

TERCERA SECCION

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION

NORMA Oficial Mexicana NOM-002-SAGARPA-2016, Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

JUAN JOSÉ LINARES MARTÍNEZ, Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con fundamento en los artículos 35 fracción IV y XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 2, 5, 87, 94, 97, 99 y 100 de la Ley de Desarrollo Rural Sustentable, 38 fracción II y IX, 39 fracción V, 40 fracciones I, XI y XII, 41, 46 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, 33 y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, 29 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación vigente, y

CONSIDERANDO

Que el Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018, tiene como finalidad obtener el máximo potencial de México a través de cinco metas nacionales, una de ellas denominada "México Próspero" cuyo objetivo es promover el crecimiento de la productividad en un clima de estabilidad económica generando una igualdad de oportunidades, contando con una infraestructura adecuada, buscando condiciones favorables para el desarrollo económico a través de una regulación que permita una sana competencia, teniendo como línea estratégica desregular, reorientar y simplificar el marco normativo del sector agroalimentario.

Que el Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario, Pesquero y Alimentario 2013-2018, establece entre sus objetivos el proporcionar mayor certidumbre en la actividad agroalimentaria mediante mecanismos de administración de riesgos; para tal efecto, como una de sus estrategias prevé el fortalecimiento de la sanidad, y calidad agroalimentaria para proteger la salud de la población y elevar la competitividad del sector. Asimismo, dentro del objetivo de impulsar la productividad en el sector agroalimentario mediante inversión en capital físico, humano y tecnológico que garantice la seguridad alimentaria; instaure diversas líneas de acción.

Que es competencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación regular, administrar y fomentar las actividades de sanidad y calidad agroalimentaria y de productos derivados de dicha cadena, reduciendo los riesgos inherentes en materia agrícola, en beneficio de los productores, consumidores e industria.

Por ello, con la presente Norma Oficial Mexicana, se pretende llevar a cabo la regulación y ordenación del producto identificado u ostentado como Fructanos de Agave, como un derivado del agave, así como proteger a los individuos que disfrutan del mismo para que puedan elegir, de manera informada, productos que cumplan adecuadamente con las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad inherentes a los fructanos de Agave; así como con las especificaciones sanitarias (microbiológicas) y de calidad agroalimentaria que son necesarias para que el producto en cuestión no cause un riesgo a la salud, ni se demerite el prestigio y la competitividad de esta cadena agroindustrial mexicana, estableciendo los métodos de prueba y procedimientos de evaluación mediante los cuales se constate que el citado producto satisface dichas especificaciones.

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Proyecto de esta Norma Oficial Mexicana fue presentado el 25 de noviembre de 2015 al Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria.

Que con fecha 18 de diciembre de 2015, conforme a lo previsto en el artículo 47, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Proyecto de la presente Norma, fue publicado en el Diario Oficial de la Federación a efecto de que dentro de los sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentarán sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria.

Que posteriormente fue publicada en el Diario Oficial de la Federación, la respuesta a los comentarios recibidos, formulada por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47, fracción III, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que la presente Norma Oficial Mexicana fue aprobada en la Primera Sesión Ordinaria del Subcomité Especializado en Competitividad, celebrada el 9 de junio de 2016 y posteriormente aprobada en la Tercera Sesión Ordinaria del Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria de la SAGARPA, de fecha 17 de junio de 2016, para que la presente Norma Oficial Mexicana, sea publicada en el Diario Oficial de la Federación como Norma Definitiva.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria y en ejercicio de las atribuciones conferidas en el Artículo 29 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 25 de abril de 2012, he tenido a bien expedir la presente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-002-SAGARPA-2016, RELATIVA A LAS CARACTERÍSTICAS DE
SANIDAD, CALIDAD AGROALIMENTARIA, AUTENTICIDAD, ETIQUETADO Y EVALUACIÓN
DE LA CONFORMIDAD DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE**

En la elaboración de la presente Norma Oficial Mexicana participaron los siguientes actores:

SAGARPA, a través de la Dirección General de Normalización Agroalimentaria
Asociación Nacional Industria de Jarabes y Fructanos de Agave, A.C.

Banuet Arrache y Asociados, S.C.

Bioagaves de la Costa, S.A. de C.V.

Bustar Alimentos, S.A.P.I. DE C.V.

EDULAG, S.A. de C.V.

Industrializadora de Fructanos de Agave Tierra Blanca, S.A. de C.V.

Inulina y Miel de Agave, S.A. de C.V.

José Manuel Cruz Rubio

Mieles Campos Azules, S.A. de C.V.

Naturalever de México S.A. de C.V.

Nekutli, S.A. de C.V.

Nutriagaves de México, S.A. de C.V.

Productos Selectos de Agave, S.P.R. de R.L. de C.V.

Visión Integral del Sur de Sinaloa, S.A. DE C.V.

ÍNDICE

0. INTRODUCCIÓN
1. OBJETIVO
2. CAMPO DE APLICACIÓN
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS
5. UNIDADES Y SÍMBOLOS
6. CLASIFICACIÓN
7. ESPECIFICACIONES
8. MUESTREO
9. MÉTODOS DE PRUEBA
10. INFORMACIÓN COMERCIAL
11. EVALUACIÓN DE LA CONFORMIDAD
12. CONTROL DE CALIDAD
13. COMERCIALIZACIÓN Y TRASLADO
14. VIGILANCIA
15. BIBLIOGRAFÍA
16. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

0. INTRODUCCIÓN

El agave es una planta mexicana reconocida mundialmente la cual tiene diversas utilidades para la producción de azúcares y fibras dietéticas solubles.

Los Fructanos de Agave pueden destacar por su efecto prebiótico y tienen aplicación en la industria alimentaria como fibra dietética soluble.

En virtud de lo anterior, los distribuidores, productores y comercializadores de este producto se han incrementado, por ello es conveniente definir sus características físicas y químicas y contrastarlas con las de otros productos que no provienen del agave y que no tienen las mismas características.

Asimismo, cabe señalar que, en la actualidad, los Fructanos de agave cuentan con características fisicoquímicas susceptibles de ser medibles y evaluadas; sin embargo, dichos métodos actualmente no están del todo estandarizados en México, haciéndose necesario el incorporar los mismos en una Norma Oficial Mexicana que proporcione certeza en este ámbito.

También cabe señalar que, en virtud del alto crecimiento que está teniendo en el mercado el producto en cuestión y considerando la amplia aceptación que el mismo ha generado, tanto en consumidores nacionales como extranjeros, en fechas recientes se ha detectado que existen productos que se ostentan como Fructanos de agave, siendo el caso de que dicha información no siempre es veraz, ya que dichos productos se extraen a partir de otras plantas u otros productos distintos al agave, haciendo creer que se está consumiendo un producto con las propiedades y los beneficios de los Fructanos de Agave sin ser un producto auténtico, lesionando los intereses de la población que lo consume y lesionando gravemente a aquellos productores y comercializadores de Fructanos de agave que sí se preocupan por ofrecer productos inocuos, auténticos, trazables y de calidad.

Aunado a lo anterior, con el incremento de la utilización y expansión de este producto, se ha fomentado un mayor número de productores, importadores y comercializadores que lo obtienen y comercializan o de acuerdo a sus propios criterios y metodologías, lo cual propicia la aparición de una oferta equívoca o bien, dolosamente alterada ya que, en ocasiones, el producto no cumple con las especificaciones fisicoquímicas necesarias para ser determinado como Fructano de agave.

En ese sentido, al no contarse a la fecha, con una regulación técnica para los Fructanos de agave, se incrementa el riesgo de la presencia en el mercado de productos análogos o imitaciones que, incluso, pudieran no cumplir con las condiciones sanitarias y de calidad agroalimentaria que resultan necesarias en el proceso de extracción y que incluso pudieran causar un riesgo a la salud de los consumidores en México y en el mundo.

Por ello, con la presente Norma Oficial Mexicana, se pretende llevar a cabo la ordenación del producto identificado como Fructanos de Agave, así como proteger a los individuos que lo utilizan como materia prima o disfrutan del mismo para que puedan elegir, de manera informada, un producto que cumpla con las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad expresamente aplicables a los Fructanos de Agave; así como las especificaciones sanitarias (microbiológicas) para que el producto mencionado no cause un riesgo a la salud, estableciendo los métodos de prueba mediante los cuales se verifique que el citado producto satisface dichas especificaciones.

1. OBJETIVO

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones de los Fructanos de Agave, así como las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado, denominaciones permitidas y procedimientos de evaluación de la conformidad, incluyendo la inspección y mecanismos de control de los mismos.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Oficial Mexicana es aplicable, desde el punto de vista territorial, dentro de los Estados Unidos Mexicanos de manera obligatoria y, en su caso, en aquellos países que, de forma soberana, decidan adoptarlo, dentro de los marcos y convenciones que rigen al Derecho Internacional.

Desde el ámbito personal de aplicación, la presente Norma Oficial Mexicana es aplicable, en lo conducente y conforme a las disposiciones previstas en este instrumento, a todas aquellas personas físicas y morales que se dediquen a la producción, extracción, proceso, distribución, comercialización, oferta, publicidad, importación, almacenaje, y/o demás actividades industriales, de evaluación y comerciales, bajo cualesquier forma, relativas a los Fructanos de agave.

Desde el ámbito material de aplicación, la presente Norma Oficial Mexicana es aplicable a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado, denominaciones permitidas y procedimientos de evaluación de la conformidad, incluyendo la inspección y mecanismos de control, del producto que corresponda a la siguiente descripción: Fructanos de estructura ramificada con o sin una unidad de glucosa misma que puede ser terminal o interna con enlaces glucosídicos tanto tipo β -2,1 como β -2,6., provenientes de las plantas de la familia de las agaváceas (*agavaceae*) conforme a lo previsto en este instrumento, los cuales deberán identificarse bajo las denominaciones previstas en esta Norma Oficial Mexicana.

Asimismo, aquellos productos, que aun sin ajustarse a la descripción anterior, hagan alusión, ya sea tanto en su información ostentada, como en la publicidad relativa a los mismos que se difunda por cualquier medio o forma, o bien a través de textos, diálogos, sonidos, imágenes, marcas, u otras descripciones que induzcan o puedan inducir a pensar que dichos productos se tratan de Fructanos de Agave, también se encontrarán sujetos al campo de aplicación de la presente Norma Oficial Mexicana y, en consecuencia, serán evaluados conforme al mismo, siendo susceptibles de ser dictaminados como violaciones a las disposiciones aquí contenidas, en aquellos casos en que no se ajusten a los parámetros, características, controles, procesos y requisitos previstos en esta regulación técnica de observancia obligatoria.

3. REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente Norma Oficial Mexicana deben de aplicarse, en los términos indicados en esta Norma Oficial Mexicana, las siguientes Leyes, Reglamentos, Acuerdos y Normas Oficiales Mexicanas vigentes, o las que, en su caso, las sustituyan o modifiquen, para efectos de lo dispuesto en el artículo 51-A, primer párrafo de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización:

3.1. Ley de Productos Orgánicos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 2006.

3.2. Reglamento de Ley de Productos Orgánicos publicado en el Diario Oficial de la Federación el 1 de abril de 2010.

3.3. Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 16 de julio del 2012.

3.4. Norma Oficial Mexicana NOM-030-SCFI-2006, Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de noviembre de 2006.

3.5. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de abril del 2010.

3.6. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de junio de 2015.

3.7. Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de febrero del 2012.

3.8. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de marzo del 2010.

3.9. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de septiembre de 1995.

3.10. Norma Mexicana NMX-F-607-NORMEX-2013, Alimentos–Determinación de Cenizas en Alimentos–Método de Prueba. Cuya Declaratoria de Vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de agosto de 2013.

3.11. Norma Mexicana NMX-F-317-NORMEX-2013, Alimentos–Determinación de pH en Alimentos y Bebidas no alcohólicas–Método de Prueba. Cuya Declaratoria de Vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de agosto de 2013.

4. DEFINICIONES, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.

Para los efectos de la correcta interpretación y aplicación de la presente Norma Oficial Mexicana, se deben emplear las siguientes definiciones, acrónimos y abreviaturas:

4.1. ADITIVO ALIMENTARIO (ADITIVO): Es cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al producto con fines tecnológicos en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del producto o un elemento que afecte a sus características (incluidos los organolépticos). Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al producto para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.

4.2. AZÚCARES PROPIOS DEL AGAVE: Carbohidratos presentes de manera natural en la planta de agave.

4.3. BASE SECA: Referido al contenido (en % w/w) de cualquier compuesto presente en la muestra, excluyendo en el cálculo el agua presente.

4.4. BASE HÚMEDA: Referido al contenido (en % w/w) de cualquier compuesto presente en la muestra, incluyendo en el cálculo el agua presente.

4.5. BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN: Conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos objeto de esta Norma Oficial Mexicana, mantienen las especificaciones requeridas para su consumo de acuerdo a la NOM-251-SSA1-2009 (Ver Capítulo "3 Referencias")

4.6. CERTIFICADO ORGÁNICO: Documento que expide el Organismo de Certificación de Productos Orgánicos acreditado y autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, conforme a lo dispuesto por la Ley de Productos Orgánicos, con el cual se asegura que el producto fue producido y/o procesado conforme a dicha Ley y sus disposiciones reglamentarias.

4.7. ETIQUETA: Todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica, ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en alto o bajo relieve estarcido, adherido o sobrepuesto al envase de los productos objeto de esta Norma Oficial Mexicana.

4.8. FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE: Los polímeros de hidratos de carbono con tres o más unidades monoméricas, que no son hidrolizados por las enzimas endógenas del intestino delgado humano."

4.9. FRUCTANOS: Son los Polisacáridos constituidos de unidades de fructosa con o sin una unidad de glucosa terminal o interna unidas por enlaces glucosídicos tipo β -2,1 y/o β -2,6.

4.10. FRUCTANOS DE AGAVE: Son los Fructanos de estructura ramificada con o sin una unidad de glucosa misma que puede ser terminal o interna con enlaces glucosídicos tanto tipo β -2,1 como β -2,6., provenientes de las plantas de la familia de las agaváceas (*agavaceae*) conforme a lo previsto por esta NOM.

4.11. HONGOS: Son organismos que se agrupan en el reino Fungi. Son organismos heterotróficos y osmotróficos, con quitina o quitosano en la pared celular. Los omicetos, cuya pared contiene celulosa, se encuentran en el reino Straminipila Si un hongo es filamentoso se llama "Moho".

4.12. JARABE: Es la solución acuosa, de consistencia viscosa, con alta concentración de carbohidratos y purificada; se caracteriza por tener un sabor dulce

4.13. JARABE DE AGAVE: Es el Jarabe producido por hidrólisis a partir de los Fructanos provenientes del agave.

4.14. GRADO DE POLIMERIZACIÓN: El grado de polimerización generalmente conocido como DP (por sus siglas en inglés: Degree of Polymerization) indica cuántas unidades repetitivas se encuentran en un polímero. Este valor se representa con: (n), que indica la cantidad de monómeros en una representación gráfica de una cadena molecular.

4.15. JARABE DE AGAVE PARCIALMENTE HIDROLIZADO: Es el Jarabe de Agave producido por hidrólisis parcial a partir de los Fructanos provenientes del agave conforme a los parámetros permitidos por esta NOM.

4.16. MATERIA EXTRAÑA: Es cualquier sustancia, resto, desecho o material (de un diámetro mayor a 1 mm) que se presenta en el producto pero que no forma parte de la composición normal de éste.

4.17. METAL PESADO (METALOIDE): Son los elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran así como de su acumulación en el organismo.

4.18. NOM: Norma Oficial Mexicana.

4.19. Norma Mexicana (NMX): Es aquella que elabora un organismo nacional de normalización, o la Secretaría, en los términos de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, que prevé que para un uso común y repetido reglas, especificaciones, atributos, métodos de prueba, directrices, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalación, sistema, actividad, servicio o método de producción u operación, así como aquéllas relativas a terminología, simbología, embalaje, marcado o etiquetado.

4.20. SECRETARÍA: Es la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

5. UNIDADES Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
ACS	Grado reactivo analítico (Por sus siglas en inglés)
AG	Amiloglucosidasa
CDS	Sistema de datos cromatográficos
DE	Equivalente de dextrosa, dextroza equivalente
DP	Grado de polimerización
d _{pn}	Grado de Polimerización en número (Por sus siglas en inglés)
d _{pw}	Grado de polimerización en peso (Por sus siglas en inglés)
FID	Ionización de flama
FN	Fructanasa
FOS	Fructooligosacáridos
g/l	Gramo por litro
GLC	Cromatografía de líquidos-gases
HFCS	Alta fructosa de maíz o jarabe de Maíz (Por sus siglas en inglés)
HMF	Hidroximetilfurfural
HPAEC	Cromatógrafo de intercambio iónico (por sus siglas en inglés).
M _i	Peso molecular del polímero i-ésimo
m/v	masa / volumen
ml	Mililitro
mg	Miligramo
M _n	Masa molar promedio en número
MS	Espectrofotometría de masas (Por sus siglas en inglés).
M _o	Peso molecular del monómero que constituye el polímero.
M _w	Masa molar promedio en peso (por sus siglas en inglés).
N _i	Número de unidades de moléculas del polímero i-ésimo.
PAD	Detección amperométrica por pulsos (Por sus siglas en inglés).
PD	Polidispersidad (Por sus siglas en inglés).
PTFE	Poli tetrafluoretileno.
RKF	Reactivo Karl Fisher.
rpm	Revoluciones por minuto.
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño (por sus siglas en inglés).
WAS	Imitación de jarabe de agave (por sus siglas en ingles).

6. CLASIFICACIÓN.

Para los efectos de esta Norma Oficial Mexicana, los productos afectos su campo de aplicación se clasifican de la siguiente manera:

6.1. FRUCTANOS NATIVOS DE AGAVE (BASE SECA), el cual debe de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 de esta Norma Oficial Mexicana, así como las previstas en los Capítulos y apartados de esta Norma Oficial Mexicana referentes a sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado, denominaciones permitidas y procedimientos de evaluación de la conformidad del mismo, incluyendo la inspección y mecanismos de control aplicables de forma general o particular a los Fructanos de Agave.

6.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) DE AGAVE, Son aquellos Fructanos de agave que presentan un DP menor a 10, los cuales deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.2 de esta Norma Oficial Mexicana, así como las previstas en los Capítulos y apartados de esta Norma Oficial Mexicana referentes a sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado, denominaciones permitidas y procedimientos de evaluación de la conformidad del mismo, incluyendo la inspección y mecanismos de control aplicables de forma general o particular a los fructooligosacáridos de Agave.

6.3. FRUCTANOS DE AGAVE DE ALTO PESO MOLECULAR (FAPM), los cuales deben de cumplir con las especificaciones previstas en el capítulo 7, índice 7.3 de esta Norma Oficial Mexicana, así como las previstas en los Capítulos y apartados de esta Norma Oficial Mexicana referentes a sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado, denominaciones permitidas y procedimientos de evaluación de la conformidad del mismo, incluyendo la inspección y mecanismos de control aplicables de forma general o particular a dichos productos.

7. ESPECIFICACIONES

7.1. FRUCTANOS NATIVOS DE AGAVE (BASE SECA)

7.1.1. MATERIA PRIMA VEGETAL

Los Fructanos nativos de agave deben cumplir con los requisitos mencionados a continuación:

El Fabricante de los productos sujetos a este apartado, es responsable de obtener de las personas físicas o morales de las cuales adquiera o pretenda adquirir los Fructanos la constancia de la identificación de todo Agave que haya sido comprometido a través de cualquier figura legal, para ser utilizado en la elaboración de los productos sujetos a este apartado.

El Fabricante de los productos sujetos a este apartado debe demostrar en todo momento, que se emplea agave como materia prima esencial para la elaboración de los mismos.

Por tal motivo, el Fabricante de los productos sujetos a este apartado debe llevar un registro actualizado de por lo menos, los documentos siguientes:

7.1.1.1. Facturas o documentos que comprueben la adquisición de Agave o los jugos de dicha materia prima vegetal,

7.1.1.2. Documentos que comprueben las entradas y salidas de materia prima vegetal.

7.1.2. USO DE ADITIVOS

No se permite adicionar aditivos a los productos previstos en este apartado.

7.1.3. VALORES FISICOQUÍMICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en la tabla 1 de esta Norma Oficial Mexicana.

TABLA 1. ESPECIFICACIONES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS FRUCTANOS NATIVOS DE AGAVE (BASE SECA)

Parámetro	Valor Mínimo	Valor Máximo	Expresado en unidades	Método de Prueba
Humedad	--	5	%	APÉNDICE B MÉTODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LOS FRUCTANOS DE AGAVE (APÉNDICE B)
Ph	5	7	unidades de pH	NMX-F-317-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias")
Cenizas	--	1	%	NMX-F-607-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias")
Sacarosa/ difructosa	0.3	5	%	APÉNDICE A MÉTODO DE PRUEBA PARA EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE CARBOHIDRATOS DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE (APÉNDICE A)
Glucosa	1,5	6	%	APÉNDICE A
Fructosa	3	9	%	APÉNDICE A
Fructanos nativos de agave	85	--	%	APÉNDICE A
Manitol	--	0.15	%	APÉNDICE A
Otros Azúcares propios del Agave	--	0.1	%	APÉNDICE A
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--	APÉNDICE A
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%	APÉNDICE A
Unidades de fructosa terminal	20	40	%	APÉNDICE C MÉTODO DE PRUEBA PARA EL ANÁLISIS DE LOS ENLACES GLUCÓSIDOS PRESENTES EN LOS FRUCTANOS DE AGAVE (APÉNDICE C)
Unidades de fructosa ramificada (con enlaces glucosidos tipo β -2,1 y β -2,6)	10	20	%	APÉNDICE C

Nota 1: para productos cuya presentación sea en estado líquido el parámetro de humedad no aplica y se deberá garantizar la calidad agroalimentaria y conservación del producto.

NOTA 2: Para efectos de la aplicación de la NMX-F-317-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias"), y en lo que correspondiente a la tabla de clasificación incluida en el Apéndice Informativo B de dicha Norma, para efectos de los productos materia de esta Norma Oficial Mexicana deberá considerarse una quinta clasificación, atendiendo a su viscosidad, debiéndose medir tomando para ello, la muestra homogeneizada que se obtenga de los mismos.

7.1.4. VALORES MICROBIOLÓGICOS

El producto objeto de este apartado debe de satisfacer los siguientes valores microbiológicos:

7.1.4.1. Cuenta bacteriana total**7.1.4.2. Hongos****7.1.4.3. Levaduras****7.1.4.4 Coliformes****7.1.4.5 *Salmonella Spp*****7.1.4.6 *E. Coli***

Conforme a las especificaciones previstas en la siguiente tabla:

TABLA 2. DE LÍMITES MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO	LÍMITES PERMISIBLES	MÉTODO DE PRUEBA (Ver Capítulo “3 Referencias”)
Hongos y Levadura	Máx. Máximo 100 UFC/g	NOM-111-SSA1-1994
Recuento total de microorganismos mesofílicos aerobios	2,500 UFC/g Máx.	NOM-210-SSA1-2014
<i>Coliformes</i>	10 UFC/g Máx.	NOM-210-SSA1-2014
<i>E. coli</i>	Negativo	NOM-210-SSA1-2014
<i>Salmonella Spp</i>	Negativo	NOM-210-SSA1-2014
<i>Staphylococcus</i>	Negativo	NOM-210-SSA1-2014

7.1.5. CALIDAD AGROALIMENTARIA Y BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA

7.1.5.1 En la elaboración de los productos objeto del presente apartado de esta Norma Oficial Mexicana se deberán cumplir los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene previstos en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios (Ver Capítulo “3 Referencias”) con el fin de evitar la contaminación a lo largo de su proceso.

7.1.5.2 Materia extraña

Para todos los productos objeto de este apartado, la presencia de materia extraña será consistente con los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene previstos en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios (Ver Capítulo “3 Referencias”).

El método de prueba para comprobar la anterior especificación debe ser el referido en el Apéndice Normativo B.2 Determinación de Materia Extraña de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. (Ver Capítulo “3 Referencias”).

7.1.5.3 Metales pesados (metaloides)

El fabricante de los productos objeto de este apartado, debe establecer mecanismos de control que permitan determinar la presencia y cantidad de metales pesados y metaloides en las materias primas, en el producto en proceso de elaboración o en el producto terminado, de acuerdo a las regulaciones aplicables a la categoría del producto. La información generada debe estar a disposición de las autoridades competentes cuando éstas así lo requieran.

7.1.6. PRODUCTOS ORGÁNICOS

Conforme a lo dispuesto por la Ley de Productos Orgánicos, para que los productos objeto de esta Norma Oficial Mexicana puedan ostentarse o denominarse como orgánicos, deberán contar con el Certificado Orgánico conforme a lo dispuesto por dicha Ley.

Para tales efectos, la Evaluación de la Conformidad y Certificación de los productos orgánicos solamente podrá llevarse a cabo por la Secretaría o por los Organismos de Certificación Orgánica acreditados y autorizados conforme a lo establecido por la Ley de Productos Orgánicos y las disposiciones que se deriven de ella, así como en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Asimismo, de conformidad con lo dispuesto por el artículo 44 del Reglamento de la Ley de Productos Orgánicos, en el etiquetado de los productos orgánicos se deberá asentar el número de certificado orgánico, el número de identificación del Organismo de Certificación Orgánica expedidor, así como la mención de que el producto se encuentra libre de organismos genéticamente modificados, de conformidad con lo dispuesto en las normas oficiales mexicanas respectivas y demás disposiciones jurídicas aplicables.

7.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) DE AGAVE

7.2.1. MATERIA PRIMA VEGETAL

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice A) subíndice 7.1.1) de esta Norma Oficial Mexicana.

7.2.2. USO DE ADITIVOS

No se permite adicionar aditivos a los productos previstos en este apartado.

7.2.3. VALORES FISICOQUÍMICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en la Tabla 3 de esta Norma Oficial Mexicana.

**TABLA 3. ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DEL
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) DE AGAVE**

	Valor Mínimo	Valor Máximo	Expresado en unidades	Método de Prueba
DPw DE 3 A 10	50	--	%	APÉNDICE D ANÁLISIS DE MASA MOLECULAR Y DISTRIBUCIÓN DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE AGAVE (APÉNDICE D)
Humedad	--	5	%	APÉNDICE B
pH	5	7	unidades de pH	NMX-F-317-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias")
Cenizas	--	1	%	NMX-F-607-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias")
Sacarosa/ difructosa	0.3	5	%	APÉNDICE A
Glucosa	1,5	6	%	APÉNDICE A
Fructosa	3	9	%	APÉNDICE A
Fructanos Nativos del Agave	70	--	%	APÉNDICE A
Manitol	--	0.15	%	APÉNDICE A
Otros Azúcares propios del Agave	--	0.1	%	APÉNDICE A
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--	APÉNDICE A
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%	APÉNDICE A

Nota 3: para productos cuya presentación sea en estado líquido el parámetro de humedad no aplica y se deberá garantizar la calidad agroalimentaria y conservación del producto.

Nota 4: Para efectos de la aplicación de la NMX-F-317-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias"), y en lo correspondiente a la tabla de clasificación incluida en el Apéndice Informativo B de dicha Norma, para efectos de los productos materia de esta Norma Oficial Mexicana deberá considerarse una quinta clasificación, atendiendo a su viscosidad, debiéndose medir tomando para ello, la muestra homogeneizada que se obtenga de los mismos.

7.2.4. VALORES MICROBIOLÓGICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.4 de esta Norma Oficial Mexicana.

7.2.5. CALIDAD AGROALIMENTARIA Y BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.5 de esta Norma Oficial Mexicana.

7.2.6. PRODUCTOS ORGÁNICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.6 de esta Norma Oficial Mexicana.

7.3. FRUCTANOS DE AGAVE DE ALTO PESO MOLECULAR (FAPM)

7.3.1. MATERIA PRIMA VEGETAL

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.1 de esta Norma Oficial Mexicana.

7.3.2. USO DE ADITIVOS

No se permite adicionar aditivos a los productos previstos en este apartado.

7.3.3. VALORES FISICOQUÍMICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en la Tabla 3 de esta Norma Oficial Mexicana.

TABLA 4. ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DE FRUCTANOS DE AGAVE DE ALTO PESO MOLECULAR (FAPM)

Parámetro	Valor Mínimo	Valor Máximo	Expresado en unidades	Método de Prueba
DPw MAYOR A 10	75	--	%	APÉNDICE D
Humedad ¹	--	5	%	APÉNDICE B
pH	5	7	unidades de pH	NMX-F-317-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias")
Cenizas	--	1	%	NMX-F-607-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias")
Sacarosa/ difructosa	0,1	5	%	APÉNDICE A
Glucosa	0,1	3	%	APÉNDICE A
Fructosa	0,1	5	%	APÉNDICE A
Fructanos Nativos del Agave	85	--	%	APÉNDICE A
Manitol	--	0.15	%	APÉNDICE A

Nota 5: para productos cuya presentación sea en estado líquido el parámetro de humedad no aplica y se deberá garantizar la calidad y conservación del producto.

Otros Azúcares propios del Agave	--	0.1	%	APÉNDICE A
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--	APÉNDICE A
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%	APÉNDICE A

NOTA 6: Para efectos de la aplicación de la NMX-F-317-NORMEX-2013 (Ver Capítulo "3 Referencias"), y en lo que correspondiente a la tabla de clasificación incluida en el Apéndice Informativo B de dicha Norma, para efectos de los productos materia de esta Norma Oficial Mexicana deberá considerarse una quinta clasificación, atendiendo a su viscosidad, debiéndose medir tomando para ello, la muestra homogeneizada que se obtenga de los mismos.

7.3.4. VALORES MICROBIOLÓGICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.4 de esta Norma Oficial Mexicana.

7.3.5. CALIDAD AGROALIMENTARIA Y BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.5 de esta Norma Oficial Mexicana.

7.3.6. PRODUCTOS ORGÁNICOS

Los productos objeto del presente apartado deben de cumplir con las especificaciones fisicoquímicas previstas en el capítulo 7, índice 7.1 subíndice 7.1.6 de esta Norma Oficial Mexicana.

8. MUESTREO

En todo caso, debido a sus propiedades higroscópicas, el producto debe ser muestreado preservando las condiciones secas del mismo, con el fin de no alterar los resultados de las evaluaciones del mismo. Este requisito corre a cargo del evaluador o de quien tome la muestra. En caso de que dicha condición no se cumpla, la muestra puede ser invalidada.

8.1. Del producto a granel

Del producto a granel, se toma una muestra representativa del lote a evaluar, constituida por porciones similares, en el entendido que el volumen extraído no debe ser menor de 3 kilogramos.

La muestra extraída, previamente homogeneizada, debe dividirse en 3 porciones de aproximadamente 1 kilogramo cada una, las cuales deben envasarse en un recipiente debidamente identificado con una etiqueta firmada por las partes interesadas debiendo cerrarse en forma tal que garantice su inviolabilidad. Estas porciones se reparten en la forma siguiente: dos para el verificador y una para el productor o envasador visitado. En el primer caso, de las dos muestras, una se analiza y la otra permanece en custodia para usarse en caso de tercera.

8.2. Del producto envasado

Para los productos ya envasados, conforme a lo dispuesto por el artículo 102 de la LFMN, las muestras se recabarán por duplicado, quedando un tanto de ellas en resguardo del establecimiento visitado. Sobre el otro tanto se hará la primera verificación.

La selección de los productos envasados, para extraer las porciones de muestras debe efectuarse al azar.

En todo caso, el evaluador o la autoridad responsable debe recabar la cantidad de producto suficiente para correr los análisis de ensayos previstos conforme a esta Norma Oficial Mexicana.

9. MÉTODOS DE PRUEBA

Para la verificación de las especificaciones que se establecen en esta Norma Oficial Mexicana, se deben aplicar los métodos a que se refieren los Capítulos y las Tablas de Especificaciones del mismo, así como las Normas Mexicanas que se indican en el Capítulo "3 Referencias".

Sin menoscabo de lo anterior, deberán aplicarse los métodos de prueba definidos en los Apéndices normativos de esta Norma Oficial Mexicana para determinar en lo conducente, los parámetros previstos en el mismo.

10. INFORMACIÓN COMERCIAL

Son requisitos obligatorios de información comercial y sanitaria los siguientes:

10.1. Nombre o denominación del Producto

10.1.1. Los productos que correspondan a la siguiente descripción: Fructanos de estructura ramificada con o sin una unidad de glucosa misma que puede ser terminal o interna con enlaces glucosídicos tanto tipo β -2,1 como β -2,6., provenientes de las plantas de la familia de las agaváceas (agavaceae), deben identificarse necesariamente bajo alguna de las siguientes denominaciones previstas en esta Norma Oficial Mexicana:

10.1.1.1 "FRUCTANOS NATIVOS DE AGAVE"

10.1.1.2 "FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE AGAVE" o "FOS DE AGAVE"

10.1.1.3 "FRUCTANOS DE AGAVE DE ALTO PESO MOLECULAR"

Asimismo, aquellos productos, que aun sin ajustarse a la descripción anterior, hagan alusión, ya sea tanto en su información ostentada, como en la publicidad relativa a los mismos que se difunda por cualquier medio o forma, o bien a través de textos, diálogos, sonidos, imágenes, marcas, u otras descripciones que induzcan o puedan inducir a pensar que dichos productos se tratan de Fructanos de Agave, también se encontrarán sujetos al campo de aplicación de la presente Norma Oficial Mexicana y, en consecuencia, serán evaluados conforme al mismo, siendo susceptibles de ser dictaminados como violaciones a la disposiciones aquí contenidas, en aquellos casos en que no se ajusten a los parámetros, características, controles, procesos y requisitos previstos en esta regulación técnica de observancia obligatoria.

10.1.2. En todo caso, aquellos productos ya sea en estado sólido, líquido u otros, que contienen Fructanos de Agave, y que hagan alusión, ya sea tanto en su información ostentada, como en la publicidad relativa a los mismos, que se difunda por cualquier medio o forma, o bien a través de textos, diálogos, sonidos, imágenes, marcas, u otras descripciones que induzcan o puedan inducir a pensar que dichos productos contienen, como uno de sus ingredientes a los Fructanos de Agave; deberán declarar el porcentaje empleado de los mismos respecto del producto.

Dicho porcentaje se declarará en la etiqueta, en forma próxima a las palabras o imágenes o gráficos que enfaticen a los fructanos de agave como ingrediente, o al lado del nombre común o denominación del alimento o bebida que lo contiene como uno de sus ingredientes, o adyacente a la mención de los mismos dentro de la lista de ingredientes.

10.2. Contenido neto.

Debe declararse el contenido neto y cuando aplique, la masa drenada en unidades del Sistema General de Unidades de Medida de conformidad a lo que establece la NOM-030-SCFI-2006, independientemente de que también pueda expresarse en otras unidades (Ver Capítulo "3 Referencias").

10.3. Nombre, denominación o razón social y domicilio fiscal.

10.3.1. Debe indicarse en la etiqueta el nombre, denominación o razón social y domicilio fiscal del responsable del producto de manera enunciativa mas no limitativa: calle, número, código postal y entidad federativa en que se encuentre.

10.3.2. Para productos importados debe indicarse en la etiqueta el nombre, denominación o razón social y domicilio fiscal del responsable del producto. Esta información puede incorporarse al producto preenvasado en territorio nacional, después del despacho aduanero y antes de la comercialización del producto.

10.4. País de origen

Se debe incorporar la leyenda que identifique el país de origen de los productos sujetos a esta Norma Oficial Mexicana, por ejemplo: "Hecho en..."; "Producto de ..."; "Fabricado en ...", u otras análogas, seguida del país de origen del producto, sujeto a lo dispuesto en los tratados internacionales de que los Estados Unidos Mexicanos sean parte.

Se permite el uso de gentilicios y otros términos análogos, siempre y cuando sean precisos y no induzcan a error en cuanto al origen del producto. Por ejemplo: "Producto español", "Producto estadounidense", entre otros.

10.5. Identificación del lote

10.5.1. Cada envase debe llevar grabada o marcada de cualquier modo la identificación del lote al que pertenece, con una indicación en clave que permita su rastreabilidad.

10.5.2. La identificación del lote que incorpore el fabricante en el producto debe marcarse en forma indeleble y permanente, y no debe ser alterada u ocultada de forma alguna hasta que sea adquirido.

10.5.3. La clave del lote debe ser precedida por cualquiera de las siguientes indicaciones: "LOTE", "Lot", "L", "Lote", "lote", "lot", "l", "lt", "LT", "LOT", o bien incluir una referencia al lugar donde aparece.

10.6. Fecha de caducidad o de consumo preferente

La fecha de caducidad o la fecha de consumo preferente deberán cumplir con lo siguiente:

10.6.1. El fabricante debe declararla en el envase o etiqueta, la cual debe consistir por lo menos de:

10.6.1.1 El día y el mes para los productos de duración máxima de tres meses;

10.6.1.2 El mes y el año para productos de duración superior a tres meses.

La fecha debe estar precedida por una leyenda que especifique que dicha fecha se refiere a la fecha de caducidad o al consumo preferente.

10.6.2. Para el caso de fecha de caducidad, ésta debe indicarse anteponiendo alguna de las siguientes leyendas, sus abreviaturas o leyendas análogas: "*Fecha de caducidad ____*", "*Caducidad ____*", "*Fech Cad ____*", "*CAD*", "*Cad*", "*cad*", "*Fecha de expiración*", "*Expira*", "*Exp*", "*EXP*", "*exp*", "*Fecha de vencimiento*", "*Vencimiento*".

10.6.3. Para el caso de consumo preferente, ésta debe indicarse anteponiendo alguna de las siguientes leyendas, sus abreviaturas o leyendas análogas: "*Consumir preferentemente antes del ____*", "*Cons. Pref. antes del ____*". y "*Cons Pref*".

10.6.4. En ambos casos, dichas leyendas deberán ir acompañadas de:

10.6.4.1 La fecha misma; o

10.6.4.2 una referencia al lugar donde aparece la fecha.

10.6.5. Tratándose de productos de importación, cuando el codificado de la fecha de caducidad o de consumo preferente no corresponda al formato establecido éste podrá ajustarse a efecto de cumplir con la formalidad establecida o, en su caso, la etiqueta o el envase debe contener la interpretación de la fecha señalada. En ninguno de estos casos los ajustes serán considerados como alteración.

10.6.6. Al declarar la fecha de caducidad o de consumo preferente se debe indicar en la etiqueta cualquiera de las condiciones especiales que se requieran para la conservación del producto si de su cumplimiento depende la validez de la fecha. Por ejemplo, se pueden incluir leyendas como: "manténgase en refrigeración"; "consérvese en congelación"; "una vez descongelado no deberá volverse a congelar"; "una vez abierto, consérvese en refrigeración", u otras análogas.

10.6.7. La fecha de caducidad o de consumo preferente que incorpore el fabricante en el producto preenvasado no puede ser alterada en ningún caso y bajo ninguna circunstancia.

10.7. Información adicional

En la etiqueta puede presentarse cualquier información o representación gráfica, así como materia escrita, impresa o gráfica, siempre que no esté en contradicción con los requisitos obligatorios de la presente norma. Cuando se empleen designaciones de calidad, éstas deben ser fácilmente comprensibles, evitando ser equívocas o engañosas en forma alguna.

Asimismo, en la etiqueta puede presentarse cualquier información o representación gráfica que indique que el envase que contiene el producto no afecta al medio ambiente, evitando que sea falsa o equívoca.

10.8. Para los productos de exportación sujetos a esta Norma Oficial Mexicana, sin menoscabo de los requisitos legales de etiquetado aplicables en el país de destino, se deberá declarar, al menos, en el etiquetado de dichos productos, la información relativa a los apartados 10.1, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6 y 10.7 de esta Norma Oficial Mexicana. La información relativa a los apartados 10.3 y 10.7 podrá ser adaptada a lo dispuesto por las regulaciones del país de destino del producto.

11. EVALUACIÓN DE LA CONFORMIDAD

Esta Norma Oficial Mexicana, es certificable y el cumplimiento con la veracidad de la información comercial de las etiquetas de los productos sujetos a la presente norma se realizará de conformidad con lo dispuesto en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y su Reglamento.

Las especificaciones de producto contenidas en la presente Norma Oficial Mexicana, pueden certificarse a través de un esquema obligatorio, para efectos de lo cual, tal evaluación de la conformidad del cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana será realizada por organismos evaluadores de la conformidad acreditados y, en su caso, aprobados, conforme a lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y su Reglamento.

La evaluación del cumplimiento de esta Norma Oficial Mexicana podrá realizarse en los lugares de fabricación, envasado, almacenaje, comercialización y/o venta de los productos sujetos a la presente Norma Oficial Mexicana.

La evaluación de la conformidad con respecto a la utilización de la cantidad de materia prima establecida para cada definición de producto, se lleva a cabo, tanto por los evaluadores de la conformidad acreditados y aprobados que actúen a solicitud de parte, como por las autoridades verificadoras en el ejercicio de sus atribuciones, a través de los siguientes procedimientos:

11.1. A través de la aplicación de muestreos y la realización de pruebas relativas a las especificaciones de las tablas del capítulo 7 de esta Norma Oficial Mexicana.

11.2. A través de la revisión de los documentos que deben mantener los sujetos obligados a cumplir con esta Norma Oficial Mexicana para demostrar que los productos elaborados y/o comercializados contienen los porcentajes de Fructanos de agave previstos en la presente Norma Oficial Mexicana, según los siguientes lineamientos:

11.3. A través de la presentación de los documentos comprobatorios que reúnan los requisitos legales conforme a la legislación aplicable y que demuestren lo siguiente:

11.3.1. la adquisición de materia prima, por parte del productor, en el cual se identifique con precisión los volúmenes de Agave utilizado, la especie, el origen geográfico de los mismos y los datos de identificación del proveedor de dichas materias primas de origen vegetal.

11.3.2. la adquisición de materiales de empaque y, en su caso, materiales e insumos de envasado utilizados en los productos sujetos al cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana.

A través de la revisión documental de bitácoras que deberán tener los productores y, en su caso, los envasadores de los productos sujetos a esta Norma Oficial Mexicana y que deberán incluir las mermas en que se incurra además de mantener un registro de la materia prima en la elaboración de los productos sujetos a la presente Norma Oficial Mexicana, para demostrar el cumplimiento.

Dicha información será la base para realizar un balance de materiales que se efectuará tomando en cuenta, como referencia, las eficiencias y rendimientos en operaciones unitarias que, de manera general, se obtienen en la industria.

Sin menoscabo de los métodos de evaluación citados anteriormente, el evaluador de la conformidad acreditado y aprobado también podrá llevar a cabo la constatación ocular de los productos, métodos, procesos, sistemas o prácticas industriales, comerciales o de servicios que se encuentren en el establecimiento o lugar sujetos a la visita de verificación, para corroborar que la evidencia recabada a través de los registros y evidencias documentales, conforme a lo establecido por la presente Norma Oficial Mexicana, corresponde a dichos productos, métodos, procesos, sistemas o prácticas industriales y comerciales.

Los Organismos Evaluadores de la Conformidad acreditados y aprobados que actúen a solicitud de parte, deben informar a las autoridades y a la Secretaría sobre aquellos productos que, conforme a las verificaciones efectuadas, detecten que violan las disposiciones de esta Norma Oficial Mexicana. En base a dichos informes, las autoridades procederán conforme a sus atribuciones.

Cuando para comprobar el cumplimiento con esta Norma Oficial Mexicana se requieran mediciones o pruebas de laboratorio, la evaluación correspondiente se efectuará únicamente en laboratorios acreditados y, en su caso, aprobados, salvo que éstos no existan para la medición o prueba específica, en cuyo caso, la prueba se podrá realizar en otros laboratorios, preferentemente acreditados en los Estados Unidos Mexicanos para otras normas, los cuales deberán ser validados por el Organismo Certificador conforme a lo previsto por las normas mexicanas o internacionales aplicables a las actividades de evaluación de la conformidad. Lo anterior sin perjuicio de lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización en materia de Acuerdos de Reconocimiento Mutuo.

Los gastos que se originen por las verificaciones por actos de evaluación de la conformidad serán a cargo de la persona a quien se efectúe ésta.

12. CONTROL DE CALIDAD

Los productores y envasadores de los productos objeto de esta Norma Oficial Mexicana deben mantener sistemas de control de calidad compatibles con las normas aplicables y las buenas prácticas de fabricación.

Asimismo, deben verificar sistemáticamente las especificaciones contenidas en esta Norma Oficial Mexicana, utilizando equipo suficiente y adecuado de laboratorio, así como los métodos de prueba apropiados, llevando un control estadístico de la producción que objetivamente demuestre el cumplimiento de dichas especificaciones.

13. COMERCIALIZACIÓN Y TRASLADO

Toda persona física o moral que se dedique a producir, envasar o comercializar los productos sujetos a la presente Norma Oficial Mexicana deben demostrar el cumplimiento con las especificaciones previstas en el mismo.

La disposición a granel sólo podrá llevarse a cabo por aquellas personas físicas o morales que sean productores, para efectos de sus procesos de industrialización y su envasado, por ellos mismos o por terceros, en términos de esta Norma Oficial Mexicana y sujetarse a la demostración, en todo momento, del cumplimiento de las especificaciones establecidas en esta Norma Oficial Mexicana. La disposición a granel al público en general no está permitida.

Los datos del país y comprador expresados en los documentos legales (Facturas, pedimentos de exportación, entre otros) que demuestren la exportación de los productos sujetos a la presente Norma Oficial Mexicana deben coincidir con el destino del producto exportado.

El traslado de productos sujetas a la presente Norma Oficial Mexicana a granel desde la planta del Productor y su recepción por parte del Envasador debe quedar asentado y constar en un registro específico.

El Productor y el Envasador, deben mantener registros sobre la cantidad de producto elaborado y, en su caso, envasado en forma diaria, identificando dichos registros por marca y presentación de producto elaborado y envasado.

El Productor y el Envasador, deben elaborar, cada uno de ellos un informe bimestral en donde se haga constar que los productos elaborados y envasados, identificándolos por marca y nombre del Productor o Envasador, cumplen con las especificaciones establecidas en esta Norma Oficial Mexicana.

14. VIGILANCIA

La vigilancia de la presente Norma Oficial Mexicana está a cargo de la SAGARPA y de la Procuraduría Federal del Consumidor, conforme a sus respectivas atribuciones, las cuales podrán en cualquier momento realizar visitas de verificación a las instalaciones y establecimientos de todos los integrantes de la cadena productiva, industrial, de envasado y comercial de los productos sujetos a su campo de aplicación. Para llevar a cabo dicha verificación se sujetarán al marco jurídico aplicable y a las previsiones contempladas en el Capítulo de Evaluación de la Conformidad de la presente Norma Oficial Mexicana.

Conforme al artículo 91 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, las autoridades competentes podrán realizar visitas de verificación con el objeto de vigilar el cumplimiento de esta Norma Oficial Mexicana, una vez que entre en vigor, independientemente y de manera adicional a los procedimientos para la evaluación de la conformidad que se hubieren establecido en esta Norma Oficial Mexicana. Al efecto, el personal autorizado por las dependencias podrá recabar los documentos o la evidencia necesaria para ello, así como las muestras conforme a lo dispuesto en el artículo 101 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

De manera concordante con el artículo 96 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, los productores, propietarios, sus subordinados o encargados de establecimientos industriales o comerciales en que se realice el proceso, envasado o comercialización, o alguna fase de los mismos, de los productos objeto de esta Norma Oficial Mexicana; tendrán la obligación de permitir el acceso y proporcionar las facilidades necesarias a las personas autorizadas por la Secretaría o por las autoridades competentes para practicar la verificación.

15. BIBLIOGRAFÍA

15.1. Ley Federal sobre Metrología y Normalización, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de julio de 1992 y sus modificaciones.

15.2. Ley de Productos Orgánicos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 2006.

15.3. Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 14 de enero de 1999

15.4. Norma Mexicana NMX-F-591-SCFI-2010, *Alimentos–Fructanos de Agave–Especificaciones, Etiquetado, y Métodos de Ensayo (Prueba)*. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de marzo de 2010.

15.5. Norma Mexicana NMX-FF-110-SCFI-2008 *Productos Alimenticios–Jarabe de agave–Especificaciones y métodos de prueba*. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de mayo de 2009.

15.6. Norma Mexicana NMX-F-103-NORMEX-2009 *Alimentos–Determinación de grados Brix*. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de junio de 2009.

15.7. Norma Mexicana NMX-F-083-SCFI-1986 *Alimentos determinación de humedad productos alimenticios*. Declaratoria de vigencia publicada en el DOF el 14 julio de 1986.

15.8. Norma Internacional ISO TC 34 N 1200 CD 26642 *Food Products–Determination of the glycemic index (GI) and relevant classification*. Organización Internacional de normalización, Ginebra, Suiza, 2007.

15.9. Código Internacional de Prácticas Recomendadas-Principios Generales sobre Higiene de los Alimentos. Comisión del Codex Alimentarius (CAC/RCP 1-1969).

15.10. Norma Internacional CODEX STAN 212-1999. Norma del Codex Alimentarius para los azúcares.

15.11. Principios y Directrices para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos relativos a los alimentos, Codex Alimentarius CAC/gi 21-1997.

15.12. Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209–217. [http://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](http://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8)

15.13. Jun, J.-G., & Gray, G. R. (1987). A New Catalyst for Reductive Cleavage of Methylated Glycans. *Carbohydrate Research*, 163, 247–261.

15.14. Lewis, D. H. (1993). Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion. *New Phytologist*, 124, 583–594.

15.15. Mellado-Mojica, E., & López, M. G. (2015). Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*, 167, 349–57. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.111>

15.16. Praznik, W., Löppert, R., Cruz Rubio, J. M., Zangger, K., & Huber, A. (2013). Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of Agave tequilana Weber, var. azul. *Carbohydrate Research*, 381, 64–73. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.025>

15.17. Praznik, W., Löppert, R., & Huber, A. (2007). Analysis and molecular composition of fructans from different plant sources. In S. Norio, B. Nouredine, & O. Shuichi (Eds.), *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research* (1st ed., pp. 93–117). Kerala: Research Signpost.

15.18. Willems, J. L., & Low, N. H. (2012). Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8745–54. <http://doi.org/10.1021/jf3027342>.

16. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional, por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

TRANSITORIOS

PRIMERO.- La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 180 días naturales siguientes al día de su publicación en el Diario Oficial de la Federación, salvo lo previsto en las demás disposiciones transitorias que se establecen a continuación.

SEGUNDO.- Las disposiciones de información de calidad agroalimentaria y etiquetado previstas en la presente Norma Oficial Mexicana, entrarán en vigor a los 365 días naturales siguientes al día de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

TERCERO.- Una vez que la presente Norma Oficial Mexicana sea publicada como definitiva y antes de la entrada en vigor de las disposiciones de información de calidad agroalimentaria y etiquetado previstas en la misma, los sujetos obligados a su cumplimiento de esta Norma, de manera voluntaria podrán optar por incorporar, a sus lotes de producción y de manera anticipada, nuevas etiquetas que ya den cumplimiento con las disposiciones de etiquetado previstas en la presente NOM; sin ser impedimento para ello, que puedan coexistir en el mercado las etiquetas que den cumplimiento a los nuevos requisitos y las etiquetas de los productos que se comercialicen con anterioridad a la entrada en vigor de esta Norma Oficial Mexicana con el fin de que pueda haber una transición en aquellos productos que se comercializan o importen en el territorio nacional.

CUARTO.- Las disposiciones relativas a la certificación obligatoria de la presente NOM entrarán en vigor a los 365 días posteriores al día en que hayan entrado en vigor las disposiciones del Artículo Segundo transitorio, siempre y cuando se cuente con un Organismo de Certificación que se encuentre acreditado y aprobado conforme a lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. En caso de que dicho Organismo de Certificación no se encuentre acreditado y aprobado al finalizar el plazo anterior, las disposiciones relativas a la certificación obligatoria de la presente NOM entrarán en vigor hasta el momento en que la Secretaría dé a conocer que se cuenta ya con dicho Organismo de Certificación acreditado y aprobado conforme a lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Ciudad de México, a 17 de junio de 2016.- El Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Juan José Linares Martínez**.- Rúbrica.

APÉNDICE A**MÉTODO DE PRUEBA PARA EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE CARBOHIDRATOS DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE****1. Introducción**

El método de prueba busca determinar los siguientes componentes característicos del jarabe de agave y evidenciar los marcadores que demuestren la adulteración del mismo en base a lo siguiente:

Perfil de carbohidratos, antes y después de hidrólisis con amiloglucosidasa.

Perfil de carbohidratos antes y fructosa después de hidrólisis con fructanasa.

Aumento de los niveles de glucosa y fructosa después del tratamiento con amiloglucosidasa y fructanasa como potencial marcador de adulteración con jarabe de maíz o fructooligosacáridos (FOS).

Determinación de fructosa, glucosa, difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol e hidroximetilfurfural (HMF).

Cuantificación de fructanos y determinación del DP promedio.

2. Objetivo y campo de aplicación

El presente método es utilizado para la detección de adulterantes en jarabe de agave, así como para la cuantificación de los principales carbohidratos presentes en este mismo (fructosa, glucosa, sacarosa/difructosa, manitol, sorbitol), así como el hidroximetilfurfural.

De manera alterna, al poder cuantificar la fructosa y glucosa, el tratamiento con fructanasa permite determinar el contenido de fructanos y su DP promedio en una muestra.

3. Principio/fundamento

3.1 Componentes característicos del jarabe de agave y marcadores aptos para adulteración (difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol y HMF).

El análisis del perfil del jarabe de agave se debe llevar a cabo a concentraciones altas de glucosa y fructosa (10 – 15 µg de azúcar por inyección) para la determinación correcta de los niveles de estos azúcares; pues esas concentraciones están fuera del rango del detector. Sólo los polioles –sorbitol y manitol– así como la difructosa/sacarosa y el HMF los que pueden ser determinados al ser comparados con los mismos.

El jarabe de agave muestra perfiles característicos de sus componentes, antes y después de hidrolizarlo con fructanasa o amiloglucosidasa altamente purificadas, o una combinación de ambas enzimas. Los perfiles después de la hidrólisis con fructanasa de alta pureza, así como de la combinación de fructanasa y amiloglucosidasa son idénticos y muestran un perfil de compuestos característicos del proceso de producción.

En las pruebas de detección de adulteración con jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS 43%, HFCS 55% y/o HFCS 90%, por sus siglas en inglés), jarabe de maíz de glucosa pura, jarabe de maíz de glucosa con diferentes equivalentes de dextrosa (DE), azúcar invertido, fructosa pura y sacarosa no se observan los compuestos característicos en el perfil del jarabe de agave originados por las condiciones de proceso. La presencia de compuestos adicionales (ej. maltooligómeros) no es evidente en el análisis del perfil de carbohidratos, pues estos compuestos pueden esconderse al co-eluir con compuestos propios del agave. Sin embargo, la comparación de los perfiles antes y después del tratamiento con fructanasa o amiloglucosidasa, o una combinación de ambas, permite demostrar la adulteración de la muestra.

El contenido de glucosa en jarabe de agave puro y aumento de la misma después de hidrolizarlo con la enzima amiloglucosidasa originado por la posible adulteración con productos de jarabe de maíz. Para el análisis correcto del contenido de glucosa, la muestra tiene que ser diluida en proporción 1:5. Las soluciones estándar de glucosa aplicadas (por lo menos a 3 concentraciones diferentes) tienen que estar en el mismo rango.

El aumento en el contenido de glucosa y fructosa del jarabe de agave puro después de hidrolizarlo con la enzima fructanasa pueden ser originados al incluir fructooligómeros no procesados por completo o en caso de adulteración al añadir jarabe de fructanos (de agave u otras fuentes). Para el análisis correcto del contenido de fructosa, la muestra tiene que ser diluida 1:20. Las soluciones estándar de fructosa aplicadas (por lo menos a 3 concentraciones diferentes) tienen que estar en el mismo rango.

3.2 Determinación de fructosa, glucosa, difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol e hidroximetilfurfural (HMF) en las muestras de jarabe y fructanos de agave.

El contenido de difructosa/sacarosa, sorbitol, manitol y HMF pueden ser calculados a partir de las áreas obtenidas por el equipo después de su correcta calibración y utilizando la muestra directamente. El contenido de fructosa y glucosa solo puede ser calculado al diluir el jarabe a niveles adecuados. En particular, el intervalo de linealidad, y donde hay una gran reproducibilidad en la cuantificación de la fructosa es muy limitado (entre 10 y 150 µg/ml).

4. Equipos y materiales

Cromatógrafo de intercambio iónico (HPAEC): Bomba con gradiente para cromatografía de líquidos con módulo desgasificador de eluyente, horno para columna, detector electroquímico de pulso funcionando en modo de detección de pulso amperométrico (PAD con amperometría integrada) y automuestreador. Equipo ICS-3000 o mejor (ICS-5000) de Thermo Scientific® Dionex® o equivalente. Software: Sistema de datos cromatográficos (CDS) Thermo Scientific® Dionex® Chromeleon® para control del cromatógrafo, adquisición de datos y su análisis.

Columna cromatográfica HPAEC: 250 X 4 mm di. con precolumna (50 X 4 mm d.i.) con resina específica de intercambio aniónico. CarboPac® PA1 o columna equivalente.

Balanza analítica. Sensibilidad de 0.01 mg.

Horno de vacío. Con capacidad de mantener $55 \pm 3^\circ\text{C}$.

Botellas de vidrio o plástico. De 100 a 150 mL de capacidad, con tapa roscada.

Desecador. Con SiO_2 , o desecante equivalente. Secar el desecante cada 2 semanas dejándolo 8 horas a 130°C en el horno a vacío.

Matraces volumétricos. 1 y 2 L de capacidad.

Agitador magnético y barras de agitación de diferentes tamaños.

Tubos cónicos de plástico para reacción (Tubos Safe-Lock).- 2.0 mL.

Racks para tubos cónicos de plástico para reacción.

Calentador eléctrico con agitación.- Rango de temperatura de 4 a 99°C para tubos cónicos de reacción de 2.0 mL (24x) o equivalente.

Baño ultrasónico.

Agitador tipo Vortex.

Micropipetas automáticas de volumen variable: incluyendo volúmenes de 500 a 5000 μL , 500 a 2500 μL , 200 a 1000 μL , 50 a 200 μL , 5 a 50 μL y 2 a 20 μL .

Filtro para jeringa. Tamaño del poro de 0.2 o 0.45 μm , Nylon.

Jeringas. Punta Luer Lock, capacidad de 1 mL, de plástico.

Equipo de filtrado al vacío.-Diámetro de 48 mm y capacidad del recipiente y embudo de 1 l.

Filtro de nylon o de acetato de celulosa.- 48 mm de diámetro.

Unidad de ultrafiltración por centrifugado.

5. Preparación de la muestra y reactivos

Reactivos

Agua. Toda el agua debe de ser ASTM Tipo 1 o equivalente.

Solución de Hidróxido de sodio. NaOH a concentración del 50% (w/w), libre de carbonatos, densidad de 1.50 g/ml.

Acetato de sodio anhidro. Grado reactivo, ACS.

Sorbitol. Grado estándar cromatográfico.

Manitol. Grado estándar cromatográfico.

Glucosa. Grado estándar cromatográfico.

Fructosa. Cristalina, Grado estándar cromatográfico.

Sacarosa. Cristalina, Grado estándar cromatográfico.

Hidroximetilfurfural. Grado estándar cromatográfico.

Hidróxido de potasio: en granalla, grado ACS o equivalente.

Sulfato de calcio. Con indicador de humedad, malla # 6.

Fructanasa. Mezcla liofilizada de fructanasas, (exo- inulinasa 20 000 U, endo-inulinasa 650 U en 36 mg). Almacene a -20°C cuando no se use.

Amiloglucosidasa. Amiloglucosidasa liofilizada con 36 000 U/g. Almacene a -20°C cuando no se use.

6. Preparación de los reactivos

Eluentes

Fase móvil A:

Solución de NaOH 200 mM, libre de carbonatos. Preparar las soluciones libre de carbonatos como se indica a continuación: Desgasificar 2 L de H₂O durante al menos 15 minutos con helio o argón en una botella de eluente del cromatógrafo (y/o con ayuda del baño ultrasónico). Agregar aproximadamente 800 mL de H₂O desgasificada en un matraz aforado de 1 L. Con una pipeta automática adicionar 10.4 mL de solución de NaOH 50% w/w a la solución sin agitar o mezclar, aforar cuidadosamente con H₂O. Continuar desgasificando la solución en el baño ultrasónico y burbujeando helio o argón durante 30 minutos más antes de utilizarla.

Fase móvil B:

Solución 100 mN de NaOH + 700 mM de acetato de sodio, libre de carbonato. Desgasificar H₂O como se indica para la fase móvil A. Agregar aproximadamente 800 mL de H₂O desgasificada en un matraz aforado de 1 L y añadir lentamente 57.4 g de acetato de sodio anhidro evitando la formación de grumos. Una vez disuelto adicionar con una pipeta automática 5.2 mL de solución de NaOH 50% w/w sin agitar o mezclar, aforar cuidadosamente con H₂O.

Fase móvil C:

Agua tipo 1.

Fase móvil D:

Solución 500 mM de NaOH, libre de carbonatos. Desgasificar H₂O como se indica para la fase móvil A. Agregar aproximadamente 800 mL de H₂O desgasificada en un matraz aforado de 1 L y con una pipeta automática adicionar 26.1 mL de solución de NaOH 50% w/w a la solución sin agitar o mezclar, aforar cuidadosamente con H₂O. Continuar desgasificando la solución en el baño ultrasónico durante 30 minutos más antes de utilizarla.

Nota: Todas las soluciones móviles deberán de ser filtradas a través de un filtro de 0.22 µm después de ser aforadas.

Es de suma importancia evitar la carbonatación de las fases móviles por absorción del CO₂ atmosférico. Para evitar esto, los eluentes se deben de mantener bajo atmosfera de helio, o de manera alternativa, se pueden aplicar filtros de decarbonización en la parte superior de las botellas de eluente. Preparación del filtro: tomar una jeringa de 30 ml y remover el pistón, rellenar la jeringa con capas de algodón o lana de vidrio, (sulfato de calcio anhidro) o gel de sílice, hidróxido de potasio (sólido), o gel de sílice, algodón o lana de vidrio, cerrar la boca ancha de la jeringa y perforarlo para permitir la entrada de aire.

7. Purificación y preparación de las enzimas

Fructanasa. Disolver 5 mg (2750 U exo-inulinasa y 90 U endo-inulinasa) en 500 µL de H₂O en un tubo de reacción de 2 ml y transferir a una unidad de ultrafiltración. Centrifugar durante 8 minutos a 13 000 rpm y remueva el filtrado, llene nuevamente la unidad de ultrafiltración con 500 µL de H₂O, mezcle cuidadosamente la solución y centrifugue otra vez, repita el proceso de lavado cuatro veces. Una vez finalizado el lavado, mezcle la solución de enzima purificada con 500 µL de H₂O, transfírela a un tubo de reacción y llene hasta 2 mL (1400 U exo-inulinasa y 45 U endoinulinasa por mililitro). Alicuotar dependiendo de los volúmenes a utilizar y almacenar a -20°C. **Amiloglucosidasa.** Disuelva 15 mg (~550 U) en 500 µL de H₂O (en un tubo de reacción de 2 mL) y transfiera a una unidad de ultrafiltración. Centrifugue durante 8 minutos a 13,000 rpm y remueva el filtrado de la parte inferior. Llene nuevamente la unidad de ultrafiltración con 500 µL de H₂O, mezcle cuidadosamente la solución y centrifugue otra vez, repita el proceso de lavado cuatro veces. Una vez finalizado el lavado, mezcle la solución de la enzima purificada con 500 µL de H₂O, transfírela a un tubo de reacción y llene hasta 2 mL (270 U/mL). Alicuotar dependiendo de los volúmenes a utilizar y almacenar a -20°C.

8. Soluciones estándar de azúcares y alcoholes de azúcares

Secar la glucosa, fructosa y sacarosa en un horno al vacío durante 24 horas a 55 ± 3°C. (Nota: no seque el sorbitol y el manitol). Prepare series adecuadas de estándares en las concentraciones correctas para el análisis. Aplique diferentes rangos de concentraciones para glucosa y fructosa y compruebe la linealidad de la curva de calibración para ambos azúcares.

Nota: La fructosa diluida en una solución acuosa es más inestable que la glucosa. Controle las soluciones estándar y muestras para una eventual pérdida de concentración de fructosa. Almacenar todas las soluciones estándar y muestras a 4°C. Preparar soluciones diluidas frescas y evitar que las muestras permanezcan mucho tiempo en el automuestreador antes de ser analizadas.

Las soluciones estándar para la calibración pueden ser preparadas siguiendo estas instrucciones:

Preparación de la solución stock: Pesar en la relación correcta (composición aproximada del jarabe a analizar) la fructosa, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol y HMF. Disolver en aproximadamente 50 ml en un matraz aforado de 100 ml. Una vez disuelto, aforar a los 100 ml. En el ejemplo se pesaron exactamente: 5.8 mg de sorbitol, 6.7 mg de manitol, 16.4 mg de HMF, 20.0 mg de glucosa, 186.3 mg de fructosa y 5.7 mg de sacarosa en 100 mL.

A1	Jarabe de agave	600µL solución stock	1400 µL H2O1	Puro
A2	Jarabe de agave	600µL solución stock	40 µL Amiloglucosidasa +1360 µL H2O2	AG
A3	Jarabe de agave	600µL solución stock	40 µL Fructanasa + 1360 µL H2O2	FN
A4	Jarabe de agave	600µL solución stock	40 µL Amiloglucosidasa +40 µL Fructanasa + 1320µL H2O2	AG+ FN
B1	Blanco amiloglucosidasa	600µL H2O	40 µL Amiloglucosidasa +1360 µL H2O2	BA
B2	Blanco fructanasa	600µL H2O	40 µL Fructanasa + 1360 µL H2O2	BF

Diluir la solución stock a varios niveles para obtener de 4 a 5 soluciones estándares para su análisis y construcción de la curva de calibración.

9. Preparación de muestras de Jarabe de Agave

Tabla 1: Diluciones de Jarabe de Agave para hidrólisis enzimática.

Se debe pesar con exactitud 250 mg de Jarabe de Agave (± 0.01 mg) en una botella de plástico de 100 mL, añada 50 mL de H2O y disuelva completamente. A partir de esta solución stock prepare las siguientes muestras para hidrólisis enzimática en tubos de reacción de 2 mL utilizando el rack para tubos:

A) Sin tratamiento enzimático;

B) después del tratamiento enzimático

Cerrar los tubos de reacción y agite durante 15 segundos en el agitador tipo Vortex. Colocar los tubos de reacción A2, A3, A4, B1, B2 (el control de la enzima es necesario únicamente después de cada nueva preparación de la misma, la ausencia de azúcares en el perfil confirma la purificación óptima en la preparación de la enzima) en el calentador eléctrico con agitación y lleve a 45°C durante 30 minutos agitando a 300 rpm. A continuación aumentar la temperatura hasta 80°C y mantener por 20 minutos con agitación continua de 300 rpm (para detener la hidrólisis). Posteriormente enfriar los tubos a temperatura ambiente en el rack, abrir los tubos y llenar con H2O hasta 2 mL. Cerrar los tubos nuevamente y mezclar en agitador tipo Vortex (15 segundos) para obtener una muestra que se encuentre en condiciones óptimas.

Posteriormente llenar para cada una de las muestras una jeringa de 1 mL con las soluciones de las muestras (A1, A2, A3, A4, B1, B2), colocar un filtro para jeringa (Tamaño de poro 0.45 µm, 13 mm o equivalente) y filtrar la solución en un vial adecuado para el automuestreador (1.5 mL), cerrar el vial y colocar en la posición adecuada de la bandeja del automuestreador para su análisis. Filtrar el resto de las soluciones de las muestras en nuevos tubos de reacción de 2 mL para las diluciones adicionales. Utilizar para cada muestra una jeringa y filtro para jeringa nuevos.

A5	Contenido de glucosa	200µL muestra A1	800 µL H2O	Dilución 1:5
A6	Contenido de glucosa después de tratamiento con AG	200µL muestra A3	800 µL H2O	Dilución 1:5
A7*	Contenido de fructosa y glucosa	100µL muestra A1	1900 µL H2O	Dilución 1:20
A8*	Contenido de fructosa y glucosa después de tratamiento con FN	100µL muestra A2	1900 µL H2O	Dilución 1:20

Tomar diferentes diluciones para el análisis del contenido de glucosa (glc) y fructosa (fru) en jarabe de agave puro y después de hidrólisis enzimática (con amiloglucosidasa y fructanasa)

Tabla 2: Diluciones para la determinación de glucosa y fructosa.

* La concentración de la fructosa debe de estar entre 10 y 150 µg/ml

Llenar con las muestras A5 a A8 sus respectivos viales (1.5 mL) filtrando las soluciones, cerrar los viales y colocarlos en la posición adecuada de la bandeja del automuestreador para su análisis.

10. Procedimiento

Método 1. Adulteración y cuantificación de azúcares.

Condiciones del cromatógrafo (HPAEC): temperatura de columna, $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$; velocidad de flujo, 1.0 mL/min; volumen de inyección, 10 μL ; sensibilidad del detector, rango análogo 1-3 μC .

Tabla 3: Gradiente de concentración de eluentes para el análisis del perfil del jarabe de agave y determinación del contenido de sorbitol, manitol, glucosa, fructosa, difructosa y sacarosa PA1 (columna y precolumna).

Tiempo, min	% fase móvil			
	A	B	C	D
	200 mM NaOH	200 mM NaOH +700 mM NaAc	Agua	500 mM NaOH
-20	Equilibrio			
-20	50	0	50	0
-10	50		50	
-9.9	50	1	49	0
0	corrida			
6	50	1	49	0
12	50	4	46	0
30	50	20	30	0
40	50	40	10	0
40.1	100	0	0	0
50	Fin corrida			

NOTA: Ver Tabla 3 para el gradiente del eluente y Tabla 4 para el programa de tiempo del detector.

Tabla 4: Programa del tiempo del detector PAD para análisis de azúcares.

Tiempo, s	Voltaje, V
0.00	0.05
0.20	0.05
0.40	0.05
0.41	0.65
0.60	0.65
0.61	-0.10
1.00	-0.10

Método 2. Sólo cuantificación de azúcares/determinación de contenido de fructanos

De manera alternativa al método de gradiente presentado, se puede llevar a cabo la separación y cuantificación con un método isocrático utilizando NaOH 80 mM. El tiempo de corrida es de sólo 15 minutos, seguido de una limpieza por 17 minutos y un tiempo de equilibrado de 20 min, resultando en un tiempo de separación total de 52 minutos. Las curvas de calibración resultantes son similares a las del método de gradiente, y el análisis de glucosa y fructosa resulta excelente con este sistema. El tratamiento con fructanasa permite analizar el contenido de fructanos en la muestra (Ver Tabla 3).

Tabla 5. Programa para el análisis de sorbitol, manitol, HMF, glucosa, fructosa y sacarosa/difructosa con columna Carbowac PA1 con NaOH 80 mM.

Tiempo, min	% fase móvil			
	A	B	C	D
	200 mM NaOH	200 mM NaOH +700 mM NaAc	agua	500 mM NaOH
-20	Equilibrio			
-20	50	0	50	0
-10	50		50	
-9.9	40	0	60	0

0	corrida			
15	40		60	0
15.1	limpieza			
15.1	15	70	15	0
23	15	70	15	40
23.1	0	0	0	100
32	Paro de corrida			

El programa del detector PAD es idéntico al del método de gradiente (ver tabla 4).

Análisis de estándares

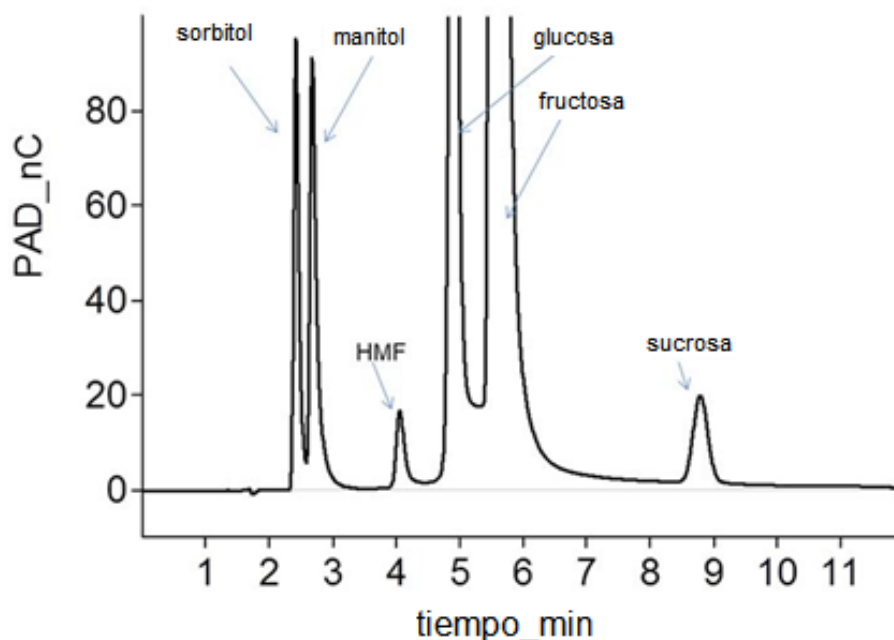
Diferentes concentraciones de la solución stock fueron analizadas considerando la respuesta lineal del detector PAD. La figura 1 muestra el perfil de la solución estándar en dilución 1:10.

Para obtener resultados precisos de las concentraciones de los azúcares aplique las soluciones estándar de los mismos por lo menos a 3 diferentes concentraciones, y de ser posible por duplicado, en cada secuencia de corridas de muestras de jarabe de agave.

Nota: Las áreas de los picos de los azúcares son fuertemente influenciadas por las condiciones de la corrida durante la separación y son muy sensibles. En general, solo la calibración externa con diferentes concentraciones de azúcares es recomendada. En este caso los factores de respuesta de los azúcares en las muestras se relacionan con la respuesta del compuesto estándar por sí mismo. El valor de coeficiente de correlación (R^2) no debe de ser menor a 0.99.

Se debe asegurar que el mismo tipo de integración se utilice tanto para muestras como para estándares. Se debe elegir el mismo ancho para los picos, y las mismas configuraciones y parámetros de integración. Se debe controlar cuidadosamente la selección de la línea base. Utilice solo el área del pico para cuantificarlo.

Fig.1 Perfil cromatográfico de soluciones estándar: glucosa (22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; tret: 5.04 min), fructosa (186.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; tret: 5.75 min), sacarosa (5.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; tret: 8.79 min), sorbitol (5.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; tret: 2.43 min), manitol (6.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; tret: 2.72 min), y HMF (16.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tret: 4.03 min); volumen de inyección: 10 μL .



11. Análisis de muestras

Para el análisis de una muestra de jarabe de agave se requieren 8 corridas de A1 a A8. Adicionalmente, 2 corridas para los blancos de las enzimas y entre 6 y 8 corridas para las soluciones estándar (sorbitol, manitol, HMF, sacarosa, glucosa y fructosa) son recomendables. Bajo estas condiciones, escriba la secuencia para el análisis y aplique el programa recomendado para la separación, ver Tabla 3. El tiempo de cada corrida es de 70 minutos y el flujo para la separación de 1 mL/min a 30°C.

Después de terminada la secuencia (alrededor de 50 corridas) limpie la columna y el detector con solución 0.5 M de NaOH durante 1 hora a un flujo de 1 mL/min. Para determinar el contenido de sorbitol, manitol, difructosa y sacarosa se pueden tomar las áreas de los picos del cromatograma del jarabe de agave puro. La calibración de estos componentes se realiza con las soluciones estándar de sorbitol, manitol HMF y difructosa/sacarosa. El contenido de difructosa puede ser calculado con la curva de calibración de sacarosa. El contenido de glucosa y fructosa es calculado correctamente solo con el área de los picos después de sus respectivas diluciones.

12. Evaluación de los resultados

Adulteración de jarabe de agave con jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS) o jarabe de maíz:

El perfil del jarabe de agave cambia en el rango de los maltooligómeros al ser eliminados por medio de hidrólisis con amiloglicosidasa. Adicionalmente, el contenido de glucosa aumenta después de la hidrólisis con amiloglicosidasa.

Adulteración con otros suplementos o el jarabe de agave es mezclado con otros compuestos extraños:

El perfil del agave no incluye los picos característicos del proceso de producción.

Contenido de fructooligómeros:

El perfil del jarabe de agave incluye el perfil de los fructooligosacáridos (FOS) y puede ser removido después de hidrólisis con fructanasa.

Contenido de fructosa, glucosa, sacarosa, manitol sorbitol y HMF.

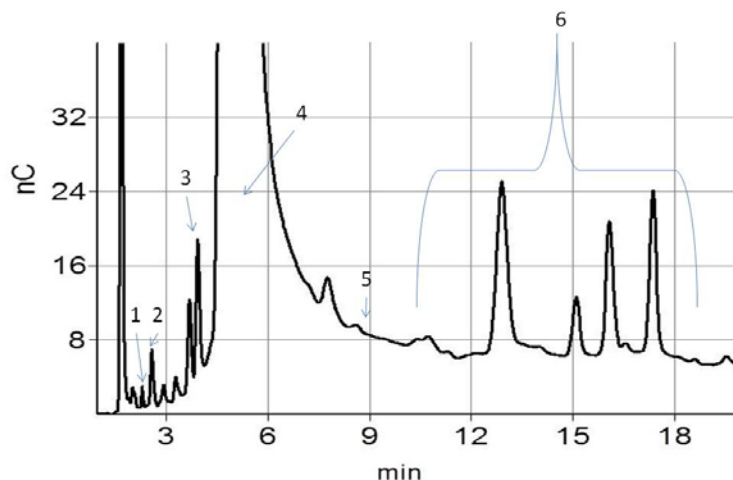
Los resultados son calculados a partir de la muestra original utilizada y sus subsecuentes diluciones después de comparar las áreas obtenidas en el análisis de la muestra contra la curva de calibración construida con las diferentes diluciones de los estándares.

Contenido de Fructanos.

Para determinar el contenido de fructanos, después de tratar con fructanasa la muestra, al contenido corregido de fructosa y glucosa (es decir, restando la fructosa, glucosa y sacarosa libre presente en el producto y aplicando el factor de corrección de 0.9 se obtiene el contenido de fructanos en la muestra

El DP promedio es calculado dividiendo el contenido de fructosa corregido entre el contenido de glucosa libre. Esto asume una molécula de glucosa por molécula de fructano.

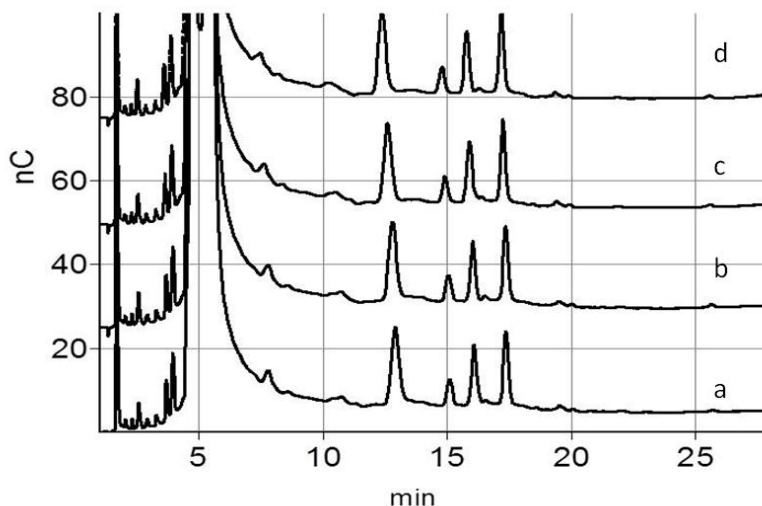
Fig. 2 Perfil del jarabe de Agave sin ningún tratamiento (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 µL; picos identificados: 1 – sorbitol, 2 – manitol, 3 – HMF (Hidroximetilfurfural), 4 – glucosa y fructosa, 5 – sacarosa/difructosa, 6 – picos sin identificar.



En este perfil, el contenido de sorbitol, manitol y HMF puede ser determinado con el área bajo el pico.

A) Jarabe antes y después de hidrólisis enzimática (muestras A1 – A4)

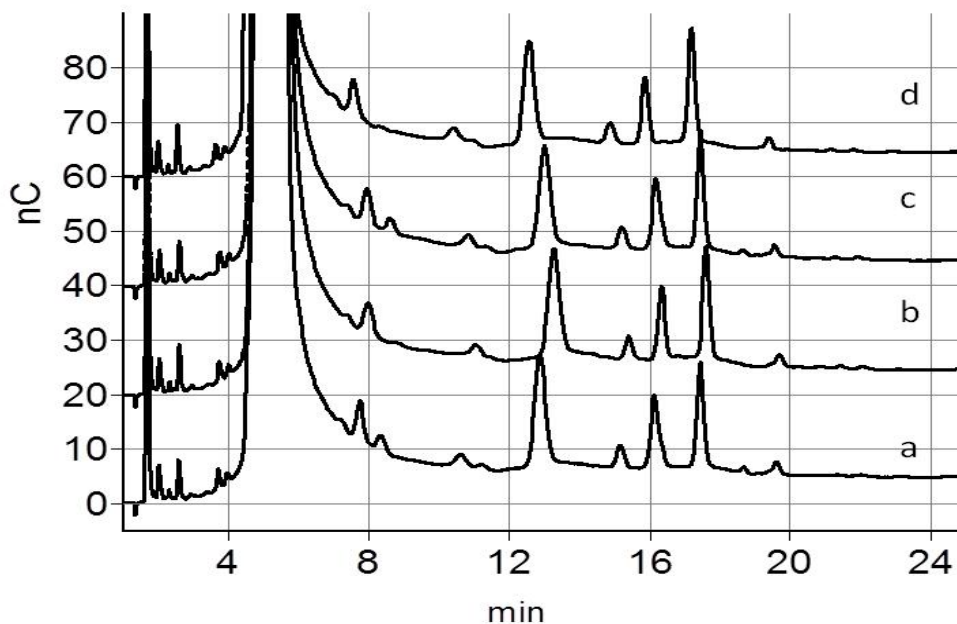
Fig. 3 Perfil de muestras de jarabe de Agave (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 μ L; a – jarabe puro (A1), b – jarabe después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – jarabe después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – jarabe después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4)



Los perfiles no muestran cambios antes y después de la hidrólisis enzimática. Este hecho permite concluir que esta muestra de jarabe de agave no incluye fructooligómeros o picos extraños ocasionados por series de maltooligómeros. Los picos característicos del perfil pueden ser únicamente debidos al proceso de producción o a componentes de la planta que no puedan ser removidos a través de la clarificación y purificación del jarabe.

B) Muestra de jarabe de Agave: antes y después de hidrólisis enzimática (muestra A1 – A4)

Fig. 4 Perfil de muestras de jarabe de Agave (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 μ L; a – jarabe puro (A1), b – jarabe después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – jarabe después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – jarabe después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4)



Los perfiles después de hidrólisis con fructanasa (b), así como fructanasa y amiloglucosidasa (d) pierden algunos picos que eran de fructooligómeros (picos significativos de difructosa, ver pico después de los 8 minutos, pico antes de los 12 minutos, pico entre los 18 y 19 minutos). Solo la hidrólisis con amiloglucosidasa presenta el mismo perfil que el puro. Esto permite concluir que este jarabe de agave incluye fructooligómeros pero no picos extraños de maltooligómeros. El otro pico puede ser originado solo por el proceso de producción o por componentes propios de la planta que no pueden ser removidos por clarificación y purificación del jarabe.

C) Jarabe de Agave Adulterado (WAS, 80% adulteración con jarabe de maíz), con la siguiente composición:

17.6 g HFCS 55% (incluye aproximadamente 0.35 (2% w/w) de maltooligómeros, principalmente isomaltotriosa e isomaltotetraosa)

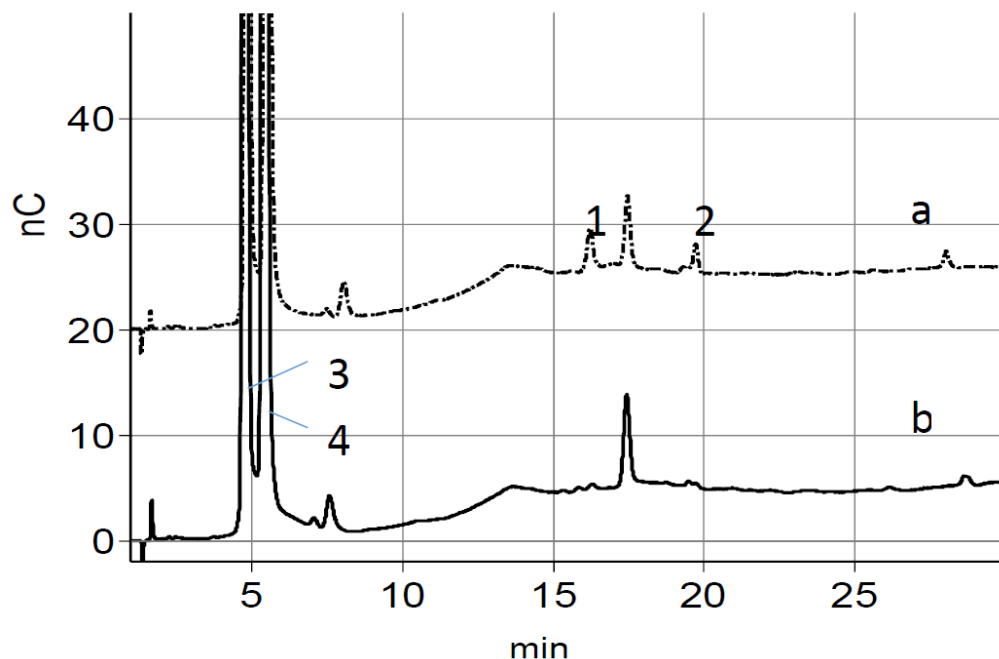
+ 62.4 g HFCS 90% (sin maltooligómeros)

+ 20 g jarabe de agave oscuro

+ 300 mg FOS

La figura 5 muestra el perfil de separación del jarabe de maíz de alta fructosa 55% (HFCS 55%) con 0.15 mg de jarabe/mL antes y después de hidrólisis con amiloglucosidasa y fructanasa. Los picos de isomaltotriosa e isomaltotetraosa pueden ser eliminados con amiloglucosidasa. Este hecho indica la posible adulteración con jarabe de maíz.

Fig. 5 Perfil del jarabe de maíz de alta fructosa 55% (HFCS 55%) (0.15 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 µL; antes y después de hidrólisis con amiloglucosidasa. 1 – isomaltotriosa, 2 – isomaltotetraosa, 3 – glucosa, 4 – fructosa.



La figura 6 muestra el perfil de una imitación de jarabe de agave (WAS) con 1.5mg de jarabe/mL. El jarabe WAS puro (7a) muestra un pequeño pico de sacarosa (pico 1) y dobles o triples picos en las posiciones 2 y 3. Después de hidrolizarlo con ambas enzimas (7d) el pico 1 desaparece y en las posiciones 2 y 3 sólo se encuentran unos picos muy pequeños. Este perfil no se ajusta al perfil del jarabe de agave certificado por lo que puede asumirse una posible adulteración con jarabe de maíz.

Esta suposición puede respaldarse con los resultados del perfil de separación después de hidrolizar solo con fructanasa (7b) y con amiloglucosidasa (7c). Después de la hidrólisis con fructanasa, el pico 1 (sacarosa) desaparece, el pico 2 se reduce a un pico de menor tamaño (parte de este pico era FOS) y el pico 3 permanece sin cambios. Después de hidrolizar con amiloglucosidasa, el pico 1 no cambia, el pico 2 se reduce significativamente (parte del pico es un maltooligómero) y el pico 3 también es reducido a un pico de menor tamaño (parte del pico también es un maltooligómero).

Para una mejor apreciación de los picos 2 y 3 la figura 7 muestra estos picos en detalle.

Fig. 6 Perfil de la imitación de jarabe de Agave (WAS, 80% adulterado con jarabe de maíz) (1.5 mg de jarabe/mL); volumen de inyección 10 μ L; a – WAS puro (A1), b – WAS después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – WAS después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – WAS después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4).

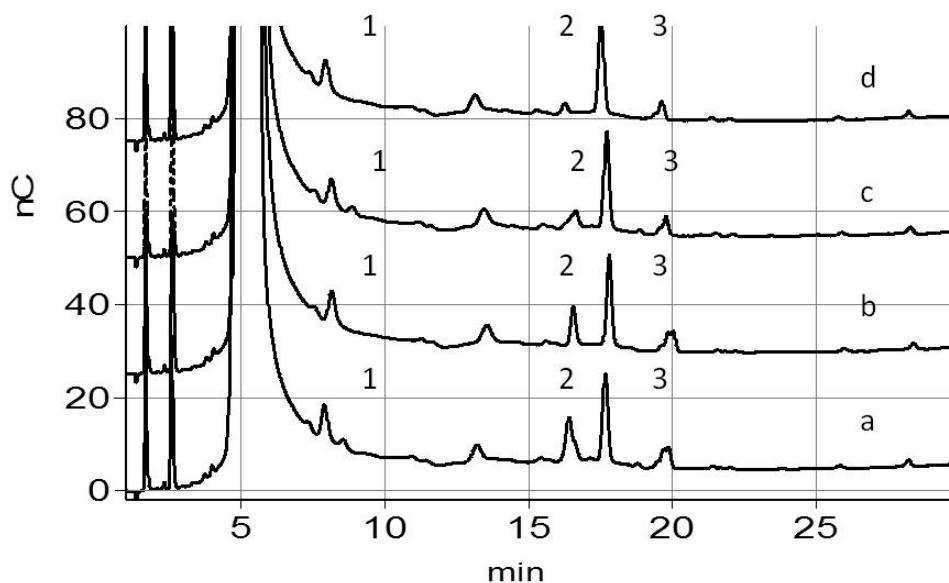
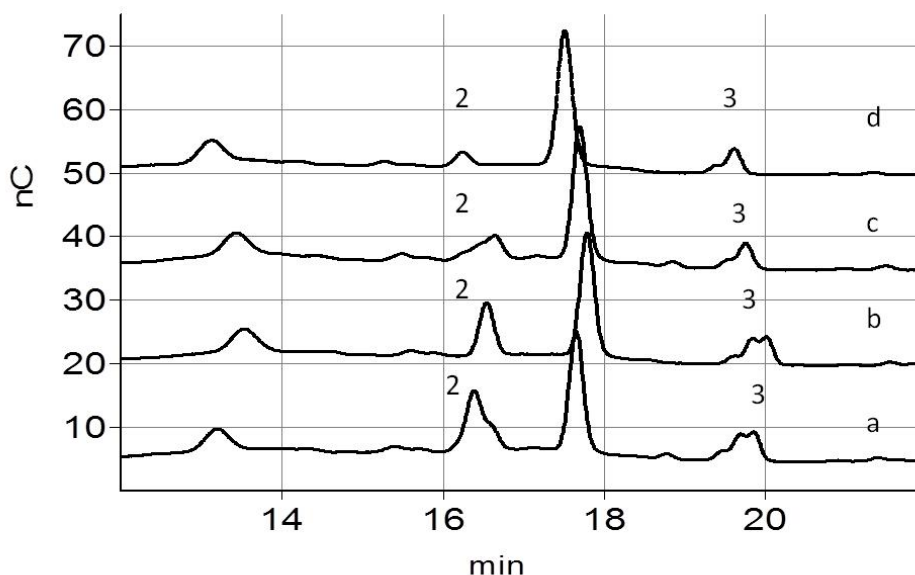


Fig. 7 Perfil de la imitación jarabe de Agave (WAS, 80% adulterado con jarabe de maíz) (1.5 mg de jarabe/mL); rango entre 12 y 22 minutos de separación; volumen de inyección 10 μ L; a – WAS puro (A1), b – WAS después de hidrólisis con fructanasa (A2), c – WAS después de hidrólisis con amiloglucosidasa (A3), d – WAS después de hidrólisis con fructanasa y amiloglucosidasa (A4).



En la Figura 7 el detalle del pico 2 muestra un doble pico en la inyección con jarabe puro (8a), con fructanasa solo se percibe un pico (8b), con amiloglucosidasa el pico dominante puede ser removido (8c) solo queda presente la parte de FOS; con ambas enzimas sólo un pequeño pico se mantiene visible. El detalle del pico 3 muestra en la inyección de jarabe puro un pico triple, el cual no puede ser removido con fructanasa, solo con amiloglucosidasa es posible remover el pico intermedio. Ambos picos, que pudieron ser removidos por la amiloglucosidasa eran los maltooligómeros provenientes del HFCS 55% y confirma la adulteración con el mismo.

APÉNDICE B**MÉTODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LOS FRUCTANOS DE AGAVE****1. Introducción**

La humedad es un parámetro crítico de calidad agroalimentaria en los Fructanos de agave.

El método estándar para la determinación de humedad en este producto es la titulación Karl Fisher, una reacción rápida y específica para la determinación de agua.

2. Objetivo y campo de aplicación

Fructanos de agave, tanto en polvo como en líquido.

3. Principio/fundamento

La muestra se debe disolver en una mezcla de metanol y formamida anhidros. La formamida ayuda a solubilizar los carbohidratos. La solución es titulada en un titulador volumétrico Karl Fisher, y el punto de vire es detectado eléctricamente.

4. Equipos y materiales

Jeringas desechables de 1 ml

Probetas de vidrio, capacidad 20 y 50 ml

Balanza analítica, sensibilidad de 0.01 mg

Titulador Karl Fisher volumétrico con bureta de 5 ml

Horno de vacío. Con capacidad de mantener $55 \pm 3^\circ\text{C}$

5. Preparación de la muestra y reactivos

Reactivos

Metanol anhidro ($<0.01\% \text{H}_2\text{O}$)

Formamida anhidra ($<0.02\% \text{H}_2\text{O}$)

Tartrato de sodio dihidratado. Secar por 12 horas en horno a vacío a 150°C y guardar en desecador

Reactivo Karl Fisher (RKF). Reactivo de un componente, con título de 5 mg $\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$ reactivo

6. Procedimiento

Se debe mezclar el metanol y la formamida en proporción 1:1. Añadir a la cámara de titulación y titular a sequedad con el reactivo KF. Típicamente se requieren 20 ml de mezcla, pero el volumen depende de la configuración e instrucciones de cada titulador en específico.

Se debe verificar el título del reactivo KF utilizando el tartrato de sodio dihidratado como estándar. Este contiene exactamente 15.66% de humedad. Añadir la cantidad necesaria de tartrato para utilizar de 4 a 5 ml de titulante.

Se debe añadir la cantidad necesaria de muestra a analizar a la cámara y titular.

Nota. En el caso de jarabes, la forma más sencilla es tomar una pequeña cantidad de muestra con la jeringa (aprox 0.2 ml), tarar la jeringa y añadir una pequeña gota del jarabe a la cámara. Volver a pesar la jeringa, y obtener el peso por diferencia. Añadir la cantidad de muestra necesaria para gastar entre 4 y 5 ml de titulante.

7. Evaluación de los resultados

$$\begin{aligned} \text{Título reactivo KF (} \text{mg H}_2\text{O} / \text{ml RKF} \text{)} \\ = \frac{\text{peso tartrato (mg)} \times \text{Humedad del tartrato (\%)}}{\text{volumen reactivo KF (ml)} \times 100} \end{aligned}$$

$$\text{Humedad de la muestra (\%)} = \frac{\text{volumen RKF (ml)} \times \text{Título RKF} \times 100}{\text{peso muestra (mg)}}$$

APÉNDICE C**MÉTODO DE PRUEBA PARA EL ANÁLISIS DE LOS ENLACES
GLUCÓSIDOS PRESENTES EN LOS FRUCTANOS DE AGAVE****1. Introducción**

Los fructanos de agave son polímeros de fructosa con una posible glucosa intermedia y varios sitios de ramificación. Es decir, cuentan con enlaces glucósidos tipo $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$. En productos terminados, por hidrólisis parcial durante el proceso puede haber fragmentos de estos. El análisis de los enlaces permite saber si una muestra de fructanos de agave ha sido adulterada con fructanos tipo inulina.

2. Objetivo y campo de aplicación

El presente método es utilizado para la detección de adulterantes en los fructanos de agave, así como para conocer su estructura promedio.

3. Principio/fundamento

Para determinar la estructura y tipos de enlaces presentes en una muestra de fructanos, el análisis por metilación, en combinación con cromatografía de líquidos-gases (GLC) acoplada a detección por ionización de flama o espectrometría de masas es un excelente método.

Los fructanos son O-permetilados, y la subsecuente escisión en condiciones reductivas del polímero, seguida de la acetilación de los resultantes grupos hidroxilo libres, resulta en diferentes derivados del anhidroalditol según su posición original en el polímero.

4. Equipos y materiales

4.1 Cromatógrafo de líquidos-gases acoplado a detector de ionización de flama (FID) o por espectrometría de masas (MS), incluyendo automuestreador.

4.2 Columna cromatográfica. Fase estacionaria (14%-cianopropil-fenil) metilpolisiloxano. Longitud 30 m, espesor de capa 0.25 μm , diámetro 0.25 mm.

4.3 Balanza analítica. Sensibilidad de 0.01 mg.

4.4 Horno de vacío. Con capacidad de mantener $55 \pm 3^\circ\text{C}$.

4.5 Tubos de reacción de vidrio, con tapa roscada y sello de PTFE.

4.6 Desecador. Con SiO_2 , o desecante equivalente. Secar el desecante cada 2 semanas dejándolo 8 horas a 130°C en el horno a vacío.

4.7 Pipetas pasteur de vidrio, punta larga.

4.8 Agitador magnético y barras de agitación adecuadas para los tubos y vasos de reacción.

4.9 Tubos cónicos de plástico para reacción (Tubos Safe-Lock).- 2.0 mL (Tubos Eppendorf No. 0030 120.094 para microcentrífuga) o equivalentes.

4.10 Racks para tubos cónicos de plástico para reacción.- Adecuado para los tubos Eppendorf.

4.11 Agitador tipo Vortex.

4.12 Micropipetas automáticas de volumen variable: incluyendo volúmenes de 500 a 5000 μL , 500 a 2500 μL , 200 a 1000 μL , 50 a 200 μL , 5 a 50 μL y 2 a 20 μL .

5. Preparación de la muestra y reactivos**5.1 Reactivos**

5.1.1 Dimetilsulfóxido.

5.1.2 Hidróxido de sodio granulado

5.1.3 Yoduro de metilo

5.1.4 Cloroformo

5.1.5 Cloruro de metileno

5.1.6 Sulfato de sodio

5.1.7 Tamices moleculares, 4Å, para secado de solventes

5.1.8 Bicarbonato de sodio

Todos grado ACS y con la menor cantidad de humedad posible.

6. Preparación de los reactivos

Todos los solventes deberán de ser manejados en condiciones libres de humedad. De ser necesario, secar los solventes con los tamices moleculares para asegurar la sequedad de los reactivos.

7. Preparación de muestras

Secar en el horno de vacío a 55°C y 10-20 mbar por 12 horas las muestras antes de ser analizadas.

8. Procedimiento

8.1 Metilación

Disolver 5 mg de muestra una vez secas (este paso es sumamente importante) en 0.5 ml de dimetilsulfóxido. Ya disueltas, alcalinizar con 20 mg de hidróxido de sodio en polvo y seco y agitar por 15 minutos o hasta que el NaOH quede casi disuelto. Añadir 0.5 ml más de dimetilsulfóxido. Si la solución es amarillenta o café, significa que las muestras o solventes no estaban lo suficientemente secos. Metilar añadiendo 0.5 ml de yoduro de metilo y agitar a temperatura ambiente de 4 a 6 horas. Añadir 0.2 ml más de yoduro de metilo y dejar agitando durante la noche. Agregar 5 ml de agua para detener la reacción. Añadir 1 ml de cloruro de metileno. Agitar muy bien por 5 minutos, centrifugar y tomar la fase orgánica y secar añadiendo una pequeña cantidad (aproximadamente 1/4 del volumen de fase orgánica presente) sulfato de sodio seco.

Como nota final, en necesario recalcar que para que la reacción se lleve a cabo la reacción debe de llevarse en condiciones absolutamente anhidras.

8.2 Ruptura reductiva

Tomar 0.25 ml de la solución de polisacáridos metilados y añadir en el siguiente orden: 0.036 ml de trimetilsilano como agente reductor, 0.020 ml de trimetilsililtrifluorometanosulfonato como catalizador y agitar por lo menos 7 horas, o de preferencia toda una noche. Añadir 0.050 ml de anhídrido acético. Agitar por 3 horas a temperatura ambiente. Neutralizar con 5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio separar la fase orgánica, lavar dos veces más con agua y añadir un volumen (0.5 ml) de cloruro de metilo. Finalizado este paso, secar la solución con sulfato de sodio al menos por 12 horas, al terminar este tiempo la muestra queda lista para su análisis por GLC. Al igual que la reacción anterior, las condiciones deben de ser absolutamente anhidras.

8.3 Corrida cromatográfica

Volumen de inyección: 2 µl

Programa de temperatura: 80°C inicial, incremento de 10°C/min hasta llegar a 140°C, e incremento de 4°C/min hasta llegar a 250°C

Gas acarreador: Helio, presión 1.0 - 1.2 bar

Temperatura de inyección: 230°C

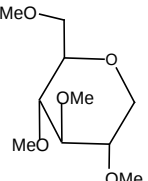
Temperatura de detección: 300°C

Se pueden correr estándares de sacarosa, 1-kestosa y fructosa junto con las muestras permetilados para corroborar que la reacción ha dado los resultados esperados, así como para conocer las posiciones relativas de cada uno de los anhidroalditoles derivados para su posterior identificación en la muestra.

9. Evaluación de los resultados

En la tabla 1 se muestran los posibles anhidroalditoles derivados resultantes de las diferentes unidades de sacáridos presentes en los fructanos de agave:

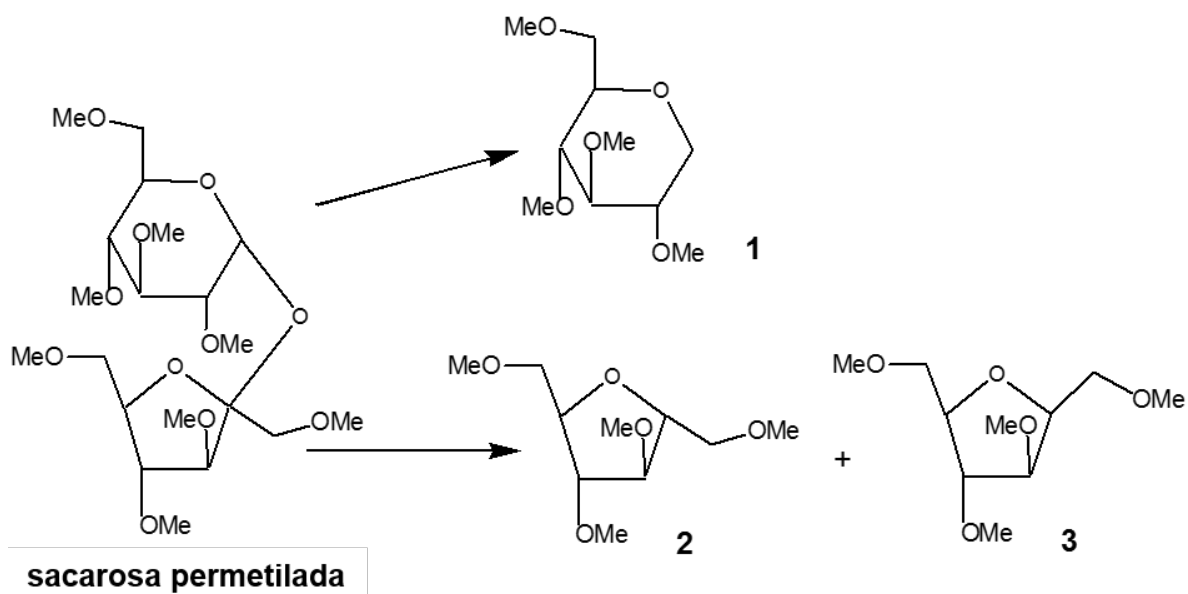
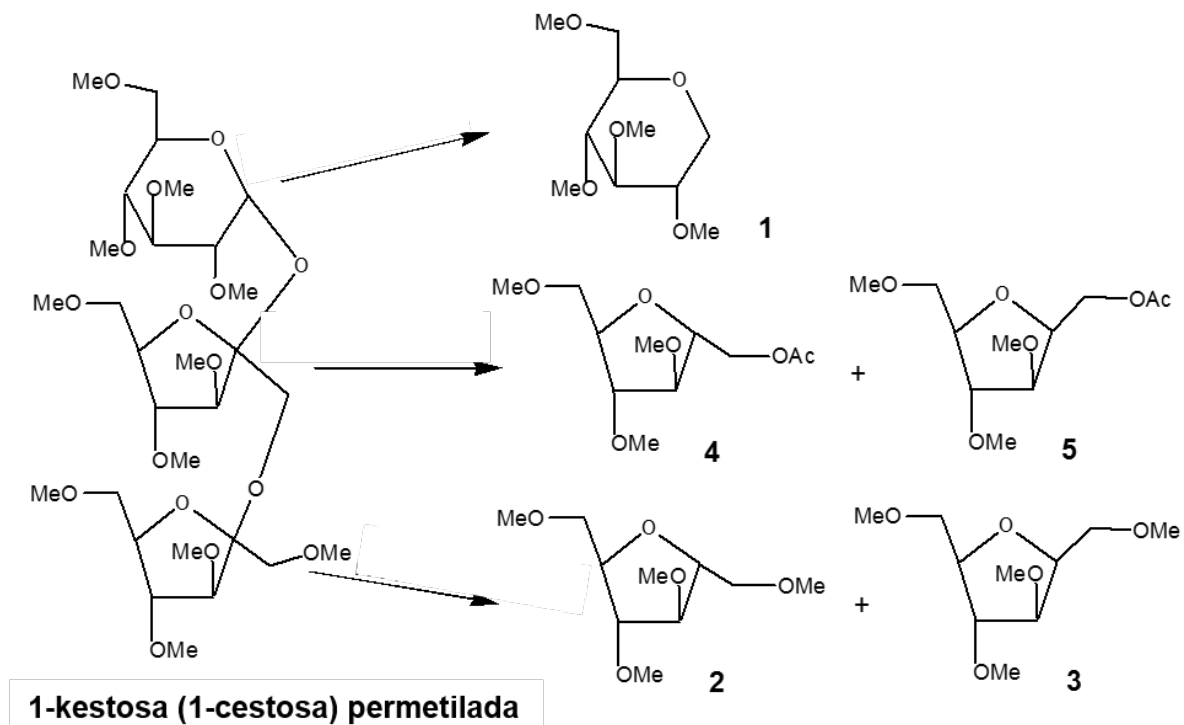
Tabla 1. Productos de la reacción de metilación y ruptura reductiva de fructanos de agave

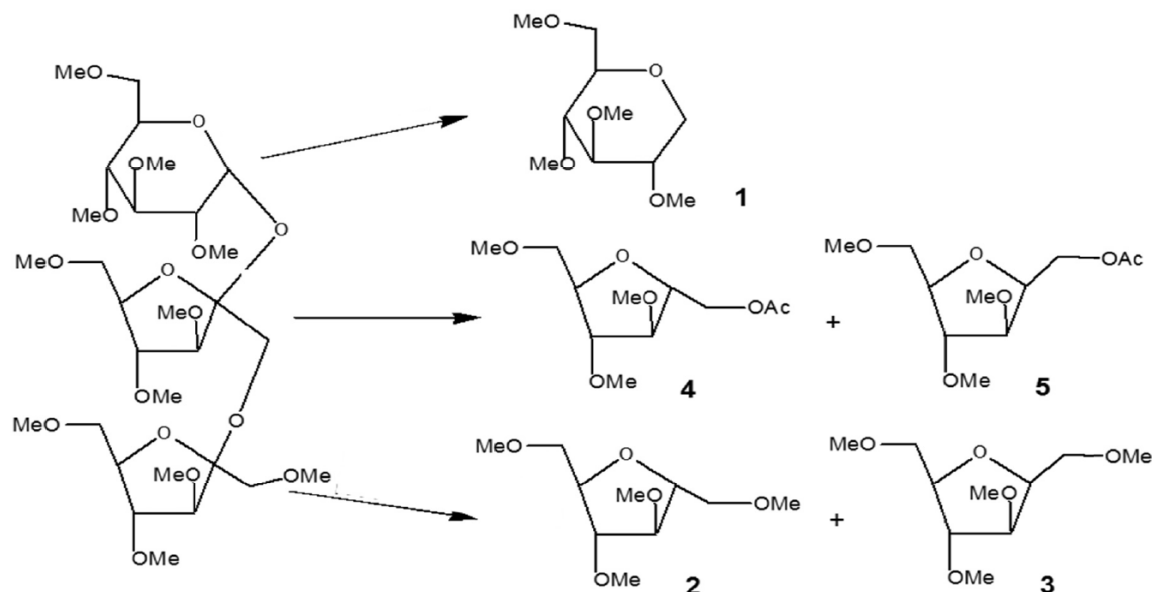
glucosa terminal 1		1,5-anhidro-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol
--------------------	---	--

fructosa terminal $\forall$ 2		2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol
fructosa terminal β 3		2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-sorbitol
glucosa enlazada 1-6 4		6-O-acetil-1,5-anhidro-2,3,4-tri-metil-D-glucitol
fructosa 2-1 $\forall$ 5		1-O-acetil-2,5-anhidro-3,4,6-tri-O-metil-D-manitol
fructosa 2-1 β 6		1-O-acetil-2,5-anhidro-3,4,6-tri-O-metil-D-sorbitol
fructosa 2-6 $\forall$ 7		6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-manitol
fructosa 2-6 β 8		6-O-acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri-O-metil-D-sorbitol
fructosa ramificada $\forall$ 9		1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-manitol
Fructosa ramificada β 10		1,6-di-O-acetil-2,5-anhidro-3,4-di-O-metil-D-sorbitol

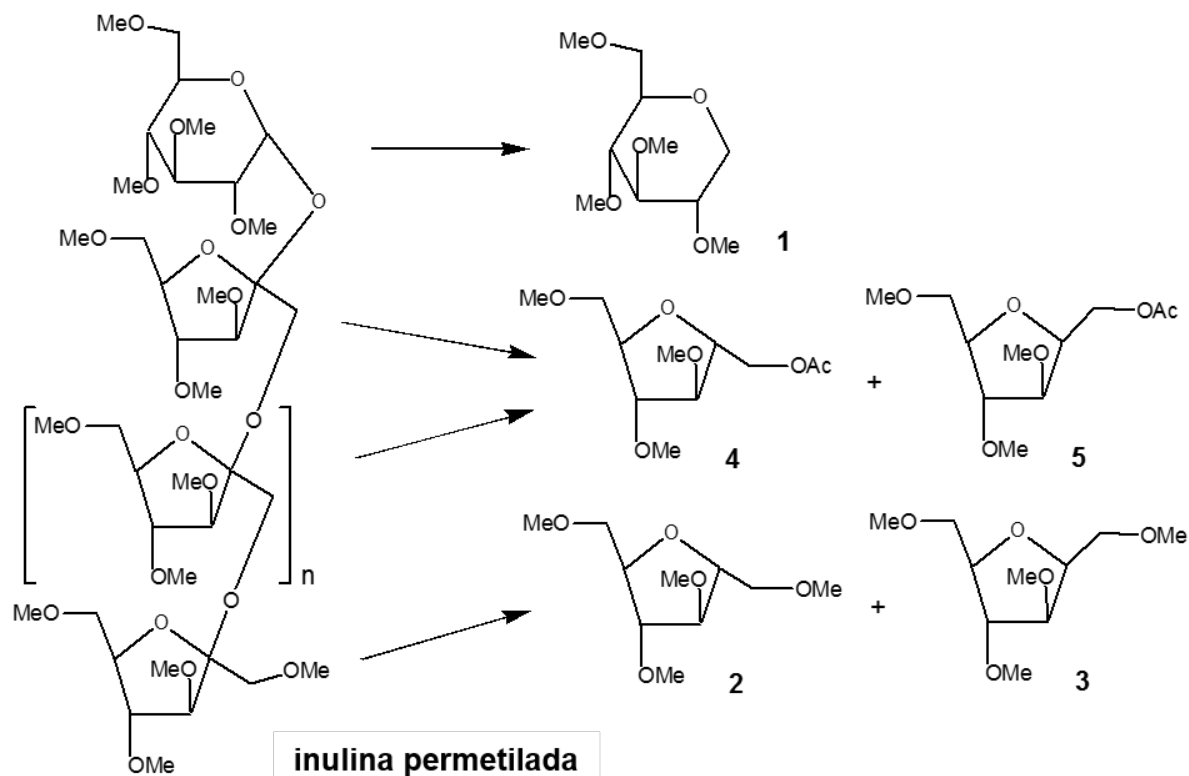
El sitio reductivo de las aldosas (i.e. glucosa) sólo genera un tipo de glucitol después de la reacción, ya que el carbono en esta posición no es quiral, mientras que las cetosas (i.e. fructosa) resultan en una molécula con un centro quiral, por lo que resultan en dos formas anómicas de glucitol.

Los siguientes esquemas muestran los resultados de la reacción en diferentes tipos de enlaces como ejemplo, utilizando la numeración de los productos de la tabla 1.

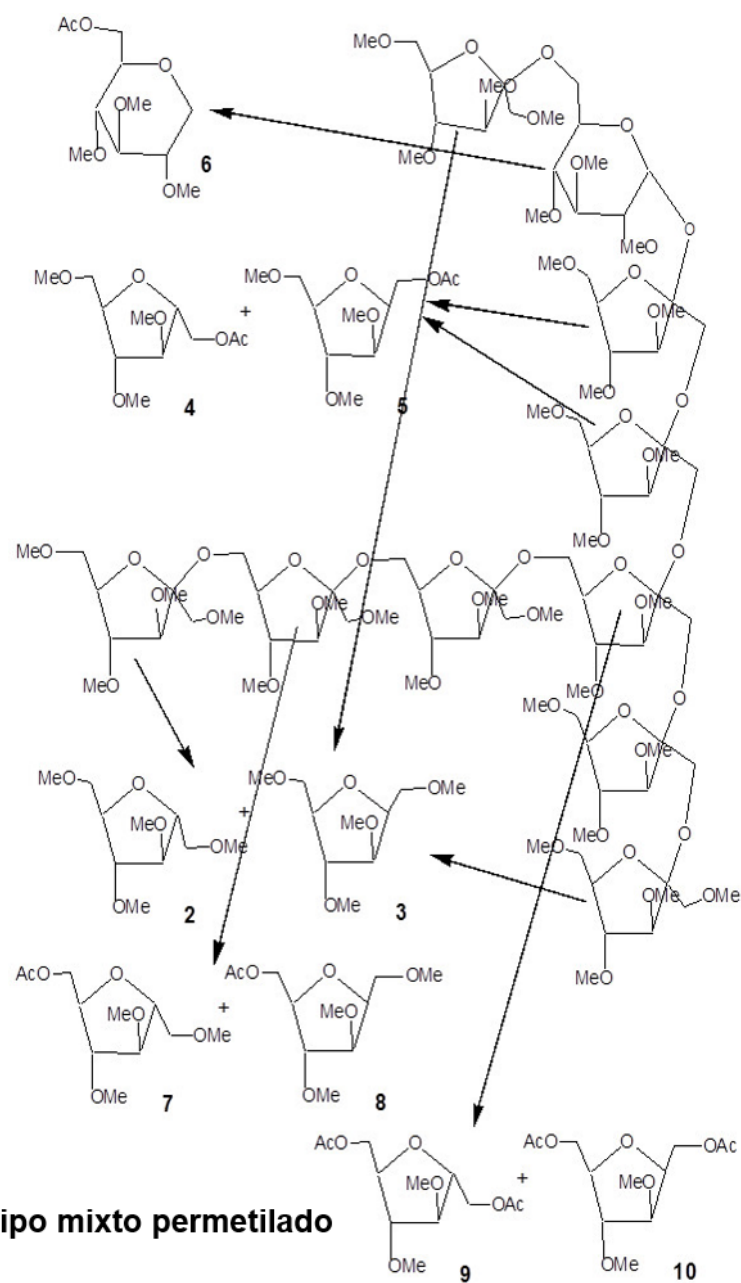
Esquema 1**Esquema 2**

Esquema 3**Esquema 4**

Con la información anterior y los resultados obtenidos del análisis de la muestra es posible entonces deducir la estructura de moléculas de fructanos más complejas es necesario recordar que los resultados obtenidos son el promedio de todos los isómeros y polímeros de fructanos presentes en la muestra. Por ejemplo, para los fructanos tipo inulina:



Fructanos de agave



APÉNDICE D

ANÁLISIS DE MASA MOLECULAR Y DISTRIBUCIÓN DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE AGAVE

1. Introducción.

La distribución de peso molecular (o alternatively grado de polimerización) es un parámetro de suma importancia en la caracterización de los fructanos de agave, pues sus propiedades tecno-funcionales (tales como viscosidad, dulzor, disminución del punto de fusión entre otras) y sus propiedades funcionales (selectividad de los microorganismos prebióticos que los utilizan como alimento) dependen de la longitud y conformación de las moléculas presentes en el fructano.

2. Objetivo y campo de aplicación.

Determinar la distribución de peso molecular o grado de polimerización de una muestra de fructanos de agave

3. Principio/fundamento.

El análisis de masa molecular de muestras de fructanos se lleva a cabo en un sistema de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). La cromatografía por exclusión de tamaño separa las moléculas al ser éstas excluidas selectivamente de una matriz porosa en base a su radio de giro hidrodinámico de giro. El sistema consiste en columnas con diferentes rangos de masas moleculares y con un detector de índice de refracción diferencial y es calibrado con estándares de peso molecular conocido y de estructura similar a la muestra a analizar. La calibración del sistema se realiza con estándares adecuados con masa molecular definida como dextranos, fructooligosacáridos, sacarosa y fructosa, lo que permite por comparación obtener la distribución de pesos moleculares de las especies presentes en la muestra. Los cálculos de masa molecular y distribución de peso molecular a partir de los perfiles por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) se realizan en un programa desarrollado específicamente (CPCWin32). El programa calcula las distribuciones de masa molecular y grado de polimerización, así como la masa molar media, masa molar promedio en número (M_n) y masa molar promedio en peso (M_w). Adicionalmente la relación de M_w/M_n muestra el índice de polidispersidad (PD, por sus siglas en inglés) de las muestras de fructanos. Estos parámetros moleculares esenciales aportan perfiles significativos para diferentes composiciones de fructanos.

En general, la masa molar promedio en número y en peso (M_n , M_w) así como su correspondiente grado de polimerización promedio en número y en peso (DP_n , DP_w) son calculadas como momentos de la distribución de masa molar.

Masa molar número promedio

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

Grado de polimerización número promedio

$$\overline{DP}_n = \frac{\sum n_i M_i / M_0}{\sum n_i}$$

Masa molar masa promedio

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

Grado de polimerización masa promedio

$$\overline{DP}_w = \frac{\sum n_i M_i^2 / M_0}{\sum n_i M_i / M_0}$$

Índice de polidispersidad (PD)

$$PD = \bar{M}_w / \bar{M}_n = \overline{DP}_w / \overline{DP}_n$$

4. Equipos y materiales.

4.1 Sistema de Cromatografía de líquidos de alto desempeño - Cromatografía de exclusión de tamaño (HPLC – SEC).

4.2 Bomba isocrática

4.3 Automuestreador capaz de inyectar 100 µl

4.4 Módulo desgasificador de eluente (opcional)

4.5 Detector de masa (detector de Índice de Refracción Diferencial (DRI por sus siglas en inglés)

4.6 Software de adquisición de datos (Codawin32) o sistema equivalente.

4.7 Software para análisis de SEC. CPCWin32.

4.8 Sistema de columnas SEC.

4.9 1 guarda-columna empacada con Toyopearl HW 40S. (150 x 10 mm d.i.)

4.10 1 columna analítica empacada con Superose 12 (300 x 10 mm d.i.)

4.11 2 columnas analíticas empacadas con Toyopearl HW 40S (300 x 10 mm d.i)

4.12 Balanza analítica. Sensibilidad de 0.01 mg.

4.13 Tubos para reacción. 1.5 mL con fondo cónico

4.14 (Tubos Eppendorf de polipropileno para microcentrífuga o equivalentes)

4.15 Racks para tubos de reacción. Adecuado para tubos plásticos con fondo cónico Eppendorf de 2 mL o equivalente.

4.16 Agitador tipo Vortex.

4.17 Botella con tapa roscada. Capacidad de 4 L para eluente.

4.18 Matraz aforado. Capacidad de 4 L para preparación de eluente.

4.19 Vaso de precipitado de vidrio. Capacidad de 500 mL.

4.20 Agitador magnético y barras de agitación de diferentes tamaños.

4.21 Baño ultrasónico.

4.22 Agitador tipo Vortex.

4.23 Micropipetas automáticas de volumen variable: incluyendo volúmenes de 500 a 5000 µL, 500 a 2500 µL, 200 a 1000 µL, 50 a 200 µL, 5 a 50 µL y 2 a 20 µL.

4.24 Filtro para jeringa. Tamaño del poro de 0.2 ó 0.45 µm, Nylon (Millipore Millex HN, 13 mm, 0.45 µm, SLHNX13NL) o similar

4.25 Jeringas. Punta Luer Lock, capacidad de 1 mL, de plástico.

4.26 Equipo de filtrado al vacío. Millipore o equivalente, diámetro de 48 mm y capacidad del recipiente y embudo de 1 l.

4.27 Filtro de nylon o de acetato de celulosa. 48 mm de diámetro, 0.45 µm. Millipore o equivalente.

4.28 Preparación de la muestra y reactivos

5. Reactivos.

5.1 Agua. ASTM Tipo 1 o equivalente.

5.2 Agente bacteriostático. Azida de sodio (preferido) o timerosal

5.3 Cloruro de sodio. Grado reactivo.

5.4 Fructosa. Cristalina, grado reactivo.

5.5 1-Kestosa. Cristalina, grado reactivo.

5.6 Kit de estándares de Dextrano para GPC Pharmacosmos. (incluyendo dextrano 1, 5, 50 y 150)

5.7 Resina Toyopearl HW 40S.

5.8 Eluente

Preparar solución 0.05 M de NaCl con 0.01% de conservador (Azida de sodio o equivalente). Filtrar el eluente con membrana de 0.22 μm . Degasificar con purga de helio por 40 min, o colocando la solución en el baño ultrasónico a 80°C por 1 h.

6. Empacado de las columnas.

Empaque de columna Tricorn – 300 x 10 mm diámetro interno. Volumen total de columna: 20 mL aproximadamente.

7. Preparación del gel.

Se deben tomar 50 mL de resina Toyopearl HW 40 S (30 μm) en una probeta graduada de 250 mL o en un vaso de precipitado del mismo volumen, agregue 100 mL de agua destilada y se debe suspender la resina agitando cuidadosamente la superficie. Se debe permitir que la suspensión se asiente (2 a 4 horas o durante toda la noche) y se debe remover las partículas finas del sobrenadante. Se debe ajustar la concentración de la suspensión al 50% de sólidos añadiendo agua destilada o removiendo el sobrenadante para alcanzar la consistencia del relleno de la columna.

8. Empacado de la columna.

Se debe verificar que la columna está armada antes de empezar el empaado. Después de fijar la unidad inferior con su filtro (usar el filtro grueso) a la columna Tricorn, se vierten 5 cm de agua dentro de la columna y se permite que fluya algunos segundos a través de la unidad inferior para eliminar todas las burbujas de aire. Conecte la salida de la columna y deje de 1 a 2 cm de agua en el fondo de la columna.

Se debe volver a suspender la resina para asegurar la homogeneidad.

Se debe verter cuidadosamente la suspensión de resina por la pared interna de la columna. Evite que quede atrapado aire en la suspensión de resina.

Una vez que la resina haya sido transferida a la columna, se deben enjuagar las paredes internas de la columna con agua destilada utilizando una pipeta Pasteur. Se debe colocar inmediatamente el adaptador de flujo de la columna sobre la suspensión de resina. No debe haber burbujas de aire entre el adaptador de flujo y el agua superficial.

Se debe abrir la salida de la columna y arranque la bomba. Comience lentamente con 0.5 mL/min para un mejor acomodo de la suspensión.

Después de 10 minutos se debe aumentar el flujo de la bomba a 1.0 mL/min y permita que la suspensión se asiente totalmente (hasta que el lecho de gel no cambie).

Se debe apagar la bomba y cierre la salida de la columna. Se debe abrir el adaptador de flujo y utilizando una pipeta (Pasteur), separe el sobrenadante acuoso del gel.

Se debe volver a llenar la suspensión y repita desde el paso 2 al 7 hasta que el lecho de resina se haya formado completamente. Aplique un flujo de 1.0 mL/min durante el llenado.

Se debe cambiar de agua a eluente (0.05 M NaCl con 0.01% NaN₃) hasta que ya no haya más compresión del lecho de resina por el adaptador de flujo (< 0.5 cm). Usualmente toma de 2 a 3 repeticiones hasta que el lecho esté estable. La presión de todo el sistema de columnas no deberá de ser mayor a 12 bar. De ser así, vaciar las columnas y volver a empaar.

Finalmente, se debe bajar el adaptador hacia el lecho entre 1 y 5 mm. La columna está lista para su uso.

9. Soluciones estándar.

Estándar 1. Fructosa (1 mg) – PM 180 + Dextrano 1 (3 mg) – PM 1080 (pico máximo) + Dextrano 50 (3 mg) – PM 43,500 (pico máximo) disueltos en 1 mL de eluente.

Estándar 2. 1-kestosa (1 mg) – PM 504 + Dextrano 5 (3 mg) – PM 4440 (pico máximo) + Dextrano 150 (3 mg) – PM 123,600 (pico máximo) disueltos en 1 mL de eluente

Antes de inyectar, filtre a 0.22 μm o centrifugue por 5 minutos a 13,000 rpm en una microcentrífuga y tome el sobrenadante.

10. Preparación de las muestras.

Se debe pesar 20 mg de muestra de fructanos en un tubo de reacción de 1.5 mL y disuélvalo en 1 mL de eluente. Antes de la inyección de 100 μL de muestra en el sistema SEC filtre a través de filtros para jeringas o centrifugue por 5 minutos a 13,000 rpm en una microcentrífuga.

11. Procedimiento.

11.1 Parámetros de separación cromatográfica:

Flujo de eluyente, 0.6 mL/min. Se debe estabilizar el equipo y detector por al menos 6 horas antes de inyectar muestras. Se deben escoger parámetros de detector de tal manera que la polaridad dé picos positivos y la sensibilidad del equipo sea la adecuada.

11.2 Análisis de estándares.

Se deben aplicar los diferentes estándares con diferentes masas moleculares para la calibración en las siguientes formas:

11.2.1 Estándar 1 (Fructosa, PM 180 + Dextran 1, PM 1080 + Dextran 50, PM 43,500)

11.2.2 Estándar 2 (1-kestosa, PM 504 + Dextran 5, PM 4440 + Dextran 150, PM 123,600)

11.3 Análisis de muestras

Volumen de inyección de muestra. 0.1 mL de 0.2% w/w de carbohidratos o el adecuado a que el detector dé una respuesta adecuada.

11.4 Evaluación de los resultados

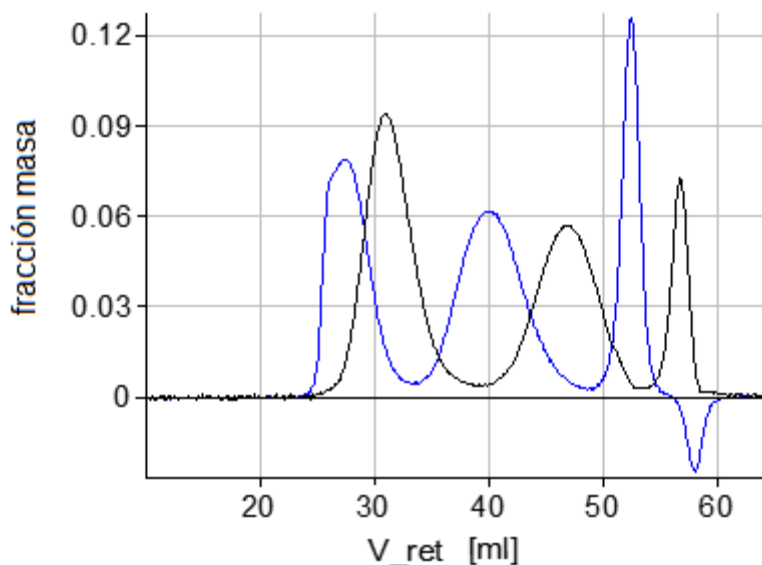
Análisis y evaluación de perfiles de Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)

Se debe calcular la distribución de masa molecular y de grado de polimerización, así como sus parámetros moleculares por medio del software CPCWin32.

11.5 Calibración del sistema SEC

Figura 1: Calibración del sistema SEC. Estándar 1: negro; Estándar 2: azul. Estándar 1: 0.9 mg Fructosa + 2.5 mg Dextran 1 (1080 Da) + 3.15 mg Dextran 50 (43500 Da), Estándar 2: 1.72 mg 1-Kestosa + 3.06 mg Dextran 5 (4440 Da) + 2.57 mg Dextran 150 (123600 Da)

Interpretación de resultados para calibración:



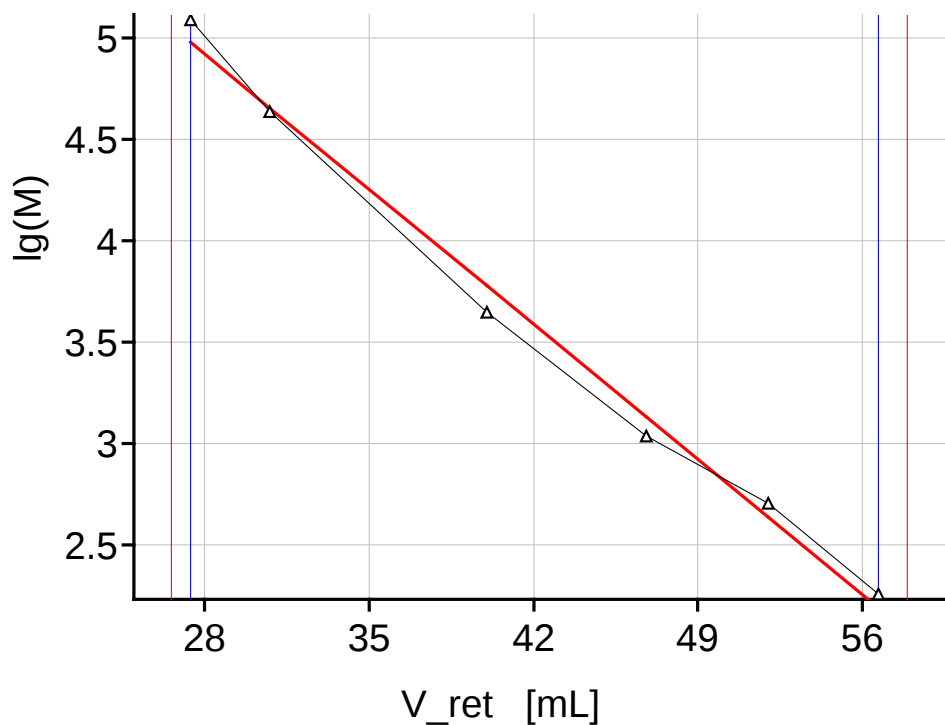
Se debe aplicar el volumen de retención en el pico máximo de los estándares y calcule en comparación al logaritmo de la masa molecular en el pico máximo (Tabla 1, Fig. 2). Estas comparaciones fueron hechas en un documento de Excel® y transferidas al software de análisis CPCWin32 para la preparación de la curva de calibración de masa molecular bajo la aplicación de un programa de ajuste lineal. Para el análisis de la distribución de masa molecular y sus parámetros moleculares, esta curva ajustada fue aplicada en los cálculos.

Tabla 1: Peso molecular y volumen de elución en el pico máximo de los estándares aplicados.

Estándar	Peso Molar (MW)	log Peso Molar (log MW)	Ve (ml)
Dextran 150	123600	5.09	27.40
Dextran 50	43500	4.64	30.8
Dextran 5	4440	3.65	40
Dextran 1	1080	3.03	46.8
1-Kestosa	504	2.70	52.3
Fructosa	180	2.26	56.7

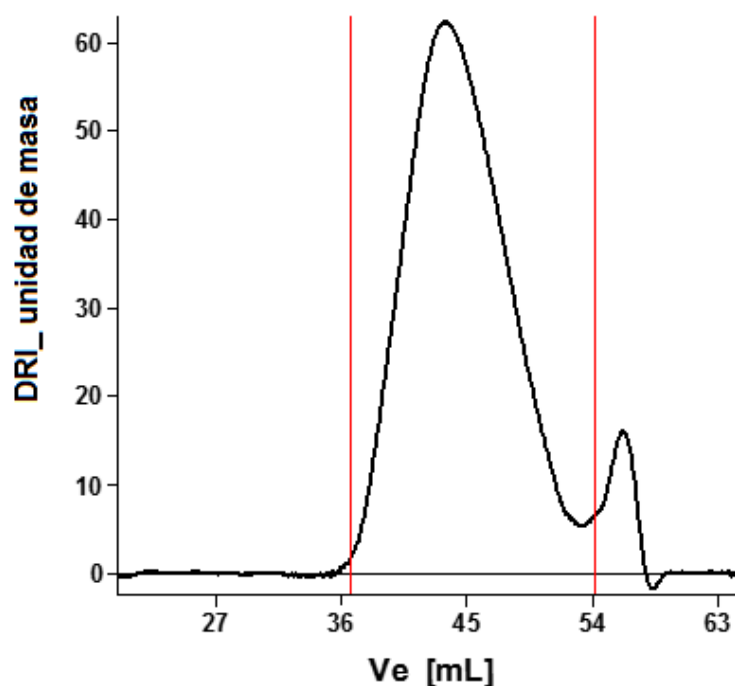
11.6 Análisis de fructanos de agave en el sistema SEC

Preparación de la muestra: 10.4 mg de fructanos de agave disueltos en 0.5 mL de eluyente, (30 segundos en agitador tipo Vortex, 5 minutos centrifugado a 13,000 rpm); inyección: 100 μ L

Figura 2: Calibración del sistema SEC con estándares 1 y 2 (puntos triangulares, valores de los picos máximos) y su curva de ajuste lineal (fit_MWV)**11.7 Análisis de fructanos de agave en el sistema SEC**

Preparación de la muestra: 10.4 mg de fructanos de agave disueltos en 0.5 mL de eluyente, (30 segundos en agitador tipo Vortex, 5 minutos centrifugado a 13,000 rpm); inyección: 100 μ L

Fig. 3: Perfil SEC de fructanos de agave en sistema SEC; rango de integración para análisis de masa molecular (líneas rojas).



Para el análisis de la distribución de masa molecular, el resultado del perfil SEC fue transformado en fracción masa con área total = 1 (ver Fig. 4). Este perfil SEC normalizado fue aplicado para la distribución de masa molecular por medio de la curva ajustada (Fig. 2) de la calibración de masa molecular. Para el análisis de la distribución de masa molecular se aplicó únicamente el rango comprendido entre las 2 líneas rojas; los mono- y disacáridos (glucosa, fructosa y sacarosa) no se incluyen (Fig. 5). Para el análisis de la distribución del grado de polimerización (dp) los valores molares se dividen entre la unidad del monómero de 162 (Fig. 6)

Fig. 4 Perfil SEC normalizado de fructanos de agave en sistema SEC. intervalo de integración para análisis de masa molecular (líneas rojas).

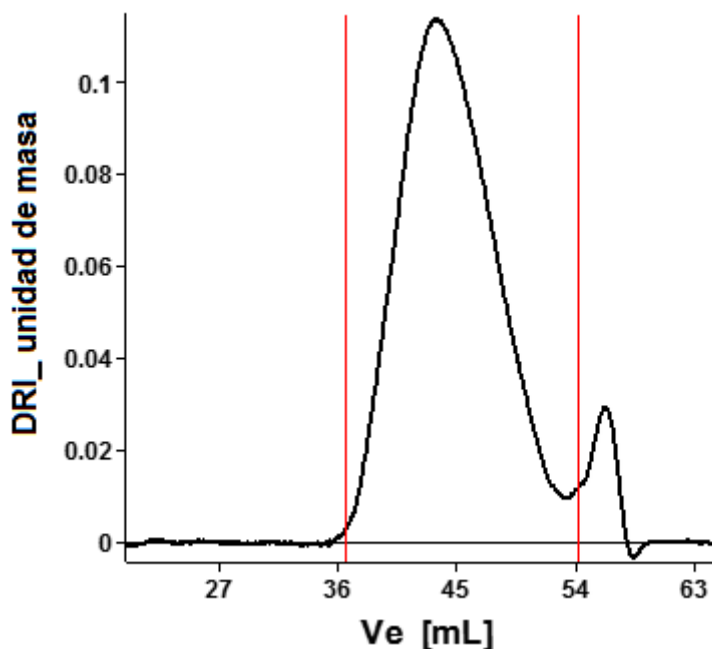


Fig. 5: Distribución de masa molecular (MW) de fructanos de agave en formato logarítmico: Parámetros moleculares calculados: $m_{Mw}=2870$ [g/mol] y $m_{Mn}=1640$ [g/mol], polidispersidad es $m_{Mw}/m_{Mn}=1.75$.

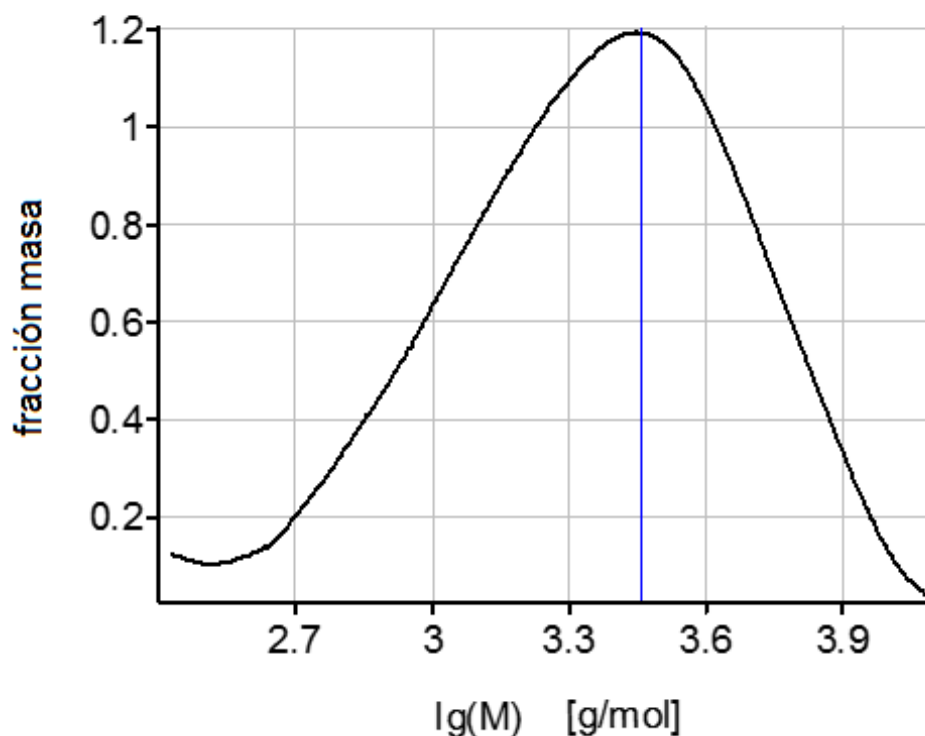


Fig. 6: Distribución del grado de polimerización (dp) de los fructanos de agave en formato logarítmico: Parámetros moleculares calculados: $m_{dpw}=18$ y $m_{dpn}=10$, polidispersidad es $m_{dpw}/m_{dpn}=1.8$.

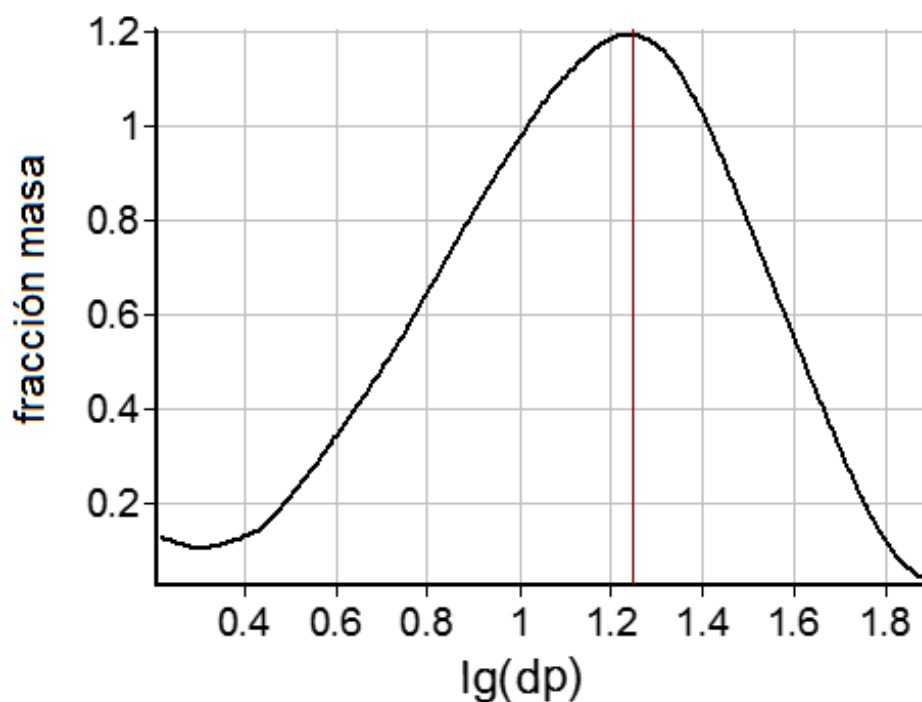
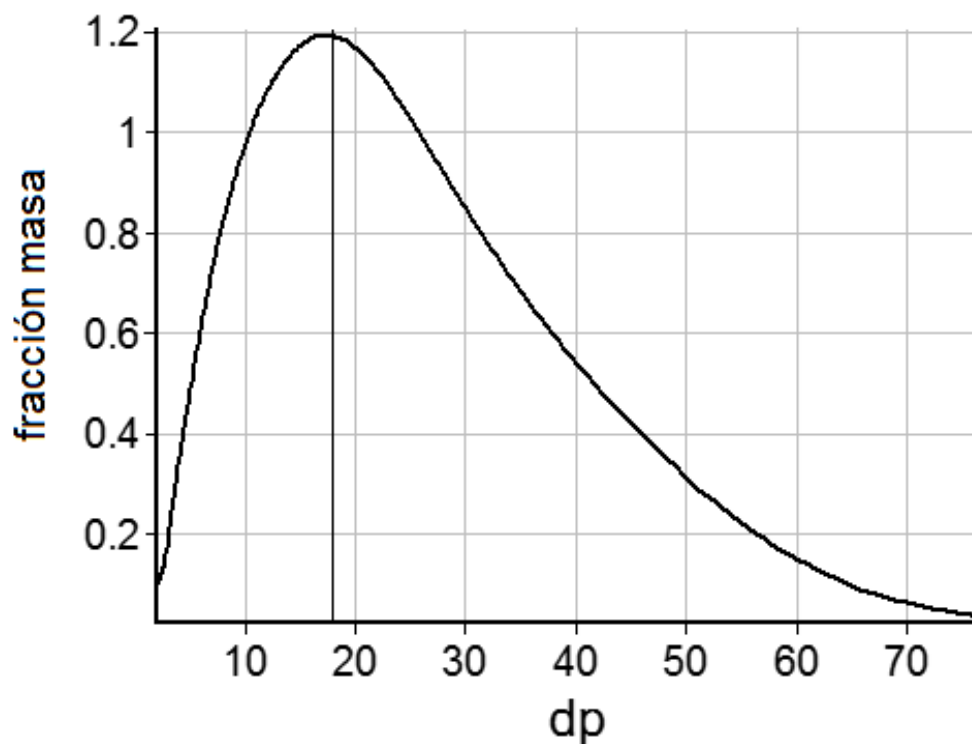


Fig. 7: Distribución del grado de polimerización (dp) de fructanos de agave en formato lineal: Parámetros moleculares calculados: $m_{dpw}=18$ y $m_{dpn}=10$, polidispersidad es $m_{(dpw/dpn)}=1.8$.



Para una mejor comprensión del perfil de polímeros de fructanos de agave, el perfil logarítmico puede transformarse a una distribución de dp lineal (fig. 7).

Adicionalmente a los parámetros moleculares, los perfiles normalizados de masa molecular y grado de polimerización (dp) permiten el cálculo del porcentaje de fructanos de agave en relación a la masa molecular y/o al rango del grado de polimerización. La Tabla 2 presenta los resultados de los fructanos de agave (ejemplo 2)

Tabla 2: Porcentaje del grado de polimerización (dp) de los componentes en la muestra de Fructanos.

Muestra	DP ≤ 10 (%w/w)	DP 10 - 20 (%w/w)	DP 20 - 100 (%w/w)
Fructano de agave	12	29	59