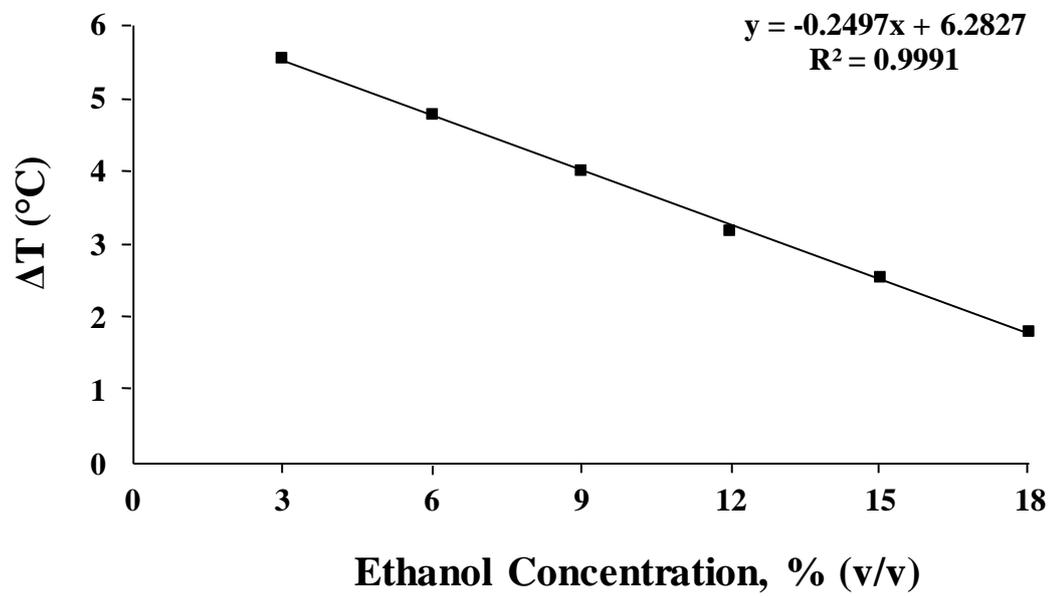
287

288 **Figure 2.** Calibration curve obtained using reference hydroalcoholic solutions (3-18%
289 v/v).

290

291 Figure 1



293 **Figure 2**

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

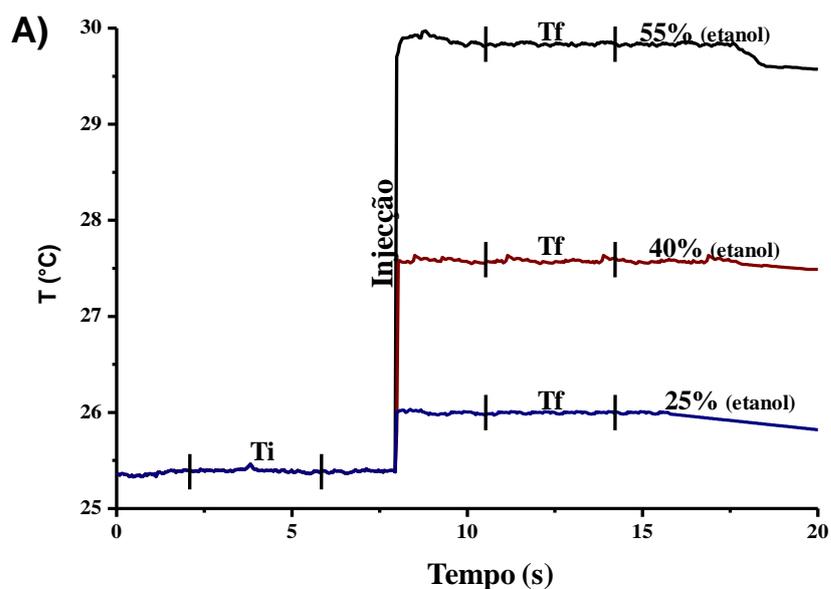
305 **REFERENCES**

- 306 [1] R.S. Jackson, 6 - Chemical Constituents of Grapes and Wine, Wine Science (Third Edition),
307 Academic Press, San Diego, 2008, pp. 270-331.
- 308 [2] N. Moreira, P. Lopes, H. Ferreira, M. Cabral, P.G. de Pinho, Influence of packaging and
309 aging on the red wine volatile composition and sensory attributes, Food Packaging and Shelf
310 Life, 8 (2016) 14-23.
- 311 [3] A.G.H.A. LEA, G. M., The phenolics of ciders, bitterness and astringency, Journal of the
312 Science of Food and Agriculture, 29 (1978) 478-483.
- 313 [4] AOAC, Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists Maryland,
314 Gaithersburg, 2005.
- 315 [5] L. Rotariu, C. Bala, V. Magearu, New potentiometric microbial biosensor for ethanol
316 determination in alcoholic beverages, Analytica Chimica Acta, 513 (2004) 119-123.
- 317 [6] S.S.M.P. Vidigal, A.O.S.S. Rangel, A reagentless flow injection system for the
318 quantification of ethanol in beverages based on the Schlieren effect measurement,
319 Microchemical Journal, 121 (2015) 107-111.
- 320 [7] T.F.M. Pais, S.S.M.P. Vidigal, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, Sequential injection system for
321 the enzymatic determination of ethanol in alcoholic beverages with in-line dilution, Food
322 Control, 30 (2013) 616-620.
- 323 [8] P. Pinyou, N. Youngvises, J. Jakmunee, Flow injection colorimetric method using acidic
324 ceric nitrate as reagent for determination of ethanol, Talanta, 84 (2011) 745-751.
- 325 [9] M.-L. Wang, J.-T. Wang, Y.-M. Choong, A rapid and accurate method for determination of
326 methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography, Journal of
327 Food Composition and Analysis, 17 (2004) 187-196.
- 328 [10] M.L.C. Wang, Y. M.; Su, N. W.; Lee, M. H. , A rapid method for determination of ethanol
329 in alcoholic beverages using capillary gas chromatography, Journal of Food and Drug Analysis,
330 11 (2003) 133-140.
- 331 [11] C.-Y. Zhang, N.-B. Lin, X.-S. Chai, L. Zhong, D.G. Barnes, A rapid method for
332 simultaneously determining ethanol and methanol content in wines by full evaporation
333 headspace gas chromatography, Food Chemistry, 183 (2015) 169-172.
- 334 [12] M. Gallignani, S. Garrigues, M. de la Guardia, Direct determination of ethanol in all types
335 of alcoholic beverages by near-infrared derivative spectrometry, Analyst, 118 (1993) 1167-
336 1173.
- 337 [13] M. Urbano Cuadrado, M.D. Luque de Castro, P.M. Pérez Juan, M.A. Gómez-Nieto,
338 Comparison and joint use of near infrared spectroscopy and Fourier transform mid infrared
339 spectroscopy for the determination of wine parameters, Talanta, 66 (2005) 218-224.
- 340 [14] J.S. Barin, B. Tischer, A.S. Oliveira, R. Wagner, A.B. Costa, E.M. Flores, Infrared thermal
341 imaging: a tool for simple, simultaneous, and high-throughput enthalpimetric analysis,
342 Analytical Chemistry, 87 (2015) 12065-12070.

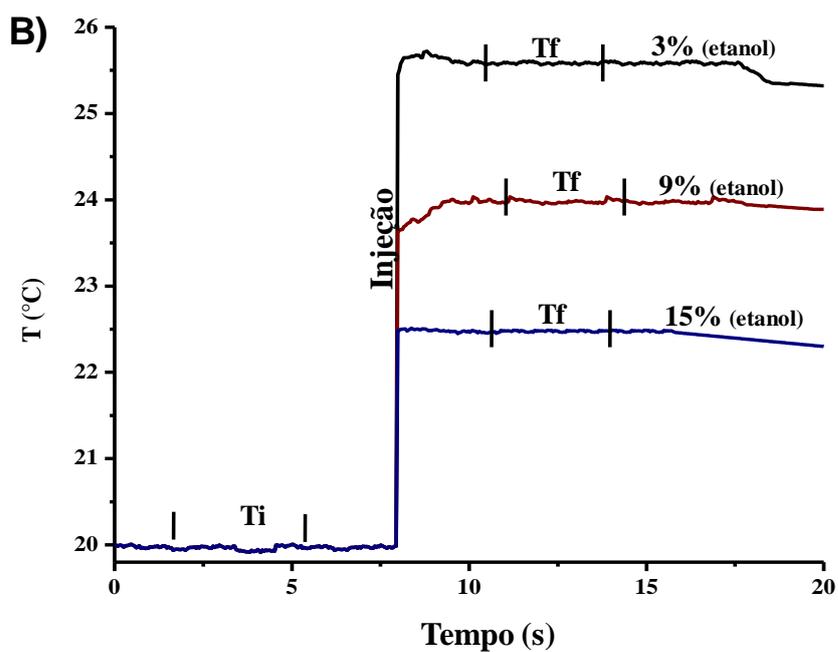
- 343 [15] B. Tischer, A.S. Oliveira, D.d.F. Ferreira, C.R. Menezes, F.A. Duarte, R. Wagner, J.S.
344 Barin, Rapid microplate, green method for high-throughput evaluation of vinegar acidity using
345 thermal infrared enthalpimetry, *Food Chemistry*, 215 (2017) 17-21.
- 346 [16] A.S. Oliveira, J.S. Barin, A reagent free direct analysis of alcoholic content of distilled
347 beverages by thermal infrared enthalpimetry. Article submission phase, *Talanta*, (2016).
- 348 [17] MAPA, PORTARIA N.º 229, DE 25 DE OUTUBRO DE 1988, in: P.e.A. Ministério da
349 Agricultura (Ed.), Brazil, 1988.
- 350 [18] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical
351 chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in*
352 *Analytical Chemistry*, 50 (2013) 78-84.

ANEXO 1. Na figura abaixo podemos observar os perfis dos sinais analíticos obtidos para a determinação de etanol em bebidas destiladas (Figura A), e em bebidas fermentadas (Figura B).

Bebida destilada + Água



Bebida fermentada + Etanol



4 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho para a determinação de etanol em bebidas alcoólicas utilizando a TIE, permitiram mostrar que os métodos desenvolvidos são rápidos, simples e empregam dispositivos de custo relativamente baixo. Os resultados analíticos apresentaram boa concordância com os métodos de referência da AOAC, porém, diversas vantagens puderam ser observadas para a TIE. A possibilidade de eliminar a etapa de preparo de amostra (p. ex., destilação, diluição) para a determinação de etanol, pode ser considerada uma grande vantagem, tendo em vista a diminuição do tempo de análise e a simplificação das operações analíticas, tornando o procedimento mais adequado à rotina laboratorial. Além disso, o volume de amostra utilizado foi menor, evitando o processamento de grandes volumes no laboratório, com consequente redução da geração de resíduos. Essas vantagens citadas, quando combinadas com o fato de redução drástica do consumo energético fazem com que os métodos propostos estejam de acordo com os princípios da química analítica verde. Cabe ressaltar, ainda, que o único reagente utilizado (etanol) provém de fontes renováveis e as microplacas utilizadas puderam ser reutilizadas para diversas análises.

A fim de obter os melhores sinais analíticos, métodos estatísticos foram empregados a fim de avaliar os melhores parâmetros de cada ensaio. Foram avaliados o volume total do poço, taxa de dispensação da pipeta multicanal, velocidade de agitação do agitador magnético e proporção de reagentes, verificando a influência direta de cada um desses parâmetros nas medições. Com base nos resultados obtidos, foi verificado que esses parâmetros podem ser facilmente ajustados de maneira a fornecer resultados com desvios (RSD) na faixa de 0,7 a 2,0%, o que foi considerado adequado por estar próximo aos valores observados para o método convencional e geralmente um pouco abaixo daqueles apresentados na literatura para métodos alternativos. Cabe ressaltar que se as condições analíticas forem controladas de maneira mais rígida, de forma a evitar a variação de temperatura do ambiente durante as análises por TIE e automatizar as operações analíticas, resultados ainda melhores com relação à precisão são esperados. Além disso, o uso de câmeras de infravermelho de maior resolução pode contribuir, também, para uma menor variação dos resultados.

Outra observação importante com relação ao método proposto é a desvantagem frente a estabilização da temperatura das soluções anteriormente à mistura. Para a realização das análises, ambas soluções (amostras e diluente) devem estar na mesma temperatura para que não ocorra uma leitura equívoca das médias de temperaturas geradas. Outros fatores que podem ter apresentado efeito nas medidas de temperatura foram 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).

Os resultados foram obtidos através de operações manuais de pipetagem e extração de dados, os quais se obtidos de forma automatizada podem gerar resultados mais precisos e exatos, sem interferência do analista. Sendo assim, esta pode ser uma alteração desejada e que pode ser introduzida nos próximos trabalhos usando a TIE.

5 CONCLUSÃO

TIE pode ser considerada uma alternativa viável e rápida para a determinação do teor alcoólico em bebidas destiladas e fermentadas, apresentando uma boa exatidão e precisão nos resultados, estando de acordo com o método convencional. Cabe também ressaltar que a presença de interferentes provenientes da composição de vinhos, além da alta concentração de etanol em bebidas destiladas, não influenciou na performance do método, e etapas como a prévia destilação das bebidas alcoólicas não foram necessárias. A otimização dos parâmetros de análise mostrou ser uma etapa importante para obter uma melhor resposta e melhorar a precisão dos resultados. Com a TIE também foi possível o emprego de menores quantidades de amostra em relação ao método convencional, além do baixo consumo de energia e uma maior frequência analítica frente ao método convencional. Assim, a combinação da termografia no infravermelho com a análise entalpimétrica mostrou-se promissora, e pode se dizer que TIE é uma importante ferramenta para executar análises de rotina e de acordo com os princípios da química analítica verde.

REFERÊNCIAS

- ADÃO, R.; BAI, G.; LOH, W. BASTOS, M. Chemical calibration of isothermal titration calorimeters: An evaluation of the dilution of propan-1-ol into water as a test reaction using different calorimeters, concentrations, and temperatures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 52, p. 57-63, 2012.
- AMERINE, M. A.; OUGH. C. S. **Análisis de vinos y mostos**, p. 46-59. Zaragoza: Editorial Acribia, 1976.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4, p. 14-18. São Paulo: Blucher, 2001.
- AU-GAYON, J. R.; PEYNAUD, E. **Analisi e controllo dei vini**, v. 2, p. 31-35. Bologna: Edagricole, 1966.
- 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.
- BOYACI, I. H.; GENIS, H. E.; GUVEN, B.; TAMER, U.; ALPER, N. A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, p. 1171-1176, 2012.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**, v. 1, p. 212. Campinas: Editora da Unicamp, 1999.
- CHEN, Q.; ZHANG, C.; ZHAO, J.; OUYANG, Q. Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 261-274, 2013.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSAMAN, D. **Análise instrumental**, p. 213-339. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.
- COPPERS, L. **História do alambique e da destilação**. Disponível em: <http://www.lusiancoppers.com/files/HistoriaAlambique.pdf> Acesso em: 31 de junho de 2016.
- CRISPIM, J. E.; BANDIERA, V.; NONI, D.; MAY, F. Tipos de leveduras e qualidade da cachaça produzida. Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina – EPAGRI – Urussanga, 2004. Disponível em: http://www.jecrispim.com/cariboost_files/Fermenta_C3_A7_C3_A3o.pdf Acesso em: 02 de julho 2016.

CUIBUS, L.; CASTRO-GIRÁLDEZ, M.; FITO, P. J.; FABBRI, A. Application of infrared thermography and dielectric spectroscopy for controlling freezing process of raw potato. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 24, p. 80-87, 2014.

DUPONT, P. Determination of the alcohol level of alcoholic beverages with the technicon thermometric autoanalyser. **Ann. Nutr. Aliment.**, v. 32, p. 905-914, 1978.

FERREIRA, D. **Análise rápida da acidez de bebidas em dispositivos de papel empregando entalpimetria no infravermelho**. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2016.

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

FLETCHER, P. J.; STADEN, J. F. Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p. 123-128, 2003.

FLIR. **The Ultimate infrared handbook for R&D professionals**. In the ultimate resource guide for using infrared in the research and development industry. 2013.

GALLIGNANI, M.; AYALA, C.; BRUNETTO, M. R.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. A simple strategy for determining ethanol in all types of alcoholic beverages based on its on-line liquid-liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR. **Talanta**, v. 68, p. 470-479, 2005.

GALLIGNANI, M.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Derivative Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 287, p. 275-283, 1994.

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.

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

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

KITAGAWA, Y.; KITABATAKE, K.; SUDA, M.; MURAMATSU, H.; ATAKA, T.; MORI, A.; TAMIYA, E.; KARUBE, I. Amperometric detection of alcohol in beer using a flow

cell and immobilized alcohol dehydrogenase. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2391-2393, 1991.

LAMA, R. R.; BENJAMIN, C-Y. LU. Excess thermodynamic properties of aqueous alcohol solutions. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 10, p. 216-219, 1965.

LARKIN, J. A. Thermodynamic properties of aqueous non-electrolyte mixtures I. Excess enthalpy for water + ethanol at 298.15 to 383.15 K. **Journal Chemical Thermodynamics**, v. 7, p. 137-148, 1975.

LEI, L.; MATTOS, I. L.; CHEN, Y. Microfluidic devices for optical determination of ethanol concentration. **Microelectronic Engineering**, v. 85, p. 1318-1320, 2008.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v. 3, p-67-71, São Paulo: Edgard Bucher, 2001.

MAKAROVA, I. L. VIII. Mischungswärme in binaren systemen ethanol-wasser, dioxan-wasser and dioxan-ethanol. *Vestn.Leningr.Univ.Fiz.Khim*, p. 101-107, 1970.

MAKAROVA, I. L. IX Mischungswärme in ternaren System wasser-ethanol-dioxan 25°C. *Vestn.Leningr.Univ.Fiz.Khim*, p. 113-117, 1971.

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

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://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm.

Acessado em: 10 de junho de 2016.

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://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm. Acessado em: 10 de

junho de 2016.

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

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**, p. 111-112. Porto Alegre, Artmed, 2008.

NICULESCU, M.; MIELIAUSKIENE, R.; LAURINAVICIUS, V.; CSÖREGI, E. Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using

pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors. **Food Chemistry**, v.82, p.481-48, 2003.

NORDON, A.; MILLS, A.; BURN, R. T.; CUSICK, F. M.; LITTLEJOHN, D. Comparison of non-invasive NIR and Raman spectrometries for determination of alcohol content of spirits. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, p. 148-158, 2005.

OLIVEIRA, W. A.; PASQUINI, C. Determination of water in ethanol and acetone by direct injection enthalpimetry based on the heat of dilution. **Talanta**, v. 31, p. 82-84, 1984.

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

OLIVER, J. D.; GABORIEAU, M.; CASTIGNOLLES, P. Ethanol determination using pressure mobilization and free solution capillary electrophoresis by photo-oxidation assisted ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1348, p. 150-157, 2014.

PAIS, T. F. M.; VIDIGAL, S. S. M. P.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in alcoholic beverages with in-line dilution. **Food Control**, v. 30, p. 616-620, 2013.

PAIXÃO, T. R.L.C.; CORBO, D.; BERTOTTI, M. Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium. **Analytica Chimica Acta**, v. 472, p. 123-131, 2002.

PASQUINI, C. **Uso analítico do calor de diluição. Dissertação de mestrado.** Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, 1981.

PEETERS, D.; HUYSKENS, P. Endothermicity or exothermicity of water/alcohol mixtures. **Journal of Molecular Structure**, v. 300, p. 539-550, 1993.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; SERBAN, A. I.; NEGULESCU, G. P. Ethanol determination by an amperometric bienzyme sensor based on a Clark-type transducer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 671, p. 85-91, 2012.

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

RICHMOND, H. D.; MERREYWETHER, J. E. The rapid estimation of the strength of sulphuric acid. **Analyst**, v. 42, p. 273-274, 1917.

ROCCHIA, M.; ROSSI, A. M.; ZEPPA, G. Determination of ethanol content in wine through a porous silicon oxide microcavity. **Sensors and Actuators B Chemical**, v. 123, p. 89-93, 2007.

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

SANTOS, S. R. B.; ARAÚJO, M. C. U.; BARBOSA, R. A. An automated FIA system to determine alcoholic grade in beverages based on Schlieren effect measurements using an LED-photocolorimeter. **Analyst**, v. 127, p. 324-327, 2002.

TEP, Y.; BRUN, S.; LEBOEUF J. P.; BARD, M. Automatic determination of the alcohol level of dry wines. **Ann. Nutr. Aliment.**, v. 32, p. 899-904, 1978.

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

TUMA, P.; OPEKAR, F. Contactless conductometric determination of methanol and ethanol in samples containing water after their electrophoretic desalination. **Electrophoresis**, v. 36, p. 1976-1981, 2015.

USAMENTIAGA, R.; VENEGAS, P.; GUEREDIAGA, J.; VEGA, L.; MOLLEDA, J.; BULNES, F. G. Infrared thermography for temperature measurement and non-destructive testing. **Sensors**, v. 14, p. 12305-12348, 2014.

VALLESI, M.; HOWELL, G. Which alcohol analysis method should you use? Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak., n. 467, p. 53-54, 2002.

VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 413-420. São Paulo: Blucher, 2010.

VIDIGAL, S. S.M.P.; RANGEL, A. O.S.S. A reagentless flow injection system for the quantification of ethanol in beverages based on the Schlieren effect measurement. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 107-111, 2015.

VOGEL, A. I. *Análise química quantitativa*, 5. ed., p. 213-339, Rio de Janeiro: LTC, 1992.

WANG, M-L.; CHOONG, Y-M.; SU, N-W.; LEE, M-H. A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. **Jornaul of Food and Drug Analysis**, v. 11, p. 133-140, 2003.

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.

YARITA, T.; NAKAJIMA, R.; OTSUKA, S.; IHARA, T.; TAKATSU, A.; SHIBUKAWA, M. Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performace liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 976, p. 387-391, 2002.

ZARPELON, F. As especificações do álcool focadas para o mercado mundial. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Especificacoes_doAlcool_Focado_28_para_Mercado_Mundial_000fxgfcrtu02wyiv80soht9hal6t8qx.pdf Acesso em: 02 de julho 2016.

ZHANG, C-Y.; LIN, N-B.; CHAI, X-S.; LI, Z.; BARNES, D. G. A rapid method for simultaneously determining ethanol and methanol content in wines by full evaporation headspace gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 183, p. 169-172, 2015.