

# Precisão dos métodos refratométricos para análise de umidade em mel

## *Precision of the refractometric methods of moisture honey analysis*

Cristiane Bonaldi CANO<sup>1\*</sup>, Maria Lurdes FELSNER<sup>2</sup>, Roy Edward BRUNS<sup>3</sup>

### Resumo

Para a determinação dos teores de umidade de mel, a legislação brasileira adota o método refratométrico proposto pela AOAC. No entanto, em outro trabalho, os autores observaram que a cristalização interferia na medida do índice de refração quando a amostra de mel se encontrava cristalizada e, portanto, eram obtidos teores de umidade superestimados. A Comissão Européia de Mel (EHC) adota outro método refratométrico, que usa um pré-tratamento da amostra quando esta estiver cristalizada. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a precisão destes métodos refratométricos por diferentes técnicas estatísticas e estabelecer então o procedimento mais adequado para a análise de umidade em mel. Os resultados da análise dos teste *t* no nível de 95,0% de confiança para os teores médios de umidade das amostras de méis sugeriram que existiam diferenças significativas entre os dois métodos refratométricos (AOAC e EHC) somente para as amostras cristalizadas. A análise dos desvios padrão pela aplicação do teste *F* e construção de intervalos de confiança mostrou que o método da EHC foi mais preciso que o da AOAC para amostras de méis cristalizados. Desta forma, pode-se sugerir a adoção pela legislação brasileira do método refratométrico da EHC, como método oficial por este não apresentar erros sistemáticos.

**Palavras-chave:** mel; refratometria; precisão; estado físico; análise estatística.

### Abstract

For the determination of the moisture contents of honey, the Brazilian legislation adopts the refractometric method proposed by AOAC. However, in other work, the authors observed that the crystallization interferes in the refractive index measurement when the honey sample if encountered crystallized and, therefore, moisture contents overestimated were obtained. The European Honey Commission (EHC), adopt other refractometric method that use a pre-treatment of sample when this one was crystallized. So, the objective of this work was to compare the precision of these refractometric methods by different statistical techniques and it establish thus the more adequate procedure for moisture analysis in honey. The results of t-tests analysis in the 95% confidence level for the average moisture contents of the honey samples suggested that there were significant differences between the two-refractometric methods (AOAC e EHC) only for the crystallized samples. The analysis of standard deviations by application of F-test and building of confidence intervals shown that the EHC method was more precise than the AOAC methodology for the crystallized honey samples. In this way, it may be suggested the adoption by Brazilian legislation of refractometric method of EHC, as official method, by this one not present systematic errors.

**Keywords:** honey; refractometry; precision; physical state; statistical analysis.

## 1 Introdução

A determinação de umidade em alimentos é normalmente considerada um procedimento analítico simples. No entanto, este tipo de determinação envolve muitas complexidades, e os métodos existentes para a sua avaliação são raramente absolutos. De um ponto de vista econômico, a determinação rápida e confiável deste parâmetro físico-químico é imprescindível<sup>8,11</sup>.

A legislação em vigor para mel (Instrução Normativa nº 11, 2000, MAPA)<sup>5</sup> estabelece métodos oficiais para a avaliação de parâmetros físico-químicos oriundos do CODEX ALIMENTARIUS<sup>7</sup>. O conteúdo de umidade do mel é mensurado pelo método refratométrico de Chataway, que estabelece uma relação da medida do índice de refração com a porcentagem de umidade,

num intervalo de 13 a 25%. Esta técnica é considerada como um método indireto de medida do conteúdo de umidade. Para méis cristalizados, a Comissão Européia de Mel (EHC)<sup>5</sup> sugere um pré-tratamento da amostra, que consiste na dissolução dos cristais em banho-maria a 50 °C<sup>2,4</sup>.

Em um trabalho anterior, os autores empregaram um planejamento fatorial para investigar a influência do estado físico (líquido e cristalizado) e do método refratométrico adotado (AOAC e EHC) nos valores de umidade de amostras de méis, com o intuito de escolher a metodologia mais adequada para esta determinação<sup>6</sup>. Os resultados sugeriram que a cristalização interferia nas leituras do índice de refração e conseqüentemente nos conteúdos de umidade quando se utilizava o método da AOAC, enquanto que o método da EHC poderia ser empregado para amostras nos dois estados físicos. Estes fatos estimulam o desenvolvimento de mais estudos sobre a precisão destes métodos analíticos, especialmente porque a metodologia proposta pela EHC não é ainda adotada pelos órgãos fiscalizadores brasileiros. Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de comparar a precisão dos métodos refratométricos da AOAC e EHC, em termos de médias e desvios padrão, por diferentes técnicas estatísticas e estabelecer então o procedimento mais adequado para a análise de umidade em mel.

Recebido para publicação em 3/7/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001777)

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bebidas, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo - SP, Brasil,  
E-mail: cbonaldi@ial.sp.gov.br;

<sup>2</sup> Laboratório de Análise de Alimentos, Escola Mário Amato, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI, São Paulo - SP, Brasil,  
E-mail: mlfelsner@yahoo.com.br;

<sup>3</sup> Instituto de Química, bloco H, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, CEP 13089-970, Campinas - SP, Brasil,  
E-mail: bruns@iqm.unicamp.br;

\*A quem a correspondência deve ser enviada

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

#### *Amostragem*

Trinta amostras de méis (líquidas e cristalizadas), produzidas em diferentes regiões do estado de São Paulo - Brasil, foram coletadas de apicultores e entrepostos e estocadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  em recipientes plásticos.

### 2.2 Métodos analíticos

#### *Método refratométrico da AOAC*

O conteúdo de umidade foi determinado em triplicata pelo método refratométrico da AOAC (2000) - método 969.38b<sup>1</sup>, sem qualquer pré-tratamento das amostras de mel em um refratômetro de Abbé, termostatizado a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a determinação da umidade, as amostras de mel foram retiradas do freezer e mantidas em repouso até atingirem a temperatura ambiente.

#### *Método refratométrico da EHC*

Simultaneamente, o conteúdo de umidade foi obtido em triplicata pelo método refratométrico da Comissão Europeia de Mel (EHC)<sup>2</sup>. A única diferença do último método é que ele considera o pré-tratamento da amostra, quando ela se encontra cristalizada. Para o estudo foi usado um refratômetro de Abbé termostatizado a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O pré-tratamento aplicado consistiu no aquecimento de uma pequena quantidade da amostra de mel cristalizada em um frasco de vidro com tampa, em banho-maria a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 5 a 10 minutos até a dissolução completa dos cristais. Após o pré-tratamento, as amostras foram mantidas em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas as medidas do índice de refração para a determinação de umidade.

### 2.3 Análise estatística

Para facilitar a comparação entre os métodos refratométricos, os conteúdos de umidade são apresentados como a média, desvio padrão e diferenças entre médias. A comparação entre as variâncias ponderadas ( $Sp^2$ ) de cada um dos métodos analíticos foi realizada pela aplicação de um teste  $F$  apropriado e pelo cálculo de intervalos de confiança para a razão entre variâncias e para os desvios padrão ponderados ( $Sp$ ) no nível de confiança de 95%<sup>3,9,12</sup>. Para verificar a presença de erros sistemáticos nos conteúdos de umidade determinados pelos dois métodos refratométricos, foram aplicados teste  $t$  para as diferenças médias dos conteúdos de umidade obtidos de forma pareada, e calculados intervalos de confiança no nível de 95,0% de confiança<sup>3,9,12</sup>. Toda a análise estatística dos dados foi realizada usando o pacote estatístico Statistica and Statistica Industrial System [Statsoft, Inc. (1995), Tulsa, USA]<sup>10</sup>.

## 3 Resultados e discussão

Os valores de umidade obtidos pelos dois métodos refratométricos (AOAC e EHC)<sup>1,2</sup> são apresentados na Tabela 1

como médias, desvios padrão e diferenças entre médias. Esta tabela apresenta também dados qualitativos sobre o estado físico (líquido e cristalizado) das amostras quando foram realizadas as análises.

A análise dos resultados contidos na Tabela 1 sugere que o emprego do método refratométrico da AOAC resulta em conteúdos médios de umidade superiores aos determinados pelo método da EHC quando as amostras se encontravam cristalizadas, o que foi verificado também por CANO et al.<sup>6</sup> em outro trabalho. O mesmo comportamento foi observado para os desvios padrão e diferenças entre médias. Isto sugere que a cristalização interfere na medida do índice de refração pelo método da AOAC, produzindo assim valores superestimados para os conteúdos de umidade.

Para avaliar se as diferenças entre os conteúdos médios de umidade, obtidos pelos dois métodos analíticos, para amostras líquidas e cristalizadas, são significativamente diferentes, isto é, se há a presença de erros sistemáticos foram aplicados teste  $t$  característicos no nível de 95,0% de confiança<sup>9,12</sup>. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

A análise do teste  $t$  bicaudal (Tabela 2) sugeriu que as diferenças entre as médias dos conteúdos de umidade determinadas pelos dois métodos analíticos, somente para amostras cristalizadas, são significativamente diferentes, pois o valor de  $t$  observado foi superior ao tabelado no nível de 95% de confiança. Em vista deste resultado foi investigada a presença de erros sistemáticos positivos, já que foram observadas diferenças positivas entre as médias dos conteúdos de umidade (Tabela 2), pela aplicação de um teste  $t$  monocaudal no nível de 95,0% de confiança<sup>9,12</sup>. Novamente o valor de  $t$  observado foi superior ao valor tabelado (Tabela 2), confirmando a hipótese levantada. Estes resultados mostram que o método da AOAC produz de forma sistemática, conteúdos médios de umidade superiores aos observados para o método da EHC, e que esta variação sistemática é causada pela cristalização das amostras de mel. Isto sugere também que o método da AOAC só poderia ser adotado para amostras líquidas, enquanto que o método da EHC poderia ser usado tanto para amostras líquidas quanto para cristalizadas<sup>6</sup>.

No entanto, antes de sugerir que o método da EHC seja adotado para a legislação brasileira, é preciso comparar sua precisão com a do método oficial da AOAC. A comparação entre as precisões foi realizada pela aplicação de um teste  $F$ , que considera a razão entre as variâncias amostrais dos dois métodos analíticos no nível de 95,0% de confiança<sup>12</sup>, e os resultados são apresentados na Tabela 3.

A análise do teste  $F$  (Tabela 3) sugere que os dois métodos refratométricos investigados aqui apresentam precisões significativamente diferentes. Para verificar qual das duas metodologias é mais precisa foi construído um intervalo de confiança para a razão entre variâncias, no nível de 95,0% de confiança<sup>9,12,13,14</sup>. O intervalo de confiança obtido (1,85 – 5,18), por apresentar o limite inferior maior do que 1, indica que o método da AOAC produz maior variação do que o método da EHC. Todavia, a razão entre variâncias pode estar localizada em qualquer ponto entre 1,85 e 5,18 no nível de 95% de con-

**Tabela 1.** Conteúdos médios, desvios padrão e diferenças entre as médias dos conteúdos de umidade obtidas pelos métodos refratométricos da AOAC e EHC para as amostras de méis.

Amostras de mel	Estado físico*	Método refratométrico				Diferenças entre as médias ( $x_1 - x_2$ )
		AOAC		EHC		
		Média ( $x_1$ )	D.P.**	Média ( $x_2$ )	D.P.**	
01	C	16,9	0,21	16,2	0,06	0,8
02	C	16,4	0,55	15,5	0,20	0,9
03	C	17,3	0,29	16,0	0,12	1,3
04	C	18,9	0,47	17,8	0,12	1,2
05	C	18,1	0,40	16,8	0,12	1,3
06	C	18,2	0,81	15,4	0,12	2,9
07	C	17,8	0,23	16,7	0,20	1,1
08	C	16,8	0,06	16,9	0,00	-0,1
09	L	15,8	0,10	15,8	0,12	0,0
10	L	15,8	0,10	15,9	0,15	-0,1
11	L	15,5	0,06	15,6	0,17	-0,1
12	L	15,6	0,12	15,4	0,12	0,2
13	L	15,6	0,12	15,6	0,12	0,1
14	L	16,0	0,06	16,0	0,12	0,1
15	L	16,3	0,25	16,2	0,12	0,1
16	C	17,4	0,10	16,9	0,20	0,5
17	C	18,5	0,20	17,1	0,40	1,4
18	C	18,6	0,23	17,2	0,23	1,3
19	L	17,2	0,12	17,4	0,17	-0,2
20	C	19,9	0,21	18,4	0,31	1,5
21	C	19,4	0,23	17,2	0,10	2,2
22	C	18,7	0,20	17,0	0,23	1,7
23	C	20,1	0,38	17,2	0,15	2,9
24	C	18,6	0,50	16,6	0,10	2,0
25	C	18,9	0,25	16,9	0,26	2,0
26	C	19,7	0,06	17,4	0,12	2,2
27	C	20,2	0,26	18,1	0,06	2,1
28	C	19,6	0,31	17,7	0,06	1,8
29	C	19,0	0,31	16,5	0,06	2,4
30	C	20,4	0,43	18,3	0,35	2,1

\*L = líquido; C = cristalizado; e \*\*os desvios padrão foram calculados com medidas triplicadas dos conteúdos de umidade para cada um dos métodos analíticos investigados.

**Tabela 2.** Resultados da comparação pareada da diferença entre os conteúdos médios de umidade determinados pelos métodos da AOAC e EHC para amostras de méis líquidos e cristalizados.

Estado físico	Diferenças entre médias (%)	Valor de $t_{obs}$	Intervalos de confiança a 95,0%
Líquido	0,0042	0,094	[(-0,100)-0,109]
Cristalizado	1,6136	10,075	(1,281-1,946)

$t_{crit(0,95;7)} = 1,895$  para amostras líquidas;  $t_{crit(0,95;21)} = 1,721$  para amostras cristalizadas;  $t_{crit(0,975;21)} = 2,080$  para amostras cristalizadas.

**Tabela 3.** Comparação da precisão de métodos refratométricos usados para análise de umidade em méis.

Método analítico	Graus de liberdade	$Sp^2$	$F_{obs}^*$
AOAC	60	0,09344	0,09344/0,03014 = 3,10
EHC	60	0,03014	

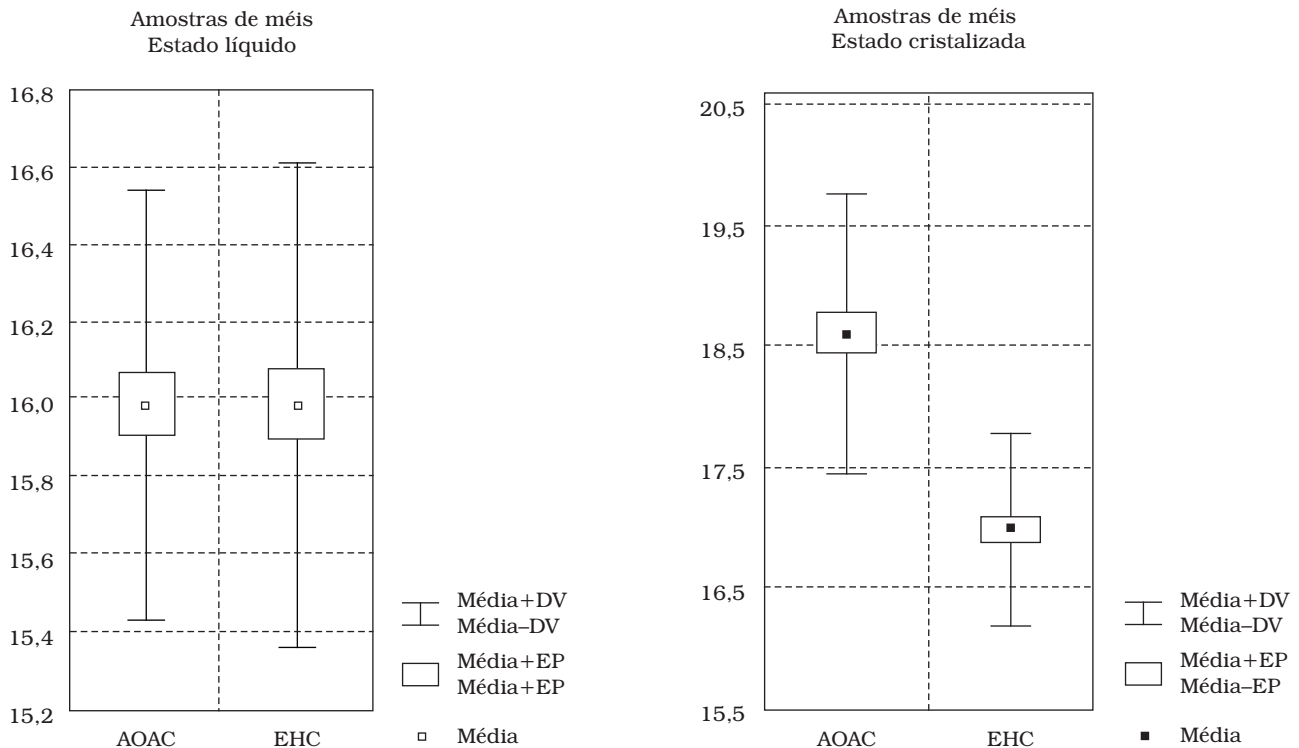
\*significativo quando  $F_{obs} > F_{crit(0,975;60;60)} = 1,67$ .

fiança. Para melhor avaliar as diferenças de precisão entre os métodos da AOAC e EHC, foram construídos então, intervalos de confiança para os desvios padrão ponderados de cada um dos métodos analíticos<sup>13,14</sup>, os quais são apresentados na Tabela 4.

A análise dos dados da Tabela 4 concorda com os resultados do teste  $F$  (Tabela 3), pois não se observa sobreposição

entre os intervalos de confiança para os dois métodos analíticos<sup>13,14</sup>. Isto é melhor visualizado nos gráficos de Box-Plot, mostrados na Figura 1. Além disso, pode-se sugerir também, que o método da EHC apresenta maior precisão do que o método da AOAC para a determinação de umidade em mel.

A menor precisão do método da AOAC pode ser atribuída também à cristalização do mel, que dificulta a leitura correta



**Figura 1.** Gráfico Boxplot de comparação entre os métodos refratométricos da AOAC e EHC dos conteúdos médios de umidade, erros padrão e desvios padrão das amostras de méis nos estados físicos líquido e cristalizado.

**Tabela 4.** Desvios padrão ponderados e seus respectivos intervalos de confiança no nível de 95,0% de confiança dos métodos refratométricos.

Método analítico	Sp (%)	Intervalo de confiança
AOAC	0,298	(0,276-0,396)
EHC	0,177	(0,157-0,229)

$\chi^2_{0,975} = 83,30$ ;  $\chi^2_{0,025} = 40,48$  e g.l. = 60.

do índice de refração, o que influencia diretamente nos valores de umidade. No refratômetro de Abbé, a leitura do índice de refração é feita somente após o acerto do campo claro e do campo escuro<sup>15,16</sup>.

Para amostras de mel líquidas, observa-se no refratômetro uma divisão nítida entre os dois campos. No entanto, para amostras cristalizadas, nota-se uma menor nitidez (dependente do tipo de cristalização da amostra) no limite entre os campos claro e escuro, o que dificulta o ajuste correto pelo analista destes campos. Isto resulta em valores de índice de refração e, conseqüentemente, de umidade, superestimados e com maior variabilidade.

#### 4 Conclusões

A comparação pelo teste *t* para as diferenças entre as médias sugeriu que o método da AOAC produz sistematicamente conteúdos médios de umidade mais altos do que o método da EHC para as amostras cristalizadas. Portanto, este é indicado somente para amostras líquidas, enquanto que o último pode ser usado para amostras nos dois estados físicos.

Os resultados da comparação entre as variâncias pelo teste *F* mostraram que os métodos apresentam precisões diferentes, sendo o método da EHC mais preciso do que o método da AOAC. Estes dados reforçam as conclusões de CANO et al.<sup>6</sup> de que a cristalização interfere na medida da umidade por métodos refratométricos que não fazem uso de qualquer pré-tratamento da amostra como o da AOAC, já que o refratômetro é construído para a leitura de amostras lípidas, sem cristais ou sujidades.

Desta forma, recomenda-se a adoção do método da EHC pela legislação brasileira, considerando-se que de acordo com os resultados desta investigação, este método não apresenta erros sistemáticos, pois mostra precisão superior a do método oficial, pode ser usado para amostras líquidas e cristalizadas e não sofre influência do pré-tratamento da amostra.

#### Referências bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17<sup>th</sup>. v. II., 2000.
- BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. Harmonised Methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, sp. iss., p. 1-59, 1997. 2<sup>a</sup> ed. Campinas. SP. Editora Unicamp. 2002.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.
- BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; PERSANO ODDO, L. Physico-chemical methods for characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, v. 35, p. S4-S17, 2004.

5. BRASIL. Instrução Normativa n. 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, 23 p.
6. 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 Comp. Anal.**, v. 14, n. 2, p. 101-109, 2001.
7. CODEX ALIMENTARIUS STANDARD FOR HONEY. Ref. Nr. CL 1993/14-SH FAO e WHO, Roma, 1993.
8. ISENGARD, H. D. Water Content, one of most important properties of food. **Food Control.**, v. 12, p. 395-400, 2001.
9. MILLER, J. C.; MILLER, J. N. *Estadística para Química Analítica*. 2ª. Ed. Delaware: Addison-Wesley Iberoamerican, S. A., 1993.
10. STATSOFT INC., *Statistica for Windows, Version 6.0*, 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK, 74104, USA, 1998.
11. VLACHOS, N. A.; KARAPANTSIOS, T. D. Water content measurement of thin sheet starch products using a conductance technique. **J. Food Eng.**, v. 46, p. 91-98, 2000.
12. WERNIMONT, G. T. *Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods*. 1ª. ed. Virginia: AOAC International, 1985.
13. BERTHEA, R. M.; DURAN, B. S.; BOULLION, T. L. *Statistical Methods for Engineers and Scientists*. 2ª. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1985.
14. MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 2a. ed. Londres: John Wiley & Sons, 1984.
15. NIELSEN, S. S. *Introduction to the Chemical Analysis of Foods*. 1ª. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1994.
16. POMERANZ, Y.; MELOAN, C. E. *Food Analysis: Theory and Practice*. 3ª. ed. Nova Iorque: Chapman & Hall, 1994.