

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO PARA AUTENTICIDADE DE MEL – LIMITAÇÕES E ABORDAGENS PARA HARMONIZAÇÃO

Apimondia 2023

Dr. Klaus Beckmann, Intertek Food Services GmbH
Setembro 2023

CRONOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE AUTENTICIDADE DO MEL



1989

- Primeiro teste específico para mel: ^{13}C -EA-IRMS
- Testes focados apenas em açúcares de plantas C4

2007

- Desenvolvimento de ^{13}C -EA/LC-IRMS

2008-2012

- Teste de enzimas estranhas
- Oligossacarídeos estranhos

2015

- Lançamento do Bruker Honey Profiling[®]

2018

- Desenvolvimento de LC-HRMS

VISÃO GERAL SOBRE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO



Method	Methodology	Adulterants	
¹³ C EA-IRMS	Element Analyzer – isotope ratio mass spectrometry (AOAC method 998.12)	C4 sugar (e.g. corn, sugar cane)	Screening
¹³ C EA/LC-IRMS	Combination of EA – IRMS and liquid chromatography-Isotope ratio mass spectrometry	All C4 and C3 Sugars	
¹ H NMR Profiling	Bruker NMR FoodScreener	Any	
LC-HRMS	Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry	Any	
Mannose	Ion chromatography – electrochemical detection (IC-ECD)	Syrup/processing	Markers
SM-R	LC-MSMS	Specific marker for rice syrup	
TM-R	ICP-MS	Trace marker for rice syrup	
Hf-OS ¹	Liquid chromatography – evaporate light scattering detection (LC-ELSD)	Starch hydrolyzates	
E 150d	LC-MSMS	Food caramel colorant	
Psicose	Liquid chromatography – evaporate light scattering detection (LC-ELSD)	Starch-based syrups	Enzymes
β-FF ²	Liquid chromatography – refractive index (LC-RI)	Sucrose-based inverted sugar	
β-/γ-AMYL ³	Liquid chromatography – UV detection (LC-UV)	Starch-based syrup, foreign diastase	
α-AMYL ³ (heat stable)	Enzymatic test	Starch-based syrup, foreign diastase	
FAmyP ⁴	Enzymatic test	Foreign diastase	

¹ Honey-foreign oligosaccharides ² beta-fructofuranosidase ³ Amylase ⁴ Foreign alpha-amylase profiling

¹³C-EA/LC-IRMS - SORGO

- Primavera de 2021: méis do norte da Argentina e do Uruguai
 - ¹³C-EA/LC-IRMS: resultados de isótopos para fração de trissacarídeo divergente

→ Avaliação quanto à adulteração "positiva"

- Razão para diferenças nas frações de açúcar: Plantas de sorgo → insetos produtores de melado
- Problema: o teste não é capaz de diferenciar adições de açúcares estranhos e açúcares naturais - "contaminações" de melado

→ Recomendação: utilizar outros testes para controle de autenticidade de tais méis (como RMN, HRMS)



VISÃO GERAL SOBRE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO



Method	Methodology	Adulterants	
¹³ C EA-IRMS	Element Analyzer – isotope ratio mass spectrometry (AOAC method 998.12)	C4 sugar (e.g. corn, sugar cane)	Screening
¹³ C EA/LC-IRMS	Combination of EA – IRMS and liquid chromatography-Isotope ratio mass spectrometry	All C4 and C3 Sugars	
¹ H NMR Profiling	Bruker NMR FoodScreener	Any	
LC-HRMS	Liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry	Any	
Mannose	Ion chromatography – electrochemical detection (IC-ECD)	Syrup/processing	Markers
SM-R	LC-MSMS	Specific marker for rice syrup	
TM-R	ICP-MS	Trace marker for rice syrup	
Hf-OS ¹	Liquid chromatography – evaporate light scattering detection (LC-ELSD)	Starch hydrolyzates	
E 150d	LC-MSMS	Food caramel colorant	
Psicose	Liquid chromatography – evaporate light scattering detection (LC-ELSD)	Starch-based syrups	
β-FF ²	Liquid chromatography – refractive index (LC-RI)	Sucrose-based inverted sugar	Enzymes
β-/γ-AMYL ³	Liquid chromatography – UV detection (LC-UV)	Starch-based syrup, foreign diastase	
α-AMYL ³ (heat stable)	Enzymatic test	Starch-based syrup, foreign diastase	
FAmyP ⁴	Enzymatic test	Foreign diastase	

¹ Honey-foreign oligosaccharides ² beta-fructofuranosidase ³ Amylase ⁴ Foreign alpha-amylase profiling

FAMYP – MEL DE MELATO DA PENÍNSULA IBÉRICA



- 2019: resultados dos testes para méis de melato de Espanha e Portugal
- Muitos pontos positivos
- Propriedades destes méis:
 - Mel escuro, quase preto
 - Alta condutividade elétrica (> 1,2 mS/cm), altos resultados para atividades enzimáticas e prolina
 - Outros testes para adulteração: negativo
- Adições de açúcares estranhos não são plausíveis
- Razão potencial (!) para resultados positivos do FAmYP: melato específica de carvalhos
 - *Metcalfa*? nenhuma indicação encontrada

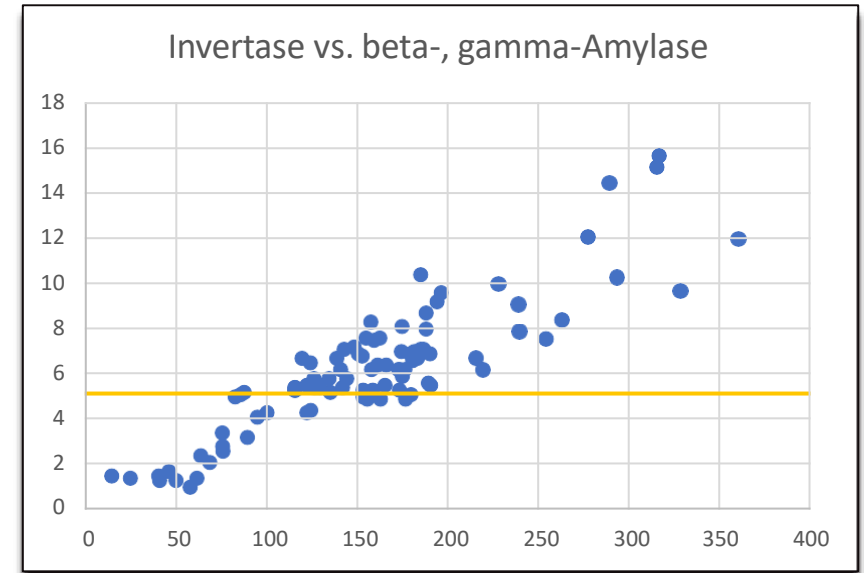
~~POSITIVO~~ NEGATIVO/INCONCLUSIVO

BETA-, GAMA-AMILASE







- Resultados em mel > 5 U/kg:
 - Prova indireta de adição de açúcares estranhos
 - Resíduos de material de alimentação (suplementos alimentares)
 - Melado de cigarras *Metcalfa*
- Observação: frequentemente resultados para beta-amilase, gama-amilase > 5 U/kg em ocorrências simultâneas de atividades mais altas de invertase.
- Alteração na avaliação dos resultados:

→ Atividades de beta-amilase, gama-amilase superiores a 5 U/kg são consideradas naturais se as atividades de invertase forem superiores a 80 U/kg.



NMR – MANOSE + DHA



Compound	Value	Unit	LOQ	Reference Range	Flag
mannose	0.08	g/100g	0.01	<0.01  0.03	
dihydroxyacetone (DHA)	108	mg/kg	5	<5  431	

- Avaliação de manose e diidroxiacetona (DHA)
 - Carboidratos, gerados na produção de xarope de açúcar sob certas condições, muito prevalentes em muitos xaropes de açúcar C3 usados para adulteração de mel.
 - Presença simultânea de ambas as substâncias: não é natural no mel em níveis > 5 mg/kg de DHA e > 200 mg/kg de manose.
- Méis poliflorais e a maioria dos méis monoflorais: não contêm essas substâncias em tais níveis.
- Exceções: Manuka (→ DHA), Jujuba (*Ziziphus*) (→ DHA + manose), melato, Abacate (→ manose)
- A interpretação dos resultados precisa ser baseada em características adicionais do mel.



LC-HRMS – SM-B



- SM-B: marcador específico para açúcar de beterraba
 - 3-Metoxi-tiramina (alcaloide)
- Resultados com **LC-HRMS** ou **LC-MS/MS**: indicação da presença de xaropes à base de açúcar de beterraba no mel.
- Desde 2017: um número significativo de descobertas positivas em méis do México/Cuba.
 - Plantas da família cactaceaea e do gênero euphorbia são supostas de conter 3-metoxi-tiramina naturalmente.
 - Exceção para descobertas de SM-B em méis de regiões específicas.





- Possíveis influências naturais para quase todos os testes de autenticidade do mel
- Precisa ser considerado para interpretações e avaliações dos resultados dos testes
- Deve fazer parte da discussão para a harmonização dos métodos de análise



HARMONIZAÇÃO DE MÉTODOS

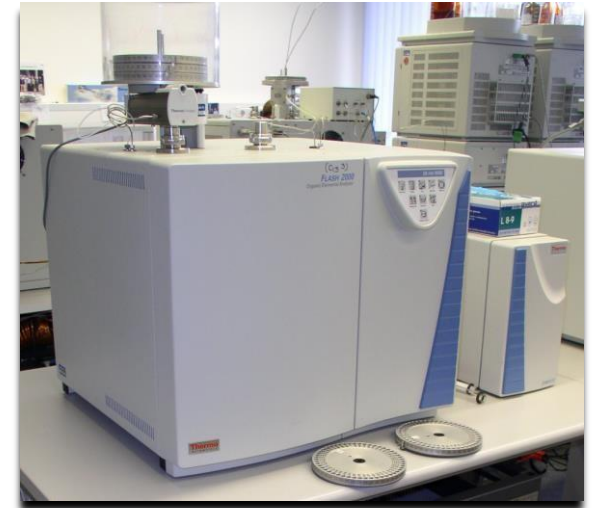
- Objetivo: todos os laboratórios estão utilizando interpretações idênticas dos parâmetros de teste e avaliações dos resultados.
- Desafios:
 - Os laboratórios constroem seus próprios bancos de dados, que são usados como referências para a interpretação dos resultados.
 - Os laboratórios estão utilizando seus procedimentos de teste há muitos anos.
- Situação atual:
 - Resultado dos testes de intercomparação, organizados pelo Grupo de Trabalho Técnico da F.E.E.D.M. de 2021 a 2022.
 - Boa correlação de resultados para ^{13}C -EA/LC-IRMS e RMN.
 - Alta variação de resultados para LC-HRMS.
 - ^{13}C -EA/LC-IRMS e RMN: interpretações/limites diferentes para certos parâmetros.

→ Há uma forte necessidade de métodos harmonizados.

ABORDAGENS PARA HARMONIZAÇÃO – ^{13}C -EA/LC-IRMS



- Primeira abordagem:
 - Reuniões em 2020 entre laboratórios privados que realizam este teste.
 - Resultado:
 - Consenso sobre como interpretar vários parâmetros técnicos.
 - Definição de intervalos limítrofes.
 - Avaliações harmonizadas para tipos específicos de mel difíceis (por exemplo, méis de melato de árvores *Bracatinga*).
- Mas: ainda existem limites de decisão diferentes (positivos/negativos).
- EN 17958:
 - Padronização de método em nível europeu
 - Status atual: Rascunho



ABORDAGENS PARA HARMONIZAÇÃO – NMR



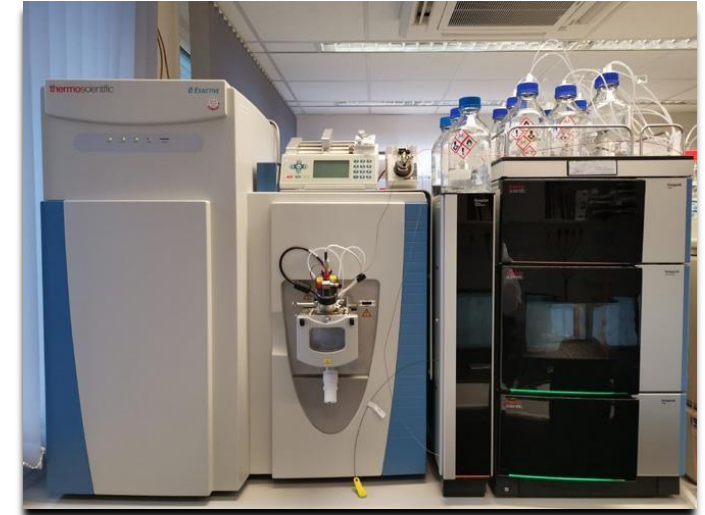
- A maioria dos laboratórios está utilizando o Bruker Honey Profiling[®].
 - Vantagens:
 - Maior banco de dados de mel do mundo (> 28.000 amostras)
 - Protocolo explícito de preparação de amostras e medição (válido para cada laboratório individualmente).
 - Organização mensal de mesas-redondas para discutir questões atuais.
- Padronização em nível nacional/internacional:
 - Itália e Alemanha: projetos de RMN para mel.
 - Independente do banco de dados da Bruker: a criação de um novo banco de dados → levará muito tempo.
 - Situação atual: intercâmbio científico; ainda não há rascunho disponível.



ABORDAGENS PARA HARMONIZAÇÃO – LC-HRMS



- Primeira abordagem para harmonização:
 - Iniciada pelo Grupo de Trabalho Técnico da F.E.E.D.M.
 - Ideias básicas:
 - 1) Grupos mínimos de substâncias marcadoras que precisam ser consideradas
 - 2) Estabelecimento de limites para substâncias marcadoras conhecidas
- Status até o momento
 - Várias reuniões com intenso intercâmbio científico entre laboratórios
 - Após a divulgação do relatório do JRC "From the hives", os processos foram interrompidos → decidir como proceder



PROJETO JRC "HARMHONEY"“



- Projeto com o objetivo de obter métodos de análise melhorados, harmonizados e geralmente aceitos para detectar fraudes no mel
- Mesa-redonda junto com especialistas internacionais está agendada para outubro
- **Processo planejado:**
 - Coleta de amostras de mel e xaropes artificiais
 - Otimização e validação dos métodos de teste
 - Elaboração de procedimentos operacionais padrão

CONCLUSÕES



- Processos de harmonização para os principais métodos de teste (complexos) estão em andamento.
- **Muitas influências naturais → necessidade de muita experiência para interpretar os resultados.**

→ colaboração da indústria do mel, especialistas em autoridades e laboratórios privados é indispensável.



Obrigado!

Dr. Klaus Beckmann



+49 421 65727 355



klaus.beckmann@intertek.com



intertek

Total Quality. Assured.