

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-003-SAG/GAN-2016, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

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; 40. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 38 fracciones II y IX, 40 último párrafo, 41, 43, 44, 45, 46, 47 fracción IV, 52, 62, 63, 64, 73 y 74 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1, 2 inciso B fracción XVII, 17 fracciones I, XII y XXIII, 28, 29 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

CONSIDERANDO

Que es responsabilidad del Gobierno Federal impulsar el desarrollo agropecuario, sustentado en un sector agroalimentario productivo, competitivo, rentable, sustentable y justo, que garantice la seguridad alimentaria del país.

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), establecer programas y acciones que tiendan a fomentar la productividad y la rentabilidad de las actividades económicas rurales.

Que la producción apícola es una actividad importante en el aspecto socioeconómico y ecológico, ya que se dedican más de 43 mil productores con 1.9 millones de colmenas que generan una producción anual que supera las 57 mil toneladas de miel y la obtención de diferentes productos de la colonia de abejas, permite incrementar los recursos económicos del productor, lo que beneficia en forma directa o indirecta a los integrantes de la cadena apícola, así como el incremento en la producción agrícola, debido al efecto de la polinización.

Que los propóleos son un producto apícola que brindan alternativas económicas importantes al apicultor debido a las propiedades biológicas y microbiológicas que proporcionan grandes beneficios en salud animal, inocuidad agroalimentaria y fomentan la creación de nuevos espacios en el desarrollo del mercado nacional e internacional al implementar los propóleos como materia prima.

Que en México existe un alto potencial de producción de propóleos y actualmente es limitada y de composición variable, debido a que no se cuenta con instrumentos que posibiliten estandarizar los sistemas de producción, recolección y procesamiento.

Que es necesario clasificar física, química y microbiológicamente los propóleos, debido a que sus características más importantes dependerán de aspectos productivos vinculados a la región, tipo de vegetación y temporada en que se colectan y que actualmente no se cuenta con métodos de prueba reconocidos oficialmente.

Que ante la creciente demanda de propóleos, se posibilita la adulteración o distribución de propóleos de dudosa composición, representando un riesgo para los consumidores y desprestigio para los productores apícolas, con la consecuente pérdida de dinero para el productor.

Que el fortalecimiento de los procedimientos para la producción, almacenamiento, procesamiento y comercialización de los propóleos permitirá a los apicultores obtener un producto altamente competitivo en el mercado nacional e internacional.

Que con fecha 5 de agosto de 2016, el Subcomité Especializado en Ganadería aprobó recomendar al Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación publicar el presente proyecto para fines de consulta pública en el Diario Oficial de la Federación.

Que el presente Proyecto de Norma Oficial Mexicana se publica a efecto de que los interesados, dentro de los 60 días naturales siguientes a la fecha de publicación del mismo, presenten sus comentarios ante el Subcomité Especializado en Ganadería, sito en Av. Municipio Libre 377, Col. Santa Cruz Atoyac, Del. Benito Juárez, Ciudad de México, C.P. 03310 y al correo electrónico rvazquez.dgg@sagarpa.gob.mx.

PREFACIO

Unidad Administrativa responsable de la elaboración de esta Norma:

Coordinación General de Ganadería.

En la elaboración de esta Norma Oficial Mexicana participaron los siguientes organismos e instituciones:

- Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas A.C.
- Comité Nacional Sistema Producto Apícola
- Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal.
- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- Universidad Autónoma de Campeche.

Que en razón de lo anterior 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, he tenido a bien expedir el presente:

PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-003-SAG/GAN-2016, PROPÓLEOS, PRODUCCIÓN Y ESPECIFICACIONES PARA SU PROCESAMIENTO.

ÍNDICE.

0. Introducción

1. Objetivo y campo de aplicación.
2. Referencias.
3. Definiciones.
4. Consideraciones generales
5. Especificaciones físicas, químicas y microbiológicas
6. Métodos de prueba.
7. Evaluación de la conformidad.
8. Sanciones
9. Concordancia con normas y lineamientos internacionales
10. Bibliografía.
11. Disposiciones transitorias

0. Introducción

0.1. El avance en el conocimiento y usos de los propóleos, principalmente los de tipo medicinal, han generado un incremento en su consumo a nivel nacional e internacional y por consiguiente una mayor demanda por la sociedad.

0.2. Es importante que en México se fomente la producción de propóleos mediante sistemas de producción que permitan una recolección y procesamiento de manera estandarizada para garantizar que su composición química no se altere en perjuicio de sus propiedades.

0.3. La regulación que garantice las características físicas, químicas y microbiológicas de los propóleos, beneficiará económicamente al sector apícola ya que fomentará su competitividad en el mercado nacional e internacional.

1. Objetivo y campo de aplicación.

1.1. Esta Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer las especificaciones de producción, características físicas, químicas y microbiológicas, que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su procesamiento y comercialización en el país.

1.2. Esta Norma es aplicable a las unidades económicas pecuarias dedicadas a la producción, importación, acondicionamiento y almacenamiento con fines de distribución y comercialización de propóleos y sus extractos en el territorio nacional.

1.3. La aplicación de las disposiciones contenidas en esta Norma compete a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través de la Coordinación General de Ganadería así como a las Delegaciones de la SAGARPA en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

2. Referencias.

Para la correcta aplicación y complementación de esta Norma deben consultarse las siguientes:

2.1. Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCOFI-1993, Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.

2.2. Norma Oficial Mexicana NOM-030-SCFI-1993, Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de octubre de 1993.

2.3. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI-1994, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas pre envasados, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de enero de 1996.

3. Definiciones.

Para efectos de esta Norma, se entiende por:

3.1. Acondicionamiento: Todas las operaciones necesarias para envasar, empacar y etiquetar el producto, hasta llegar a la presentación final para su conservación, almacenamiento y distribución.

3.2. Compuestos fenólicos: Son compuestos aromáticos, que junto a los flavonoides, le confieren a los propóleos sus usos y aplicaciones biológicas; los principales compuestos fenólicos de los propóleos son: ácido cafeico, ácido ferúlico, entre otros.

3.3. Constatación: Procedimiento mediante el cual la Secretaría verifica que el producto cumple con las especificaciones de composición establecidas en la presente norma

3.4. Flavonoides: Compuestos orgánicos derivados hidroxilados de la 2-fenilbenzopirán-4-ona, y sistemas reducidos en C2-C3 y/o C4 provenientes de exudados vegetales con múltiples aplicaciones.

3.5. Impurezas: Elementos ajenos a los propóleos, que han sido incorporados durante el proceso de recolección y manipulación de éste.

3.6. Materia prima: Ingrediente de cualquier origen utilizado en la elaboración de productos terminados.

3.7. Métodos promotores de cortinas de propóleos: Son todos aquellos que crean espacios entre las cámaras de cría, alzas, tapas internas de la colmena y/o en las paredes de las mismas, dichos espacios pueden ser de dos centímetros o menos y sirven para promover la acumulación de propóleos en forma de cortina para bloquear la entrada de aire o intrusos a la colmena. Entre estos métodos se encuentran los brasileños (CPI, pirassununga, bastidores, cuadros móviles, entre otros) y el Campechano de origen mexicano.

3.8. Mallas y Rejillas plásticas: Son dispositivos plásticos que presentan orificios de diferentes tamaños. Mallas y Rejillas plásticas: son dispositivos plásticos que presentan orificios de diferentes tamaños que pueden ir desde los tejidos como las mallas mosquiteros que presentan hilos de un grosor de 0.5 mm y orificios de aproximadamente 1.0 por 1.0 mm de luz y las matrizadas (que se forma por medio del prensado en un molde caliente), que son de una sola pieza y pueden presentar orificios desde 1.0 por 1.0 mm de luz y un grosor de 1.0 mm; hasta las de 2.0 por 2.0 mm de luz y un grosor de 2.0 mm, y las tipo rejilla con orificios de 2.0 mm por 5.0 cm de largo y un grosor de 2.0 mm, estas mallas y rejillas presentan una forma trapezoidal isósceles.

3.9. Propóleos en greña o en bruto: Son los propóleos obtenidos directamente de la colmena, sin ningún tipo de tratamiento.

3.10. Propóleo o propóleos: Nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante.

3.11. Secretaría: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

4. Consideraciones generales.

4.1. Producción de propóleos.

La producción de los propóleos se debe realizar por medio del uso de rejillas, mallas plásticas o métodos promotores de cortinas de propóleos en las colmenas específicas para su cosecha.

4.2. Recolección de propóleos.

La recolección debe realizarse con materiales libres de residuos de algunas sustancias que puedan contaminarlo. Durante la cosecha, no debe exponerse a los rayos del sol, evitar su almacenamiento cerca de fuentes de calor y no debe mezclarse con la cera que se encuentra en tapas o sobre los bastidores. Los propóleos en bruto contenido en las trampas se debe introducir a un congelador entre -10°C y -20°C por lo menos una hora para que la resina se torne rígida y quebradiza para que facilite su obtención. En todos los casos se debe evitar la manipulación directa y la formación de conglomerados.

5. Especificaciones físicas, químicas y microbiológicas.

5.1. Especificaciones físicas.

Características	Parámetros
Color	Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso o balsámico, dependiendo de su origen botánico.
Sabor	Variable, de suave, balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.
Consistencia	A temperatura ambiente maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.

5.2. Especificaciones químicas.

Determinación cualitativa	Parámetros
Flavonoides	Presencia
Fenoles totales	Presencia
Índice de oxidación	Máximo 22 segundos

Determinación cuantitativa	Parámetros
Compuestos fenólicos	Expresados como equivalentes de ácido gálico: mínimo 5% (m/m)
Flavonoides	Expresados como equivalentes de quercetina: mínimo 0.5% (m/m)
Actividad antioxidante (CA ₅₀)	Mínimo 100 µg/mL

5.3. Especificaciones microbiológicas.

Inhibición de crecimiento: *Staphylococcus aureus* (ATCC CDBB B-1005), *Escherichia coli* (ATCC CDBB-B-1010) y *Candida albicans* (ATCC 14053).

6. Métodos de prueba.

6.1. Acondicionamiento de la muestra.

Los propóleos en bruto o en greña debe acondicionarse eliminando las impurezas visibles tales como virutas de madera, restos de abejas, restos de pinturas, restos vegetales, entre otros. Posteriormente debe ser refrigerada para favorecer su maceración, debe conservarse en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

6.2. Para las especificaciones físicas.

6.2.1. Determinación del color: Colocar la muestra sobre una superficie blanca y comparar con una escala de colores; debe realizarse en un ambiente con buena iluminación. Se puede utilizar un microscopio estereoscópico para visualizar definidamente los colores presentes utilizando el Catálogo Internacional de Colores.

6.2.2. Determinación del aroma: Retirar una porción de la muestra a fin de que el envase no interfiera en la percepción olfativa.

6.2.3. Determinación del sabor: Colocar una porción de la muestra en la parte media de la lengua y analizar mediante la comparación de sus atributos de sabor con los que mejor lo distinguen.

6.2.4. Consistencia a temperatura ambiente: Retirar una porción de la muestra y colocarla en un vidrio de reloj, hasta que alcance la temperatura ambiente. Determinar la consistencia tocándola con los dedos y comparar con el atributo que mejor la describa. Suave y maleable a temperaturas entre 20 y 40 ° C y rígido a temperaturas inferiores a 20 ° C.

6.3. Para las Especificaciones químicas.

6.3.1 Preparación del Extracto Etanólico de Propóleos (EEP): Pesar una cantidad no menor a 50 gramos de los propóleos en bruto, previamente acondicionada, añadir etanol al 70% en una proporción 3:1 y dejar macerar por un período de 72 horas con agitación constante. Pasado este tiempo filtrar y el filtrado se concentra (utilizando preferentemente un rotovapor), pasar el extracto a un envase ámbar, empleando la mínima cantidad de etanol al 70%, y dejar a sequedad utilizando una bomba de vacío, debe conservarse en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

6.3.2. Prueba cualitativa de flavonoides.

Para el aislamiento de flavonoides se recurre a la extracción con solventes de polaridad creciente o directamente con hidróxido de sodio (NaOH). El color amarillo intenso característico de los flavonoides, flavonas y flavonoles.

6.3.2.1. Preparación de reactivos.

Acetato de plomo Pb (C₂H₃O₂)₂ al 10%. Pesar 5 g y disolver en 15 mL de agua destilada, posteriormente aforar a 100 mL. Caducidad de 6 meses.

Hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Pesar 10 g y disolver en 25 mL de agua destilada. Agitar después de enfriar y aforar a 100 mL. Caducidad de 6 meses.

6.3.2.2. Procedimiento.

a) Pesar 200 mg de los propóleos en bruto o EEP y añadir 5 mL de alcohol etílico y mezclar perfectamente.

b) Añadir 1 mL de la solución preparada a dos tubos de ensaye marcados como a) y b).

c) Tubo a): añadir una gota de NaOH al 20% y observar un cambio de coloración que va del amarillo a naranja de acuerdo a la cantidad de flavonoides presentes.

d) Tubo b): añadir 500 µL (0.5 mL) de Pb (C₂H₃O₂)₂ al 10%, y observar un cambio de coloración que va de un amarillo y la presencia de un precipitado, lo que indica la presencia flavonoides.

6.3.3. Prueba cualitativa de fenoles totales.

La mayor parte de los fenoles dan disoluciones coloreadas (azul, verde, violeta, entre otros). Si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa. Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona. Los ácidos, a excepción de los fenólicos, no dan la reacción aunque algunos dan disoluciones o precipitados de color amarillento.

6.3.3.1. Preparación de reactivos.

Cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) al 1%: Pesar 10 g y disolver en 100 mL de agua destilada caliente, posteriormente aforar a 100 mL. Caducidad de 6 meses.

Etanol al 70%: Medir 355 mL de alcohol etílico y aforar a 500 mL con agua destilada.

6.3.3.2 Procedimiento.

a) Colocar una pequeña muestra de los propóleos en bruto o EEP (aproximadamente del tamaño de una lenteja) en un vaso de precipitados de 10 mL y añadir 1 mL de etanol al 70%.

- b) Mezclar y agregar una gota de la solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1% y observar el desarrollo de color.
- c) En caso de la presencia de fenoles, se observará un precipitado y una coloración de azul a negro.

6.3.4. Índice de oxidación.

El índice de oxidación es influenciado por el contenido de compuestos fenólicos. Esto indica que a mayor concentración de fenoles totales, el tiempo de la reacción es más rápido (poder antioxidante de los propóleos, sobre la solución de permanganato de potasio).

6.3.4.1. Preparación de reactivos.

Permanganato de potasio (KMnO_4) 0.1 N. Pesar 3.2 g de KMnO_4 en un vidrio de reloj y disolver en 250 mL de agua destilada y agitar vigorosamente para su disolución. Filtrar la solución y añadir agua destilada hasta que todo el reactivo se disuelva y repetir la operación cuantas veces sea necesario hasta la completa disolución del reactivo. Finalmente aforar a 1L, guardar en un recipiente de vidrio y protegido de la luz. En caso de presentar precipitado, es necesario filtrar antes de su uso. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 20%. Colocar en un matraz aforado de 100 mL una pequeña cantidad de agua destilada y agregar lentamente 20.83 mL del ácido y aforar con agua destilada. **Precaución:** la reacción libera calor.

6.3.4.2. Procedimiento.

- a) Pesar 20 mg de los propóleos en bruto o EEP y añadir 5 mL de alcohol etílico.
- b) Añadir 100 mL de agua destilada, agitar hasta homogeneizar la mezcla y filtrar a gravedad.
- c) Tomar 10 mL de esta solución y aforar a 100 mL con agua destilada.
- d) Tomar 2 mL de la solución diluida y añadir 1 mL de H_2SO_4 al 20% y agitar un minuto.
- e) Añadir una gota de KMnO_4 0.1 N, sin tocar las paredes.
- f) Cronometrar y registrar el tiempo en que tarda en desaparecer el color rosa.

6.3.5. Compuestos fenólicos: método de Folin-Ciocalteu.

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente).

6.3.5.1. Preparación de reactivos.

Solución stock de ácido gálico (0.2 mg/mL): Disolver 20 mg de ácido gálico y aforar a 100 mL con agua destilada. Mantener en refrigeración y protegido de la luz.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%: Disolver 20 g de carbonato de sodio anhidro en 70 mL de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 100 mL con agua destilada.

6.3.5.2. Procedimiento.

Trazado de la curva de calibración.

- a) A partir de la solución stock de ácido gálico de 0.2 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL).
- b) A cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

6.3.5.3. Preparación de las muestras.

Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos. Tomar una alícuota de 250 μL de ésta y agregar 750 μL de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL. Al tener los sistemas preparados se procede de la siguiente manera:

- a) Tomar 1 mL de cada concentración y añadir 6 mL de agua destilada.
- b) Adicionar 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos.
- c) Adicionar 1.5 mL de la solución de Na_2CO_3 y aforar con agua destilada hasta un volumen de 10 mL, se observará un cambio de color a azul.
- d) Esperar 2 horas a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.

- e) Realizar la prueba por triplicado y considerar el promedio.
- f) Graficar la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico.
- g) Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico /g de extracto o en porcentaje (%).

6.3.6. Cuantificación de flavonoides.

El principio básico del método colorimétrico de cloruro aluminio es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides.

6.3.6.1. Preparación de reactivos.

Solución stock de quercetina (1 mg/mL). Pesar 10 mg de quercetina dihidratada y aforar a 10 mL de metanol grado reactivo. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

Tricloruro de aluminio, $AlCl_3$ (2%): Disolver 2 g de cloruro de aluminio en agua destilada y aforar a 100 mL con agua destilada con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.

6.3.6.2. Preparación de la muestra.

Pesar 500 mg del EPP y disolverlo en 10 mL de metanol grado reactivo.

6.3.6.3. Procedimiento

6.3.6.3.1 Preparación de la curva de calibración.

A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener concentraciones seriadas de 1 a 90 μ g/mL (ppm).

6.3.6.3.2. Preparación del blanco de muestra.

Tomar 3 mL de la solución del EEP (500 mg EEP/10 mL de metanol) y agregar 3 mL de metanol HPLC.

Al tener todos los sistemas anteriores preparados, se procede de la siguiente manera:

a) Adicionar a cada tubo 3 mL de la solución de $AlCl_3$, esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-VIS.

b) Graficar la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina.

c) El contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto o en porcentaje (%).

6.3.7. Actividad antioxidante: Método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•).

La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• éste absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del EEP de prueba para atrapar radicales.

6.3.7.1. Preparación de reactivos.

Solución stock de quercetina (1 mg/mL). Pesar 10 mg de quercetina y aforar a 10 mL con metanol grado HPLC. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

Solución de DPPH• (100 μ M). Pesar 1.9716 mg, disolver y aforar a 50 mL con metanol grado HPLC. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

6.3.7.2. Preparación de la muestra.

Pesar 10 mg del EEP y disolver en metanol grado reactivo, aforar a 10 mL.

Las concentraciones a preparar y a evaluar son en un rango de 1 a 40 μ g/mL.

Al tener los sistemas anteriores preparados se procede de la siguiente manera:

a) Colocar en tubos de ensaye, 250 μ L de la muestra y 750 μ L de solución de DPPH•.

b) Proteger de la luz y dejar reposar 30 minutos.

c) Determinar la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.

d) Como control negativo se utiliza metanol y control positivo se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

e) Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

% de reducción= Absorbancia del DPPH• - Absorbancia de la mezcla (DPPH• + compuesto problema)*100

6.4. Para las especificaciones microbiológicas.

6.4.1. Actividad antimicrobiana: difusión en agar.

Esta es una prueba cualitativa que únicamente reflejará si la muestra a evaluar inhibe el crecimiento bacteriano. Se evalúa la actividad antifúngica del extracto de los propóleos, el cual se coloca en sensidiscos y difundirá sobre la placa de agar; si hay inhibición del crecimiento del microorganismo a evaluar se observará un halo alrededor del sensidisco.

6.4.1.1. Preparación de reactivos.

Estándar No. 0.5 de MacFarland: añadir 0.5 mL (500 µL) de sulfato de bario (BaSO_4) y aforar a 100 mL de H_2SO_4 0.36 N.

6.4.1.2. Microorganismos de referencia.

a) Bacterias:

Staphylococcus aureus: ATCC CDBB B-1005.

Escherichia coli: ATCC CDBB-B-1010.

b) Levadura:

Candida albicans (ATCC 14053).

6.4.1.3. Medio de cultivo.

Caldo Müller-Hinton.

Para bacterias: Agar Müller-Hinton (MH).

Para levadura: Agar Müller-Hinton (MH) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno.

Se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

6.4.1.4. Preparación de la muestra.

Pesar 160 mg del **extracto etanólico** de los propóleos (EEP) y disolver en 100 µL de alcohol étílico al 70%.

6.4.1.5. Preparación de la suspensión de microorganismos.

a) Tomar una asada de las colonias sembradas del microorganismo a evaluar y sumergirla en 5 mL de caldo Muller-Hinton.

b) Enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material y retirar el asa.

c) El tubo de cultivo se incuba a 37°C/ 24 horas para bacterias y para levaduras por 35°C/48 horas.

d) Ajustar la densidad del inóculo de acuerdo al tubo 0.5 del nefelómetro de MacFarland (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL)

e) La comparación de la turbidez se realiza a 640 nm en el espectrofotómetro.

6.4.1.6. Preparación de sensidiscos.

Se emplearán discos de papel Whatman N° 5, de 5 mm de diámetro (previamente esterilizados). Los discos se impregnarán con 10 µL de la solución de EEP (160 mg/100 µL) para que tengan una concentración de 16 mg de EEP y se dejarán secar a temperatura ambiente por 24 horas.

6.4.1.7. Procedimiento.

a) A partir del inóculo con una concentración de 1×10^6 UFC/ mL, realizar con un hisopo estéril un sembrado masivo sobre las placas de agar MH para las bacterias y de SDA para las levaduras.

b) Con ayuda de una aguja estéril, colocar los sensidiscos impregnados de la muestra de los propóleos procurando dejarlo en el centro de la caja.

c) Permitir que el sensidisco se adhiera a la placa de agar, teniendo la precaución de evitar desplazamientos del disco. En caso de que se evalúen más de una muestra de EEP en la misma caja, se recomienda Dejar al menos 1.5 cm de distancia entre cada sensidisco y el borde de la caja.

d) Incubar a 37°C / 24 horas para las bacterias y 35°C / 48 horas para la levadura.

Como control negativo se empleará discos impregnados con 10 µL del disolvente utilizado.

e) Como control positivo se emplearán discos de antibióticos y antifúngicos conocido de marca comercial.

6.4.1.8. Resultados.

Después del tiempo de incubación, con una regla calibrada de milímetros o de preferencia con un Vernier, medir el diámetro de los halos de inhibición y se repetirá la medición a las 48 horas para la levadura.

6.4.1.9. Interpretación.

La presencia de un halo de inhibición indica actividad antimicrobiana y se reportará el diámetro de los halos de inhibición (en mm). La ausencia de halo de inhibición indicará que no existe actividad antimicrobiana.

7. Evaluación de la conformidad

La evaluación de la conformidad de los productos objeto de la presente Norma Oficial Mexicana, se llevará a cabo en laboratorios oficiales, laboratorios aprobados por la Secretaría y en laboratorios acreditados y aprobados en los términos de lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

8. Sanciones

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma, será sancionado conforme a lo establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

9. Concordancia con normas y lineamientos internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional al momento de su elaboración.

10. Bibliografía.

10.1. Catálogo Internacional de Colores <http://catalog.weidmueller.com>.

10.2. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. (2001). Ministerio de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa Nº 3, de 19 de janeiro da 2001. Seção1, p. 18-23. Recuperado el 23 de junio de 2011 de www.extranet.agricultura.com.br

10.3. Norma Argentina, Instituto Argentino de Normalización (2008). Normas IRAM-INTA 15935-1, Parte 1: Propóleos en bruto.

10.4. Norma Argentina, Instituto Argentino de Normalización (2008). Normas IRAM-INTA 15935-2, Parte 2. Extractos de propóleos.

10.5. Norma Ramal Cubana (1994). Propóleos Materia Prima. Especificaciones. Apicultura NRAG-1135-94. Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

10.6. Norma Ramal Cubana (1994). Extracto fluido y extracto blando, NRAG 1129 Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

10.7. Norma Rusa (1977). Propóleos. Métodos analíticos para el control de su calidad.

10.8. Norma Ramal Rusa RST-RSFSR-317-77. Diário Oficial de San Salvador. (2003).

10.9. Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 65.19.02.03: Calidad de propóleo crudo. Recuperada el 15 de enero de 2013 de <http://faolex.fao.org>

10.10. González Guerra, A. (1997). Propóleos: un camino hacia la salud. La Habana, Cuba: Pablo de la Torre.

10.11. Rodríguez Pérez, B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

11. Disposiciones transitorias

Artículo único. El presente Proyecto de Norma Oficial Mexicana estará a disposición de los interesados, para que presenten sus comentarios, por un periodo de 60 días naturales siguientes al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Ciudad de México a 19 del mes de agosto de 2016.- El Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Juan José Linares Martínez.**- Rúbrica.