

Análise Voltamétrica Cíclica: Uma Ferramenta para a Análise Qualitativa do Mel

Gabriela Possebon

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no
âmbito da Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica
Federal do Paraná*

Orientado por

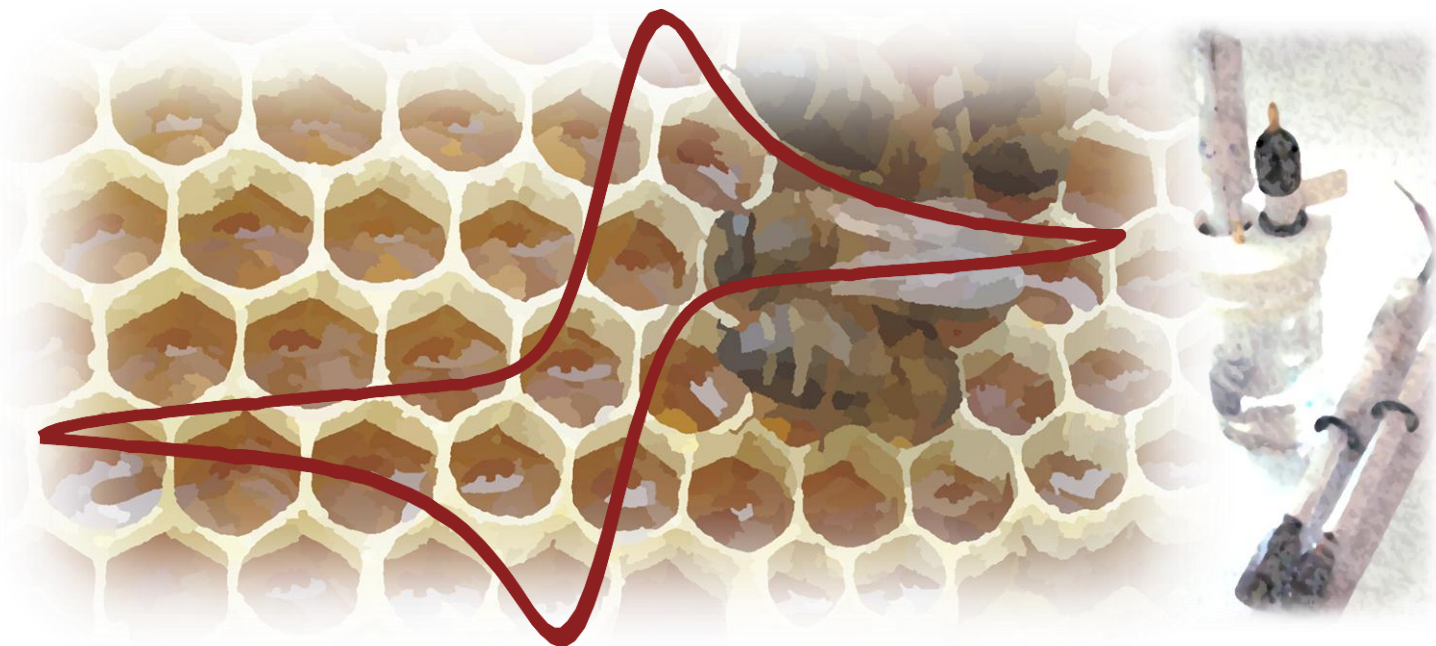
Professor Dr. Luís Avelino Guimarães Dias

Professora Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Professor Evandro Bona

Bragança

2019



Análise Voltamétrica Cíclica: Uma Ferramenta para a Análise Qualitativa do Mel.

Gabriela Possebon

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por
Professor Dr. Luís Avelino Guimarães Dias
Professora Dra. Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho
Professor Dr. Evandro Bona

Bragança
2019

Aos meus pais Carlos e Elaine, meus irmãos Caio e Fernanda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade e me abençoar nessa nova caminhada, sem a proteção dele eu não teria conseguido tantas conquistas e força para chegar até aqui.

Ao meu orientador Professor Doutor Luís Dias por todo conhecimento, paciência, disponibilidade, ajuda e experiências transmitidas durante todo o trabalho realizado; e à Professora Doutora Letícia Estevinho pela ajuda nas correções e nas análises polínicas.

Ao meu co-orientador e pesquisador, Professor Doutor Evandro Bona pela chance de ingressar na área científica e me proporcionar desde o início da graduação inúmeros benefícios para chegar até aqui.

À minha família Carlos, Elaine, Fernanda, Caio, tios, primos e avós pelo apoio, dedicação, incentivo durante toda minha jornada de estudos, sempre me amparando nos momentos que mais precisei e principalmente em todo meu mestrado.

Aos meus amigos Iara, Ana Luiza, Nayara e Leonardo que assim como minha família me apoiaram e estiveram presente de alguma forma enquanto eu estive longe de casa. Bem como meus amigos de Campo Mourão que foram parceiros do começo ao fim e sempre me incentivaram.

À UTFPR e IPB pelo acordo de Dupla Diplomação e todo amparo proposto durante o trabalho.

À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança e ao Departamento de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de orgulhosamente fazer parte da comunidade acadêmica e desenvolver este trabalho.

Aos professores que me acompanharam ao longo da minha jornada e que contribuíram não só com a minha formação acadêmica, mas também pessoal.

Aos amigos e colegas de Bragança, em especial aos meus amigos de moradia Edmar, Diego, Felipe, João e minhas amigas Letícia, Milena, Nathália, Nadine e Nagila, pela parceria, apoio e tornarem meus dias aqui melhores. Agradeço também às minhas parceiras de mestrado Larissa, Liandra e Beatriz pelo companheirismo em todos os trabalhos e disciplinas.

A todos manifesto a minha gratidão pela contribuição para a realização desta Tese de Mestrado.

RESUMO

O presente trabalho consistiu na aplicação da voltametria cíclica como ferramenta analítica para a discriminação de amostras de méis, com o objetivo de se estabelecer uma técnica rápida, simples e barata em estudos futuros de análise de qualidade e autenticidade de méis. Para este propósito, o estudo envolveu a construção de eléctrodos de trabalho compósitos de grafite sem e com a adição de nanopartículas (NiO) que foram testados no seu desempenho analítico e comparados com os eléctrodos de trabalho de platina e carbono vítreo (eléctrodos comerciais), usando voltametria cíclica. Estes testes envolveram a análise de uma solução redox, de reação reversível, e a discriminação de cinco amostras de mel comerciais (caracterizadas no seu perfil polínico e cor). O método estatístico multivariado para comparação do desempenho analítico de cada eléctrodo na discriminação dos 5 méis selecionado foi o método de análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A implementação deste método foi o segundo propósito deste estudo, tendo-se estabelecido critérios para a seleção do melhor modelo e avaliação da robustez na previsão da classificação das amostras. Neste estudo testaram-se também pré-tratamentos dos voltamogramas cíclicos para otimizar os modelos de previsão (escalonamento, 1ª e 2ª derivadas).

Os melhores modelos PLS-DA obtidos para os 4 eléctrodos testados mostraram resultados com sensibilidade e seletividade acima de 97%, indicando que apenas 1 amostra analisada no total de 40 análises (cada mel foi analisado 9 vezes) foi mal classificada nos modelos selecionados. O eléctrodo de grafite foi o que permitiu obter o modelo PLS-DA mais simples (6 componentes) usando os dados originais dos voltamogramas cíclicos. Os resultados obtidos mostraram um cenário positivo para a análise voltamétrica cíclica, afirmando de que a mesma permite fazer a discriminação das amostras de mel e que poderá ser uma ferramenta adequada para a análise qualitativa deste produto.

Palavras-chave: mel; voltametria cíclica; análise polínica; eléctrodos compósitos; método dos mínimos quadrados parciais; discriminação.

ABSTRACT

The present work consisted in the application of cyclic voltammetry as an analytical tool for the discrimination of honey samples, in order to establish a fast, simple and inexpensive technique in future studies of honey quality and authenticity analysis. For this purpose, the study involved the construction of graphite composite working electrodes with and without the addition of nanoparticles (NiO) that were tested in their analytical performance and compared with platinum and vitreous carbon electrodes (commercial electrodes), using cyclic voltammetry. These tests involved the analysis of a redox solution, a reversible reaction, and the discrimination of five commercial honey samples (characterized in their pollen profile and color). The multivariate statistical method selected for comparing the analytical performance of each electrode on the 5 honeys' discrimination was the method of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The implementation of this method was the second purpose of this study, establishing criterias for the selection of the best model and evaluation of the prediction robustness in the samples' classification. In this study, pre-treatments of the cyclic voltammograms were also tested to optimize the prediction models (scaling, 1st and 2nd derivatives).

The best PLS-DA models obtained for the 4 electrodes tested showed results with sensitivity and selectivity above 97%, indicating that only 1 sample analyzed in the total of 40 analyzes (each honey was analyzed 9 times) was poorly classified in the selected models. The graphite electrode was the one that allowed to obtain the simplest PLS-DA model (6 components) using the original data of the cyclic voltammograms. The results obtained showed a positive scenario for the cyclic voltammetric analysis, stating that it allows to discriminate the honey samples and that could be an adequate tool for the qualitative analysis of this product.

Keywords: honey; cyclic voltammetry; pollen analysis; composite electrodes; partial least squares method; discrimination.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
PREÂMBULO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O mel	1
1.2. Análise polínica	2
1.3. Caracterização do Mel.....	2
1.4. Métodos analíticos para a caracterização do mel	7
1.5. Método eletroquímico	9
1.5.1 Voltametria Cíclica.....	10
1.6.2. Eléctrodos de Trabalho	11
2. METODOLOGIA.....	14
2.1. Amostragem	14
2.2. Caracterização da Cor do Mel	15
2.3. Análise Polínica.....	16
2.4. Análise voltamétrica	17
2.4.1 Eléctrodos compósitos de grafite.....	17
2.4.2. Equipamento voltamétrico.....	17
2.4.3. Voltametria cíclica numa solução redox	18
2.4.4. Voltametria cíclica no mel.....	18
2.5. Métodos Estatísticos	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
3.1. Cor do Mel.....	21
3.2. Perfil polínico	21
3.3. Desempenho dos eléctrodos de trabalho	23
3.4. Pré-tratamentos e aplicação do modelo PLS-DA.....	26
4. CONCLUSÃO.....	38
5. REFERÊNCIAS	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Informação apresentada no rótulo de cada frasco de mel.....	14
Tabela 2 - Cores padrão do mel definidas pela USDA e seus repetivos intervalos da escala mm PFund.....	15
Tabela 3 - Composição dos eléctrodos construídos.....	17
Tabela 4 - Condições operacionais para a voltametria cíclica da solução Redox	18
Tabela 5 - Condições operacionais para a voltametria cíclica do mel.....	19
Tabela 6 - Cores obtidas nas 5 amostras de méis	21
Tabela 7 - Percentagem de cada tipo de pólen identificado presente nas amostras de mel.	22
Tabela 8 - Classificação e os 2 pólenes mais predominantes nas amostras de mel.....	23
Tabela 9 - Resultados médios de parâmetros obtidos e calculados a partir dos voltamogramas cíclicos da solução Redox	24
Tabela 10 - Resultados da validação cruzada k-folds e dos melhores modelos de PLS-DA obtidos.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de uma célula eletroquímica com 3 eléctrodos. R: eléctrodo de referência; W: eléctrodo de trabalho; C: contra-eléctrodo ou eléctrodo auxiliar; V: controlo de potencial através do potenciostato; A: fluxo de corrente. Fonte: Otlés, 2016.	9
Figura 2 – Voltamograma típico de uma reacção reversível. Fonte: Wang, 2006.	10
Figura 3 – Voltamograma cíclico de uma substância em a intensidade da corrente aumenta com o acréscimo da concentração de analito. Fonte: Wang, 2006.	11
Figura 4 – Amostras de mel usadas	14
Figura 5 – Escala de cores do mel com seus repetivos valores de mmPFund.	16
Figura 6 – Voltamogramas cíclicos obtidos de todos os eléctrodos em estudo com a solução redox. CV – eléctrodo carbono vítreo; G – eléctrodo de grafite; PT – eléctrodo de platina; GNp – eléctrodo de grafite com nano-partículas.....	25
Figura 7 – Voltamogramas cíclicos obtidos com os quatro eléctrodos do presente trabalho em solução redox: A) originais; B) pré-tratamento escalonamento; C) pré-tratamento 1ª derivada; D) pré-tratamento 2ª derivada	27
Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eléctrodos de grafite sem e com nanopartículas nas amostras de mel A1: A) originais; B) pré-tratamento escalonamento; C) pré-tratamento 1ª derivada; D) pré-tratamento 2ª derivada.	28
Figura 9 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eléctrodos de platina e carbono vítreo nas amostras de mel A1: A) originais; B) pré-tratamento escalonamento; C) pré-tratamento 1ª derivada; D) pré-tratamento 2ª derivada	29
Figura 10 – Representações gráficas dos 3 primeiros CPs PLS-DA obtidas da discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o eléctrodo G.	30
Figura 11 – Gráfico de setas para o modelo de discriminação PLS-DA com 7 CPs dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o eléctrodo G.....	31
Figura 12 – Contribuição de cada potencial do voltamograma cíclico nas 7 componentes presentes no melhor modelo PLS-DA selecionado para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o eléctrodo G.	32
Figura 13 – Curvas ROC da validação cruzada com o modelo PLS-DA de 7 componentes para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o eléctrodo G.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE	Variação de potencial redox anódico e catódico
A	Âmbar
A1	Amostra 1
A2	Amostra 2
A3	Amostra 3
A4	Amostra 4
A5	Amostra 5
AC	Âmbar claro
Ag	Prata
Ag/Cl	Cloreto de prata
AOAC	Associação de Químicos Agrícolas Oficiais
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês “Differential pulse voltammetry”)
E	Escuro
E°	potencial redox
E_{pa}	Potencial do pico anódico
E_{pc}	Potencial do pico catódico
FNAP	Federação Nacional dos Apicultores de Portugal
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
I_{pa}	Intensidade do pico anódico
I_{pc}	Intensidade do pico catódico
KCl	Cloreto de Potássio
LSV	Voltametria de varredura linear (do inglês “Linear sweep voltammetry”)
NiO	Óxido de níquel
Np	Nanopartículas
CPs	Componentes
PLS-DA	Análise discriminantes por métodos dos mínimos quadrados
SWCSV	Voltametria de decaagem catódica (do inglês “Cathodic stripping voltammetry”)
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês “Squarewave voltammetry”)

PREÂMBULO

a) Enquadramento

O mel é um alimento rico em muitas substâncias benéficas à saúde humana, podendo ser ingerido puro ou indiretamente, por estar presente em alimentos como aditivo. Este produto natural, tem grande valor económico no mercado consumidor, necessitando assim ter que passar por uma série de análises para garantir sua qualidade e autenticidade. Por exemplo, a classificação do mel em monofloral ou multifloral é importante para as empresas que o comercializam, devido ao valor acrescentado da segunda denominação. Esta classificação é verificada através da análise polínica, uma análise demorada e que exige técnicos especializados. Também no controlo de qualidade do mel são necessárias várias análises químicas demoradas e de valor económico elevado. Por isto, o desenvolvimento de metodologias analíticas alternativas rápidas, simples e baratas que forneçam informação relevante sobre o mel e que possam ser usadas como ferramentas de decisão são desejáveis para toda a indústria do mel. Neste âmbito decidiu-se aplicar a voltametria cíclica, uma ferramenta analítica eletroquímica, na análise qualitativa do mel com utilização de vários eléctrodos de trabalho para efeitos comparativos do desempenho analítico, salientando-se os eléctrodos compósitos de grafite com e sem nanopartículas, que foram construídos para serem aplicados neste estudo.

b) Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consistiu em estudar o desempenho de vários eléctrodos de trabalho na análise qualitativa de 5 méis por voltametria cíclica, usando os voltamogramas cíclicos para a análise discriminante por implementação de uma metodologia estatística multivariada.

Os objetivos específicos foram:

- construção de eléctrodos de trabalho compósitos de grafite com e sem nanopartículas (NiO).
- verificar e comparar o desempenho dos eléctrodos construídos com eléctrodos de trabalho comerciais de platina e carbono vítreo.
- efetuar a análise de cor e polínica nas amostras de mel.

- verificar o desempenho analítico dos eléctrodos construídos com uma solução redox, de reação reversível.
- estudar as condições experimentais para a análise do mel por voltametria cíclica.
- estabelecer a metodologia multivariada de análise discriminante pelo método dos mínimos quadrados parciais para o tratamento dos voltamogramas cíclicos.
- comparar os desempenhos analíticos dos eléctrodo de trabalho na análise do mel.

c) Estrutura do trabalho

O trabalho possui 4 capítulos divididos em revisão bibliográfica, metodologia, resultados e discussões, conclusão e referências.

No primeiro capítulo faz-se uma breve introdução sobre o mel, suas propriedades, caracterizações e metodologias analíticas utilizadas para garantir a qualidade do produto. Também se incluiu uma breve explicação sobre a voltametria cíclica e os eléctrodos necessários para esta análise, bem como, exemplos de aplicação desta técnica em estudos de análise de mel.

No segundo capítulo estão as metodologias usadas no presente trabalho para realizar os objetivos em cima mencionados, com a descrição sobre as condições experimentais analíticas aplicadas e a preparação das soluções usadas neste estudo. Além disso neste capítulo fez-se um breve resumo da metodologia estatística multivariada usada para obter os modelos discriminantes de previsão.

Em resultados e discussões apresentam-se os resultados obtidos em todas as análises feitas na solução redox e nas amostras de mel, bem como, resultados do tratamento de dados.

No quarto capítulo conclui-se sobre os objetivos principais e específicos propostos neste estudo. Por fim apresenta-se as referências utilizadas no desenvolvimento deste estudo.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mel

Segundo a legislação comunitária no Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro, o mel é definido como uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar ou das secreções de plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia (Decreto- Lei nº 214/2003, de 18 de Setembro). Este produto é produzido geralmente em duas etapas. Na primeira, o néctar é recolhido em diversas espécies de plantas nectaríferas (plantas que produzem flores com elevada concentração de néctar) mais próximas das colméias. Em seguida, o néctar sugado passa por reações enzimáticas no pré-estômago das abelhas produzindo frutose e glucose a partir da sacarose. A segunda fase é caracterizada pela transferência de néctar entre as abelhas produtoras proporcionando adição de açúcares simples através das secreções salivares em conjunto com as transformações enzimáticas. A partir disso, as abelhas distribuem o mel nos alvéolos da colmeia onde ocorre a redução de umidade até mais ou menos 20% (Huidobro et al., 1995).

Em Portugal, a produção do mel tem impacto económico relevante, salientado pelos 10 mil apicultores registrados nos dados apresentados no Programa Apícola Nacional para 2014-2016 e pela produção média de 10 mil toneladas com rendimento de 50 milhões de euros, com venda destinada tanto ao consumidor direto, como para indústrias e centros comerciais (Federação Nacional dos Apicultores de Portugal - FNAP, 2016).

Considerando a sua relevância comercial como produto alimentar, existem vários estudos sobre as características e propriedades do mel com o objetivo da valorização como, por exemplo: classificação do mel em monofloral e multifloral associada à sua origem floral (Sancho, 1992; Maia et al., 2003; Morais et al., 2007); controlo de qualidade para garantir a originalidade (Sivakesava e Irudayaraj, 2002; Vargas, 2006; Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril; Ball, 2007; Ruoff et al., 2004; Acquarone et al., 2007; Finola et al., 2007); análise da sua composição físico-química (Bertoncelj, 2007; Olaitan et al., 2007; De Rodríguez et al., 2004; Al-Mamary et al., 2002; Finola et al., 2007; Decreto-Lei 214/2003, de 18 de Setembro; Anklam, 1998; Castro-Vázquez et al., 2009).

A seguir faz-se uma breve descrição das análises do mel mais utilizadas para a sua caracterização, realçando a informação analítica que se obtém. Evidenciam-se as técnicas

usadas para estabelecer a origem polínica do mel, qualidade do mel e caracterização físico-química. Posteriormente, efetuou-se uma apreciação global da informação analítica de metodologias instrumentais, finalizando-se com apresentação das técnicas eletroquímicas e dos eléctrodos de trabalho mais comuns usados na análise do mel em trabalhos publicados.

1.2. Análise polínica

Quanto à sua origem floral, o mel pode ser classificado como monofloral, quando existe um néctar predominante de um género de planta, ou multiflorais caso tenha mais géneros e não possuir um que seja predominante (Sancho, 1992; Maia et al., 2003). Para essa denominação é feita uma análise da contagem microscópica de grão de pólen presentes no mel, com o objetivo de identificar os pólenes de plantas nectaríferas e definir a percentagem de predominância ou não de um determinado grão de pólen no mel. O espectro polínico do mel permite definir a sua origem floral. Considerando a informação sobre as características das plantas ao nível da produção de néctar e produção do pólen, é possível estabelecer o perfil polínico do mel, cuja informação pode ser também usada para estabelecer a sua origem geográfica (Morais et al., 2007). Em geral, para classificar um mel como mel monofloral usa-se o seguinte critério geral baseado no pólen de maior predominância: mel com percentagem >45% de um pólen é monofloral, com excepção dos pólenes de Lavandula, Eucaliptus e Castanea que necessitam ter níveis de iguais ou superiores 15, 70 e 90% num mel, respectivamente, para este ser classificado de mel monofloral desse pólen.

A análise polínica é um dos métodos mais importantes para a autenticidade do mel em questão de origem geográfica e botânica, porém é uma análise que exige pessoal técnico especializado e experiente, além de que a mesma não poder ser feita com muitas amostras no mesmo dia por ser demorada (Dias, 2013).

1.3. Caracterização do Mel

O mel vem sendo muito utilizado como alternativa substitutiva de adoçantes, em geral, devido à sua composição, propriedades medicamentosas e principalmente por ser de origem natural. Em questão dessa oferta/procura, o mesmo pode passar por adulterações na composição para aumentar a sua quantidade ou diminuir seu valor económico. Sendo assim, para garantir a qualidade do mel com suas características originais e garantir que o consumidor não seja enganado existem requisitos da qualidade do mel definidos pelo Codex Alimentarius no Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril ao nível dos parâmetros físico-químicos (Sivakesava e Irudayaraj, 2002; Jorge et al., 2016). A seguir efectua-se uma

apresentação dos parâmetros típicos da avaliação da qualidade do mel e da caracterização físico-química.

1.3.1. Parâmetros de qualidade

O controlo de qualidade do mel é necessário para garantir que é um produto alimentar autêntico, sendo proibido acrescentar-lhe ou remover qualquer ingrediente (Ball, 2007). Para comercializar o mel deve ser analisado de forma rotineira a parâmetros de qualidade de modo a prevenir a adulteração por adição de outros ingredientes alimentares (por exemplo, xaropes de sacarose ou melaços) e tratamentos que levem à alteração do produto (fermentação, aquecimento e filtração) (Ruoff et al., 2004). A seguir apresentam-se exemplos de parâmetros típicos da avaliação da qualidade do mel.

Teor de matérias insolúveis. A presença de matérias insolúveis no mel está associada aos componentes naturais do mel (os grãos de pólen) e de outros por contaminação, associados à higienização e condições no processamento do mel (Vargas, 2006). Este teor deve ser no máximo 0,1 g e 0,5 g por 100 g de mel respetivamente no mel centrifugado e processado (Decreto-Lei n.º 131/85, de 29 de Abril).

Condutividade elétrica. A condutividade elétrica do mel está relacionada com a presença de sais minerais, ácidos orgânicos e proteínas, sendo assim, diferem-se de acordo com a origem botânica da matéria-prima recolhida pela abelha para a produção do mel (Acquarone et al., 2007). Os méis em geral devem ter no máximo 0,8 mS/cm de condutividade, com exceções dos méis de flores de castanheiro e *Arbutus unedo* (medronheiro), *Erica* spp (erica), *Eucalyptus* spp (eucalipto), *Tilia* spp. (tília), *Calluna vulgaris* (torga ordinária), *Leptospermum* spp (leptospermo), *Melaleuca* spp. (melaleuca) e mistura dos mesmos, que podem apresentar níveis no mínimo de 0,8 mS/cm (Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril).

Ácidos Livres. Os ácidos livres presentes no mel são os ácidos orgânicos que são responsáveis pela acidez do mel com pH entre 3,5 e 4,5. Estes valores baixos de pH inibem o crescimento de microrganismos, por isso o controlo de acidez se torna importante para a conservação do produto e o aumento de vida de prateleira e, consequentemente, a qualidade

do mel (Finola et al., 2007). Sendo assim, está estabelecido que a concentração de ácidos deverá ser no máximo de 50 miliequivalentes/1000g de mel e para uso industrial no máximo de 80 miliequivalentes/1000 g de mel (Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril).

Índice Diastásico. O índice diastásico é relacionado com a diástase (α e β -amilase) que possui pouca resistência ao calor, cuja análise permite ter uma indicação se a qualidade do mel foi afectada, por exemplo, pelo aquecimento do produto nas condições de armazenamento e/ou tempo de prateleira. Este é medido em escala Schade e deve ter no mínimo 8 valores para o mel em geral. Com exceção, os méis com baixo teor natural de enzimas como a α e β -amílase, o valor de índice diastásico pode ser no mínimo de 3 valores (Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril).

1.3.1. Parâmetros de caracterização físico-química

O mel tem grande variabilidade na sua composição físico-química e na cor, pois dependem de fatores como a origem floral do néctar utilizado na produção, clima, condições ambientais, manuseio, armazenamento, e processamento do mel. Na sua composição há cerca de 200 substâncias diferentes (Al-Mamary et al., 2002; Arráez-Román et al., 2006; Küçük et al., 2007) salientando-se os hidratos de carbono principalmente glucose, frutose e sacarose com elevadas concentrações. Os outros compostos secundários por estarem com concentrações baixas são os minerais, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgânicos, aminoácidos (Finola et al., 2007), compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), enzimas e outros fitoquímicos (Bertoncelj, 2007). A seguir apresentam-se exemplos de parâmetros mais comuns na caracterização físico-química do mel.

Cor. A cor do mel geralmente está relacionada com a sua composição de minerais, compostos fenólicos e tipo de grãos de pólen relacionado com a origem botânica do néctar utilizado na sua produção. As cores podem variar do claro ao âmbar; o âmbar engloba as cores desde o alaranjado até ao preto. Outros factores que afectam a cor do mel são a idade e as condições de armazenamento. Também o aquecimento do mel altera a cor através da reação de Maillard por caramelização da frutose junto de reações de polifenóis. O grau de

escurecimento depende da temperatura e/ou tempo de armazenamento (Bertoncelj, 2007; Olaitan et al., 2007).

Hidratos de Carbono. Os hidratos de carbono no mel correspondem a mais de 95% da sua matéria seca, sendo que cerca de 70% deles são frutose, glucose e sacarose, e os restantes correspondem a dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos. Os teores de açúcares influenciam diretamente o mel em relação à viscosidade, densidade, cristalização e valores energéticos (De Rodríguez et al., 2004), bem como, as características organolépticas (sabor) do mel (Olaitan et al., 2007). O nível de sacarose não deve ultrapassar o máximo de 5 g/100 g de mel. Méis com predominância do pólen de *Robinia pseudoacacia* (falsa acácia), *Medicago sativa* (luzerna ou alfalfa), *Banksia menziesii* (Mensies Banksia), *Hedysarum* (hedisaro), *Eucalyptus camadulensis*, *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milliganii* e *Citrus spp.* (citrinos), poderá conter no máximo 10 g/100 g de mel. Já o mel de *Lavandula spp.* (rosmaninho, alfazema) e *Borago officinalis* (borragem), deverão conter no máximo 15 g/100 g de mel (Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril).

Em relação ao teor total de frutose e glucose há um requisito mínimo de 60 g/100 g de mel de néctar e de 45 g/100 g de mel de melada (Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril). A relação entre frutose/glucose é muito importante na caracterização dos méis, uma vez que a frutose é mais doce que a glucose, verificando-se que os méis com valores maiores nessa relação tendem a serem mais líquidos e mais doces (De Rodríguez et al., 2004).

Água. A água é o segundo composto maioritário no mel e influencia a qualidade. Está estabelecido o limite máximo de 20% de água no mel pela legislação portuguesa (Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro). Porém os méis para uso industrial, em geral, podem conter no máximo 23%, e o mel de urze (*Calluna*) também para uso industrial, no máximo 25% (Decreto-Lei nº 131/85, de 29 de Abril). O teor de água no mel é muito importante para a determinação do seu tempo de vida útil, pois o mel se mantém estável com valores baixos na atividade de água, prevenindo a granulação e evitando a fermentação durante o armazenamento. Por outro lado, a humidade baixa está relacionada com o aumento de viscosidade do mel que pode levar à cristalização e diminuir a qualidade do ponto de vista de aquisição pelo consumidor.

Ácidos Orgânicos. Esses compostos são responsáveis pela acidez e contribuem para o sabor característico do mel. Os ácidos orgânicos mais comuns no mel são: glucônico (responsável pela digestão enzimática da glucose), málico, cítrico, succínico, fumárico e pirúvico (Anklam, 1998; Olaitan et al., 2007). O nível de acidez no mel é um parâmetro analítico importante, por permitir avaliar a possibilidade de ocorrer fermentação do mel, visto que níveis abaixo do limite máximo (50 miliequivalentes por 1000 gramas) indica não haver presença de leveduras que necessitam de pouca humidade para se reproduzirem, uma vez que as mesmas aumentam o nível de acidez (De Rodríguez et al., 2004).

Minerais. Esses compostos estão em baixa concentração no mel variando entre 0,04% e 0,2% em méis claros e escuros, respectivamente. Os níveis de ião potássio destacam-se com o cálcio, cobre, ferro, manganês e fósforo. O perfil mineral do mel pode ser usado nos estudos de pesquisa geográfica, pois está associada às características do solo onde as plantas nectaríferas cresceram (Anklam, 1998).

Proteínas. As proteínas representam 0,2% da composição do mel, incluindo as enzimas (α -glucosidase, β -glucosidase e amilase). A atividade enzimática no mel permite avaliar o grau de exposição ao calor durante o processamento e armazenamento e, por isso, é indicadora da qualidade do mel (Anklam, 1998).

Compostos Nitrogenados. Estes compostos correspondem a 0,04% da massa seca do mel e englobam os alcaloides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas. A presença e o tipo de aminoácidos dependem do tipo de mel porém, a prolina é dominante de todos eles (Al-Mamary et al., 2002).

Compostos Voláteis. Os compostos voláteis são compostos orgânicos presentes no néctar e responsáveis pelo aroma característico do mel. No perfil de compostos voláteis deste produto inserem-se compostos com grupos funcionais de aldeído, cetona, álcool, ácido carboxílico e

éster. O perfil destes compostos voláteis permite efectuar estudos de origem floral do mel, classificação, etc (Castro-Vázquez et al., 2009).

Compostos Fenólicos. Na composição do mel os compostos fenólicos principais englobam os flavonóides e ácidos fenólicos. Segundo Anklam (1998), os principais flavonóides presentes no mel pertencem ao grupo das flavanonas e flavonas e são: miricetina, tricetina, quercetina, hesperatina, luteolina, caempferol, pinocembrina, crisina, pinobanksina, genkvanina e galangina. Os ácidos fenólicos são na maioria ácidos hidroxibenzóicos e cumáricos, sendo os mais comuns os ácidos: cafeico, ferrúlico, elágico e clorogénico, siríngico, vanílico, cinámico e p-hidroxibenzoico (Anklam, 1998). Em geral, as propriedades medicamentosas do mel têm sido atribuídas à sua composição fenólica. Algumas das suas propriedades terapêuticas para a saúde humana são a sua aplicação em distúrbios gastrointestinais, cicatrização de feridas e queimaduras; como agente antimicrobiano devido à sua propriedade osmótica que aumenta a resistência proliferação de microrganismos; pelas propriedades antibióticas e antibacterianas através dos compostos existentes em sua composição como as enzimas e os hidratos de carbono (Al-mamary et al., 2002).

A seguir faz-se uma breve descrição dos métodos analíticos mais usados na caracterização do mel que envolvem os métodos colorimétricos, espectrofotométricos e de separação (cromatográficos). Posteriormente, incide-se nos métodos eletroquímicos que são menos usados, mas com elevado potencial para desenvolver novas metodologias de análise do mel por permitirem uma análise rápida, simples, económica e robusta. Nos métodos eletroquímicos deu-se relevância à voltametria cíclica por se pretender aplicar esta técnica na discriminação de méis.

1.4. Métodos analíticos para a caracterização do mel

Para a caracterização físico-química e avaliação da qualidade do mel, é necessário aplicar vários métodos analíticos, como por exemplo:

- a quantificação de água presente no mel é feita com o uso de refratómetro de Abbé, do qual se obtém o índice de refração do composto em questão (desvio da luz ao atravessar a amostra). A interpretação do resultado é feita com o uso da tabela de Chataway, com correção do valor caso a leitura tenha sido feita a uma temperatura diferente de 20°C (Finola et al., 2007).

- a condutividade elétrica e o valor das cinzas totais são obtidos de acordo com as metodologias propostas por Sancho et al. (1991) por condutivimetria usando um condutivímetro (Sancho, 1991).
- o pH é determinado por potenciometria usando um milivoltímetro calibrado previamente com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.
- a acidez livre é analisada por titulação volumétrica ácido-base .
- os açúcares redutores são determinados por titulação com soluções padrão de Fehling e a sacarose aparente pelo método da inversão utilizando o mesmo procedimento de titulação (Finola et al., 2007).
- a espectrofotometria ultra-violeta é utilizada para determinar o HMF e o índice diastásico de acordo com o Método Oficial AOAC 958,09 (AOAC, 1990).
- a cromatografia líquida é geralmente usada na análise do perfil de açúcares, antibióticos, aminoácidos, ácidos fenólicos e flavonóides do mel (Kamal & Klein, 2011; Kelly et al., 2010; Zhang et al., 2018).
- a cromatografia gasosa é aplicada para analisar o perfil de componentes voláteis e contaminantes como, por exemplo, pesticidas (Rissato et al., 2007; Wolski et al., 2006).

Estas técnicas analíticas acopladas com análises tradicionais de melissopalínologia e com ferramentas quimiométricas permitem vários estudos de caracterização do mel, nomeadamente:

- (i) Verificação da autenticidade do mel, através da identificação de origem botânica, entomológica e/ou geográfica (Belay et al., 2017; Prosser & Hebert, 2017);
- (ii) Avaliação de parâmetros físico-químicos do mel, bem como atividades antioxidantes e antimicrobianas e propriedades terapêuticas (Almasaudi et al., 2017; Oryan et al., 2016; Osés, 2016);
- (iii) Detetação de contaminantes como inseticidas, pesticidas, medicamentos veterinários ou resíduos de antibióticos em mel (Rissato et al., 2007; Vichapong, 2016);
- (iv) Detetação de adulterações no mel (Guelpa et al., 2017; Siddiqui et al., 2017).

1.5. Método eletroquímico

A voltametria é uma técnica eletroanalítica da qual se obtém informações qualitativas e quantitativas através das reações oxidação-redução de uma substância química na superfície de um eletrodo de trabalho cuja resposta origina curvas corrente-potencial (Pacheco et al., 2013, Compton, 2013). Este tipo de análise é feita dentro de uma célula eletrolítica onde ocorre a eletrólise, constituída por três eléctrodos chamados de eléctrodos de trabalho, auxiliar e de referência (Aleixo, 2003). Enquanto que o eléctrodo referência torna o potencial constante, o auxiliar ajuda no equilíbrio do sistema fazendo reações contrárias às feitas pelo eletrodo de trabalho, por isso chamado de contra-eléctrodo. Através de um potenciostato é feito o varrimento do potencial e a leitura da intensidade de corrente da célula eletrolítica, com velocidade constante no tempo. Este varrimento é registrado em um gráfico chamado de voltamograma (Pacheco et al., 2013; Teixeira, 2018; Trovo, 2017).

A Figura 1 esquematiza uma célula electrolítica com os três eléctrodos, ligada a um potenciostato para a análise voltamétrica.

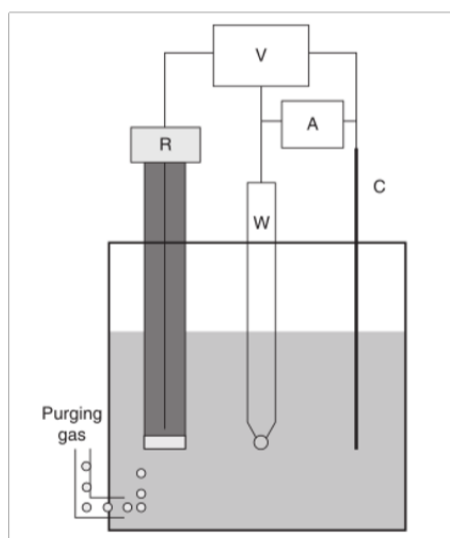


Figura 1 – Esquema de uma célula eletroquímica com 3 eléctrodos. R: eléctrodo de referência; W: eléctrodo de trabalho; C: contra-eléctrodo ou eléctrodo auxiliar; V: controlo de potencial através do potenciostato; A: fluxo de corrente. Fonte: Otles, 2016.

A possibilidade de a medida ser realizada diretamente na amostra sem pré-tratamentos, ter respostas rápidas qualitativas e quantitativas ter baixo custo nas análises e menor tempo de análise em relação aos métodos cromatográficos e espectroscópicos, fazem

com que a voltametria seja intensamente utilizada para análise de compostos (De Souza et al., 2003).

1.5.1 Voltametria Cíclica

A técnica da voltametria cíclica (CV do inglês, Cyclic Voltammetry) permite analisar e obter informações qualitativas sobre reações eletroquímicas (Wang, 2006), por exemplo, sobre a termodinâmica de processos redox, cinética das reações de transferência de elétrons e as reações químicas envolvidas em processos de adsorção (Compton, 2013).

A CV baseia-se no varrimento linear do potencial entre os eléctrodos de trabalho e o de referência inserida na solução contendo o analito (composto que se deseja fazer a análise), medindo-se a intensidade de corrente elétrica devido às reações oxidação-redução que ocorrem. No varrimento linear do potencial no sentido positivo obtêm-se picos anódicos e no sentido negativo, picos catódicos. O conjunto dos dois varrimentos resulta no voltamograma cíclico. Na Figura 2 apresenta-se o voltamograma cíclico típico de uma solução redox cujo par conjugado óxido-redutor representa uma reação reversível (Vernasqui, 2017; Trovo, 2017; Wang, 2006).

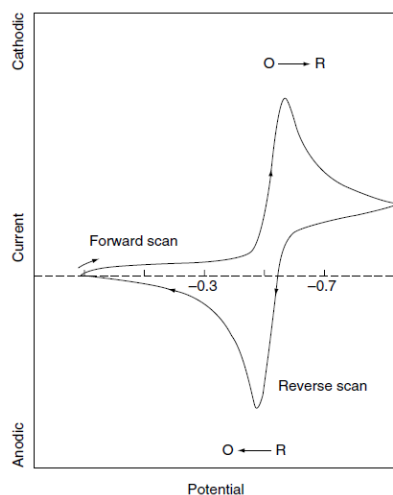


Figura 2 – Voltamograma típico de uma reação reversível. Fonte: Wang, 2006.

Na CV, a intensidade da corrente aumenta com a concentração de composto, ou seja, quanto maior a intensidade do pico maior a concentração da substância em análise, como pode ser visualizado na Figura 3, que mostra voltamogramas onde os picos catódicos e anódicos aumentam, com a concentração (Wang, 2006). O par redox geralmente usado para

testar o desempenho de eléctrodos de trabalho é o ferrocianeto/ferricianeto que possui reação oxidação/redução eletroquimicamente reversível (Vernaschi, 2017).

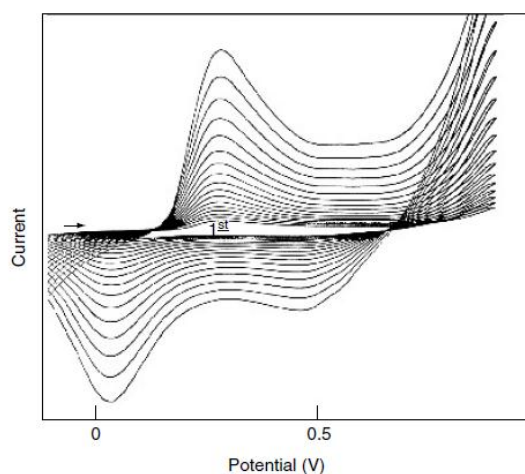


Figura 3 – Voltamograma cíclico de uma substância em a intensidade da corrente aumenta com o acréscimo da concentração de analito. Fonte: Wang, 2006.

1.6.2. Eléctrodos de Trabalho

Os eléctrodos de trabalho mais utilizados na análise eletroquímica são os de platina ou de carbono, tendo cada um as suas particularidades (Teixeira, 2018). O eléctrodo de platina (ou de outros metais sólidos) passa por polimento que lhe dá aspecto de um espelho e melhora a interação do eléctrodo com o solvente para facilitar a transferência de eletrões. Este eléctrodo tem desvantagens devido à possível formação de camadas de hidrogênio, oxigênio ou óxido de platina na superfície (Teixeira, 2018). O eléctrodo de carbono pode ser constituído por vários materiais como a grafite, o carbono vítreo, pasta de carbono, entre outros. Estes eléctrodos constituídos por carbono têm estruturas e características diferentes que acabam por interferir na análise. A grafite é o mais utilizado em análises voltamétricas devido ao baixo custo e por possuir porosidade em sua estrutura química permite que os iões e moléculas mais facilmente interajam na sua superfície (Silva, 2006; Teixeira, 2018).

Para a análise do mel usou-se eléctrodos de grafite sem e com óxidos de metais (nanopartículas) usando resina epoxídica como suporte. A composição interfere na densidade da corrente e no alcance do potencial voltamétrico e, segundo Silva (2006), os eléctrodos devem ter baixa volatilidade, baixa solubilidade no meio e alta pureza para evitar espécies eletroativas indesejadas.

Avanços recentes no desenvolvimento de eléctrodos incluem a aplicação de vários nanomateriais: materiais à base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de carbono); nanopartículas inorgânicas e orgânicas (nanopartículas de óxidos metálicos e metálicos, argilas nanométricas); polímeros condutores e isolantes (polímeros nanométricos e nanoestruturados, polímeros molecularmente impressos); e materiais híbridos, etc (Kumar et al., 2013). Eles têm sido aplicados com sucesso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para monitoramento de segurança ambiental e de alimentos, permitindo o aprimoramento do desempenho eletroanalítico de sensores e a imobilização de elementos de bioreconhecimento. Sua inclusão permite obter eléctrodos modificados que exibem maiores correntes atribuídas à oxidação ou redução da sonda redox em comparação com os eléctrodos não modificados. Esse aumento no sinal é interpretado como um aumento na área de superfície eletroativa, que é a porção disponível do eletrodo de trabalho que pode participar da transferência de eletrões (De Carvalho, 2013; Giordano, 2015).

As técnicas eletroquímicas na análise do mel são recentes, apresentando-se, a seguir, alguns exemplos onde o sistema voltamétrico usando:

- três eléctrodos (eléctrodo de platina como eléctrodo de trabalho; Ag/AgCl saturado KCl como eléctrodo de referência; eléctrodo de platina como eléctrodo auxiliar) usando voltametria cíclica foi aplicado no estudo de discriminação de 4 méis monoflorais (Tiwari et al., 2012);
- um eléctrodo de trabalho de ouro, um eléctrodo de referência calomelano e um eléctrodo auxiliar de platina, utilizando técnicas de DPV, LSV, CV e SWV foi aplicado na detecção de adulteração de mel com xaropes de açúcar e na quantificação da porcentagem de adulteração (Men et al., 2014);
- um eléctrodo de trabalho de prata, um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, e um eléctrodo auxiliar de platina com a técnica de CV foi possível diferenciar a origem botânica os méis monoflorais (*Castanea sp.*, *Echium sp.*, *Rubus sp.*, *Lavandula sp.*, *Prunus sp.*, *Erica sp.*, *Trifolium sp.*), como também o mel monofloral de acordo com a escala de cores (Peres et al., 2016);
- um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo, um eléctrodo de referência de calomelano saturado com KCl e um eléctrodo auxiliar de platina, com técnicas CV e SWV permitiu a determinação de agentes anti-sépticos (eugenol, carvacrol e timol) em amostras de mel (Tonello et al., 2016);

- um eléctrodo de trabalho constituído por uma película de antimônio revestindo um eletrodo de carbono vítreo, um de referência Ag/AgCl saturado com NaCl e um auxiliar de platina determinou-se a presença de antibióticos (tetraciclina) em amostras de mel usando as técnicas CV e SWCSV (Krepper et al., 2017).

2. METODOLOGIA

2.1. Amostragem

Foram utilizadas 5 amostras de méis obtidos comercialmente, sendo 4 Portuguesas e 1 Espanhola. As amostras estão representadas na Figura 4 e foram selecionadas pela cor com o objetivo de obter variabilidade na sua composição.



Figura 4 – Amostras de mel usadas

A informação dos rótulos de cada frasco de mel está apresentada na Tabela 1, com o posterior objetivo de se comparar com os resultados das análises polínicas.

Tabela 1 - Informação apresentada no rótulo de cada frasco de mel

Mel	Origem	Género da planta	Discrição polínica
A1	Portugal	<i>Lavandula sp.</i>	Mel de rosmarinho
A2	Espanha	-	Mel de urze
A3	Portugal	-	Mel multifloral
A4	Portugal	-	Mel de flores
A5	Portugal	<i>Eucalyptus sp.</i>	Mel de eucalipto

2.2. Caracterização da Cor do Mel

Para determinar a cor de cada amostra utilizada no presente trabalho, utilizou-se 5 g de mel em 10 mL de água (no caso de haver cristais em uma das diluições, a amostra era aquecida a 50°C) e em seguida deixadas em repouso por 10 minutos antes da análise. Para o branco usou-se água desionizada. A cor do mel foi determinada através de uma escala de mm Pfund a partir da medição da absorvância das diluições em um espectrofotômetro UV-Vis (Jenway modelo Genova) a um comprimento de onda de 635 nm. Para utilizar a escala mm Pfund utilizou-se na Equação 1 (Dias, 2013):

$$mmPfund = -38,70 + 371,39 \times Absorvância \quad (Eq. 1)$$

Posteriormente, o resultado desta escala é comparado a uma paleta de cores mencionadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 1985) que considera 6 grupos de cor para o mel, mostrada na Tabela 2, em que cada cor corresponde a intervalos de cor da escala mm Pfund.

Tabela 2 - Cores padrão do mel definidas pela USDA e seus repetivos intervalos da escala mm Pfund

Cores padrão do mel	Intervalos de cor da escala mm Pfund
Branco água	≤ 8
Extra Branco	$>8 \text{ e } \leq 17$
Branco	$>17 \text{ e } \leq 34$
Âmbar extra claro	$>34 \text{ e } \leq 50$
Âmbar	$>85 \text{ e } \leq 114$
Âmbar escuro*	>114

(*) Geralmente classificado como mel escuro

Na Figura 5 mostra-se uma correspondência entre intervalos mais pequenos de escala mm Pfund e a cor do mel associada, de forma a estabelecer uma escala visual.

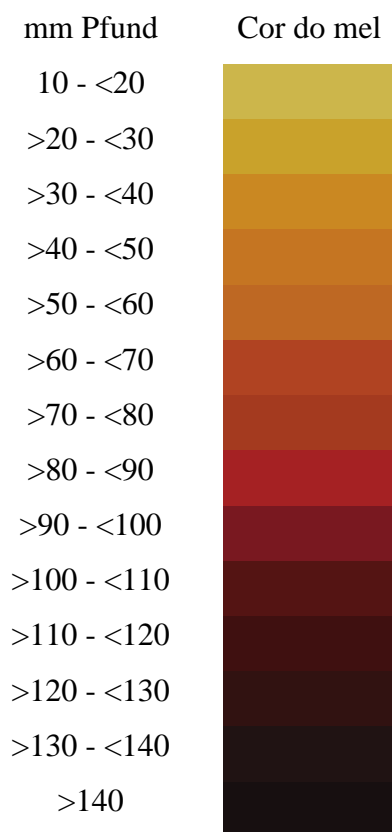


Figura 5 – Escala de cores do mel com seus repetivos valores de mmPFund.

2.3. Análise Polínica

Esta análise foi feita com o âmbito de estabelecer as diferenças entre as amostras de mel analisadas e estabelecer comparações com os resultados análises voltamétricas e determinar assim se estas podem ser usadas na discriminação de amostras de mel, uma metodologia analítica, rápida e econômica (Dias, 2013).

A análise de polén foi efetuada através do método de Louveaux que envolveu dissolver 10 g de mel em água destilada, centrifugar a 1500 rpm por 30 minutos e decantar. Após a adição de 10 mL de uma de mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico, colocou-se a solução em banho maria durante 3 minutos, sendo decantada posteriormente. O sedimento foi novamente lavado, centrifugado e decantado mais duas vezes sendo a primeira lavagem feita com 12 mL de água destilada e a segunda lavagem com 12 mL de hidróxido de potássio 7%. Depois desse procedimento os grãos de polén foram corados com uma solução de fucsina básica (Merck) e misturada com glicerina (Absolve). A determinação dos poléns presentes nas amostras foi através de um microscópio (Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar, Germany) com objetivas 400x e 1000x. Os grãos de polén foram agrupados em tipos

polínicos, conjunto de grãos de pólen com morfologia semelhante, normalmente originários de plantas do mesmo género.

Para a classificação em mel multifloral e monofloral usou-se o critério geral baseado no pólen de maior predominância méis com percentagem >45% de um pólen são monoflorais. Com excepções de méis de Lavandula, Eucaliptus e Castanea que são classificados em méis monoflorais se o respetivo pólen tem níveis superiores a 15,70 e 90% respectivamente.

2.4. Análise voltamétrica

2.4.1 Eléctrodos compósitos de grafite

Foram construídos 2 eléctrodos compósitos de grafite, um sem e outro com nanopartículas de NiO. O corpo dos eléctrodos consistiu num material cilíndrico de acrílico (10 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetros interno) e numa das extremidades (a inferior) colocou-se a pasta constituída por uma mistura de resina epoxídica da marca Araldite (Parte A e B) e grafite, podendo conter também nanopartículas de NiO. As percentagens de massa dos materiais usados na preparação dos eléctrodos estão referidas na Tabela 3. Pela outra extremidade do tubo introduziu-se um fio condutor de cobre, descarnado nas duas pontas, de maneira que uma das pontas do fio de cobre fique inserido na pasta, garantindo o contacto, e a outra ponta fora do tubo para se estabelecer a ligação ao potenciostato.

Tabela 3 - Composição dos eléctrodos construídos.

Eléctrodo	% Araldite	% C	% Np
G	50,0	50,0	-
GNp	47,0	52,5	0,5

% C – percentagem de carbono; % Np – percentagem de nanopartículas NiO

2.4.2. Equipamento voltamétrico

Para a análise voltamétrica foi montada uma célula electroquímica constituída por três eléctrodos:

- o eléctrodo de trabalho, tendo-se usado 4 eléctrodos diferentes para avaliar e comparar o desempenho analítico; 2 eléctrodos compósitos de grafite sem e com nanopartículas construídos para este trabalho e 2 eléctrodos comerciais, platina e carbono vítreo;

- contra-eléctrodo de filamento de platina (Biologic Science Instruments, A – 002233);
- eléctrodo de referência Ag/AgCl de junção simples (Biologic Science Instruments, RE – 1B).

Estes eléctrodos foram conectados a cabos ligados a um potenciostato-galvonostato PG580 (Uniscan Instruments Ltd), controlado com o Software UiEChem versão 1.34 (Uniscan Instruments Ltd), o qual foi instalado em um computador, permitindo adquirir as informações de voltametria.

2.4.3. Voltametria cíclica numa solução redox

Para a avaliar o desempenho analítico dos eléctrodos de trabalho construídos e dos eléctrodos comerciais, utilizou-se uma solução padrão redox preparada a partir de 0,4227 g de $K_4[Fe(CN)_6]$ e 0,745 g KCl num balão volumétrico de 100mL para se obter a concentração de 0,1 mol/L. Da análise desta solução com os quatro diferentes eléctrodos de trabalho foi medida a intensidade de corrente em relação ao potencial usando as condições de voltametria cíclica referidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições operacionais para a voltametria cíclica da solução Redox

Parâmetros	Condições estabelecidas
Potencial inicial (V)	- 0,4
Tempo de potencial inicial (s)	5
Potencial de varrimento 1 (V)	- 0,4
Potencial de varrimento 2 (V)	0,8
Velocidade de varrimento (V/s)	0,1
Volts por pontos (V)	0,01
Número de ciclos	5
Corrente (mA/V)	1

2.4.4. Voltametria cíclica no mel

Com o objetivo de verificar se era possível discriminar os méis deste estudo por voltametria cíclica e seleccionar qual dos 4 eléctrodos tinha melhor desempenho analítico, obtiveram-se voltamogramas cíclicos dos méis. Para isso os 5 méis foram analisados de forma a obter 9 voltamogramas cíclicos. Em cada análise foram medidos 5 g de mel e

dissolvidos em 25 mL de solução tampão. A solução tampão utilizada foi preparada com 0,7456 g de KCl e 5,44 mL de H₂SO₄ em um volume de 1000 mL, obtendo-se concentrações de 5 g/L e 0,1 mol/L, respectivamente.

Na Tabela 5 mostra-se as condições operacionais de cada eletrodo de trabalho para a análise voltamétrica cíclica das amostras mel.

Tabela 5 - Condições operacionais para a voltametria cíclica do mel.

Parâmetros	CV	G	GNp	PT
Potencial inicial (V)	-0,4	- 1,4	- 1,4	-0,3
Tempo de potencial inicial (s)	2,0	2,0	2,0	2,0
Potencial de varrimento 1 (V)	-0,4	- 1,4	- 1,4	-0,3
Potencial de varrimento 2 (V)	1,4	1,3	1,3	1,6
Velocidade de varrimento (V/s)	0,1	0,1	0,1	0,1
Volts por pontos (V)	0,05	0,05	0,05	0,05
Número de ciclos	3,0	3,0	3,0	3,0
Corrente (mA/V)	10,0	1,0	1,0	1,0

CV – Eléctrodo de carbono vítreo; G – Eléctrodo compósito de grafite; GNp – Eléctrodo compósito de grafite com nanopartículas; PT – Eléctrodo de platina.

2.5. Métodos Estatísticos

O presente trabalho implicou em organizar e tratar os resultados através de métodos estatísticos multivariados usando o programa de estatística R (versão R 3.5.0) e RStudio (versão 1.1.383), para obter os modelos de previsão e efetuar os testes de validação. Usaram-se as bibliotecas ggplot2 (Wickham, 2016), MASS (Venables, 2002), mdatools (Kucheryavskiy, 2018), caret (Kuhn et al., 2019) e mixOmics (Rohart, 2017).

O tratamento estatístico foi efetuado em duas etapas. Testou-se o efeito de pré-tratamentos de dados escalonamento ou derivadas, no intuito de remover informações indesejáveis ou redundantes e elevar a relação sinal/ruído (Teixeira, 2018; Kucheryavskiy, 2018). Aplicou-se a técnica multivariada de modelação de análise discriminante com o método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para obter os modelos de previsão entre as variáveis dependentes e independentes efetuando a análise qualitativa (classificação) desejável ao estudo. O PLS (do inglês, “Partial Least Square”) um modelo multivariado que se baseia na decomposição dos dados das variáveis independentes (dados X) e a variável

quantitativa dependente (dados Y) num conjunto de valores e vectores próprios, semelhante à análise de componentes principais. No entanto, as pontuações para os dados X e Y não são seleccionadas com base na direcção da variação máxima, mas são seleccionados para maximizar a correlação entre as pontuações das variáveis X e Y. Este método reduz os ruídos obtidos e permite utilizar um conjunto de variáveis independentes superior ao número de amostras analisadas (Ferreira, 2017; Oliveira, 2016; Teixeira, 2018). A PLS-DA permite obter um modelo multidimensional para previsão das características qualitativa e separação de grupos categóricos, relacionando o espaço associada à variável dependente Y (*separação das classes*) com o espaço definido para as variáveis independentes X. Para este método é necessário ter o conhecimento prévio da classe das amostras, para a relação direta entre a resposta instrumental e a propriedade de interesse (Ferreira, 2017; Valderrama et al., 2015; Vieira et al., 2019).






É também feita uma validação geral dos modelos de previsão obtidos usando validação cruzada interna com k-folds e do melhor modelo seleccionado através dos parâmetros sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos que são correctamente identificados) e seletividade (proporção de verdadeiros negativos que são correctamente identificados) (Cetó et al., 2013; Kuhn et al., 2019). Para a visualização dos resultados do modelo de discriminação PLS-DA utiliza-se o gráfico de representação do espaço de representação XY combinado (gráficos de “seta”) que permite verificar a distribuição das amostras entre o espaço X e o espaço Y (Rohart, 2017). A seta inicia-se na representação de X e a ponta, na localização da amostra no espaço de Y, representado setas curtas uma boa concordância encontrada pelo modelo entre os dois conjuntos de dados. O gráfico da curva ROC (do inglês, “Receiver Operating Characteristic”) permite visualizar a evolução dos resultados da sensibilidade e especificidade no modelo de discriminação, podendo-se obter valores de AUC (do inglês, “Área Under the Curve”) para avaliar a capacidade de cada modelo na previsão de classificação das amostras nos respetivos grupos (Rohart, 2017)..

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Cor do Mel

A cor é um dos atributos verificados pelos consumidores na hora da escolha para a compra comercial, sendo a mesma uma característica principal da fonte floral do mel e podendo ter relação, assim, com a análise polínica. As 5 amostras de méis foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis e determinada a cor por escala mm Pfund através das absorvâncias obtidas a seguir pela Tabela 6.

Tabela 6 - Cores obtidas nas 5 amostras de méis

Amostras	Abs (635 nm)	mm Pfund	Cor	
A1	0,286	67,5	AC	
A2	0,475	137,7	E	
A3	0,567	171,9	E	
A4	0,264	59,3	AC	
A5	0,343	88,7	A	

Na Tabela 6 verificou-se que as cores variam do âmbar extra claro ao escuro, logo não se obteve nenhuma amostra representativa com cor extra branco ou branco com variações no intervalo de 67,5 a 171,9 mm Pfund. As cores obtidas nas amostras analisadas foram âmbar, âmbar extra claro e escuro. A análise polínica permite verificar se a variabilidade obtida na cor poderá corresponder a acentuada variação na composição química, associada à mistura de diferentes nectares de plantas identificadas pelo perfil das amostras.

3.2. Perfil polínico

O perfil polínico das amostras corresponde a uma análise quantitativa, pela contagem dos grãos de pólen com morfologia semelhante, originários de plantas do mesmo gênero (por tipo de pólen). A proporção de cada tipo de pólen presente em cada amostra de mel está apresentada na Tabela 7, o que permite a sua classificação em termos de origem botânica (multifloral ou monofloral, considerando interpretação dos perfis polínicos). Para uma classificação mais rigorosa, a classificação do mel deveria ser confirmada com uma análise sensorial. Na Tabela 7 mostra-se a lista global dos tipos de pólen que foram identificados nas amostras e a respectiva percentagem de cada pólen associada à contagem do número de pólenes que foram indentificados na análise. Nos 5 méis foi possível identificar 19 tipos de pólen, que

são comuns nos méis Portugueses (Pires et al., 2014). A classificação das amostras em mel monofloral/multifloral foi efectuada usando como critério a percentagem dos 2 pólenes mais predominantes nas amostras de mel analisados (Tabela 8).

Tabela 7 - Percentagem de cada tipo de pólen identificado presente nas amostras de mel.

Pólen (%)	A1	A2	A3	A4	A5
<i>Acacia sp</i>			9.1		
<i>Castanea sativa</i>	35.3		6.1	41.7	8.6
<i>Cistus sp</i>	2.0	5.3	26.3	2.8	
<i>Crepis sp</i>	5.6				
<i>Echium sp</i>	2.3	2.8	2.2	2.7	53.4
<i>Erica sp</i>		52.2	5.4		12.3
<i>Eucaliptus sp</i>	17.0		4.0	7.5	11.3
<i>Halinifolium sp</i>			2.9		
<i>Lavandula sp</i>	10.4		2.2		2.5
<i>Leontodon sp</i>	3.7			14.0	
<i>Nynphae alba</i>	3.5				
<i>Morus sp</i>			32.9		
<i>Outros</i>	1.5		2.3		
<i>Pinus sp</i>				2.6	
<i>Prunus sp</i>	4.2	10.6	2.9	9.5	
<i>Quercus sp</i>					3.9
<i>Rubus sp</i>	6.2	1.4		2.4	5.3
<i>Tryfolium sp</i>		27.9		6.7	
<i>Vicia fava</i>	8.5		4.0	10.4	2.9

Os méis monoflorais (2 amostras) têm percentagens de pólen principal (1º pólen predominante) superiores a 45% (pólen *Erica sp* e *Echium sp*). Os restantes méis têm valores inferiores a 45% tendo sido classificados como méis multiflorais: mel A1, *Castanea sativa* (35,3%); mel A3, *Morus sp* (32,9%); mel A4, *Castanea sativa* (41,7%). Os méis A1 e A4 apresentam semelhantes níveis do 1º pólen predominante e, por isso, analiticamente poderá ser esperado resultados semelhantes entre estes dois méis. Nos restantes méis é esperado que a composição seja diferente pois, os pólenes mais predominante são diferentes.

Em relação à informação que as amostras de mel A1 e A5 apresentavam nos rótulos (mel de rosmaninho e eucalipto) verificou-se que o pólen *Lavandula sp* e *Eucaliptus sp* estavam presentes no respetivo perfil polínico, com níveis inferiores aos necessários para

uma classificação de monofloral. No caso do mel A1, o pólen *Lavandula sp* está com níveis próximos de 15% e, por isso, considerado como o pólen mais predominante.

Tabela 8 - Classificação e os 2 pólenes mais predominantes nas amostras de mel

Mel	Classificação	2 Pólenes mais predominantes
Mel A1	Multifloral	<i>Lavandula sp</i> , 10,4%; <i>Castanea sativa</i> , 35,3%
Mel A2	Monofloral de Erica	<i>Erica sp</i> , 52,2%; <i>Tryfolium sp</i> , 27,9%
Mel A3	Multifloral	<i>Morus sp</i> , 32,9%; <i>Cistus sp</i> , 26,3%
Mel A4	Multifloral	<i>Castanea sativa</i> , 41,7%; <i>Leontodon sp</i> , 14,0%
Mel A5	Monofloral de Echium	<i>Echium sp</i> , 53,4%; <i>Erica sp</i> , 12,3%

3.3. Desempenho dos eléctrodos de trabalho

Os voltamogramas cíclicos obtidos com os eléctrodos comerciais (CV-carbono vítreo e PT-platina) e construídos no laboratório (G-grafite e GNp-grafite com nanopartículas) da análise da solução redox estão apresentados na Figura 6. A Figura 6 mostrou que os quatro eléctrodos testados mostram voltamogramas cíclicos da análise da solução redox semelhantes, mas com intensidades de corrente diferentes.

Com o intuito de avaliar o desempenho dos eléctrodos usados, na Tabela 9 mostram-se os resultados adquiridos nos voltamogramas cíclicos, ou seja, o potencial do pico catódico (Epc) e anódico (Epa), bem como, a intensidade da corrente do pico catódico (Ipc) e anódico (Ipa). Também se mostram os parâmetros calculados: a razão entre essas intensidades (I_{pc}/I_{pa}), a variação do potencial redox anódico e catódico (ΔE) e o potencial redox (E°). Globalmente, os resultados apresentados nesta Tabela 9 são valores médios obtidos a partir de 3 medições eletroquímicas concordantes. Os resultados das intensidades de corrente mostraram precisões aceitáveis, pois os erros (desvios padrão relativos percentuais) obtidos são inferiores ou iguais a 2,1%. De salientar também que, se obtiveram erros mais baixos para as análises com os eléctrodos construídos (0,8% e 0,9% para os eléctrodos de G e GNp, respectivamente) e maiores para os eléctrodos comerciais (2,0% e 2,1% para os eléctrodos de PT e CV, respectivamente). Em relação aos valores de potencial medidos em todas as análises verificou-se terem erros inferiores a $\pm 0,01$ V.

De acordo com a Figura 6 e os dados apresentados na Tabela 9, o eléctrodo de GNp foi o que apresentou os maiores valores de intensidade de corrente quer no pico catódico quer

no anódico. Verificou-se que estes níveis são aproximadamente 2 vezes superiores aos valores de intensidade de corrente obtidos para o eléctrodo de G, 11 vezes superiores aos do eléctrodo de PT e 38 vezes superiores aos do eléctrodo de CV.

Numa reacção reversível a razão entre as intensidades de corrente do pico catódico vs pico anódico I_{pc}/I_{pa} deve ter o valor próximo a 1. Neste sentido há um elevado desempenho analítico em relação a um sistema redox reversível, sendo o eléctrodo de PT o que apresenta resultados mais próximo de 1, com o valor da razão entre as intensidades de corrente sendo 1,02. A seguir, os eléctrodos de G e GNp possuem resultado também de uma reacção quase reversível, pois ambos os eléctrodos apresentam uma razão I_{pc}/I_{pa} de valor 0,96. O eléctrodo CV foi o que mais se afastou ao de um processo reversível, uma vez que a razão I_{pc}/I_{pa} para a solução redox analisado foi de valor 1,16, ultrapassando 0,16 valores de 1. Mesmo que o eléctrodo GNp não teve essa razão tão próxima a 1, ainda tem melhor desempenho em questão do seu alto valor de corrente comparado ao eléctrodo de PT.

Tabela 9 - Resultados médios de parâmetros obtidos e calculados a partir dos voltamogramas cíclicos da solução Redox

Eléctrodo	E_{pc} (V)	I_{pc} (A)	E_{pa} (V)	I_{pa} (A)	I_{pc}/I_{pa}	ΔE (mV)	E°
CV	0,37	$1,09 \times 10^{-05}$	0,11	$9,36 \times 10^{-06}$	1,16	260	240
G	0,32	$2,30 \times 10^{-04}$	0,15	$2,39 \times 10^{-04}$	0,96	170	240
GNp	0,34	$4,13 \times 10^{-04}$	0,13	$4,28 \times 10^{-04}$	0,96	210	240
PT	0,29	$3,77 \times 10^{-05}$	0,18	$3,70 \times 10^{-05}$	1,02	110	240

*) CV - Carbono Vítreo; G - Grafite; GNp - Grafite com nano-partículas; PT – Platina

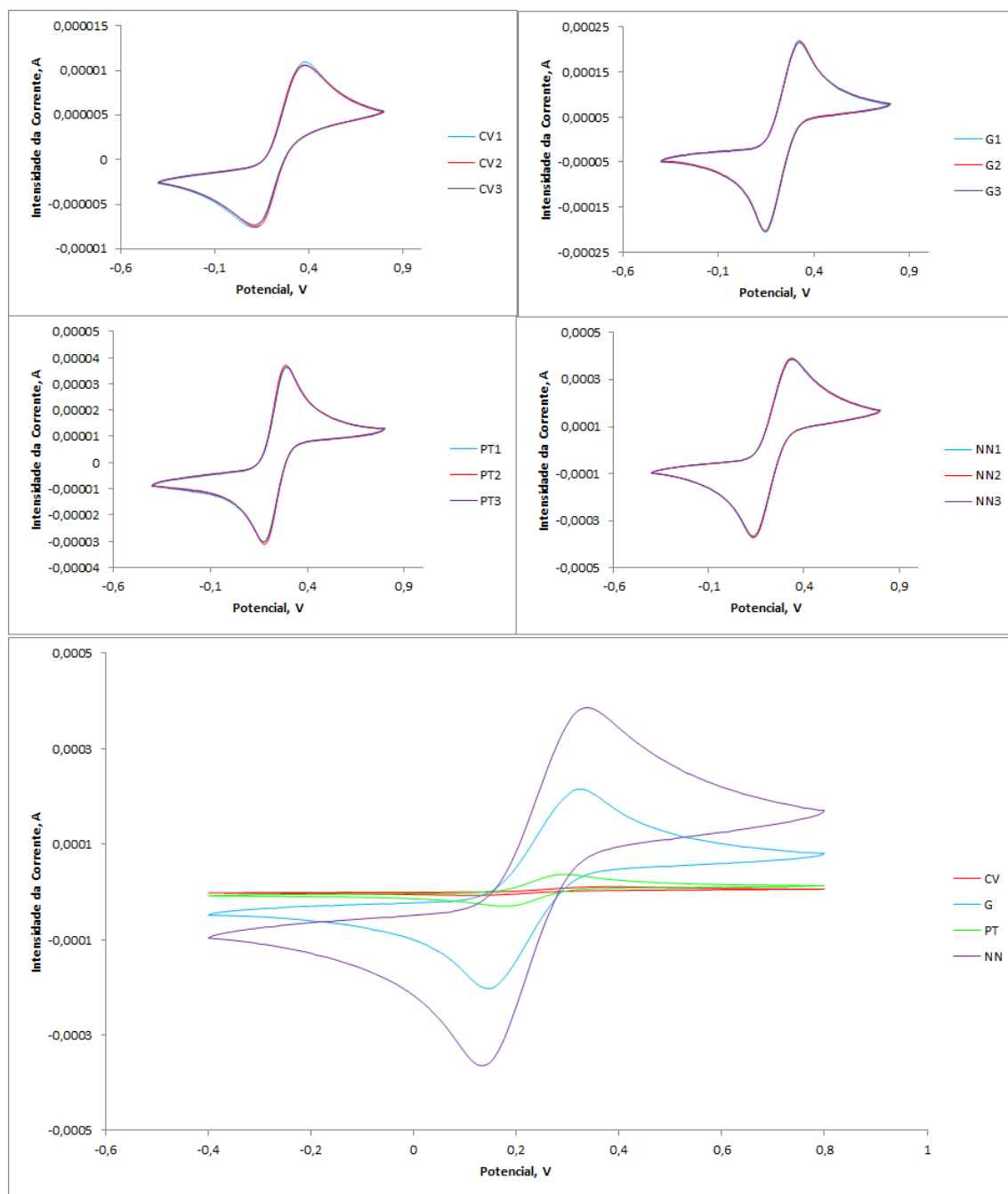


Figura 6 – Voltamogramas cíclicos obtidos de todos os eléctrodos em estudo com a solução redox. CV – eléctrodo carbono vítreo; G – eléctrodo de grafite; PT – eléctrodo de platina; GNp – eléctrodo de grafite com nano-partículas.

3.4. Pré-tratamentos e aplicação do modelo PLS-DA.

Para um melhor dimensionamento do voltamograma são utilizados pré-tratamentos que de certa forma são transformações de todos os pontos de cada voltamograma, ficando dimensionado e melhorando a visualização do mesmo.

Sendo assim, em busca de uma melhor visualização do pré-tratamentos utilizados em cada eléctrodo no presente trabalho, foi utilizada uma solução redox para determinar o comportamento destes, exemplificando os voltamogramas típicos para cada pré-tratamento original, escalonamento, 1ª derivada e 2ª derivada com cada eléctrodo de G, GNp, PT, CV, como representado pela Figura 7.

O objetivo da utilização dos tratamentos de escalonamento, primeira e segunda derivada é permitir o aumento de informação no pico analisado, pois nesses tratamentos as variações na linha de base entre os voltamogramas são corrigidas, os ruídos são amplificados e as características pequenas são mais evidenciadas diante das características maiores.

Os voltamogramas cíclicos obtidos usando os 4 eléctrodos testados da análise a todos os méis (dados originais) e após tratamento de escalonamento, 1ª derivada e 2ª derivada estão a seguir apresentados nas Figuras 8 e 9. Estas figuras mostram existir variação nos voltamogramas cíclicos (originais ou com pré-tratamentos) obtidos para os cinco méis analisados, com maior evidência nos resultados obtidos com os eléctrodos de G e GNp, indicativo da possibilidade de haver informação analítica possível de ser usada para discriminar as amostras de mel.

Na Figura 10 mostram-se as representações gráficas dos 3 primeiros componentes (CPs) do modelo PLS-DA obtido, a título de exemplo, para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o eléctrodo G, com 7 CPs por apresentar 100% de classificações corretas na validação cruzada com k-folds (valor médio de 54 modelos testados) de 100% (logo, 100% de exatidão na sensibilidade e seletividade no melhor modelo selecionado). Verificou-se que os grupos de amostras A2 e A4 são os que mais facilmente se discriminam, seguido do grupo do mel A3. Os grupos dos méis A1 e A5 mostram maior semelhança nos voltamogramas cíclicos e, por isso, estas amostras apresentam-se sobrepostas no espaço bidimensional definido em cada gráfico da Figura 10.

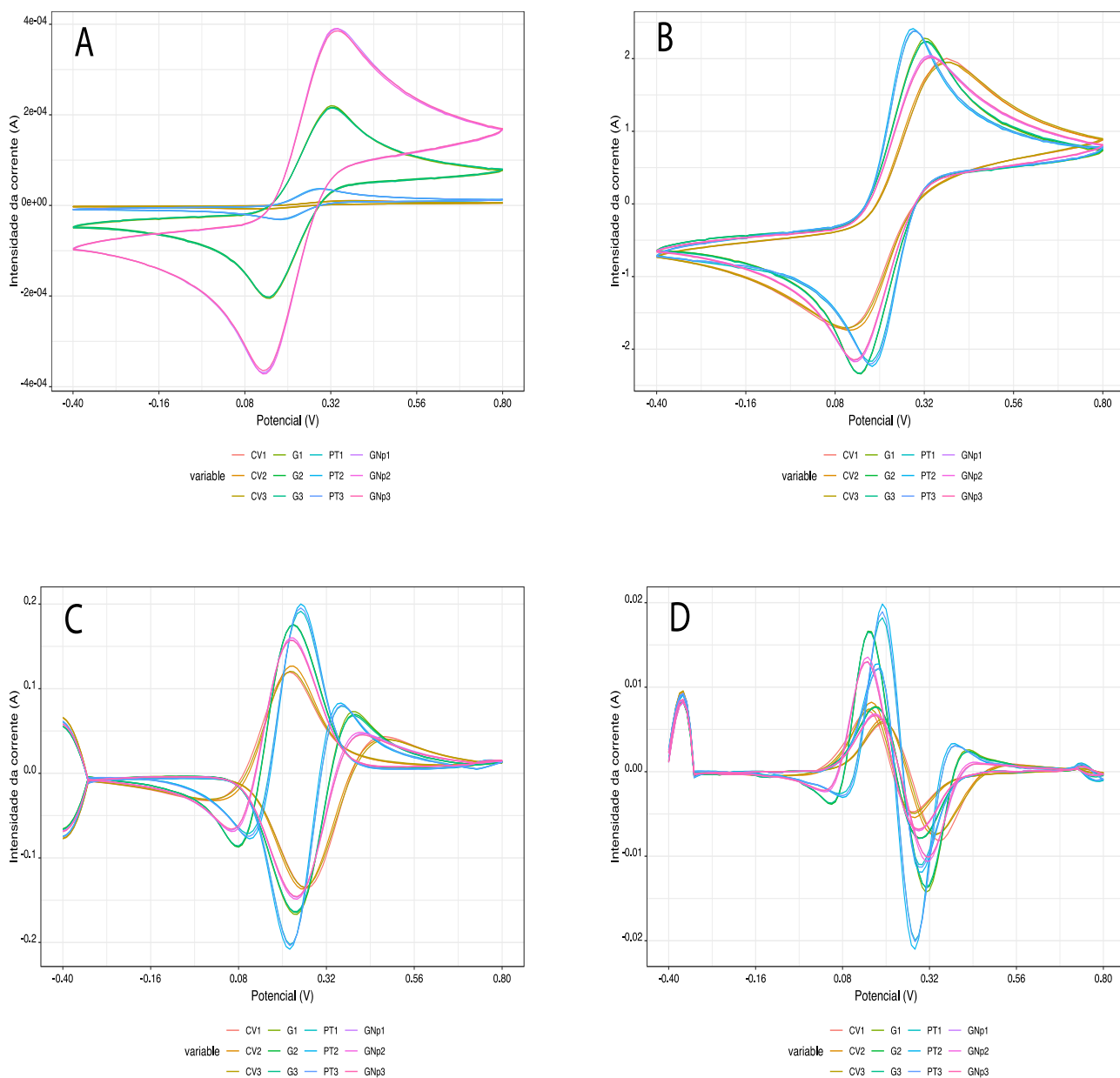


Figura 7 – Voltamogramas cíclicos obtidos com os quatro eléctrodos do presente trabalho em solução redox: A) originais; B) pré-tratamento escalonamento; C) pré-tratamento 1^a derivada; D) pré-tratamento 2^a derivada

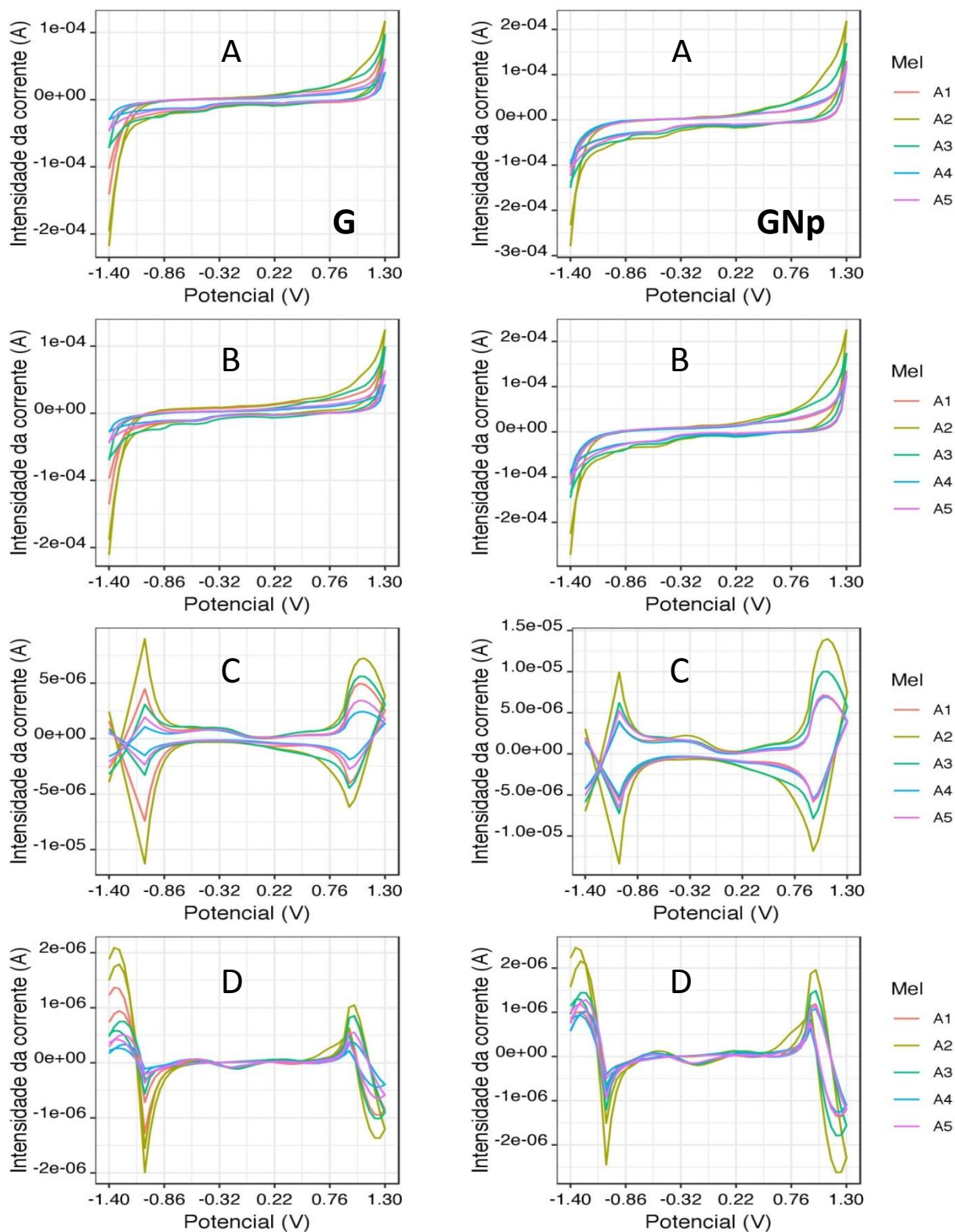


Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eléctrodos de grafite sem e com nanopartículas nas amostras de mel: A) originais; B) pré-tratamento escalonamento; C) pré-tratamento 1ª derivada; D) pré-tratamento 2ª derivada.

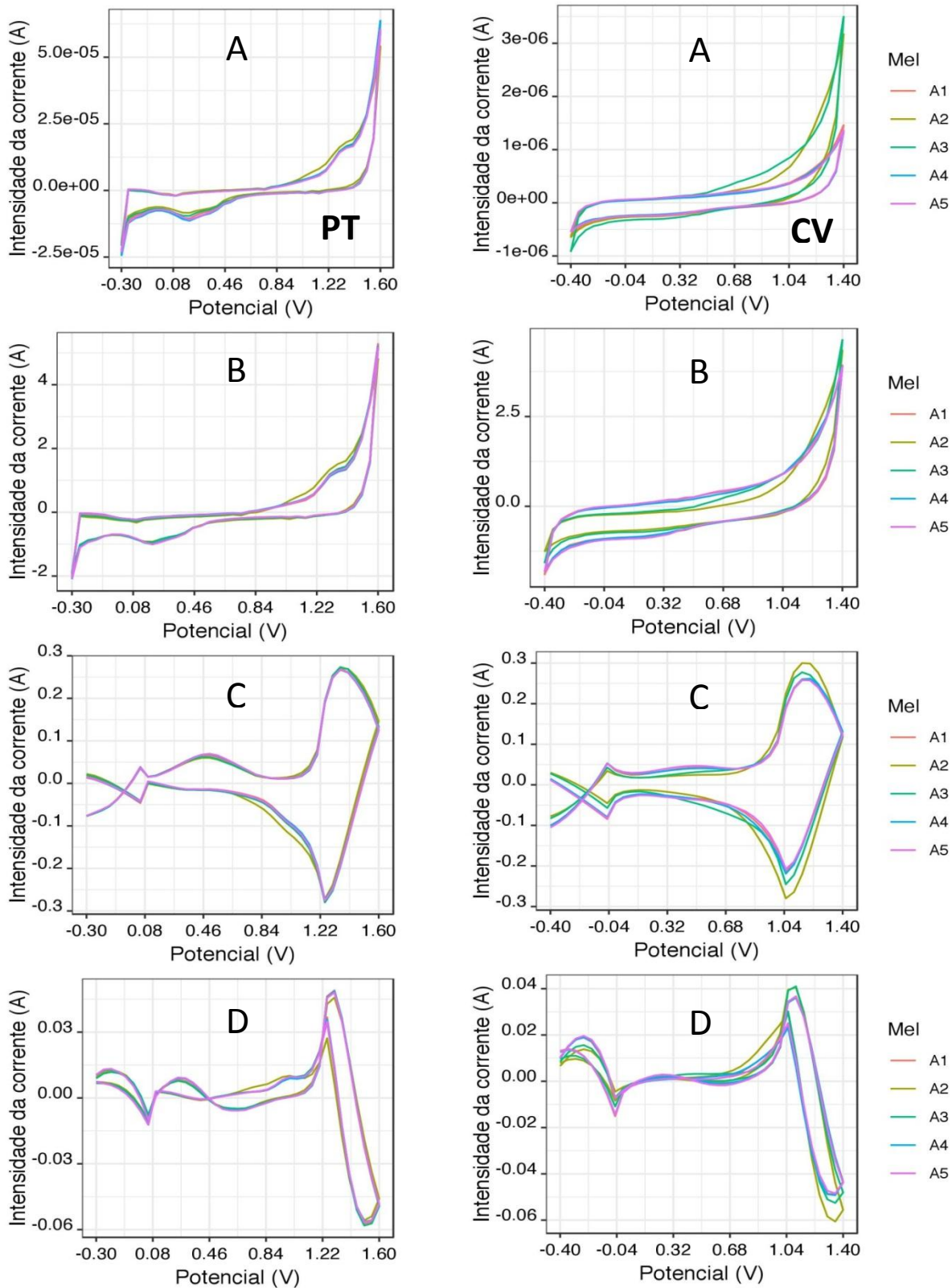


Figura 9 – Voltamogramas cíclicos obtidos com eléctrodos de platina e carbono vítreo nas amostras de mel: A) originais; B) pré-tratamento escalonamento; C) pré-tratamento 1^a derivada; D) pré-tratamento 2^a derivada

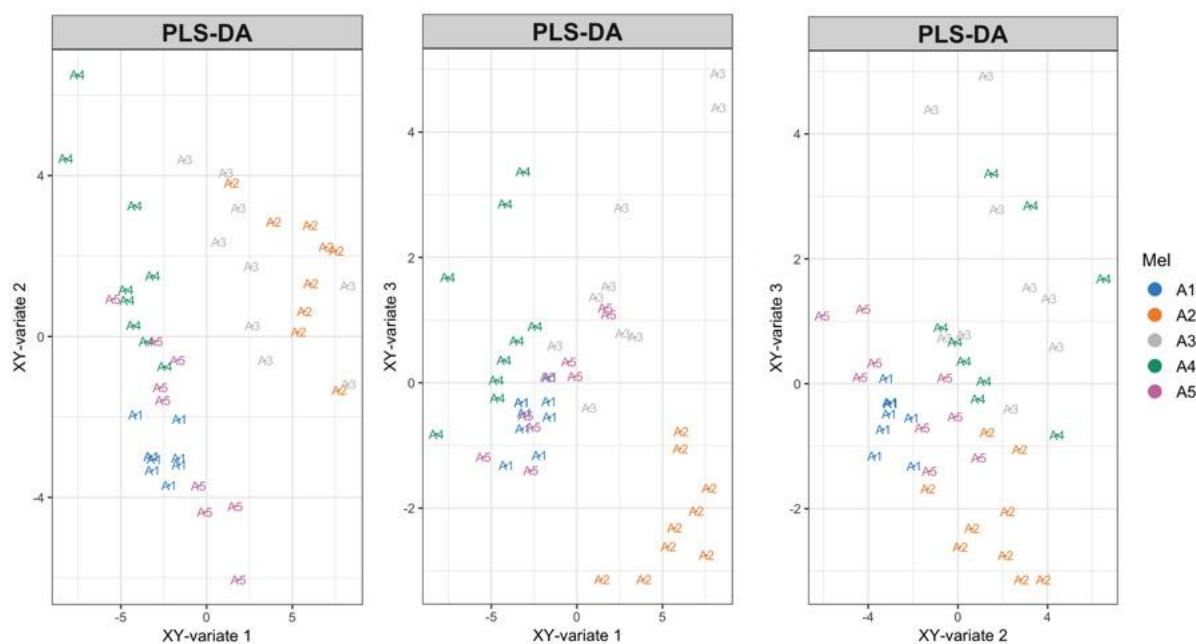


Figura 10 – Representações gráficas dos 3 primeiros CPs PLS-DA obtidas da discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o elétrodo G.

Em vez de projetar as amostras no espaço de representação XY combinado, como mostrado anteriormente, podem-se sobrepor os gráficos de representação X e Y através dos gráficos de “seta”, como o apresentado na Figura 11, para o modelo de discriminação PLS-DA dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o elétrodo G. Nesta figura, cada seta une a mesma amostra do espaço X ao espaço Y e setas curtas indicam uma boa concordância encontrada pelo modelo entre os dois conjuntos de dados, enquanto que setas longas mostram um desacordo entre os dois conjuntos de dados. O início da seta indica a localização da amostra no gráfico de representação de X e a ponta, a localização da amostra no espaço de Y. De reparar, que são os méis A5 que estão no centro do gráfico, indicando que nestes méis se obtiveram voltamogramas com intensidades médias relativamente aos restantes méis.

Na Figura 12 visualiza-se a contribuição de cada potencial do voltamograma cíclico nas 7 CPs presentes no melhor modelo PLS-DA selecionado para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o elétrodo G. Os 7 CPs têm informação maioritária dos méis A1, A2 e A4; e, de forma mais pontual, sobre os méis do grupo A3. A informação sobre os méis A5 parece ser mais residual (coeficientes baixos nos CPs, inferindo-se que foram discriminados por último. Outra maneira de verificar a influência das CPs na discriminação dos diferentes grupos de méis é o gráfico da curva ROC (do inglês

“Receiver Operating Characteristic”) que é insensível ao desequilíbrio de classes e permite visualizar as variações entre sensibilidade e especificidade no modelo de discriminação. Para este gráfico calculam-se os valores de AUC (do inglês “Área Under the Curve”) a partir da validação cruzada, usando grupos de amostras para avaliar a capacidade de cada modelo na previsão de classificação (calculada em média). O ROC é uma curva de probabilidade e a AUC representa o grau ou medida da separabilidade entre os grupos. O gráfico informa em que medida, o modelo é capaz de distinguir os grupos (classes). Quanto maior a AUC, melhor o modelo consegue prever 0s como 0s e 1s como 1s. Na Figura 13 mostram-se exemplos de curva ROC da validação cruzada com o modelo PLS-DA para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o elétrodo G, usando 7 CPs.

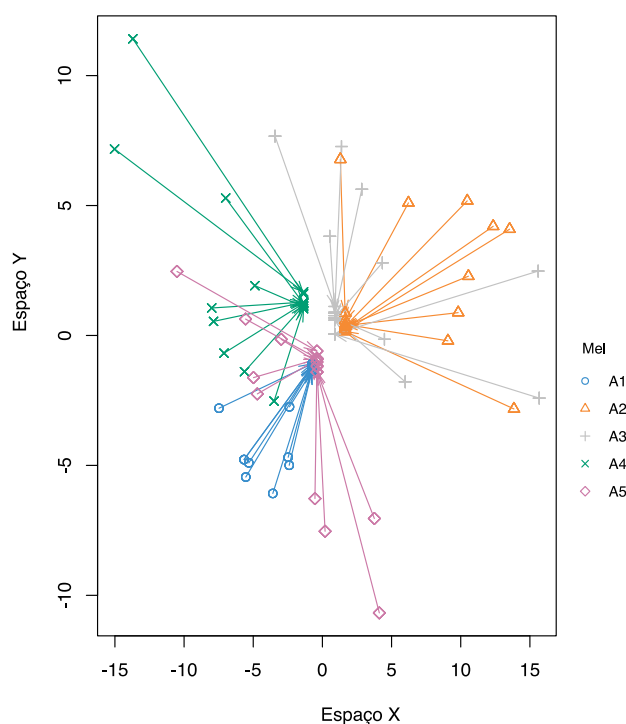


Figura 11 – Gráfico de setas para o modelo de discriminação PLS-DA com 7 CPs dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o elétrodo G.

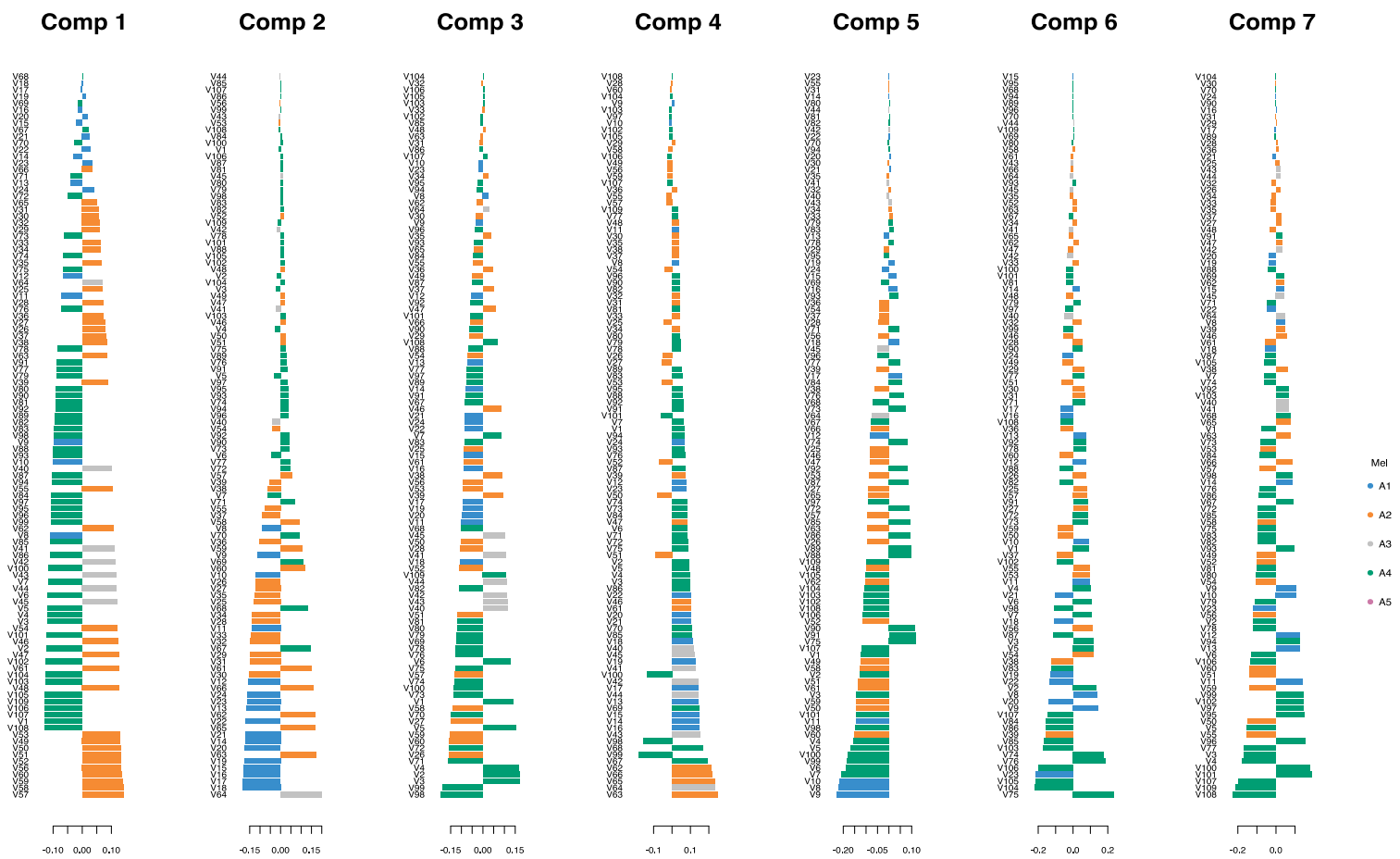


Figura 12 – Contribuição de cada potencial do voltamograma cíclico nas 7 componentes presentes no melhor modelo PLS-DA selecionado para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o elétrodo G.

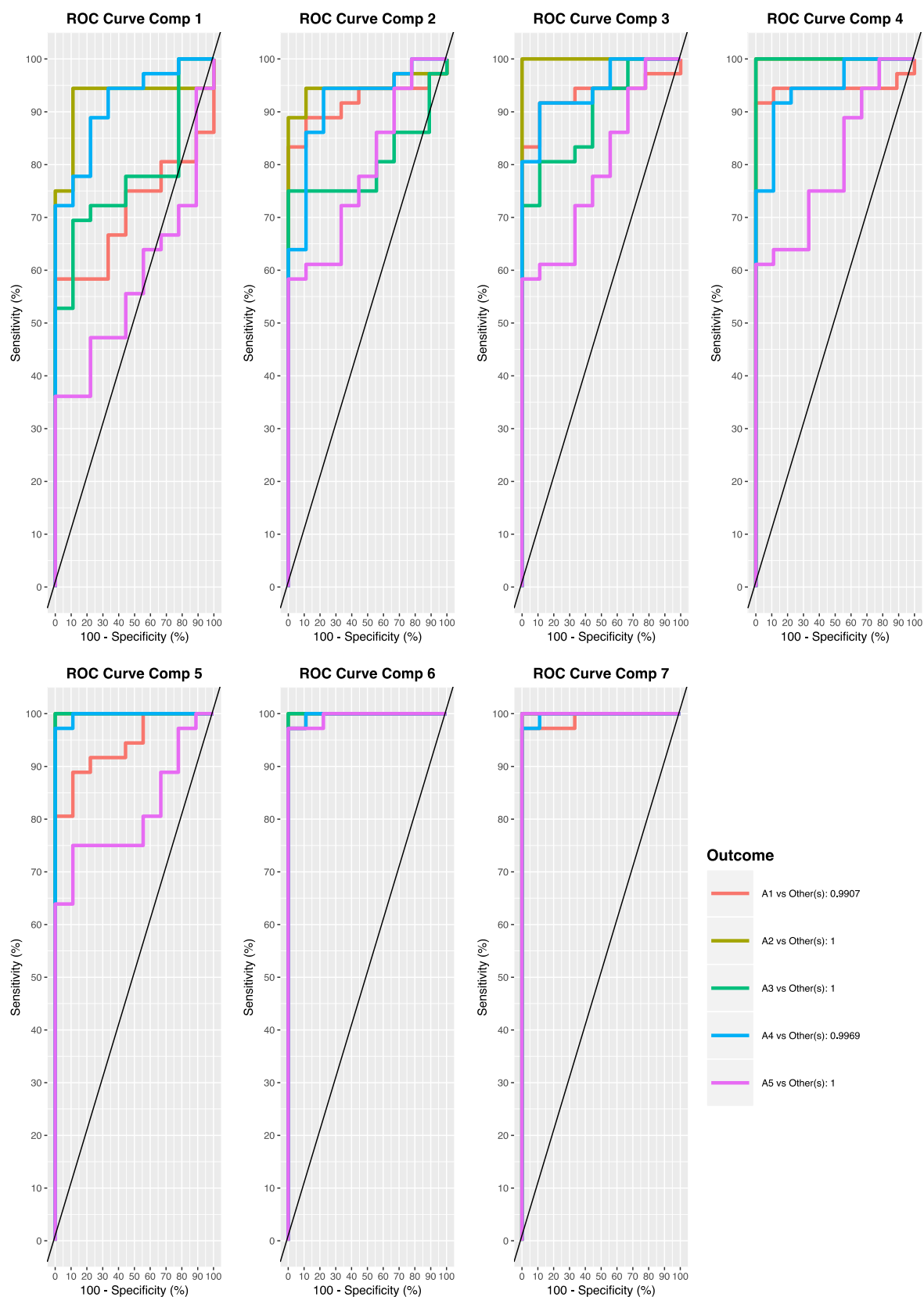


Figura 13 – Curvas ROC da validação cruzada com o modelo PLS-DA de 7 componentes para a discriminação dos 5 méis usando voltametria cíclica (dados originais) com o eléctrodo G.

A Figura 13 mostra que o modelo PLS-DA com 6 e 7 componentes apresenta valores AUC semelhantes na discriminação das amostras de mel nos 5 grupos analisados. Como já foi referido, o modelo com 7 CPs mostrou resultados de classificações corretas na validação cruzada com k-folds (valor médio de 54 modelos testados) de 100%, tal como, para a sensibilidade e seletividade do melhor modelo selecionado. Neste caso, considerou-se que o modelo de discriminação mais adequado para efeitos comparativos do desempenho do elétrodo de G com os voltamogramas cíclicos (dados originais) seria o modelo PLS-DA com 6 CPs. Devido à similaridade encontrada nos resultados da aplicação do modelo PLS-DA com os 4 eléctrodos, quer com os dados originais quer com os pré-tratamentos dos voltamogramas cíclicos, definiu-se que o número selecionado de CPs no modelo PLS-DA corresponderia à obtenção da curva ROC, exemplificada na Figura 13 no gráfico com 6 CPs.

Na Tabela 10 mostram-se os resultados obtidos dos modelos selecionados para os dados originais e para os dados com tratamento associados aos valores AUC total, o qual tem por função determinar a assertividade do modelo obtido. No geral, verifica-se que os modelos PLS-DA obtidos mostram discriminações aceitáveis dos 5 méis para os 4 eléctrodos, quer com os dados originais quer com os pré-tratamentos dos voltamogramas cíclicos. Os resultados mostram que, na validação cruzada dos modelos PLS-DA, a sensibilidade média foi sempre superior a 0,91%, o que mostra a robustez dos modelos na discriminação dos 5 méis, indicando que as análises às amostras de mel mostram exatidão e precisão aceitáveis.

Os melhores modelos selecionados mostram sensibilidades e seletividades superiores a variar entre 0,91 e 0,99%, mostrando que os 4 eléctrodos, quer com os dados originais quer com os pré-tratamentos dos voltamogramas cíclicos, permitem a discriminação aceitável dos 5 méis. Verificou-se que, de forma geral, os grupos de mel com previsões de classificações corretas de 100% são os dos méis A2 e A3. Dependendo dos modelos, os méis A1, A4 e A5 poderão ter más classificações. Dos resultados de cada elétrodo salientam-se os melhores modelos (a negrito na Tabela 10) selecionados considerando: primeiro, o maior valor de exatidão nas classificações por validação cruzada; segundo, o maior valor de sensibilidade e seletividade no melhor modelo obtido; terceiro, o valor mais elevado de AUC no melhor modelo obtido. De realçar que se desejam modelos com o menor número de CPs, porque modelos mais simples mostram geralmente maior robustez na previsão de classificação.

Tabela 10 - Resultados da validação cruzada k-folds e dos melhores modelos de PLS-DA obtidos

Eléctodo	nCPs	Tratamento	Exatidão	Melhor modelo			Classificações corretas (sensibilidade)				
			k-folds	Sensibilidade	Seletividade	AUC total	G1	G2	G3	G4	G5
G	6	Original	0.978	0.978	0.994	0.974	0,889	1,000	1,000	1,000	1,000
	6	Escalonamento	0.933	0.933	0.983	0.972	0,667	1,000	1,000	1,000	1,000
	8	1ª Derivada	0.933	0.933	0.983	0.967	0,778	1,000	1,000	1,000	1,000
	7	2ª Derivada	0.933	0.933	0.983	0.982	0,778	1,000	1,000	1,000	0,889
GNp	6	Original	0.911	0.911	0.978	0.951	0,889	1,000	1,000	0,889	0,778
	7	Escalonamento	0.978	0.978	0.994	0.979	0,889	1,000	1,000	1,000	1,000
	6	1ª Derivada	0.956	0.956	0.989	0.977	0,778	1,000	1,000	1,000	1,000
	5	2ª Derivada	0.956	0.956	0.989	0.971	0,889	1,000	1,000	1,000	0,889
PT	9	Original	0.933	0.933	0.983	0.926	0,778	1,000	1,000	1,000	0,889
	5	Escalonamento	0.978	0.978	0.994	0.968	1,000	1,000	1,000	0,889	1,000
	6	1ª Derivada	0.978	0.978	0.994	1.000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,889
	6	2ª Derivada	0.978	0.978	0.994	0.996	1,000	1,000	1,000	0,889	1,000
CV	8	Original	0.978	0.978	0.994	0.994	0,889	1,000	1,000	1,000	1,000
	6	Escalonamento	0.956	0.956	0.989	0.984	0,778	1,000	1,000	1,000	1,000
	6	1ª Derivada	0.978	0.978	0.994	0.989	0,889	1,000	1,000	1,000	1,000
	5	2ª Derivada	0.956	0.956	0.989	0.985	1,000	1,000	1,000	0,778	1,000

nCPs – número de componentes; G – Eléctrodo compósito de grafite; GNp - Eléctrodo compósito de grafite com nanopartículas; PT - Eléctrodo de platina; CV - Eléctrodo de carbono vítreo; G1 – grupo das amostras de mel A1; G2 – grupo das amostras de mel A2; G3 – grupo das amostras de mel A3; G4 – grupo das amostras de mel A4; G5 – grupo das amostras de mel A5.

Considerando o referido, os melhores modelos PLS-DA obtidos de cada elétrodo testado mostraram terem sensibilidades e seletividades com o mesmo valor (97,8% e 99,4%, respetivamente). A seguir faz-se uma breve descrição dos melhores modelos PLS-DA obtidos para cada elétrodo:

- elétrodo de G: no modelo obtido com dados originais dos voltamogramas cíclicos usando 6 CPs, apresentou má classificação numa amostra A1, classificada como sendo A5;
- elétrodo de GNp: no modelo obtido com os voltamogramas cíclicos pré-tratados com escalonamento usando 7 CPs, 1 amostra A1 foi má classificada como sendo amostra A4;
- elétrodo de PT: o modelo obtido com os voltamogramas cíclicos com pré-tratamento da 1ª derivada e com 6 CPs, classificou erradamente uma amostra A5 como sendo A4;
- elétrodo de CV: o modelo obtido com os dados originais do voltamograma cíclico e 8 CPs, classificou mal uma amostra A1 como sendo A5.

Dos 4 modelos acima selecionados, os melhores resultados foram obtidos com o elétrodo de G porque, o modelo selecionado tem o menor número de CPs e os resultados de previsão mostram apenas uma amostra mal classificada. Como o elétrodo de GNp mostrou mais sensibilidade nos sinais medidos, podendo-se inferir que também incrementou as diferenças provenientes da análise, o que justificaria um modelo PLS-DA com voltamogramas cíclicos escalonados e maior número de CPs. De salientar que os eléctrodos compósitos e o de carbono vítreo apresentam os múltiplos modelos que, em geral, classificam mal uma das amostras A1 (grupo 1), enquanto que no elétrodo de platina, incidem nas amostras de A4 e A5. Em geral, os 4 eléctrodos usados mostram capacidade de discriminar as 5 amostras de mel quer com os voltamogramas cíclicos originais, quer com os voltamogramas com os 3 pré-tratamentos testados.

De referir que todos os modelos PLS-DA referidos na Tabela 10 apresentariam sensibilidades com 100% de classificações corretas se for acrescentado mais 1 componente ao número de CPs indicados para o melhor modelo.

Todos os gráficos de discriminação para os melhores modelos PLS-DA mostraram aspecto visual semelhantes (tal como, o apresentado na Figura 11). A ordem de discriminação dos 5 grupos (5 méis) na primeira dimensão foi A4 – A1 – A5 – A3 – A2 (amostras no espaço X, do quadrante negativo para o quadrante positivo). Esta ordem correspondeu à sequência de cores das amostras de mel, do mais claro para o mais escuro (AC – AC – A – E – E, respetivamente), mostrando que a composição da

matriz de cada mel está relacionada com a discriminação obtida por voltametria cíclica. Ou seja, como foi referido no capítulo da Introdução, a cor do mel está relacionada com os níveis de sais minerais e compostos fenólicos, cuja composição depende da origem botânica do néctar utilizado na sua produção. Assim, o mel escuro mostra uma matriz mais complexa do que os méis mais claros (Bertoncelj, 2007; Baltrušaitytė et al., 2007; Finola et al., 2007).

4. CONCLUSÃO

Verificou-se que os objetivos deste trabalho foram completados considerando que os dois eléctrodos construídos e os eléctrodos comerciais obtiveram um bom desempenho analítico por voltametria cíclica pois, permitiram discriminar as 5 amostras de mel usadas neste trabalho. Para isto, implementou-se com sucesso a técnica estatística multivariada PLS-DA, usando modelos com voltamogramas cíclicos originais ou após pré-tratamento destes por escalonamento ou 1ª derivada. Neste estudo, considerou-se os melhores modelos testados com validação interna usando k-folds, selecionados por terem o menor número de CPs, seletividade e sensibilidade maior que 97%.

Os resultados globais obtidos indicaram que o eléctrodo de G mostrou melhor comportamento analítico, pois o melhor modelo foi obtido com 6 CPs usando os dados originais dos voltamogramas cíclicos. Em seguida, foi o eléctrodo de GNp que apresentou um modelo selecionado contendo 7 CPs, usando os dados escalonados dos voltamogramas cíclicos. No caso do eléctrodos comerciais, o eléctrodo de CV permitiu obter um modelo PLS-DA com desempenho semelhante ao eléctrodo de G, mas com 8 CPs. Com o eléctrodo de PT obteu-se um modelo de previsão com 6 CPs, mas este foi obtido com dos dados da 1ª derivada dos voltamogramas cíclicos, o que implica um modelo mais complexo.

Considerando a facilidade do processo de construção dos eléctrodos compósitos de grafite e o bom desempenho analítico destes, conclui-se que são uma alternativa aos eléctrodos de PT e CV comerciais. Mais, a análise voltamétrica cíclica acoplada à modelação PLS-DA (estabelecidas metodologias no âmbito desta pesquisa) mostraram uma possibilidade de aplicação em trabalhos futuros na análise qualitativa do mel, uma vez que foi confirmado que possui vantagens de ser uma técnica rápida, barata e simples na discriminação do mel.

5. REFERÊNCIAS

- Al-mamary, M., Al-meeri, A., & Al-habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041–1047.
- Aleixo, L. M. (2003). *Voltametria: Conceitos e Técnicas | Chemkeys Português*. Apostila, (Ii), 40.
- Almasaudi, S. B., Al-Nahari, A. A. M., El-Ghany, E. S. M. A., Barbour, E., Al Muhayawi, S. M., Al-Jaouni, S., Azhar, E., Qari, M., Qari, Y. A. & Harakeh, S. (2017) Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi J. Biol. Sci.*, 24, 1255-1261.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549–562.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis* (15th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Acquarone, C., Buera, P. & Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 101, 695-703.
- Ball D. W., The chemical composition of honey, *Journal of Chemical Education* 84 (2007) 1643-1646
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R. & Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101, 502–514.
- Belay, A., Haki, G. D., Birringer, M., Borck, H., Addi, A., Baye, K. & Melaku, S. (2017) Rheology and botanical origin of Ethiopian monofloral honey. *Food Sci. Technol.*, 75, 393-401.
- Bertoncelj, J. (2007). Evaluation of the phenolic content , antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105, 822–828.
- Castro-Vasquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A. & Pérez-Coello, M.S., 2009. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, **112**, 1022-1030.
- Cetó, X., Céspedes, F., & Del Valle, M.. (2013). Comparison of methods for the processing of voltammetric electronic tongues data, *Microchim. Acta*, vol. 180, pp. 319–330.

- Compton, R. G., Laborda E. & Kristopher R. (2013). Understanding of voltammetry: Imperial College Press.
- Decreto-Lei n.º 131/1985, de 29 de Abril. Diário da República Iª Série A.
- Decreto-Lei n.º 214/2003 de 18 de Setembro, Diário da República Iª Série A.
- De Carvalho, M. A. R.(2013). Preparação e caracterização de elétrodos de óxido níquel para eletrolisadores alcalinos de produção de hidrogénio, 126 (Tese de mestrado em Tecnologia e Valorização Ambiental e Preservação de Energia, Instituto Politécnico de Porto Alegre, Porto Alegre).
- De Rodríguez, G.O., Ferrer, B.S., Ferrer, A. & Rodríguez, B., 2004. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, 84, 499-502.
- De Souza, D., Machado, S. A. S., & Avaca, L. A. (2003). Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, 26(1), 81–89.
- Dias, M. (2013). Língua eletrónica potenciométrica: uma ferramenta para análise da qualidade do mel, 67 (Tese de mestrado em Química, Universidade do Porto, Porto).
- Ferreira, J. A. (2017). Detecção e identificação rápidas dos principais contaminantes microbiológicos em fármacos por espectroscopia de infravermelho (Tese de mestrado em Engenharia farmacêutica, Universidade de Lisboa, Lisboa).
- Finola, S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina, *Food Chemistry*, 100, 1649–1653.
- Guelpa, A., Marini, F., du Plessis, A., Slabbert, R. & Manley, M. (2017). Verification of authenticity and fraud detection in South African honey using NIR spectroscopy. *Food Control*, 73, 1388-1396.
- Giordano, G. F. (2015). Modificação de elétrodos com óxido/hidróxido de níquel e acoplamento em sistema de difusão gasosa para a determinação de etanol em amostras de vinho de cana-de-açúcar (Tese de Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas).
- Huidobro, J.F., Santana, F.J., Sanchez, M.P., Sancho, M.T., Muniategui, S. & Simal-Lozano, J. (1995). Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *Journal of Apicultural Research*, 34, 39-44.
- Kamal, M. A., & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 17–21.
- Kelly, M. T., Blaise, A., & Larroque, M. (2010). Rapid automated high performance

- liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine , fruit and honey. *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7385–7392.
- Krepper, G., Pierini, G.D., Pistonesi, M.F. & Di Nezio, M.S. (2017) “In-situ” antimony film electrode for the determination oftetracyclines in Argentinean honey samples. *Sens. Actuat. B*, 241, 560–566.
- Kucheryavskiy, S. (2018). *mdatools: Multivariate Data Analysis for Chemometrics*. R package version 0.9.1.
- Küçük, M., Kolailı, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C. & Candan, F., (2007).iological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526-534.
- Kuhn, M., Contributions from: Wing, J., Weston, S., Williams, A., Keefer, C., Engelhardt, A., Cooper, T., Mayer, Z., Kenkel, B., the R Core Team: Benesty, M., Lescarbeau, R., Ziem, A., Scrucca, L., Tang, Y., Candan, C. & Hunt, T. (2019). *caret: Classification and Regression Training*. R package version 6.0-82.
- Kumar A. R., Tuan, L. A. , Park, C. J., & Kim, J. (2013). Electrochemical study of NiO nanoparticles electrode for application in rechargeable lithium-ion batteries. *Ceramics International*, 39(6), 6611–6618.
- Maia, M., Russo-Almeida, P.A. & Pereira, J.O.B., (2003). Contribuição para a caracterização do mel da região do Alvão-Marão. *O Apicultor*, 39, 19-23.
- Melo, R. J. P. (2016). Estudo de méis monoflorais incluindo casos particulares : méis de Alfarroba , Medronheiro , Poejo e Tomilho (Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança).
- Men, H., Gao, H., Li, J., Liu, J. & Zhang, Y. (2014) Fuzzy ARTMAP for the Adulterated Honey Discrimination with Voltammetric Electronic Tongue. *Sens. Transduc.*, 178, 40-46.
- Morais, L., Dias, L.A., Peres, A. M., Rocha, A. C., Estevinho, L. & Machado, A. A. S. C. (2007). Aplicação de uma língua electrónica na classificação de méis monoflorais. In: *Actas do 8º Encontro de Química de Alimentos*, Beja.
- Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural. (2016). Programa Apícola Nacional 2017-2019, 99.
- Moniruzzaman, M., An, C. Y., Rao, P. V., Nurul, M., Hawlader, I. & Gan, S. H. (2014). Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from bangladesh by high performance liquid chromatography: determination of

- antioxidant capacity, Bangladesh by High Performance Liquid, (June).
- Oryan, A., Alemzadeh, E. & Moshiri, A. (2016) Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *J. Tissue Viability*, 25, 98-118.
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M. A. & Sancho, M. T. (2016). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS-Wagen. J. Life Sc.*, 78, 29–33.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E & Ola, I.O., 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7, 159-165.
- Oliveira, E. C. da S. (2016). Utilização da RMN associada a métodos quimiométricos na caracterização de petróleos e derivados (Tese de doutorado em Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória).
- Otles, S. (Ed.). (2016). *Handbook of food analysis instruments*. CRC Press.
- Pacheco, W. F., Semaan, F. S., De Almeida, V. G. K., Ritta, A. G. S. L., & Aucélio, R. Q. (2013). Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. *Revista Virtual de Química*, 5(4), 516–537.
- Peres, A. M., Sousa, M. E. B., Veloso, A. C. A., Estevinho, L. & Dias, L. G. (2016) *Electrochemical Sensors for Assessing Antioxidant Capacity of Bee Products*. In *Applications of Honeybee Plant-Derived Products*, Cardoso S.M., Silva, A.M.S., Eds.; Bentham Science Publishers; pp. 196-223.
- Pires, S. M. A., Rodrigues, T., Rocha, A., Pajuelo A. & Pereira O. (2005). Caracterização polínica do mel de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 87-99
- Prosser, S. W. J. & Hebert, P. D. N. (2017) Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chem.*, 214, 183–191.
- Rissato, S. R., Galhiane M. S., De Almeida M. V., Gerenutti M. & Apon, B. M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography – mass spectrometry and application in environmental contamination, *Food Chemistry*, 101, 1719–1726.
- Rohart F., Gautier B., Singh A & Le Cao K.-A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology* 13(11):e1005752

- Ruoff K. & Bogdanov S., Authenticity of honey and other bee products, *Apiacta* 38 (2004) 317-327.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Sánchez, P., Huidobro, J.F., Simal, J. (1991). Mieles del País Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas. *Anales de Bromatología*, 4, 311-324.
- Siddiqui, A.J., Musharraf, S.G., Choudhary, M.I. & Rahman A.U. (2017). Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*, 217, 687–698.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J. (2002). Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science & Technology*, 37, 351-360.
- Teixeira, G. G. (2018). Voltametria de Onda Quadrada na Análise de Compostos Fenólicos com Elérodos Compósitos de Grafite: 4- clorofenol , fenol e 4-nitrofenol (Tese de mestrado em Tecnologia Ambiental, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança) .
- Tiwari, K., Tudu, B., Bandhopadhyaya, R. & Chatterjee, A. (2012). Discrimination of monofloral honey using cyclic voltammetry. 3rd National Conference on Emerging Trends and Applications in Computer Science, pp. 132-136.
- Tonello, N., Moressi, M. B., Robledo, S. N., D'Eramo, F. & Marioli, J. M. (2016). Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey. *Talanta*, 158, 306–314
- Trovo, R. S. (2017). Análise de cafeína em café por voltametria cíclica e com eléctrodos compósitos de grafite , óxidos de metal e resina epoxilica e resina epoxilica (Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança).
- USDA Agricultural Marketing Service, United States Standards for Grades of Extracted Honey, USDA, Washington DC, May 23, 1985.
- Valderrama, L., Gonçalves, R. P., Março, P. H., & Valderrama, P. (2015). UV-Vis spectrum fingerprinting and chemometric method in the evaluation of extra virgin olive oil adulteration and fraud Espectroscopia Uv-Vis e Método Quimiométrico na Avaliação de Adulterações e Fraudes em Azeite de Oliva Extra Virgem, *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, 32–40.
- Vargas, T. (2006). Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos campos gerais do Paraná. (Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, ..

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa)

- Venables, W.N. & Ripley, B.D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Vernasqui, L. G. (2017). *Análise do fenol por voltametria cíclica : elétrodos compósitos de resina epoxídica , grafite e óxidos de metal* (Tese de mestrado em Tecnologia Ambiental, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança).
- Vichapong, J., Burakham, R., Santaladchaiyakit, Y. & Srijaranai S. (2016). A preconcentration method for analysis of neonicotinoids in honey samples by ionic liquid-based cold-induced aggregation microextraction. *Talanta*, 155, 216–221.
- Vieira, F. T., Makimori, G. Y. F., Scholz, M. B. dos S. , Zielinski, A. A. F. & Bona, E. (2019). Chemometric approach using ComDim and PLS-DA for discrimination and classification of commercial yerba mate (*ilex paraguariensis* St. Hil.). *Food Analytical Methods*, 5(1), 299–319.
- Wang, J., (2006). *Analytical electrochemistry*, 3^o edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wolski, T., & Tambor, K. (2006). Identification of ohoney volatile components by solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Journal of Apicultural Science*, 50(2), 115–126.
- Zhang, Y., Li, X. Q., Li, H. M., Zhang, Q. H., Gao, Y., & Li, X. J. (2019). Antibiotic residues in honey : A review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 344–356.