

# Influência de Variáveis Experimentais na Determinação Refratométrica de Umidade em Mel por Planejamento Fatorial

## Influence of Experimental Variables in the Refractometric Determination of Moisture in Honey by Factorial Design

**Maria Lurdes Felsner**

Departamento de Química

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava, PR

*mlfelsner@gmail.com*

**Cristiane Bonaldi Cano**

Centro de Bromatologia e Química

Instituto Adolfo Lutz – IAL, São Paulo, SP

*cbonaldi@ial.sp.gov.br*

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi investigar, por um planejamento fatorial, se fontes de variação como origem floral, cristalização, método e operador influenciam na determinação refratométrica dos teores de umidade em mel. Os resultados sugeriram que somente o fator operador não interfere nesse tipo de determinação. Foram verificados efeitos de interação significativos de duas e três variáveis entre origem botânica, estado físico e método. Então, pode ser sugerido que o método refratométrico da Comissão Européia de Mel poderia ser adotado pela legislação brasileira como uma alternativa ao método oficial da AOAC já que ele independe da origem floral dos méis, cristalização e operador.

**Palavras-chave:** mel; planejamento fatorial; refratometria; umidade.

**Abstract:** The objective of this work was to investigate, by a factorial design, whether

Recebido em 22/03/2011 - Aceito em 01/07/2011.

---

RECEN      Guarapuava, Paraná      v. 13      nº 1      p. 139-150      jan/jun 2011

---

variation sources as floral origin, crystallization, method and operator influence in the refractometric determination of moisture contents in honey. The results suggested that only factor operator not interfere in this type of determination. Significant interaction effects of two and three variables between floral origin, crystallization and method were verified. Thus, it can be suggested that the refractometric method of the European Honey Commission could be adopted by Brazilian legislation as an alternative to official method of AOAC, since it does not depend of floral origin of honeys, physical state and operator.

**Key words:** factorial design; honey; moisture; refractometry.

## 1 Introdução

O teor de umidade no mel tem um papel decisivo sob o ponto de vista da qualidade e estabilidade. A quantidade de água presente no mel afeta propriedades físicas e sensoriais como cor, viscosidade, sabor, peso específico, solubilidade, determinando, dessa forma, seu valor comercial [1-3].

Normalmente, amostras de mel apresentam teores de umidade no intervalo de 13 a 25% que estão relacionados às suas origens botânica e geográfica e as condições climáticas as quais esse produto foi submetido durante sua elaboração. O mel sendo uma solução saturada de açúcares, especialmente em frutose e glicose, é notavelmente higroscópico e a adoção de diferentes práticas de apicultura pode influenciar em seus teores de umidade [1-3]. Sendo assim, a avaliação desse parâmetro na determinação da estabilidade de méis durante a estocagem (vida de prateleira) é de suma importância devido à sua relação com a fermentação e granulação [2, 3].

A legislação em vigor para mel (Instrução Normativa nº 11, 2000, MAPA) [4] estabelece métodos oficiais para a avaliação de parâmetros físico-químicos oriundos do CODEX ALIMENTARIUS (1993) [5]. O teor de umidade do mel é mensurado pelo método refratométrico de Chataway, que estabelece uma relação da medida do índice de refração com o teor de umidade. Essa técnica é considerada como um método indireto de medida do teor de umidade.

Recentemente, a Comissão Europeia de Mel (EHC) [6] propôs uma modifica-

ção desse método. Tal modificação baseia-se na realização de um pré-tratamento da amostra quando ela se encontra cristalizada, que consiste na dissolução dos cristais em banho-maria à 50°C [6, 7].

Cano *et al.* [7] com o intuito de investigar a influência das variáveis: estado físico da amostra e dos métodos refratométricos da AOAC e da EHC nos teores de umidade de méis aplicou um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. Os resultados indicaram que a cristalização interferia na medida do índice de refração e, dessa forma, o método da AOAC era afetado pelo estado físico dos méis, enquanto que o método da EHC poderia ser adotado independentemente para amostras líquidas e cristalizadas. No entanto, o método da Comunidade Européia não é adotado pelos órgãos fiscalizadores brasileiros. Para que uma metodologia seja aceita como oficial, é necessário que alguns requisitos sejam atendidos, tais como independência da composição da amostra, do instrumento de medida, do sistema de medição e do operador, fundamentado por um estudo de validação [8].

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram investigar, pela aplicação de um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, se fontes de variação como origem floral, cristalização, método e operador interferem de forma significativa nos teores de umidade de méis e estabelecer o método refratométrico mais adequado para essa determinação.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Materiais

Duas amostras de méis monoflorais de eucalipto e duas amostras de méis monoflorais de laranja foram escolhidas aleatoriamente, estocadas em frascos plásticos de polietileno e mantidas à -18°C até a realização das análises.

### 2.2 Métodos analíticos

#### 2.2.1 Método refratométrico da AOAC

Os teores de umidade das amostras de mel foram determinados pelo método refratométrico 969.38b da AOAC [9]. Os índices de refração foram obtidos em um

refratômetro de Abbé, termostatizado a 20°C.

### 2.2.2 Método refratométrico da EHC

Os teores de umidade das amostras de mel foram obtidos pelo método refratométrico da Comissão Europeia de Mel (EHC) [6]. A única diferença dessa metodologia em relação à da AOAC, descrita acima, é a aplicação de um pré-tratamento para amostras cristalizadas com dissolução dos cristais em banho-maria a 50°C.

### 2.3 Planejamento fatorial

A influência das variáveis: origem floral, cristalização, operador e método analítico nos teores de umidade de amostras de méis monoflorais foi investigada por um planejamento fatorial  $2^4$ , cada fator sendo estudado em dois níveis [10, 11]. Os teores de umidade foram determinados em duplicata e em ordem aleatória para todas as combinações dos níveis dos fatores apresentados na tabela 1.

Os efeitos dos fatores do planejamento fatorial foram calculados por:

$$E_f = (R^+) - (R^-)$$

em que  $R^+$  e  $R^-$  são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos.

*Tabela 1. Fatores e níveis do planejamento fatorial  $2^4$  para a determinação do teor de umidade em amostras de mel pela refratometria*

Fatores	Nível(-)	Nível(+)
Origem Floral (A)	Eucalipto	Laranja
Cristalização (B)	Sem Cristais	Com Cristais
Método Analítico (C)	AOAC	EHC
Operador (D)	1	2

Os efeitos das variáveis nos teores de umidade foram testados para a significância estatística no nível de 95% pelo cálculo do erro padrão. Toda a análise estatística

dos dados foi realizada, usando o pacote estatístico *Statistica and Statistica Industrial System* [Statsoft, Inc. (1995), Tulsa, USA] [12].

### 3 Resultados e discussão

Em outro trabalho, os autores investigaram a influência da cristalização da amostra e do método analítico nos teores de umidade por um planejamento fatorial  $2^2$  [7]. Para verificar se os métodos refratométricos estudados apresentavam também independência com relação à composição da amostra e operador, esse planejamento foi ampliado para um planejamento fatorial  $2^4$ . Os resultados da aplicação da técnica estatística são apresentados na tabela 2, na forma de média e desvio padrão e os efeitos calculados são listados na tabela 3.

Tabela 2. Teores médios e seus respectivos desvios-padrão para o planejamento fatorial  $2^4$

Fatores				Teores Médios $\pm$ Desvios Padrão
(A)	(A)	(C)	(D)	
(-)	(-)	(-)	(-)	19,70 $\pm$ 0,00
(+)	(-)	(-)	(-)	15,90 $\pm$ 0,00
(-)	(+)	(-)	(-)	19,30 $\pm$ 0,00
(+)	(+)	(-)	(-)	21,40 $\pm$ 0,14
(-)	(-)	(+)	(-)	19,70 $\pm$ 0,00
(+)	(-)	(+)	(-)	15,50 $\pm$ 0,28
(-)	(+)	(+)	(-)	17,40 $\pm$ 0,14
(+)	(+)	(+)	(-)	20,10 $\pm$ 0,28
(-)	(-)	(-)	(+)	19,80 $\pm$ 0,14
(+)	(-)	(-)	(+)	15,70 $\pm$ 0,00
(-)	(+)	(-)	(+)	19,60 $\pm$ 0,14
(+)	(+)	(-)	(+)	21,30 $\pm$ 0,00
(-)	(-)	(+)	(+)	19,70 $\pm$ 0,0
(+)	(-)	(+)	(+)	15,60 $\pm$ 0,14
(-)	(+)	(+)	(+)	17,55 $\pm$ 0,21
(+)	(+)	(+)	(+)	20,10 $\pm$ 0,00

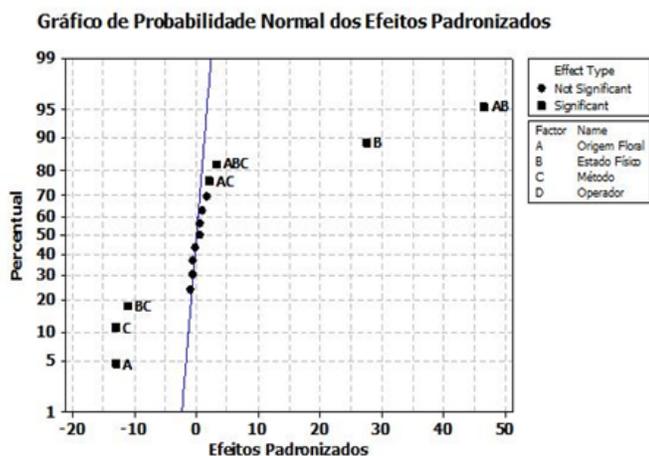
A partir da análise do teste-t e teste-F no nível de 95% de confiança, foram considerados como significativos os efeitos das variáveis: origem botânica, estado físico da amostra e método analítico, bem como as interações de duas variáveis - origem floral

e cristalização (A x B), origem botânica e método (A x C), cristalização e método analítico (B x C) e de três variáveis – origem botânica, cristalização e método analítico (A x B x C) (Tabela 3). A análise dos gráficos de probabilidade normal (Figura ??-a) e de Pareto (Figura ??-b) no nível de 95% de confiança sugeriram que os efeitos de interação de duas variáveis (A x C) e de três variáveis (A x B x C) são pouco significativos e podem ser explicados por ruídos embutidos nas medições [11].

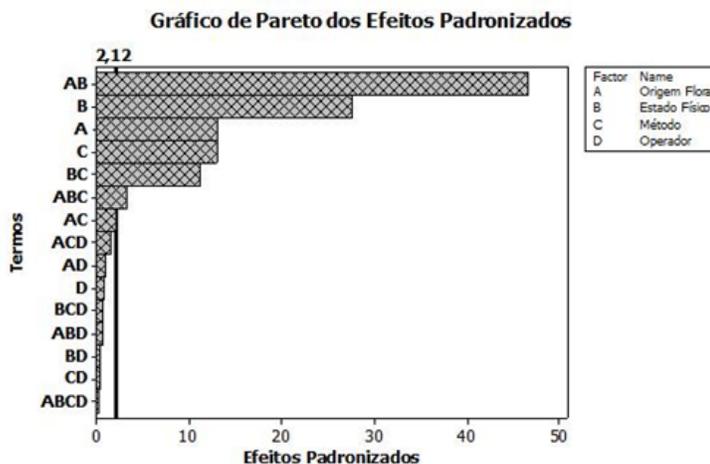
*Tabela 3. Efeitos calculados e seus erros padrão para o planejamento fatorial 2<sup>4</sup>*

<b>Efeitos</b>	<b>Estimativas ± Erro Padrão</b>
<b>Média Global</b>	18,65 ± 0,02
<b>Efeitos Principais:</b>	
Origem Floral (A)	-0,89 ± 0,05
Cristalização (B)	1,89 ± 0,05
Método Analítico (C)	-0,88 ± 0,05
Operador (D)	0,05 ± 0,05
<b>Efeitos de Interação de dois fatores:</b>	
A x B	3,16 ± 0,05
A x C	0,13 ± 0,05
A x D	-0,09 ± 0,05
B x C	-0,73 ± 0,05
B x D	0,05 ± 0,05
C x D	0,02 ± 0,05
<b>Efeitos de Interação de três fatores:</b>	
A x B x C	0,23 ± 0,05
A x C x D	-0,04 ± 0,05
A x B x D	0,08 ± 0,05
B x C x D	-0,03 ± 0,05

De acordo com os resultados do planejamento fatorial, a origem floral dos méis interfere nos teores de umidade (Figura 2). Isso está relacionado ao fato dos méis monoflorais de eucalipto apresentarem valores médios de umidade mais altos (0,89%) do que os encontrados para méis monoflorais de laranja, como observado na Tabela 3. Isso sugere que a umidade poderia ser utilizada como um parâmetro para a discriminação de méis monoflorais quanto à sua origem botânica e corrobora os resultados encontrados na literatura por outros autores em estudos de caracterização de méis [13–16].



(a)



(b)

Figura 1. Gráfico de (a) Probabilidade Normal e de (b) Pareto dos efeitos padronizados do planejamento fatorial  $2^4$  no nível de 95% de confiança

O efeito principal mais importante foi de cristalização da amostra, pois os méis com cristais apresentaram teores de umidade mais altos (1,89%) do que os determinados para as amostras sem cristais (Tabela 3, Figura 2). Esses resultados concordam com os dados obtidos por Cano *et al.* [7]. Esse fato está relacionado ao princípio de funcionamento do refratômetro, utilizado para as determinações de umidade em mel. Nesse equipamento, durante a leitura do índice de refração é alcançada maior

eficiência na luz transmitida e refletida quando as amostras analisadas são transparentes e isentas de sujidades e cristais irregulares [17]. Para amostras de mel sem cristais, observa-se no refratômetro uma divisão nítida entre os dois campos. No entanto, para amostras com cristais, nota-se uma menor nitidez (dependente do tamanho dos cristais presentes na amostra) no limite entre os campos claro e escuro, o que dificulta o ajuste correto pelo analista desses campos. Isso resulta em valores de índice de refração e, conseqüentemente, de umidade, superestimados e com maior variabilidade [18]. Em outras palavras, são minimizados os erros sistemáticos decorrentes da leitura do índice de refração no refratômetro quando as amostras de mel se encontram sem cristais.

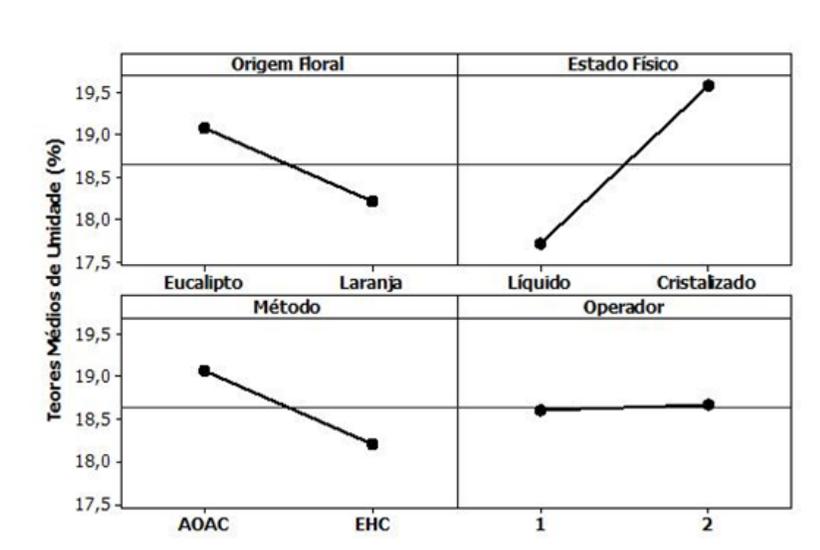
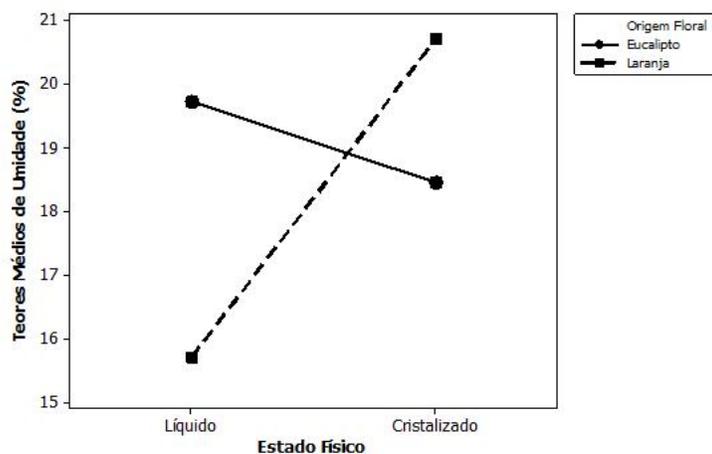


Figura 2. Diagrama para interpretação dos efeitos do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> para a determinação do teor de umidade em mel

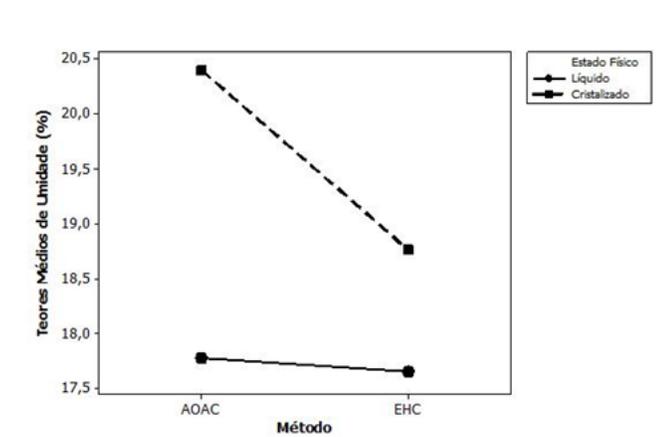
O efeito principal de método analítico sugere que quando se aplica o método refratométrico da AOAC são obtidos teores de umidade superiores (0,88%) em relação aos determinados pelo método da EHC (Tabela 3, Figura 2). Isso está relacionado ao fato do método refratométrico da Comunidade Européia adotar um pré-tratamento para amostras de mel cristalizadas, que consiste na dissolução dos cristais em banho-maria, antes da realização das leituras do índice de refração. Somente o efeito principal de operador não foi significativo, sugerindo que existe independência deste em

relação à cristalização, aos métodos analíticos e as diferentes origens florais, das amostras de mel investigadas neste trabalho (Tabela 3, Figura 2).

Além dos efeitos principais, foram observados também efeitos de interação de dois fatores significativos entre as variáveis estudadas (Tabela 3), ou seja, os fatores não podem ser analisados separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis (Figuras 3a e 3b).



(a)



(b)

Figura 3. Gráficos dos efeitos de interação entre: (a) origem floral e cristalização e entre (b) cristalização e método analítico

O efeito de interação de dois fatores entre origem floral e cristalização, ilustrado na figura 3-a pelo cruzamento das linhas, indicou que os teores de umidade de méis monoflorais de eucalipto e laranja dependem do nível da variável cristalização (sem cristais ou com cristais). Nos méis monoflorais de eucalipto pode-se observar uma diminuição nos teores de umidade quando a amostra sem cristais passa a apresentar cristais, enquanto que, nos méis monoflorais de laranja, verifica-se o comportamento oposto. Esses fatos estão relacionados às diferenças na composição de carboidratos desses tipos de mel, especialmente de frutose e glicose, que influenciam no processo de cristalização e, conseqüentemente, nos respectivos teores de umidade [2, 3].

O efeito de interação entre cristalização e método analítico, apresentado na figura 3-b constatou que os teores de umidade não são afetados pelo método refratométrico adotado, quando as amostras de mel se encontram sem cristais. No entanto, para amostras de mel com cristais são observados teores de umidade mais altos quando se utiliza o método refratométrico da AOAC em relação ao método refratométrico da EHC. Como já descrito anteriormente, o método da AOAC não faz uso de qualquer pré-tratamento das amostras de mel e, portanto são obtidos valores superestimados para os teores de umidade em amostras cristalizadas, devido a erros sistemáticos na leitura do índice de refração. Esses resultados são corroborados pelos trabalhos realizados por Cano *et al.* [7, 18], em que foram realizadas comparações dos dois métodos refratométricos para diferentes amostras de méis (sem cristais e com cristais) aplicando-se diferentes ferramentas estatísticas (ANOVA, teste-t pareado, teste-F para variâncias e respectivos intervalos de confiança para as médias e variâncias) com o intuito de avaliar a precisão dessas metodologias e identificar possíveis erros sistemáticos.

#### 4 Conclusões

Os resultados do planejamento fatorial aplicado neste trabalho sugeriram que somente os fatores: origem floral, cristalização e método analítico são importantes para a determinação refratométrica de umidade em mel e não podem ser analisados independentemente, pois apresentam efeitos de interação de dois e três fatores.

O efeito de interação entre origem floral e cristalização está relacionado à varia-

bilidade nos teores de umidade dos méis monoflorais de eucalipto e laranja, devido às diferenças nas propriedades físico-químicas desses tipos de méis, especialmente na composição de açúcares. A presença de cristais nas amostras de mel interfere na medida do índice de refração pelo método da AOAC, como foi observado pelo efeito significativo de interação entre os fatores cristalização e método analítico, devido à menor nitidez na leitura do índice de refração. Sendo assim, sugere-se que o método refratométrico da Comissão Européia de Mel (EHC) deveria ser adotado pela legislação brasileira como um método oficial para análise de umidade em mel, considerando-se que ele apresenta independência da composição, da cristalização e do operador.

## 5 Referências

- [1] APARNA, A. R.; RAJALAKSHMI, D. Honey – its characteristics, sensory aspects, and applications. *Food Rev Int*, v. 15, n. 4, p. 455–471, 1999.
- [2] WHITE JR., J. W. Honey. *Adv Food Res*, v. 24, p. 287–364, 1978.
- [3] CRANE, E. Honey: A Comprehensive Survey. Londres: Heinemann, 1<sup>st</sup> ed., 1975, 608 p.
- [4] BRASIL. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mel. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 out 2000. Seção 1, n. 204, p. 23.
- [5] CODEX ALIMENTARIUS STANDARD FOR HONEY. Ref. Nr. CL 1993/14-SH FAO e WHO, Roma, 1993.
- [6] BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; PERSANO ODDO, L. Physico-chemical methods for characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, v. 35, p. S4–S17, 2004.
- [7] CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; MATOS, J. R.; BRUNS, R. E.; WHATANABE, H. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparison of methods of determining moisture content of citrus and eucalyptus Brazilian honeys by refractometry. *J Food Compos Anal*, v. 14, n. 2, p. 101–109, 2001.

- [8] WERNIMONT, G. T. Use of Statistics to develop and evaluate analytical methods. Virginia: AOAC International, 1<sup>st</sup> ed., 1985.
- [9] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. II, 17<sup>th</sup> ed., 2000.
- [10] BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Unicamp: Campinas, 2 ed., 2002.
- [11] BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for Experimenters. New York: Willey Press, 1<sup>st</sup> ed., 1978, 652 p.
- [12] STATSOFT INC., Statistica for Windows, Version 6.0, 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK, 74104, USA, 1998.
- [13] TERRAB, A.; RESCAMALES, A. F.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J. Characteristics of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chem*, v. 88, p. 537–542, 2004.
- [14] SERRANO, S.; VILLAREJO, M.; ESPEJO, R.; JODRAL, M. Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. *Food Chem*, v. 87, p. 619–625, 2004.
- [15] CORBELLA, E.; COZZOLINO, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *Food Sci Technol-LEB*, v. 39, p. 534–539, 2006.
- [16] MATEO, R.; BOSCH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. *J Agr Food Chem*, v. 46, p. 393–400, 1998.
- [17] CECCHI, H. M. Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos. Campinas: Unicamp, 1999, 212 p.
- [18] CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; BRUNS, R. E. Precisão dos métodos refratométricos para análise de umidade em mel. *Ciencia Tecnol Alime*, v. 27, n. 2, p. 328–328, 2007.