

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

RAQUEL PISCHKE GARSKE

**DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DIRETA DE ACIDEZ DE ALIMENTOS SEMI-SÓLIDOS
ATRAVÉS DE ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

Porto Alegre

2018

RAQUEL PISCHKE GARSKE

**DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DIRETA DE ACIDEZ DE ALIMENTOS SEMI-SÓLIDOS
ATRAVÉS DE ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheira de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna Tischer

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Pischke Garske, Raquel
Determinação rápida e direta da acidez de alimentos
semi-sólidos através de entalpimetria no infravermelho
/ Raquel Pischke Garske. -- 2018.
46 f.
Orientadora: Bruna Tischer.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curso de
Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Acidez. 2. Entalpimetria. 3. TIE. 4.
Infravermelho. 5. Alimentos. I. Tischer, Bruna,
orient. II. Título.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**DETERMINAÇÃO RÁPIDA E DIRETA DE ACIDEZ DE ALIMENTOS SEMI-SÓLIDOS
ATRAVÉS DE ENTALPIMETRIA NO INFRAVERMELHO**

Raquel Pischke Garske

Aprovada em: 06/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Bruna Tischer (UFRGS)

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Kátia Rezzadori (UFRGS)

Doutora em Engenharia de Alimentos

Michele Utpott

Engenheira de Alimentos (UFRGS)

Dedico este trabalho ao meu irmão Rafael, cujo apoio foi, é e sempre será essencial. Obrigada por ser fonte de inspiração em todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Uma pessoa não faz nada sozinha e devo meu muito obrigada a diversas pessoas que fizeram parte dessa trajetória e contribuíram com a minha formação. Os ensinamentos que precisamos estão sempre presentes naqueles que nos cercam. Primeiramente gostaria de agradecer à minha mãe, que literalmente está sempre do meu lado em todas as horas, para ouvir minhas histórias e me aconselhar sempre que preciso. Agradeço ao meu irmão Rafael, que me apoiou na escolha de cursar engenharia, me ajudou em inúmeros momentos da trajetória acadêmica e sempre foi fonte de inspiração na hora de buscar meus objetivos. Sem vocês eu jamais chegaria onde estou hoje.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Carol, Ana, Camila, Júlia e Maíra, cujo apoio e presença foram fundamentais para dividir as inseguranças sobre a vida e multiplicar as alegrias. Todas são presentes que a engenharia me deu e sou muito grata pela nossa amizade.

Agradeço ao Alisson, Carol Morais, Carol Heckler, Carol Machado, Diego, Eliana, Gabi, Lívia, Martina, Michele e Roberta, meus colegas formandos, pela turma unida que formamos, e que me mostraram que é possível sempre alcançar nossos objetivos e lidar com os desafios que a faculdade propôs. Temos uma sintonia incrível e espero que continuemos com a nossa amizade para sempre, a nossa união foi muito importante nos últimos anos do.

Ao Rodrigo, por sempre estar disposto a me ouvir, sempre estar do meu lado na hora de tomar decisões e por sempre me incentivar. E principalmente, por sempre me fazer manter a calma. Teu apoio, paciência e carinho foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Obrigada por não me deixar desistir e por me fazer feliz.

À minha professora, paraninfa, orientadora de estágio, orientadora de monitoria e orientadora de trabalho de conclusão Bruna, que acreditou em mim desde o início, me deu suporte para realização deste trabalho e se tornou uma grande amiga. Te admiro muito como profissional e me considero uma pessoa de sorte por ter te encontrado no último ano de faculdade. És uma pessoa incrível.

À Michele, Marianne e Raul que me auxiliaram durante as minhas análises e sempre estiveram dispostos a me ajudar nas etapas deste trabalho. Em especial à Mari, que sem ela o meu trabalho seria muito mais longo e muito mais tedioso.

E por fim, agradeço à UFRGS por me proporcionar ensino gratuito e de qualidade, e por disponibilizar recursos para realização deste trabalho.

*“Nobody said it was easy, no one ever said it would
be so hard”*

(Coldplay)

RESUMO

A análise de acidez de alimentos é uma ferramenta útil para determinação do estado de conservação dos mesmos, bem como a adequação aos parâmetros de legislação e de controle de qualidade. A quantificação da acidez normalmente é realizada de acordo com os compêndios oficiais de análise, porém estes métodos são relativamente antigos e apresentam pontos negativos, como a possibilidade de gerar erros de detecção do ponto final, além disso são demorados, requerem diversas etapas de preparo de amostra e necessitam de grande quantidade de amostras e reagentes. A TIE (entalpimetria no infravermelho, do inglês: *Thermal Infrared Enthalpimetry*) é um novo método, rápido e direto, proposto para determinação de diversos parâmetros dos alimentos, dentre eles, a acidez. Caracteriza-se por um método que utiliza a termografia no infravermelho, que tem a capacidade de quantificar a variação de temperatura durante uma reação química, e este valor pode ser relacionado com a quantidade de ácido orgânico presente no alimento, após a elaboração de uma curva de calibração. Neste trabalho, a TIE foi aplicada em cinco tipos de molhos alimentícios, em amostras de catchup, de geleias tradicional, *diet* e zero açúcar. A técnica foi otimizada e os resultados foram comparados com as metodologias de titulação tradicionais. Após, foi analisada a interferência da presença de elevadas quantidades de açúcares em amostras, e ainda foram feitos testes para futura miniaturização da técnica. Os valores de LOD e LOQ foram de 0,08 °C e 0,27 °C, respectivamente. Os resultados obtidos pela TIE nas amostras de molhos alimentícios não diferiram estatisticamente das análises convencionais. Nas amostras com elevado teor de açúcar, observou-se diferença nos resultados, devido a liberação de calor por reações de hidrólise da sacarose. A TIE também demonstrou resultados satisfatórios na miniaturização. Sendo assim, a técnica mostra-se viável para aplicação direta na análise de acidez de molhos alimentícios com reduzido teor de açúcar, e necessita de mais testes quanto à aplicação em amostras com elevada quantidade de açúcar, para verificação da interferência de seus componentes.

Palavras-chave: acidez, entalpimetria, infravermelho, miniaturização, TIE.

ABSTRACT

The acidity analysis of foods is a useful tool to determine its conservation state, as the adequacy to the regulation parameters and quality control. The acidity quantification is regularly performed according to the official analysis compendia, however those methods are relatively old and can show negative points, as the possibility of generate errors in the final point determination. Besides that, these methods are slow, require many steps of sample preparation and need a huge amount of samples and reagents. In this context, TIE analysis (thermal infrared enthalpimetry) is a new, fast and direct method, which is propose to determine several parameters of foods, among them, the acidity. It is characterized as a method that uses infrared thermography, which can quantify the temperature variation while a reaction happens, and this value can be related to the quantity of organic acid present in the food, after the elaboration of a calibration slope. In this work, TIE was applied in five types of food sauces, ketchup, regular, diet and zero sugar jam. The technique was optimized and the results were compared to the traditional titration methods. Then, the interference of sugar on the temperature elevation was analyzed, and as well the miniaturization of the technique. The LOD and LOQ values were 0,08 °C and 0,27 °C, respectively. The results obtained by the TIE on the food sauces samples didn't differ statistically from the conventional analysis. On the samples with high sugar content, differences on the results were observed, due to the liberation of heat which occurs by of the sucrose hydrolysis. TIE also showed satisfactory results at the miniaturization. Thus, the application of the technique on the direct acidity analysis is viable on food sauces with lower content of sugar, however it requires more tests for the application on samples with high content of sugar, for the verification components interference.

Key words: acidity, enthalpimetry, infrared, miniaturization, TIE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Entalpogramas típicos a) TET b) DIE	19
Figura 2 – Disposição das amostras nos orifícios da placa, para verificação da transferência de calor	28
Figura 3 - Curva de calibração obtida com soluções de ácido acético (0,08-0,83 mol L ⁻¹)	32
Figura 4 – Curva de calibração obtida com soluções de ácido clorídrico (0,1-1,5 mol L ⁻¹)	33
Figura 5 – Entalpograma gerado pela curva de calibração de ácido acético	33
Figura 6 – Entalpograma gerado pela curva de calibração de ácido clorídrico	34
Figura 7 – Diferentes concentrações de açúcar em HCl 0,25 mol L ⁻¹ e suas respectivas diferenças de temperatura	38
Figura 8 - Curva de calibração obtida com soluções de ácido acético (0,17-0,83 mol L ⁻¹), para a miniaturização	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exatidão da TIE em relação ao método convencional obtida nos diferentes testes de otimização	32
Tabela 2 – Valores de LOD e LOQ para a curva de calibração.....	34
Tabela 3 - Resultados (média \pm desvio padrão) para diferentes tipos de molhos utilizando a TIE (n = 3) e método convencional (n = 3)	35
Tabela 4 – Resultados (média \pm desvio padrão) para diferentes tipos de produtos de frutas utilizando a TIE (n = 3) e método convencional (n = 3)	36
Tabela 5 – Sólidos solúveis totais nas amostras	37
Tabela 6 – Resultados (média \pm desvio padrão) para molho de mostarda e molho de alho, a TIE em Placa de ELISA com poços de 0,3 mL (n = 3) e método convencional (n = 3)	38
Tabela 7 - Exatidões obtidas pela TIE na placa de 48 orifícios e na Placa de ELISA (96 orifícios)	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AT Acidez Titulável

DIE Entalpia de Injeção Direta (do inglês: *Direct Injections Enthalpimetry*)

LOD Limite de Detecção (do inglês: *Limit of Detection*)

LOQ Limite de Quantificação (do inglês: *Limit of Quantification*)

SST Sólidos Solúveis Totais

TET Titulação de Entalpia Termométrica (do inglês: *Thermometric Enthalpy Titrations*)

TIE Entalpia no Infravermelho (do inglês: *Thermal Infrared Enthalpimetry*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Alimentos semi-sólidos	15
3.2 Determinação da acidez de produtos alimentícios	15
3.3 Métodos convencionais para determinação de acidez	16
3.4 Métodos alternativos para determinação de acidez	17
3.5 Validação de métodos	20
4 MANUSCRITO	22
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A análise de acidez de produtos alimentícios é recomendada para uma grande quantidade de alimentos, como para leite, leite de coco, óleos, vinagres, produtos de frutas, entre outros. Para quantificação da acidez de amostras incolores é recomendada a titulação convencional com indicador fenolftaleína, já para amostras coloridas recomenda-se o uso da titulação potenciométrica (IAL, 2008). O teor de acidez de um produto alimentício é um indicador do estado de conservação do mesmo, visto que reações de oxidação e deterioração por bactérias acidófilas aumentam a acidez do produto (CECCHI, 2003), porém ela também pode estender o prazo de vida útil de um alimento, visto que a diminuição do pH retarda a ação microbiológica (GAVA, 2008).

Na análise de alimentos, é comum a utilização de métodos recomendados nos compêndios oficiais de análise, porém muitos destes métodos são morosos, envolvem o emprego de grande quantidade de amostra e reagentes, além de envolver diversas etapas de preparo de amostra. Ainda, muitos deles exigem equipamentos caros e operadores treinados, além de poderem gerar perigos ao operador devido ao uso de reagentes explosivos, ao uso de condições extremas de operações e a maioria gera quantidade de resíduos (MASINO *et al*, 2005).

Sendo assim, há a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas de análise, as quais estejam de acordo com os princípios da química verde, ou seja, que utilizem menor quantidade de amostras e que estas sejam analisadas diretamente, que diminuam o uso de reagentes, reduzindo o custo energético. Dentre os princípios da química verde, estão a redução do emprego de reagente tóxicos, miniaturização de métodos de análise, medidas *in situ*, uso mínimo de quantidade e volume de amostras, uso de metodologias que analisem diversos compostos ao mesmo tempo e que aumentem a segurança do operador (GALUSZKA, 2013).

Recentemente, foi proposto um novo método de análise de acidez por Barin *et al* (2015), utilizando a técnica de entalpietria no infravermelho (TIE, do inglês: *thermal infrared enthalpimetry*), que utiliza a relação da diferença de temperatura gerada durante a reação de neutralização (exotérmica) com a quantidade do composto de interesse. A concentração deste analito é calculada a partir de uma curva de calibração, construída a partir da concentração de um padrão referente ao composto de interesse (px. ácido acético, ácido clorídrico, ácido cítrico) e da variação de temperatura gerada na reação de neutralização (com reagente em excesso, px. hidróxido de sódio). O método atende aos princípios da química verde, sendo mais rápido do que

os métodos convencionais, permitindo o aumento da frequência analítica, além disso envolve menores quantidades de reagentes, amostras, menor descarte de resíduos e utiliza materiais simples. Trabalhos relacionados abordaram a aplicação da técnica para análise de acidez em diferentes tipos de vinagres (TISCHER, 2017a) e em salmoura de conservas vegetais (TISCHER, 2017b). Não há dados na literatura sobre aplicação do método em amostras sólidas ou semi-sólidas, sendo uma necessidade a verificação da aplicabilidade desta técnica para estes tipos de amostras.

Neste trabalho, foi estudada a análise da acidez total de produtos semi-sólidos (molhos para salada, mostarda, catchup e geleias) utilizando a entalpietria no infravermelho, técnica rápida e direta para a determinação da acidez de alimentos, via observação das temperaturas iniciais e finais, geradas na reação de neutralização, entre as amostras/padrão e reagente em excesso, através do uso de placas de cultura, pipeta multicanal e câmara termográfica no infravermelho. A avaliação do efeito de interferentes também foi estudada, visto que mais de uma reação pode acontecer, liberando calor durante a análise pela TIE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar e padronizar metodologia utilizando a entalpietria no infravermelho para determinação da acidez de alimentos semi-sólidos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade da TIE para aplicação em amostras de alimentos semi-sólidos e com alta concentração de sólidos solúveis totais;
- Otimizar a aplicação da TIE para amostras de alimentos semi-sólidos;
- Determinar figuras de mérito como exatidão e limites de detecção e quantificação;
- Miniaturizar a técnica, através da execução da mesma em placas de ELISA de 96 poços (capacidade de 300 μ L) e comparar com os resultados obtidos com a execução da técnica em placas de cultura (capacidade de 1,55 mL).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos semi-sólidos

Alimentos semi-sólidos são aqueles cuja consistência se assemelha à purês e pastas (DOGAN, 2007). Dentro da categoria de alimentos semi-sólidos, pode-se mencionar os molhos alimentícios, como molho de mostarda, molho à base de pimenta, molho inglês, ainda, catchup, e produtos de frutas como geleias e doces cremosos, entre outros (BOBBIO, 1992).

Molhos alimentícios, consistem de emulsões semi-sólidas preparadas à base de óleos vegetais, ingredientes, acidificantes, gema de ovo e preparado de amido, dentre outros ingredientes. Como acidificantes destes produtos, geralmente são utilizados vinagres (FDA, 2018). Vinagres são oriundos de fermentação acética de mosto de fruta, de cereal, de outros vegetais, dentre outros (BRASIL, 2009). Catchup é o molho obtido a partir de polpa de tomate, com adição de especiarias, sal, açúcar e outros condimentos (BRASIL, 2005). Mostarda preparada, ou mostarda de mesa, é o produto feito a partir de mostarda em pó, vinagre e olho, podendo ser adicionado de especiarias, açúcar e sal (BRASIL, 1978). Geleias de frutas são produtos obtidos pela cocção de frutas ou pedaços de frutas, seu suco ou sua polpa, com adição de açúcar e água, concentrando a mistura até atingir consistência gelatinosa, podendo ainda ser adicionadas de ácidos e pectina (BRASIL, 1978). Em catchup e molhos para salada, é comum a utilização de vinagre, provavelmente devido a este ingrediente proporcionar sabor e extensão da vida útil destes produtos. Em geleias, a acidez é proveniente da fruta empregada ou da adição de ácidos orgânicos para promover melhor geleificação do produto.

3.2 Determinação da acidez de produtos alimentícios

A acidez é um importante parâmetro na determinação do estado de conservação de um alimento, podendo variar de acordo com reações de hidrólise, fermentação ou oxidação, os quais alteram os níveis de íons de hidrogênio do meio. A acidez pode ser avaliada de acordo com a acidez titulável (AT) ou por medidas de potencial hidrogeniônico (IAL, 2008).

A determinação da acidez é normalmente realizada por titulometria, técnica que se baseia na reação de um componente de interesse com adição de uma solução reagente, de concentração conhecida. Na titulação volumétrica, expressa-se o resultado em termos de peso da amostra por volume de reagente adicionado (OHLWEILER, 1980).

A presença de ácidos orgânicos, constituintes dos alimentos, pode alterar as suas características organolépticas, de estabilidade e qualidade. A determinação da acidez pode indicar a pureza de vinhos, a deterioração causada por bactérias produtoras de ácido, a oxidação de lipídios e também pode ser relacionada com a sua estabilidade, visto que a alta acidez retarda a deterioração de alimentos (CECCHI, 2003).

A redução do pH de alimentos auxilia no aumento do seu prazo de validade, bem como proporciona alterações sensoriais desejáveis (GAVA, 2008). Ácidos como acético, láctico e cítrico são comumente adicionados à alimentos para elevar sua acidez e diminuir a ação de micro-organismos (RUSSEL, 2003). O ácido acético apresenta baixa atividade antimicrobiana por se tratar de um ácido fraco, porém tem sabor aceitável, podendo ser adicionado em alimentos como molhos, mostarda e catchup (AZEREDO, 2012).

Alguns produtos podem apresentar problemas de deterioração quando sua acidez não se encontra dentro dos limites sugeridos. Para geleias, a rigidez da estrutura do gel formado por pectina e água é diretamente afetada pela acidez do produto. Quanto mais alta a acidez, maior a rigidez das fibras da rede do gel. A acidez ideal para o produto deve estar na faixa de 0,5 a 0,8%, visto que valores acima destes provocam a liberação de líquido na geleia (sinérese) (TORREZAN, 1998).

3.3 Métodos convencionais para determinação de acidez

A acidez total titulável é a quantidade de ácido presente em uma amostra que reage com uma solução básica, de concentração previamente determinada. Para determinação da acidez total titulável, comumente se utiliza a titulação, técnica realizada utilizando uma certa quantidade de amostra, com adição de hidróxido de sódio até o ponto de viragem, determinado com auxílio de indicadores. Para amostras de cor clara, utiliza-se a adição de fenolftaleína como indicador de cor, a solução adquire tom rosado quando neutralizada. Para amostras coloridas, a titulação realizada deve ser a potenciométrica, feita com o auxílio de um medidor de pH. A adição de hidróxido de sódio deve ocorrer até uma faixa de pH, estando entre 8,2 e 8,4, devido à presença de ácidos fracos nos alimentos (CECCHI, 2003; IAL, 2008).

Na determinação de acidez de frutas ou produtos de frutas, expressa-se o teor de acidez em gramas de ácido orgânico por 100 gramas de amostra. Cada alimento é relacionado ao ácido orgânico presente em maior quantidade (IAL, 2008).

Estes métodos são considerados simples, porém podem apresentar erros devido à observação da coloração do ponto de viragem da titulação, problemas na calibração do pHmetro e variação brusca do pH com adição de hidróxido de sódio.

3.4 Métodos alternativos para determinação de acidez

As análises tradicionais propostas pelas metodologias oficiais normalmente são compostas de várias etapas, envolvem o uso de grande volume de amostras e reagentes, bem como demandam um grande tempo de análise (MASINO *et al*, 2005). Os métodos convencionais, como a titulação com uso de fenolftaleína com viragem por mudança de cor, precisam de operadores treinados e que mantenham os padrões de observação durante todo o histórico de análises. Sendo assim, há uma demanda por novos métodos, que são desenvolvidos para melhorar a qualidade das análises (GAŁUSZKA, 2013).

Existem novas metodologias sendo desenvolvidas para determinação de acidez em alimentos. Pode-se citar o método de iodeto-iodato aplicado na determinação de ácidos pela reação de equilíbrio entre o ácido, iodato e iodeto, também os métodos cromatográficos, os quais podem ser utilizados na determinação de ácidos graxos em óleos e gorduras. Além destas, podem ser empregadas a determinação da acidez por transformada de Fourier em espectroscopia no infravermelho e a determinação da acidez através da titulação por condutometria (CALAMARI, 2016; DEL RÍO, 2010; DARIAS-MARTINA *et al*, 2003).

A espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR) baseia-se na criação de um modelo de predição de vários parâmetros simultaneamente, medindo várias frequências infravermelho ao mesmo tempo. A AT medida na espectroscopia no infravermelho é obtida diretamente medindo a flexão e o estiramento das ligações químicas dos componentes envolvidos na reação de neutralização (CALAMARI, 2016).

Outro método que pode ser utilizado para determinação de AT é a titulação por condutância. Este método baseia-se na determinação do ponto de equivalência de uma titulação através da condutância da solução do analito pela adição do titulante. A condutância de um meio diminui com a perda de íons hidrogênio. A mudança de inclinação da curva indica o ponto final da análise (DARIAS-MARTINA *et al*, 2003).

Outros métodos utilizam a entalpiometria para determinação de acidez de amostras. A análise entalpimétrica é a designação para uma família de métodos analíticos que medem a

diferença de entalpia em uma reação, para determinar a quantidade de um reagente ou catalisador (INCZÉDY, 1997).

A análise entalpimétrica convencional baseia-se em procedimentos de titulação utilizando calorímetros. Dentre os métodos entalpimétricos estão a titulação termométrica (TET, do inglês: *Thermometric Enthalpy Titrations*) e a entalpimetria de injeção direta (DIE, do inglês: *Direct Injections Enthalpimetry*). A diferença de temperatura é relacionada com a titulação para quantificar o elemento de interesse, sendo que na entalpimetria de injeção direta se utiliza o reagente titulante em excesso (GRIME, 1981).

A TET baseia-se no fato de que a maioria das reações libera ou absorve calor do ambiente, impondo que o reagente seja escolhido de acordo com a possibilidade de diferença de entalpia e, portanto, diferença de temperatura, sendo avaliada a diferença de temperatura em relação ao volume de titulante gasto (GRIME, 1981). O reagente deve reagir estequiometricamente e instantaneamente com o analito quando inserido em um recipiente adiabático (INCZÉDY, 1997).

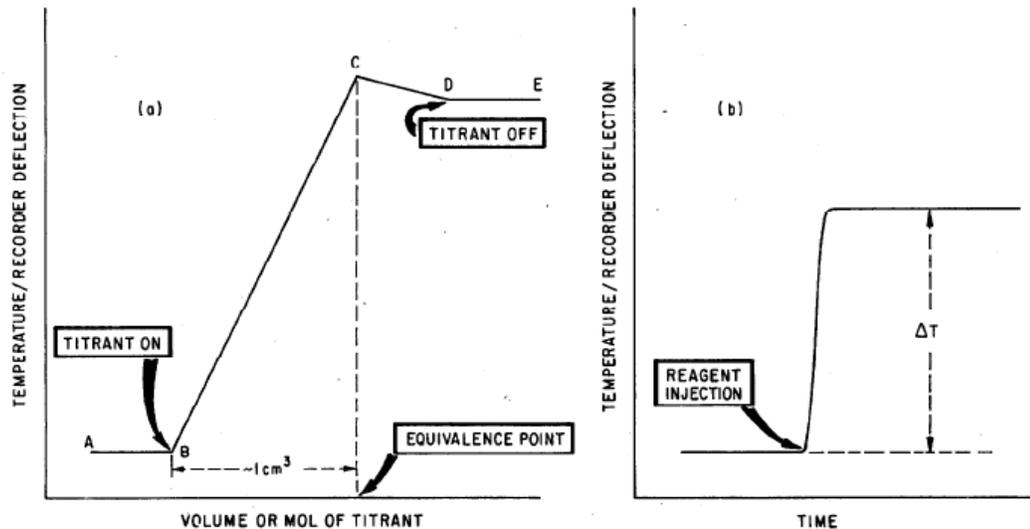
Já a DIE utiliza a diferença de temperatura total gerada por uma reação química, a partir da injeção de um reagente em excesso estequiométrico na amostra. A diferença de temperatura gerada em um período de tempo, na reação de neutralização, usando um reagente em excesso gera um gráfico chamado entalpograma (GRIME, 1981). Em trabalhos da literatura são demonstrados os entalpogramas gerados pelas análises TET (temperatura x volume de titulante) e DIE (temperatura x tempo), mostrados na Figura 1.

Os métodos entalpimétricos tradicionais são executados com a utilização de calorímetros adiabáticos e tituladores termométricos, e a determinação da temperatura através de termômetros ou termistores. Entretanto estes aparatos são relativamente caros, apresentam baixa frequência analítica, são destrutivos e demandam elevadas quantidades de amostras e reagentes, assim como geram elevadas quantidades de resíduos.

Uma opção no monitoramento da temperatura nas reações entalpimétricas é a utilização de sensores de temperatura não invasivos, como os que operam no infravermelho. Dentre eles podemos citar as câmeras termográficas no infravermelho. Além disso, a execução da reação, principalmente no caso de reação de neutralização, a qual é relativamente rápida, pode ser feita em recipientes mais simples e baratos que os calorímetros adiabáticos, como por exemplo, placas de cultura com elevada quantidade de cavidades (poços). Em se tratando de reações lentas, as quais poderão envolver elevadas taxas de perda de calor, os calorímetros podem ser mais adequados, mas

por exemplo em reações de neutralização, precipitação, oxirredução e complexação, as quais ocorrem rapidamente, pode-se utilizar aparatos mais simples e que contribuam para o aumento da frequência analítica.

Figura 1: Entalpogramas típicos a) TET b) DIE



A: início da titulação; B: início da adição do reagente; C: ponto máximo de temperatura devido ao calor liberado pela reação; D: término da adição do reagente; E: fim da análise.

Fonte: GRIME, 1981.

A termografia no infravermelho baseia-se que todo material acima de zero Kelvin emite radiação eletromagnética na região do infravermelho. Na termografia no infravermelho, a radiação infravermelha por um corpo é detectada sem contato direto utilizando a lei de Stefan-Boltzmann, obtendo assim a temperatura da superfície do corpo. Uma das vantagens da técnica é a necessidade de poucos instrumentos, visto que é necessária apenas uma câmera infravermelha e uma saída de vídeo para demonstrar as imagens adquiridas (BAGAYATHIAPPAN *et al*, 2013). Portanto, a termografia no infravermelho pode ser utilizada para registrar o perfil de temperatura durante o tempo e também a distribuição e mapeamento da temperatura em um objeto, sendo uma nova opção de monitoramento de reações entalpimétricas.

A entalpimetria no infravermelho (TIE) foi proposta por BARIN *et al* (2015), os quais utilizam a combinação da técnica de termografia no infravermelho com reações entalpimétricas, visto que a liberação ou absorção de calor gera diferenças de temperaturas, que são registradas

pelas câmeras termográficas. A técnica se baseia na construção de uma curva de calibração usando o padrão do composto a ser determinado, através do registro da variação de temperatura gerada na reação entre o padrão e o reagente em excesso (px. ácido acético e hidróxido de sódio). Após são observadas as variações de temperatura entre a amostra e o reagente em excesso, e a partir da curva de calibração é possível calcular a quantidade de analito presente na amostra.

Para a análise, são necessários um recipiente de análise, que pode ser uma placa de cultura, uma câmera no infravermelho, a amostra e o reagente em excesso estequiométrico. Visto que a reação de neutralização é exotérmica, é possível acompanhar a diferença de temperatura gerada e determinar a quantidade de analito, comparando com uma curva de calibração.

A TIE, quando comparada aos métodos convencionais de determinação de acidez em alimentos, apresenta inúmeras vantagens, como a redução do volume de amostra utilizada, bem como o uso de menor quantidade de reagente. O tempo de análise e o consumo de energia também são menores, porque é possível que mais amostras sejam analisadas ao mesmo tempo (TISCHER, 2017a).

3.5 Validação de métodos

Novos métodos, ao serem desenvolvidos, devem passar por um processo de validação, ou seja, devem ser avaliados para que sua eficiência seja comprovada e mostrar que o método é adequado para uso. Dentre os critérios de validação, estão o cálculo da exatidão, o limite de detecção e o limite de quantificação (AMARANTE JÚNIOR. *et al*, 2001; HUBERT *et al*, 1999). Uma vez desenvolvido, um método deve ter sua performance analisada via figuras de mérito (FEINBERG e RAGUÉNÉS, 1999).

A exatidão de um método relaciona-se com o quão próximo do valor verdadeiro o valor medido se encontra, ou seja, está relacionado com a veracidade das medidas (BACCAN *et al*, 1979). Devem ser analisadas no mínimo 10 amostras, em duplicata, para o cálculo da exatidão (FEINBERG e RAGUÉNÉS, 1999). O valor da exatidão é calculado com a razão do valor obtido no novo método e do método de referência, multiplicado por cem, com resultado expresso em porcentagem (EURACHEM, 2014).

Novos métodos sempre devem ter sua exatidão estabelecida, e métodos quantitativos com analitos em baixa concentração também devem ter seu limite de detecção e quantificação estabelecidos (ZONEN *et al*, 1999).

O limite de detecção (LOD, do inglês: *Limit Of Detection*) é definido como “a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado” e o limite de quantificação (LOQ, do inglês: *Limit Of Quantification*) como “a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas” (BRASIL, 2017).

O valor do LOD é calculado como três vezes o valor do desvio padrão para o branco e o LOQ como dez vezes o valor da análise para o branco. A análise do branco deve ser executada dez vezes para cálculo do desvio padrão. Estes valores devem ser calculados sempre que o método gera respostas quantitativas ou qualitativas (EURACHEM, 2014).

A análise quantitativa se refere à concentração de um analito que pode ser determinada e expressa por um valor numérico, em unidades apropriadas. Utiliza-se curvas de calibração, com funções estimadas por mínimos quadrados. Portanto, a quantidade de analito é relacionada com a curva de calibração (CURRIE, 1999).

A ANVISA estabelece que o desvio da exatidão não deve exceder 15% na validação de procedimentos analíticos em produtos fármacos (BRASIL, 2003). Porém, não há especificação para métodos de análise de alimentos.

A seguir, está apresentado o manuscrito completo, elaborado para posterior publicação em revista da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos. As seções materiais e métodos e resultados e discussão constam no manuscrito.

4 MANUSCRITO

**Determinação rápida e direta da acidez de alimentos semi-sólidos através de entalpietria
no infravermelho**

RESUMO

A análise de acidez é recomendada para grande parte das classes de alimentos, com os objetivos de determinar o estado de conservação e para realização do controle de qualidade do produto, bem como este pode ser um parâmetro com limites estabelecidos pela legislação. A acidez normalmente é quantificada seguindo os protocolos sugeridos pelos compêndios oficiais de análise, porém estes métodos podem apresentar erros de detecção do ponto final, além de serem antigos e morosos, necessitando de etapas de preparação, e de grandes quantidades de amostras e reagentes. A TIE (entalpimetria no infravermelho, do inglês: *Thermal Infrared Enthalpimetry*) é um método novo, criado para a determinação rápida e direta de diversos parâmetros dos alimentos, como a acidez, tendo grande vantagem em relação ao método convencional principalmente em relação a amostras turvas e coloridas, devido ao mesmo não ser afetado por este tipo de amostra. Este método baseia-se na termografia no infravermelho, que quantifica a variação de temperatura gerada por uma reação química. Esta variação relaciona-se com a quantidade de ácido orgânico presente na amostra, utilizando uma curva de calibração. Neste trabalho, a TIE foi utilizada para determinação de acidez em amostras de alimentos semi-sólidos (cinco molhos alimentícios, catchup e geleias tradicional, *diet* e zero açúcar). Primeiramente, a técnica foi otimizada e os resultados obtidos foram comparados com os obtidos nas titulações convencionais. Depois, a presença de interferentes foi analisada, devido à alta quantidade de açúcar das amostras. Por fim, a TIE foi miniaturizada. Os resultados obtidos pela técnica para as amostras de molhos alimentícios foram satisfatórios. Nas amostras com elevada quantidade de açúcar, houve diferença nos resultados devido às reações de hidrólise da sacarose, simultâneas à reação de neutralização. Na miniaturização, os resultados foram satisfatórios. Portanto, a TIE mostra-se viável para determinação da acidez de amostras de molhos alimentícios com reduzido teor de açúcar, porém necessita de mais testes para aplicação em amostras com elevado teor de açúcar, verificando a presença de interferentes em sua formulação.

Palavras-chave: acidez, entalpimetria, infravermelho, miniaturização, TIE.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos semi-sólidos podem ser classificados como aqueles os quais a consistência se assemelha à de purês e pastas (DOGAN, 2007). Mostarda, catchup e molhos para salada são considerados alimentos semi-sólidos em virtude de sua composição (FDA, 2018; BOBBIO, 1992). Geleias de frutas são produtos obtidos pela cocção de frutas inteiras, em pedaços, ou a partir de seu suco ou polpa, com açúcar e água, concentrando a mistura até atingir consistência gelatinosa. As geleias devem, ao ser extraídas de sua embalagem, manter-se em estado semi-sólido (BRASIL, 1978). Na composição de catchup e molhos para salada, comumente é utilizado vinagre (ácido acético) como agente acidulante (FDA, 2018). Em geleias, a adição de ácido se deve à necessidade de diminuir o pH do produto para realçar o sabor da fruta e também promover a geleificação adequada (TORREZAN, 1998). Em geleias, é comum o uso de ácidos cítrico e láctico como acidulantes.

A análise de acidez em alimentos é um parâmetro importante para verificação do estado de conservação, variando conforme reações intrínsecas, como as de oxidação e hidrólise, estejam acontecendo, comumente determinada utilizando método convencional de acidez total titulável, que utiliza hidróxido de sódio como reagente neutralizante e um indicador do ponto final de titulação, que pode ser fenolftaleína (para amostras sem cor) ou medidor de pH (para amostras turvas e coloridas) (IAL, 2008). Os ácidos orgânicos podem estar presentes em grande quantidade de alimentos, sendo que estes ácidos apresentam papel importante nas características sensoriais dos produtos e também na estabilidade dos mesmos (CECCHI, 2003). Ácidos como o acético, láctico e cítrico são comumente adicionados a alimentos para elevar sua acidez e diminuir a ação de microrganismos (RUSSEL, 2003).

Em geleias, a estrutura do gel pode ser afetada de acordo com a quantidade de acidez, sendo recomendada uma acidez ideal de 0,5 a 0,8 %, para evitar sinérese (TORREZAN, 1998). Na análise de acidez de produtos de frutas, o teor de acidez é normalmente expresso em gramas do ácido orgânico em maior quantidade no alimentos por 100 gramas de amostra analisada (IAL, 2008).

Métodos convencionais, como a titulação, ainda são amplamente utilizados na análise de alimentos, estes porém são métodos demorados e possuem diversas fontes de erro nas análises (MASINO *et al*, 2005). Sendo assim, métodos que atendam aos princípios da química verde, como redução do emprego de reagentes, utilização de técnicas diretas que não necessitem de tratamento

da amostra, mínimo uso de volume e quantidade de amostras, análises *in situ*, utilização de análises que quantifiquem diversos parâmetros ao mesmo tempo, uso de reagentes provenientes de fontes renováveis, mínimo uso de energia e emprego de análises que possam ser miniaturizadas estão cada vez mais sendo utilizados (GALUSZKA, 2013).

Recentemente, foi proposto um método por Barin *et al* (2015) para determinação de acidez de amostras utilizando entalpimetria no infravermelho (TIE, do inglês: *Thermal Infrared Enthalpimetry*), utilizando uma câmera termográfica no infravermelho para correlação da diferença de temperatura da reação de neutralização com a quantidade de ácidos presentes no produto. A técnica utiliza placas de cultura descartáveis, reduzidas quantidades de reagentes e amostra, e apresenta a possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo ou o aumento da frequência analítica, com o uso de pipetas multicanal (BARIN *et al*, 2015).

A TIE é um método rápido e fácil para determinação da acidez de alimentos, com economia de uso de reagentes e amostras (TISCHER *et al*, 2017a). Além da acidez, também podem ser quantificados simultaneamente a acidez total, conteúdo de sódio, ferro e cálcio de produtos (BARIN *et al*, 2015).

Trabalhos anteriores avaliaram a aplicação da entalpimetria no infravermelho para avaliação de acidez e conteúdo de sódio em salmouras de conservas vegetais (TISCHER *et al*, 2017b), conteúdo de acidez total, fixa e volátil em vinagres (TISCHER *et al*, 2017a) e teor alcoólico em vinhos (OLIVEIRA *et al*, 2018). Entretanto, até o momento, os trabalhos foram realizados usando amostras líquidas, sendo necessária a avaliação e otimização da técnica para a determinação de compostos em amostras pastosas, semi-sólidas e sólidas.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a determinação da acidez de alimentos semi-sólidos através da entalpimetria no infravermelho, otimizando a técnica para esta aplicação. Foram realizadas comparações entre a TIE e o método tradicional, em seguida foi realizada a miniaturização da técnica, bem como a avaliação da presença de interferentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras, padrões e reagentes

As amostras utilizadas neste estudo foram molho de mostarda, catchup, molho rosé, molho de pimenta, molho de alho, geleia de morango sem adição de açúcar, geleia diet de laranja e geleia

tradicional de uva, obtidas de mercados locais da cidade de Porto Alegre (RS, Brasil), sendo as amostras de molhos e catchup adquiridas de pelo menos dois fabricantes diferentes e as amostras de geleia provenientes de apenas um fabricante. As amostras foram escolhidas com o objetivo de verificar o potencial da técnica para alimentos de diferentes cores, contendo misturas de ingredientes e ainda com e sem adição de açúcares. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Na determinação de acidez pela entalpiometria no infravermelho, foram usados ácido clorídrico (37%, Química Moderna, São Paulo, Brasil) e ácido acético glacial (Nuclear, São Paulo, Brasil) para preparação de soluções de referência, para a construção das curvas de calibração. hidróxido de sódio (Química Moderna, São Paulo, Brasil) padronizado com biftalato de potássio foi utilizado na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para determinação da acidez das amostras na reação de neutralização, na TIE o mesmo foi utilizado como reagente em excesso, na concentração de 2 mol L^{-1} . Sacarose, nas concentrações de 1; 3; 5; 10; 30 e 70 % em ácido clorídrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (Neon, São Paulo, Brasil) foi utilizada para verificação da interferência do teor de açúcar na diferença de temperatura observada pela TIE.

Para a determinação da acidez pelo método convencional foi utilizado hidróxido de sódio (Química Moderna, São Paulo, Brasil) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, padronizado previamente com biftalato de potássio e fenolftaleína 0,04% foi utilizada como indicador colorimétrico. Água destilada foi utilizada para o preparo de todas as soluções e reagentes.

2.2 Instrumentação

A análise por entalpiometria no infravermelho foi feita utilizando câmera termográfica no infravermelho distante (7,5-13,0 μm , A35, FLIR Systems, Inc., Wilsonville, OR), gerando imagens de 320 x 256 pixels e taxa máxima de 60 Hz). As imagens foram processadas utilizando o *software* Research IR (FLIR). As reações foram feitas utilizando placa com 48 cavidades (Nest Biotech Co., China), composta de poliestireno, com volume interno de 1,55 mL. Barras magnéticas (3,0 x 5,0 mm) foram utilizadas para homogeneizar as soluções. A câmera de infravermelho foi posicionada 20 cm acima da placa.

Nas análises de titulação potenciométrica, foi utilizado medidor de pH de bancada (modelo HI 2221-02, Hanna Instruments, EUA). Para melhor homogeneização das amostras foi utilizado agitador magnético sem aquecimento (modelo 752, Fisatom, Brasil), nas velocidades de 470 e 850

rpm. Para a quantificação de sólidos solúveis nas amostras foi utilizado um refratômetro digital (Milwaukee, modelo MA871, EUA).

2.3 Análises pelos métodos convencionais

A determinação da acidez total titulável das amostras dos molhos de mostarda, molho rosé, molho de alho e geleia de laranja diet foi realizada pela titulação convencional, usando hidróxido de sódio na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e indicador fenolftaleína. Foram pesados 1 g de amostra e diluídos em 50 mL de água destilada, conforme recomendado pelo método 312/IV (Determinação da acidez titulável em ácido orgânico) do Instituto Adolfo Lutz (2008) A adição do hidróxido de sódio foi feita até mudança da coloração da solução para tonalidade rosa. Os resultados foram expressos em gramas de ácido orgânico majoritário por 100 g de amostra.

A acidez total titulável das amostras coloridas (catchup, molho de pimenta, geleia de uva e geleia de morango sem adição de açúcares) foi determinada utilizando o método 311/IV (Determinação da acidez titulável por volumetria potenciométrica) do Instituto Adolfo Lutz (2008). A titulação foi realizada utilizando hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, adicionados a 1 g de amostra diluídas em 50 mL de água destilada, até atingir pH 8,2. Os resultados foram expressos em gramas de ácido orgânico majoritário por 100 g de amostra.

2.4 Análises pela TIE

A primeira etapa da análise de acidez pela entalpietria no infravermelho consistiu da construção de uma curva de calibração. Foram construídas duas curvas de calibração, uma com ácido acético, nas concentrações de 0,08; 0,17; 0,33; 0,50; 0,67 e 0,83 mol L^{-1} e de ácido clorídrico de 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 mol L^{-1} . Estes dois ácidos foram escolhidos devido ao ácido acético ser o ácido majoritário na maioria das amostras estudadas, e o ácido clorídrico por ser um ácido forte e garantir a completa reação de neutralização, sendo as duas curvas utilizadas para o cálculo. Foram adicionados no interior de cada cavidade 0,6 mL de ácido e 0,6 mL de hidróxido de sódio em excesso (2 mol L^{-1}). Após, as amostras foram analisadas, sendo adicionados 0,6 g (previamente corrigidos para volume) de cada amostra, com posterior adição de hidróxido de sódio (2 mol L^{-1} , 0,6 mL). Uma barra magnética de politetrafluoretileno (3,0 x 7,0 mm) foi adicionada em cada cavidade para promover a homogeneização.

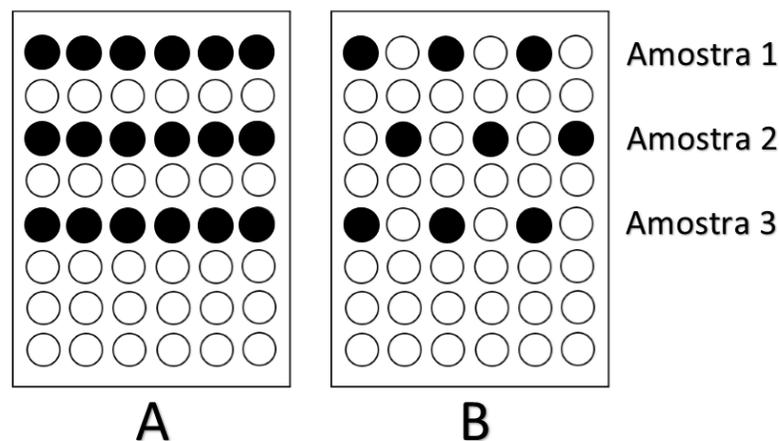
Inicialmente as amostras, padrões e reagentes foram adicionados em recipientes de vidro para estabilização da temperatura. As temperaturas das reações foram monitoradas antes, durante e depois da adição de hidróxido de sódio. Com o auxílio de um suporte, a câmera infravermelho foi posicionada 20 cm acima da placa. Utilizando o *software* da câmera, foi desenhado um círculo (compreendendo 80% da cavidade) para monitoramento da temperatura média da cavidade (poço). A diferença de temperaturas (ΔT) foi determinada pela equação $\Delta T = T_f - T_i$, onde a temperatura inicial (T_i) foi obtida pela média das temperaturas antes da reação iniciar e a temperatura final (T_f) foi dada pela média das temperaturas após a reação acontecer.

2.5 Otimização da TIE

Para proporcionar a homogeneização das amostras, a agitação utilizando um agitador magnético foi utilizada. Foram feitos testes em diferentes velocidades de agitação (470 e 850 rpm) e tempos de reação (10, 20, 30 e 40 segundos) para verificação das melhores condições.

Ainda, foram feitos testes quanto à disposição das amostras na placa, com ou sem intervalos entre os poços. Como a placa utilizada não apresenta isolamento térmico, há a possibilidade de transferência de calor entre uma cavidade e outra. Na Figura 2 estão demonstrados os orifícios onde foram adicionadas as amostras antes do teste (A) e depois do teste (B), em orifícios intercalados.

Figura 2: Disposição das amostras nos orifícios da placa, para verificação da transferência de calor



Fonte: Autor, 2018.

Também foram realizados testes alternando a ordem de adição de reagente e amostra, para verificar a melhor homogeneização da amostra. Utilizou-se inicialmente primeiro a adição de amostra na placa, e de reagente depois, e a adição da amostra após o reagente.

Os resultados foram avaliados e as condições escolhidas foram as que proporcionaram melhores exatidões em relação ao método convencional.

2.6 Avaliação dos efeitos dos interferentes

Após a determinação de acidez pela TIE, foi verificada que as amostras que apresentavam maiores concentrações de açúcares, apresentaram valores de exatidão em relação ao método convencional acima de 100%, indicando que a variação de temperatura gerada na reação era maior que a esperada. Sendo assim, testes para verificação da interferência do açúcar na determinação da acidez das amostras foram realizados. Foram avaliadas pela TIE soluções de sacarose em ácido (sacarose diluída em ácido clorídrico $0,25 \text{ mol L}^{-1}$) nas concentrações de 0; 1,0; 3,0; 5,0; 10; 30; e 70%.

2.7 Miniaturização da TIE

Para a miniaturização da técnica, as placas de cultura de 48 cavidades (com capacidade total de 1,55 mL por cavidade) foram substituídas por placas de ELISA de 96 cavidades (com capacidade de 300 μL por cavidade). Assim, reduz-se seis vezes as quantidades utilizadas a placa de 48 poços e dobrando a frequência analítica (número de cavidades duas vezes superior).

A curva de calibração foi realizada com ácido acético, em concentrações de 0,08; 0,17; 0,33; 0,50; 0,67 e $0,83 \text{ mol L}^{-1}$. A adição de amostra e reagente foi realizada utilizando pipeta multicanal eletrônica (8 canais, 0,015-0,3 mL, Research Pro, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Barras magnéticas de 3,0 x 7,0 mm foram adicionadas no interior dos orifícios para promover a homogeneização. Para a miniaturização da TIE, foram escolhidas as amostras de molho de alho e molho de mostarda, devido aos bons resultados obtidos com a placa com 48 poços e por apresentarem viscosidades e cores diferentes.

A condução das análises e registro de temperatura das reações foram feitas da mesma forma que para a determinação usando as placas de 48 cavidades.

2.8 Determinação dos sólidos solúveis totais

Devido a verificação de possíveis interferências ocorridas nas amostras que apresentavam maiores concentrações de açúcares, foi feita a determinação de sólidos solúveis totais das amostras, por refratometria, com auxílio de um refratrômetro digital (Milwaukee, modelo MA871, EUA), com exatidão de $\pm 0,2$ °Brix e calibração em água. Após, estes dados foram utilizados para a correlação entre o incremento de temperatura na reação e concentrações de sólidos solúveis totais, sendo importante a verificação de até qual concentração de sólidos solúveis presentes na amostra não há interferência e acima de qual concentração é necessária a aplicação de correção.

2.9 Análise dos resultados

Os dados experimentais foram avaliados utilizando análise de variância simples (*one-way* ANOVA) seguidos de teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As figuras de mérito foram determinadas segundo Eurachem (2014). A exatidão do método foi calculada com a razão do valor do método de referência (titulação convencional) e da TIE, multiplicado por cem, com resultados expressos em porcentagem. O valor de LOD (limite de detecção, do inglês: *limit of detection*) foi determinado por três vezes o desvio padrão, enquanto o LOQ (limite de quantificação, do inglês: *limit of quantification*) foi calculado por dez vezes o valor do desvio padrão, utilizando água como branco. Foram considerados satisfatórios resultados de exatidão entre 90 e 110%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da TIE

Testes de otimização foram realizados com molho de mostarda visto que o mesmo apresenta consistência intermediária entre as amostras selecionadas para este trabalho e além disso, a mesma apresenta certa turbidez, o que também é representativo das amostras estudadas. Inicialmente, foi realizado teste de adição de reagente após a adição da amostra, com velocidade de 470 rpm e tempo de reação de 10 segundos. A exatidão gerada foi baixa (45,3%) e foi observado que a reação levava mais tempo para ocorrer, e no tempo de 10 segundos com a agitação mais lenta a reação ainda não havia ocorrido por completo, sendo o ponto final detectado não representativo do total da reação. Testes com tempos de monitoramento de 20 e 30 segundos foram realizados,

entretanto apenas com 40 segundos se observou a completa reação para todas as amostras. Portanto, o teste seguinte foi realizado com maior tempo de reação (40 segundos) e agitação de 850 rpm. Quanto as velocidades utilizadas, observou-se que velocidades baixas não eram suficientes para a homogeneização da amostra, velocidades próximas a 850 rpm eram as mais adequadas, visto que promoviam a homogeneização rápida e velocidades maiores já promoviam a formação de respingos de produto. A exatidão obtida para o teste com velocidade de 850 rpm e tempo de monitoramento de 40 segundos foi de 101,7%, resultado bastante satisfatório. A maior velocidade de agitação proporciona melhor homogeneização da amostra com o reagente, liberando a quantidade total de calor durante um curto espaço de tempo, sem haver troca de calor com a placa e com o ambiente.

Também foi testada a adição de amostra em orifícios intercalados da placa, para verificar a possível transferência de calor entre os poços (formas A e B, Figura 2). As reações liberam calor, e o mesmo pode ser transferido por condução aos orifícios vizinhos, causando erros na determinação da temperatura inicial da reação. Foi observado durante os experimentos que reações que liberam menos calor podem ser analisadas da forma A sem interferências nos resultados (exatidões próximas a 100%), já amostras com elevada liberação de calor, a forma A já apresenta erros (exatidões próximas a 78%), sendo assim, tornou-se adequado a utilização da forma B para todas as amostras.

A inversão da sequência de adição de reagentes (1º reagente em excesso e 2º solução padrão ou amostra) também foi realizada, porém não ocorreu completa homogeneização da mistura, resultando em erros na leitura das temperaturas, como mostra a Tabela 1, sendo conveniente adicionar primeiro a solução pastosa (amostra) e após o reagente em excesso (líquido), melhorando a homogeneização.

Os resultados de exatidão dos diferentes testes, bem como os parâmetros adotados, estão descritos na Tabela 1.

Após a otimização, as condições de análise pela TIE foram padronizadas de acordo com o melhor teste, que obteve exatidão próximo a 100%. Os parâmetros satisfatórios foram: velocidade de agitação (850 rpm), observada durante 40 segundos. A sequência de adição de reagentes e amostras foi a adição de amostra ou solução padrão e após a adição do reagente em excesso.

Tabela 1: Exatidão da TIE em relação ao método convencional obtida nos diferentes testes de otimização.

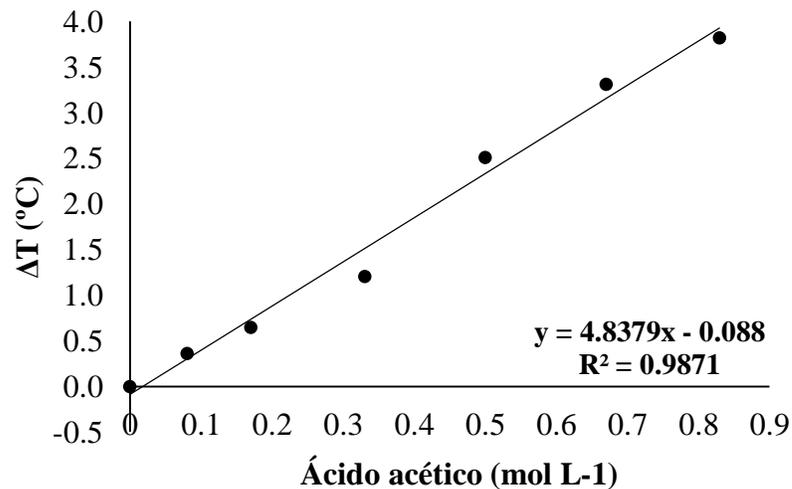
	Velocidade de agitação (rpm)	Tempo de reação (s)	Exatidão (%)
Ordem de adição:	470	10	45,25
(1° amostra 2° NaOH)	850	40	101,68
Ordem de adição:	470	10	75,65
(1° NaOH 2° amostra)	850	40	78,94

Fonte: Autor, 2018.

3.2 Determinação da acidez das amostras

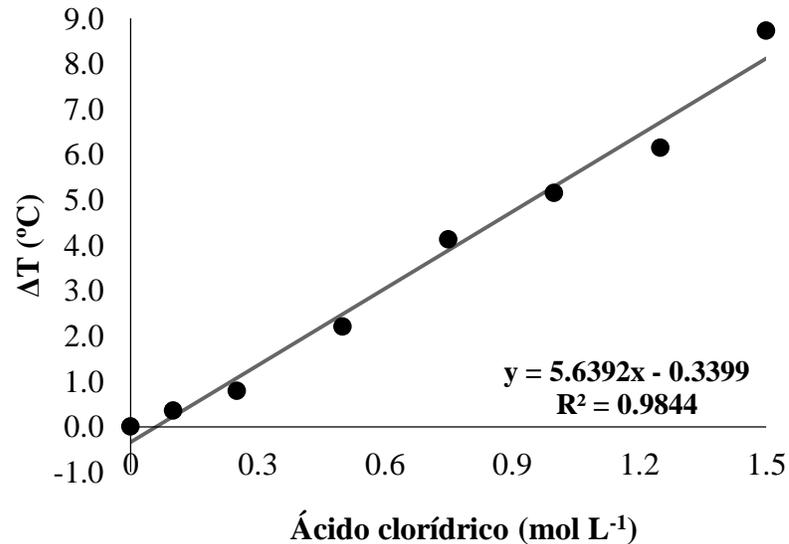
As curvas de calibração para determinação de acidez total das amostras foram construídas utilizando ácido acético (Figura 3), e ácido clorídrico (Figura 4). Ambas curvas obtiveram R^2 elevado, acima de 0,98, demonstrando que o modelo linear proposto se ajusta aos dados experimentais.

Figura 3: Curva de calibração obtida com soluções de ácido acético (0,08-0,83 mol L⁻¹).



Fonte: Autor, 2018.

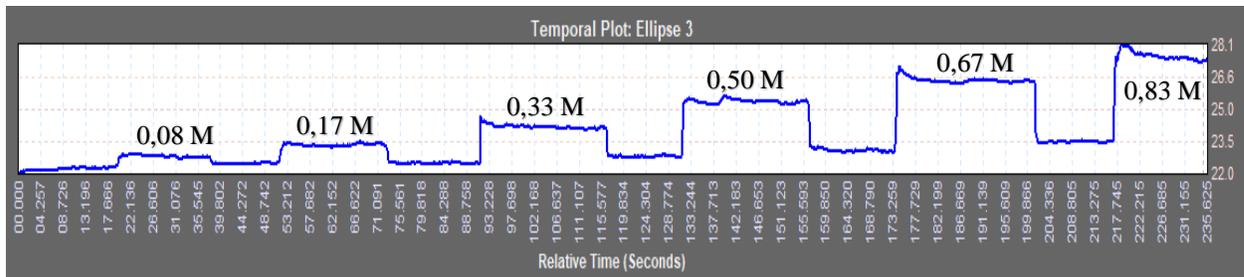
Figura 4: Curva de calibração obtida com soluções de ácido clorídrico (0,1-1,5 mol L⁻¹).



Fonte: Autor, 2018.

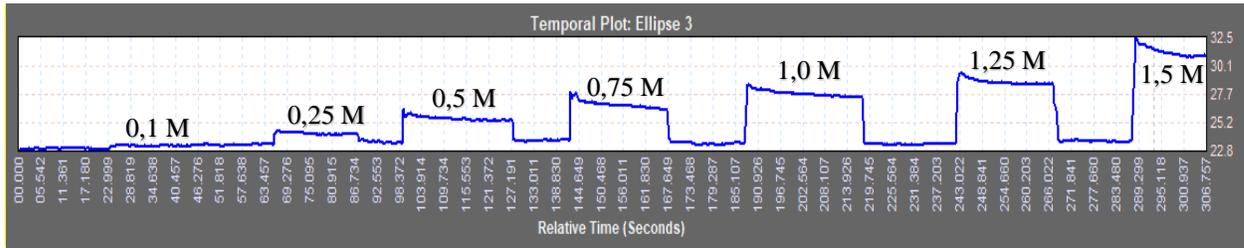
Na Figura 5 está demonstrado um dos entalpogramas gerados na análise da TIE deste estudo, com os pontos da curva de calibração de ácido acético. O entalpograma da curva de calibração de ácido clorídrico está demonstrado na Figura 6. Com os entalpogramas é possível verificar o aumento da diferença de temperatura conforme aumentam as concentrações de ácido nos orifícios da placa, além disso, pode-se observar que nas condições utilizadas os pontos apresentaram um aumento gradual e estável.

Figura 5: Entalpograma gerado pela curva de calibração de ácido acético.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 6: Entalpograma gerado pela curva de calibração de ácido clorídrico.



Fonte: Autor, 2018.

Os valores de LOD (3σ) e LOQ (6σ) foram determinados pela curva de calibração de ácido acético, e os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

Os valores de LOD representam os valores mínimos de detecção pelo método, enquanto o LOQ é o menor valor no qual a performance do método é aceitável para a aplicação (EURACHEM, 2014). A variação de temperatura encontrada para o LOD foi baixa, $0,08\text{ }^{\circ}\text{C}$, podendo ser detectado uma quantidade de ácido acético mínima de $0,272\%$ nas amostras. Para o LOQ, a variação foi de $0,27\text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma quantificação mínima de $0,5\%$ de ácido acético nas amostras. Este valor mostra que, para a aplicação do método, é necessário que as amostras apresentem um mínimo de $0,5\%$ de ácido acético para que sua quantidade de ácido orgânico seja quantificada corretamente, e este resultado é favorável para a aplicação neste estudo, visto que todas as amostras apresentaram valores de acidez superiores a $0,5\%$.

Tabela 2: Valores de LOD e LOQ para a curva de calibração.

	Curva	Delta T ($^{\circ}\text{C}$)	Valor	Unidade
LOD	Ácido Acético	0,08	0,045	mol L^{-1}
			0,272	% ácido acético
LOQ	Ácido Acético	0,27	0,083	mol L^{-1}
			0,500	% ácido acético

Fonte: Autor, 2018.

A Tabela 3 apresenta os resultados de acidez para os diferentes tipos de molhos analisados. Pela TIE, a curva de calibração selecionada foi a do ácido acético, visto que este é o ácido presente

em todos os molhos analisados. É possível verificar que não há diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as amostras analisadas pela TIE ou pelo método convencional, exceto para a amostra B de catchup. Estes resultados diferiram da metodologia tradicional provavelmente devido ao seu conteúdo de açúcar.

Tabela 3: Resultados (média \pm desvio padrão) para diferentes tipos de molhos utilizando a TIE ($n = 3$) e método convencional ($n = 3$).

Molho	Fornecedor	Acidez total (% de ácido acético)		Exatidão (%)
		TIE	CONV	
Molho de mostarda	A	1,80 \pm 0,17 ^a	1,96 \pm 0,02 ^a	101,5
	B	2,03 \pm 0,09 ^a	2,13 \pm 0,32 ^a	93,3
Molho rosé	A	1,56 \pm 0,22 ^a	1,33 \pm 0,13 ^a	117,2
	B	1,61 \pm 0,06 ^a	1,66 \pm 0,04 ^a	96,9
Molho de alho	A	1,77 \pm 0,22 ^a	1,66 \pm 0,07 ^a	106,7
	B	1,10 \pm 0,07 ^a	1,17 \pm 0,03 ^a	105,9
Molho de pimenta	A	3,36 \pm 0,92 ^a	3,47 \pm 0,40 ^a	96,8
	B	2,06 \pm 0,19 ^a	2,06 \pm 0,03 ^a	100,0
Catchup	A	1,79 \pm 0,29 ^a	1,91 \pm 0,06 ^a	93,7
	B	3,48 \pm 0,03 ^a	2,09 \pm 0,01 ^b	166,5

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Fonte: Autor, 2018.

Alguns dos resultados de desvio-padrão das amostras na TIE foram ligeiramente maiores do que na titulação convencional, provavelmente devido a falhas na homogeneização das amostras mais pastosas.

Conforme estudo conduzido por TISCHER *et al* (2017a), os valores de exatidão para acidez fixa estavam compreendidos entre 99 e 103%, além de nenhuma amostra apresentar diferença significativa da metodologia convencional. Os resultados foram satisfatórios, porém as amostras estudadas eram líquidas e não apresentavam mistura de ingredientes.

A Tabela 4 apresenta os resultados de determinação de acidez para as geleias analisadas. Para as amostras de geleia, a curva de calibração utilizada foi a de ácido clorídrico, e os resultados

expressos nos ácidos em maior quantidade na fruta de origem do produto. Todas as amostras apresentaram diferenças significativas em relação a metodologia convencional, com exatidões entre 131 e 725 %. A diferença provavelmente foi proporcionada pelo elevado teor de açúcar presente nas formulações dos produtos (presente naturalmente ou adicionados aos produtos). A discussão sobre as amostras que diferiram estatisticamente entre os métodos está mostrada no item 3.3.

Tabela 4: Resultados (média \pm desvio padrão) para diferentes tipos de produtos de frutas utilizando a TIE (n = 3) e método convencional (n = 3).

Molho	Ácido Orgânico	Acidez total		Exatidão (%)
		(% de ácido orgânico)		
		TIE	CONV	
Geleia de laranja diet	Cítrico	1,07 \pm 0,11 ^a	0,81 \pm 0,12 ^b	131,09
Geleia de morango zero açúcar	Cítrico	1,45 \pm 0,11 ^a	0,65 \pm 0,01 ^b	223,07
Geleia de uva	Tartárico	4,44 \pm 0,48 ^a	0,61 \pm 0,01 ^b	725,75

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Fonte: Autor, 2018.

3.3 Influência da concentração de açúcar

Visto que algumas amostras de molhos e geleias diferiram da metodologia padrão, a verificação dos possíveis interferentes se fez necessária.

Uma característica que deve ser observada nos métodos entalpimétricos é que qualquer variação de temperatura é determinada, e caso a variação de temperatura não se dê somente devido a reação estudada, erros podem ocorrer, ou seja, o sinal total da diferença de calor é dada por todas as mudanças de temperatura produzidas por todas as reações químicas que ocorrem no meio (GRIME, 1981).

A reação de neutralização é exotérmica, ou seja, libera calor ($\Delta H < 0$), sendo o resultado proporcional ao número de mols de ácido e base que estão reagindo. A reação de neutralização entre HCl e NaOH é exotérmica, apresentando uma variação de entalpia de -58 kJ/mol.

Em meio ácido, a sacarose é invertida em glicose e frutose, com entalpia de reação de -14,4 kJ/mol (TOMBARI *et al*, 2007). A degradação da sacarose também pode acontecer em meio alcalino (SHAW, 1969). Sendo assim, é possível que as diferenças de temperatura observadas pela TIE sejam devido à outras reações químicas, como as hidrólises, que estejam ocorrendo no meio juntamente à reação de neutralização, liberando calor.

Para investigar a influência dos interferentes, foi realizada a determinação dos sólidos solúveis totais (SST) por refratometria. A concentração de um soluto em um alimento altera o índice de refração da luz, sendo o método refratométrico útil para refletir o conteúdo de sólidos solúveis, como açúcares e ácidos orgânicos, em produtos de frutas e outros alimentos (CECCHI, 2003).

Na Tabela 5 estão demonstrados os valores de °Brix encontrados para cada tipo de amostra com elevado teor de açúcar.

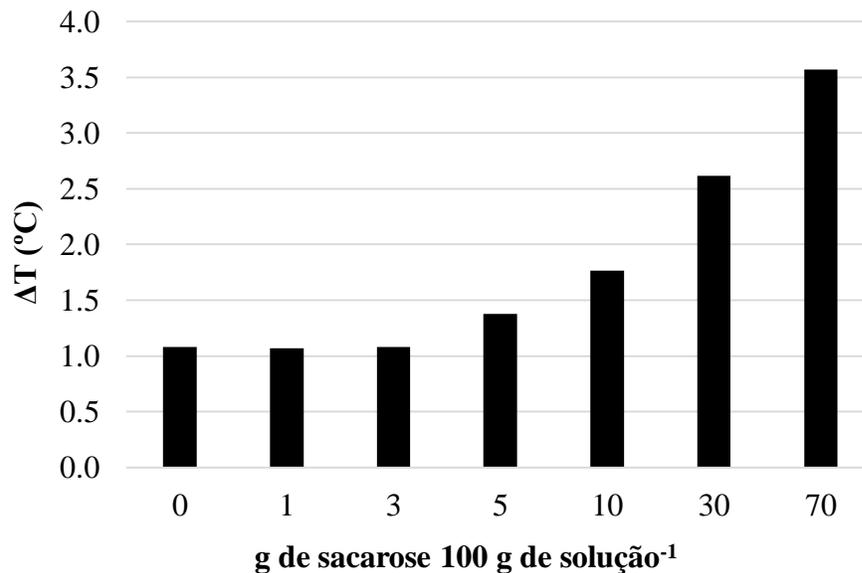
Tabela 5: Sólidos solúveis totais nas amostras.

Produto	Fornecedor	°Brix
Molho de mostarda	A	10,03 ± 0,21
	B	15,95 ± 0,17
Molho rosé	A	14,47 ± 0,12
	B	19,37 ± 0,12
Molho de alho	A	18,13 ± 0,05
	B	13,93 ± 0,12
Molho de pimenta	A	21,77 ± 0,12
	B	11,93 ± 0,09
Catchup	A	19,27 ± 0,05
	B	22,50 ± 0,05
Geleia Uva	-	68,87 ± 0,09
Geleia Zero Açúcar Morango	-	22,77 ± 0,05
Geleia Diet de Laranja	-	24,00 ± 0,12

Fonte: Autor, 2018.

Paralela à determinação de SST, foi realizada a análise da influência da quantidade de açúcar na variação da temperatura. Os resultados de ΔT versus quantidade de sacarose em meio ácido (HCl 0,25 mol L⁻¹) estão demonstrados na Figura 7.

Figura 7: Diferentes concentrações de açúcar em HCl 0,25 mol L⁻¹ e suas respectivas diferenças de temperatura.



Fonte: Autor, 2018.

Observa-se uma diferença de temperatura no meio a partir de 3% de concentração de sacarose. Portanto, uma concentração de açúcar acima de 3% na formulação dos produtos já implica em um aumento de temperatura provocado pela reação de neutralização, porém também devido à hidrólise da sacarose no meio. Como observado, resultados insatisfatórios com exatidão acima de 110% em relação ao método convencional começam a ser gerados nas amostras com concentrações de sólidos solúveis totais acima de 22 °Brix.

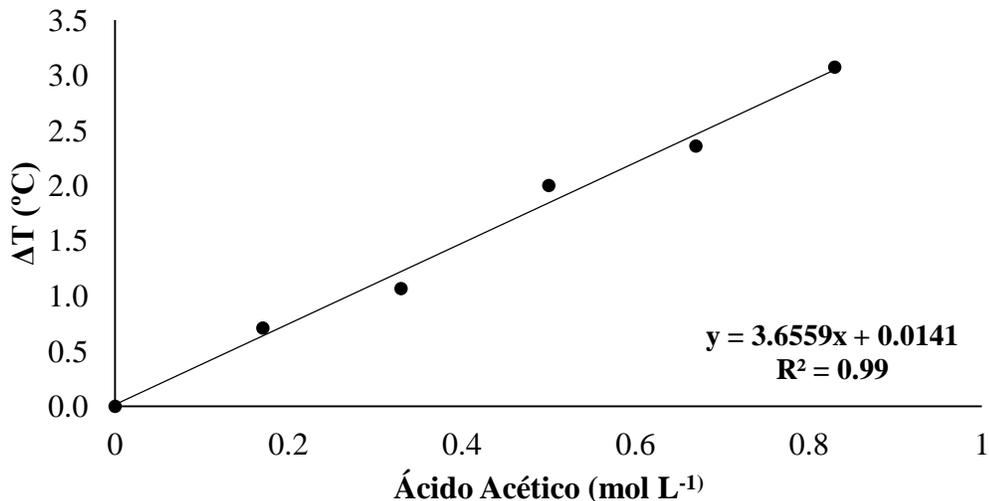
Caso as amostras obtivessem exatidão abaixo do aceitável (90 %), seria provavelmente devido à má homogeneização da amostra com o reagente, na reação da placa. Portanto, não houve mistura completa dos dois e o calor liberado não foi o total necessário para quantificar a acidez da amostra.

Nas amostras com exatidão acima de 110 %, o calor liberado em excesso provavelmente se deve à hidrólise ácida ou básica dos açúcares presentes, liberado além do calor de reação de neutralização mas também das reações de hidrólise, causando erros na determinação da acidez.

3.4 Miniaturização

A miniaturização da TIE foi realizada com amostra de molho de mostarda e amostra de molho de alho. A curva de calibração com ácido acético está demonstrada na Figura 8.

Figura 8: Curva de calibração obtida com soluções de ácido acético (0,17-0,83 mol L⁻¹), para a miniaturização.



Fonte: Autor, 2018.

A curva de calibração obtida com as soluções de ácido acético apresentou bom R², acima de 0,99, assim como a curva obtida com a placa de 48 orifícios. Sendo assim, a utilização de placa de ELISA de 96 orifícios, na miniaturização, apresenta-se viável por ter gerado resultados satisfatórios na plotagem da curva. Além disso, a mesma apresenta vantagens em relação a placa de 48 poços por apresentar possibilidade de aumento da frequência analítica, redução de reagentes e amostras utilizados e posterior redução de geração de resíduos.

Como mostrado na Tabela 6, ambas amostras de molho não diferiram significativamente ($p > 0.05$) da metodologia convencional.

Tabela 6: Resultados (média \pm desvio padrão) para molho de mostarda e molho de alho, a TIE em Placa de ELISA com poços de 0,3 mL ($n = 3$) e método convencional ($n = 3$).

Molho	Fornecedor	Acidez total (% de ácido acético)	
		TIE	CONV
Molho de mostarda	A	1,94 \pm 0,35 ^a	1,96 \pm 0,02 ^a
Molho de alho	A	1,68 \pm 0,19 ^a	1,66 \pm 0,07 ^a

Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Fonte: Autor, 2018.

Na Tabela 7 estão comparadas as exatidões obtidas com as duas amostras nos dois tipos de placa em relação ao método convencional. A exatidão do molho de mostarda foi similar no uso das duas placas, já nas amostras de molho de alho, a placa de ELISA apresentou melhores resultados que na placa de 48 orifícios.

Tabela 7: Exatidões obtidas pela TIE na placa de 48 orifícios e na Placa de ELISA (96 orifícios).

Molho	Exatidão (%)	
	48 orifícios	96 orifícios
Molho de mostarda	101,5	98,8
Molho de alho	106,7	101,4

Fonte: Autor, 2018.

Portanto, a utilização da Placa de ELISA para miniaturização do método mostra-se viável e vantajosa, visto que se utiliza menor quantidade de amostras, padrões e reagentes, bem como é possível analisar simultaneamente o dobro de amostras, gerando economia de tempo e energia.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pela TIE nas amostras com sólidos solúveis totais abaixo de 22 °Brix foram satisfatórios e não diferiram significativamente das metodologias convencionais. As exatidões ficaram compreendidas entre 93,3 e 117,2% nestas amostras. O valor de LOD foi baixo, mostrando que é possível observar-se uma diferença de temperatura a partir de 0,08 °C, e o LOQ de 0,27 °C mostra que pode-se aplicar a TIE em amostras que contenham a partir de 0,50% de teor de acidez.

Para utilização da TIE em alimentos com elevada quantidade de açúcar, observou-se diferença nos resultados, comparando com a metodologia convencional, devido a elevada quantidade de açúcar das composições. Necessita-se de maiores análises quanto à presença de interferentes, como açúcares e demais ingredientes, para investigar a relação destes com a liberação de calor.

Além disso, a técnica pode ser miniaturizada, com resultados de exatidão próximos a 100%, para análise de maior quantidade de amostras num mesmo espaço de tempo, utilizando menor volume de reagentes, padrões e amostras, adequando-se aos princípios da química verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARIN, J. S. *et al.* Infrared Thermal Imaging: A Tool for Simple, Simultaneous, and High-Throughput Enthalpimetric Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, 2015.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 143.

BRASIL. **Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978 - Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas**. São Paulo 1978.

CECCHIO, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas, São Paulo: Editora da UNICAMP, 2003. 207.

DOGAN, H.; KOKINI, J. L. **Rheological properties of foods. Handbook of engineering**. Nova York: CRC Press, 2007. 1040.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide method validation and related topics**. 2014. Disponível em: < <http://www.eurachem.org> >.

FDA. **Food dressings and foods**. 21. OFFICE, U. S. G. P. Washington DC: I.S. Government Printing Office. 21CFR169.150 2018.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993613001234> >.

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

IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. São Paulo: 2008. 1020.

MASINO, F. *et al.* A study of the relationships among acidity, sugar and furanic compound concentrations in set of casks for Aceto Balsamico Tradizionale of Reggio Emilia by multivariate techniques. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 673-679, 2005. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604006739> >.

OLIVEIRA, A. S. *et al.* Green and fast determination of the alcoholic content of wines using thermal infrared enthalpimetry. **Food Chemistry**, v. 258, p. 59-62, 2018.

RUSSEL, N. J.; GOULD, G. W. **Food preservatives**. Nova York, EUA: Library of Congress, 2003.

TISCHER, B. *et al.* Rapid microplate, green method for high-throughput evaluation of vinegar acidity using thermal infrared enthalpimetry. **Food Chemistry**, v. 215, p. 17-21, 2017.

TISCHER, B. *et al.* Rapid and simultaneous determination of acidity and salt content of pickled vegetable brine by using thermal infrared enthalpimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 34-37, 2017.

TORREZAN, R. **Manual para a produção de geleias de frutas em escala industrial**. EMBRAPA-CTAA, 1998. 27 Disponível em: < https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/doc29-1998_000gc3pnmuc02wx5ok01dx9lcy4av4k9.pdf >.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de acidez executada pela TIE em alimentos semi-sólidos gerou resultados satisfatórios nas amostras de molhos, sendo iguais estatisticamente às determinações por titulação convencional, com exatidões entre 93 e 117%, mostrando-se uma técnica alternativa e viável para determinação da acidez total destes alimentos. Quanto aos valores de LOD e LOQ, foram obtidos 0,08 e 0,27 °C, respectivamente. O valor de LOD nos mostra que mesmo baixas diferenças de temperaturas já podem ser detectadas, e o LOQ mostra que é possível aplicar a TIE em amostras que contenham a partir de 0,50 % de acidez.

Quando se trata de alimentos com elevado teor de açúcar, os valores diferem devido à hidrólise ácida e/ou básica, dentre outras reações exotérmicas, ocorrendo simultaneamente à reação de neutralização, gerando resultados que quantificam não somente a acidez, mas sim toda elevação de temperatura gerada por diferentes reações que ocorrem no meio.

Necessita-se de maiores análises quanto à presença de interferentes, visto que alimentos são produtos complexos, compostos de diversos ingredientes, podendo ocorrer simultaneamente mais de uma reação liberadora de calor. Mais testes precisam ser realizados para aprimorar a exatidão do método, com diferentes concentrações de ácidos na solução com sacarose, para simular o efeito matriz, fazendo com que o teste se aproxime mais da real formulação do produto.

A aplicação da TIE para análise de acidez de amostras semi-sólidas de alimentos com sólidos solúveis totais abaixo de 22 °Brix é uma boa alternativa para determinação deste parâmetro, quando comparada às metodologias tradicionais. O método mostra-se vantajoso visto que utiliza menor volume de amostras e reagentes, possibilitando a análise de inúmeras amostras simultaneamente, reduzindo tempo de análise e gasto de energia. Além disso, o método pode ser miniaturizado. Sendo assim, pode ser considerado um método verde, visto que respeita diversos princípios da química verde. Porém, a técnica limita-se para aplicação em alimentos com elevada quantidade de açúcar, pois a análise não é seletiva apenas para a reação de neutralização

Trabalhos futuros podem explorar o uso da TIE em placa de ELISA para análise simultânea de diversos parâmetros, como análise de ferro, sódio e cálcio, além da acidez, em amostras semi-sólidas de alimentos. Também pode-se analisar o efeito matriz dos interferentes, utilizando diversas concentrações de ácido com sacarose, para aprimorar a aplicação da técnica em amostras de alimentos com elevada quantidade de açúcar. Além disso, sugere-se que a análise seja feita em

ambiente com temperatura e umidade relativa controlada, para diminuir a geração de erro quanto à diferença de temperatura entre amostras, placas e reagentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JÚNIOR., O. P. D. et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, v. 12, n. 1/2, p. 116-131, 2001.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Brasília, Brasil: EMBRAPA, 2012.

BACCAN, N. et al. **Química analítica quantitativa elementar**. Campinas: Editora Edgard Blucher LTDA., 1979. 245.

BAGAVATHIAPPAN, S. et al. Infrared thermography for condition monitoring – A review. **Infrared Physics & Technology**, v. 60, p. 35-55, 2013.

BARIN, J. S. et al. Infrared Thermal Imaging: A Tool for Simple, Simultaneous, and High-Throughput Enthalpimetric Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, 2015.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 143.

BRASIL. **Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978 - Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas**. São Paulo 1978.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Brasil 2017.

BRASIL. **RESOLUÇÃO – RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003**. Brasil 2003.

BRASIL. **Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009** 2009.

CALAMARI, L.; GOBBI, L.; BANI, P. Improving the prediction ability of FT-MIR spectroscopy to assess titratable acidity in cow's milk. **Food Chemistry**, v. 192, p. 477-484, 2016.

CECCHIO, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas, São Paulo: Editora da UNICAMP, 2003. 207.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 105-126, 1999.

DARIAS-MARTINA, J. *et al.* Comparative study of methods for determination of titrable acidity in wine. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 16, p. 555-562, 2003.

DEL-RÍO, V.; LARRECHI, M. S.; CALLAO, M. P. Sequential injection titration method using second-order signals: Determination of acidity in plant oils and biodiesel samples. **Talanta**, v. 81, p. 1572-1577, 2010.

DOGAN, H.; KOKINI, J. L. **Rheological properties of foods. Handbook of engineering.** Nova York: CRC Press, 2007. 1040.

FDA. **Food dressings and foods. 21.** OFFICE, U. S. G. P. Washington DC: I.S. Government Printing Office. 21CFR169.150 2018.

FEINBERG, M.; RAGUÉNÉS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 239-252, 1999.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013. ISSN 0165-9936. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993613001234> >.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. D.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações.** São Paulo: Editora Nobel, 2008. 512.

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

HUBERT, P.; CHIAP, P.; CROMMENT, J. THE SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 135-148, 1999.

OHLWEILER, O. A. **Química analítica quantitativa.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S.A., 1980. 644.

IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** São Paulo: 2008. 1020.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M. **Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive rules.** 1997.

MASINO, F. *et al.* A study of the relationships among acidity, sugar and furanic compound concentrations in set of casks for Aceto Balsâmico Tradizionale of Reggio Emilia by multivariate techniques. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 673-679, 2005. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604006739> >.

RUSSEL, N. J.; GOULD, G. W. **Food preservatives.** Nova York, EUA: Library of Congress, 2003.

TISCHER, B. *et al.* Rapid microplate, green method for high-throughput evaluation of vinegar acidity using thermal infrared enthalpimetry. **Food Chemistry**, v. 215, p. 17-21, 2017.

TISCHER, B. *et al.* Rapid and simultaneous determination of acidity and salt content of pickled vegetable brine by using thermal infrared enthalpimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 34-37, 2017.

TORREZAN, R. **Manual para a produção de geleias de frutas em escala industrial.** EMBRAPA-CTAA, 1998. 27 Disponível em: <
https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/doc29-1998_000gc3pnmuc02wx5ok01dx9lcy4av4k9.pdf>.

ZOONEN, P. V. *et al.* Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 584-593, 1999.