

NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones.

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

VÍCTOR SUÁREZ CARRERA, Subsecretario de Alimentación y Competitividad de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, con fundamento en los Artículos 35 fracción IV, XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 17 y 18 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 5, 6 y 7 del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracciones II y IX; 40 fracción I, 41, 43, 44, 45, 46, 47; 52 y 73 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, 1, 2 inciso B fracción XVII, 17 fracciones I, XII y XIII, 29 fracción I, 36 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, y

CONSIDERANDO

Que es función de la Secretaría de Agricultura, y Desarrollo Rural, el organizar y fomentar la producción pecuaria y consecuentemente, fortalecer la productividad y competitividad de los subsectores pecuarios y por consecuencia que los productos cumplan con las medidas necesarias para garantizar que éstos contengan los requerimientos necesarios con el fin de atender las exigencias del consumidor;

Que la industria apícola es una actividad importante en el aspecto socioeconómico, ya que se tiene un inventario de 2 millones de colmenas con una producción anual que supera las 57 mil toneladas de miel, beneficiando en forma directa e indirecta a más de 43 mil familias, a través de la generación de empleos;

Que en los últimos cinco años se han exportado un promedio anual de 42 mil toneladas; y tan sólo en el 2015, el valor de la exportación fue de 156 Millones de USD, cifra récord en los últimos años, ubicando a México en el 3er lugar mundial como país exportador de miel;

Que actualmente la producción de miel de acuerdo a las características de sus sistemas, es susceptible de sujetarse a mecanismos de certificación, tendencia que va en aumento, lo que permite diversificar el producto y comercializarse a mejores precios, como es el caso de la producción de miel orgánica, requiriéndose en todo momento asegurar el cumplimiento de las especificaciones del producto.

Que la polinización es el proceso por el cual se favorece la reproducción de plantas así como la producción de frutos y semillas que son indispensables para la regeneración de ecosistemas y que constituyen un alto porcentaje de la alimentación de personas y animales. Su aportación económica en el valor de la agricultura mundial está calculada en un 10% del valor de la misma, 43 mil millones de pesos en México.

Que las abejas son los principales agentes polinizadores y en los últimos años se ha registrado una alta mortandad de colonias de abejas en el mundo, poniendo en riesgo la producción de alimentos así como el mantenimiento de los ecosistemas;

Que las propiedades de la miel han favorecido el desarrollo del mercado nacional y que la presencia de mieles adulteradas en el mercado ocasiona un detrimento de la economía de los apicultores y en consecuencia de la infraestructura apícola nacional, requiriendo de acciones para evitar fraude al consumidor, proteger a la apicultura y por consiguiente a las abejas;

Que como parte elemental de las acciones para evitar fraude al consumidor, proteger la apicultura y a las abejas, es necesario contar con un instrumento que establezca las condiciones que se deben cumplir para la producción de miel.

Que a efecto de dar cumplimiento a lo previsto en los artículos 78 de la Ley General de Mejora Regulatoria y Quinto del Acuerdo que fija los lineamientos que deberán ser observados por las dependencias y organismos descentralizados de la Administración Pública Federal, en cuanto a la emisión de los actos administrativos de carácter general a los que les resulta aplicable el artículo 69-H de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo, la Secretaría incorporó en el Análisis de Impacto Regulatorio (AIR) las acciones de simplificación en trámites, que representan un ahorro de hasta \$75,988,511.15 pesos.

Que conforme a lo establecido en el artículo 40 de la Ley Federal de Metrología y Normalización, las normas oficiales mexicanas se constituyen como el instrumento idóneo para la protección de los intereses y seguridad de los consumidores, por lo que, en ejercicio de las atribuciones conferidas en el Artículo 29

fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, he tenido a bien expedir la presente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SAG/GAN-2018, PRODUCCIÓN DE MIEL Y
ESPECIFICACIONES**

PREFACIO

En la elaboración del presente proyecto de Norma Oficial Mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

AMEMA A.C. (ASOCIACIÓN MEXICANA DE EXPORTADORES DE MIEL DE ABEJA, A.C.)

ASOCIACIÓN NACIONAL DE MÉDICOS VETERINARIOS ESPECIALISTAS EN ABEJAS, A.C.

CENTRO NACIONAL DE SERVICIOS DE CONSTATACIÓN EN SALUD ANIMAL

COMITÉ NACIONAL SISTEMA PRODUCTO APÍCOLA

CONSEJO REGULADOR DE LA MIEL DE ABEJA MEXICANA, A.C.

CONSEJO TÉCNICO CONSULTIVO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN-UNAM

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA-UNAM

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM

INSTITUTO DE GEOLOGÍA DE LA UNAM

PROGRAMA NACIONAL PARA EL CONTROL DE LA ABEJA AFRICANA

ÍNDICE

1. Objetivo y Campo de Aplicación.
2. Referencias.
3. Definiciones.
4. Consideraciones generales.
5. Características, clasificación y designación de la miel.
6. Especificaciones de la miel.
7. Toma de muestras.
8. Métodos de Prueba.
9. Etiquetado.
10. Miel como ingrediente.
11. Evaluación de la conformidad.
12. Sanciones.
13. Bibliografía.
14. Disposiciones transitorias

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Objetivo: La presente Norma Oficial Mexicana establece las características generales para la producción de miel que propicien el cuidado de las abejas melíferas y su correcto desarrollo, así como, las especificaciones que la miel debe cumplir para su comercialización, ya sea para consumo directo y/o procesamiento; a fin de coadyuvar en el desarrollo de la apicultura nacional y la competitividad de la cadena de la miel.

1.2 Campo de aplicación: Esta Norma es de observancia obligatoria a personas físicas o morales que se dediquen a la producción de miel en territorio nacional, y a quienes se dediquen al acopio, envasado y/o comercialización de miel nacional o de importación, procedente de abejas melíferas, que se comercialice o se pretenda comercializar dentro del territorio de los Estados Unidos Mexicanos en sus diferentes presentaciones, cuya denominación debe corresponder a la establecida en esta Norma Oficial Mexicana.

1.3 La vigilancia y aplicación de esta Norma Oficial Mexicana corresponde a la Coordinación General de Ganadería y Delegaciones Estatales de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, la Procuraduría Federal del Consumidor, en el ámbito de sus respectivas atribuciones.

2. Referencias

La presente norma no concuerda con ninguna Norma Internacional al momento de su elaboración y se complementa con la siguiente normativa y acuerdos vigentes o las que las sustituyan:

2.1 NOM-051-SCFI/SSA1-2010-Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas pre envasados-Información comercial y sanitaria. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de abril de 2010.

2.2 NOM-092-SSA1-1994-Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995.

2.3 NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de octubre de 1995.

2.4 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.

2.5 NOM-145-SCFI-2001 Información comercial-Etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de abril de 2001.

2.6 "Modificación del inciso 4.2 y se eliminan los numerales 4.2.3 y 4.2.4 de la Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001, Información comercial-Etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones, publicada el 23 de abril de 2001", misma que fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 05 de agosto de 2009.

2.7 NMX-F-036-NORMEX-2006 Alimentos, miel, especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de enero de 2007.

2.8 Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, los cuales se encuentran regulados por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 09 de octubre del 2014.

2.9 NOM-001-SAG/GAN-2015. Sistema Nacional de Identificación Animal para Bovinos y Colmenas. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de mayo del 2015.

2.10 Modificación a la NOM-001-ZOO-1994. Campaña Nacional Contra la Varroasis de las abejas. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de diciembre del 2005.

2.11 Ley de Productos Orgánicos. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 07 de febrero del 2006.

2.12 Reglamento de Ley de Productos Orgánicos. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 01 de abril del 2010.

2.13 Acuerdo por el que se dan a conocer los Lineamientos para la Operación Orgánica de las actividades agropecuarias. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 29 de octubre del 2013.

2.14 Ley Federal de Sanidad Animal, Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de julio del 2007.

2.15 Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de mayo del 2012.

2.16 NOM-002-SAG/GAN-2016. Actividades técnicas y operativas aplicables al Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 05 de octubre del 2016.

3. Definiciones

Para los efectos de esta Norma Oficial Mexicana, se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Abeja melífera: Insecto himenóptero del género *Apis* especie *mellifera*.

3.2 Colmena tecnificada: Nicho que aloja una colonia de abejas cuyos panales son móviles para permitir su manejo y aprovechamiento racional.

3.3 Miel: “Es la sustancia dulce natural producida por abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure o pueda añejarse.

3.3.1 Miel del néctar de las flores: Es la miel producida por abejas directamente de los néctares de las flores.

3.3.2 Miel de mielada o mielatos: Es la miel producida por abejas que procede principalmente de secreciones de partes extraflorales de las plantas o de excreciones de áfidos. (Insectos pertenecientes al orden Hemiptera succionadores de savia).

3.4 Miel en panal: Es la miel que no ha sido extraída de su almacén natural de cera y puede consumirse como tal. El panal deberá estar operculado y libre de larvas.

3.5 Miel líquida: Es la miel que ha sido extraída de los panales operculados, que cumple con lo señalado en el punto 3.3 y que se encuentra en estado líquido, sin presentar cristales visibles.

3.6 Miel cristalizada: Producto que cumple con lo señalado en el punto 3.3 y que se encuentra en estado sólido o semisólido granulado; es resultado del fenómeno natural de cristalización de los azúcares presentes en su composición natural que la constituyen.

3.7 Miel Orgánica: Producto que cumple con lo señalado en el punto 3.3 y además se obtiene conforme a los sistemas de producción y procesamiento establecidos en la Ley de Productos Orgánicos y su Reglamento.

3.8 Miel para uso industrial: producto que presenta un sabor o un olor extraño no característico; humedad mayor al 20%; haber comenzado a fermentar, haber fermentado o haberse sobrecalentado.

3.9 Secretaría: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

4. Consideraciones generales

4.1 La producción de miel deberá realizarse a través de la reproducción, crianza y desarrollo de colonias de abejas melíferas, asegurando en todo momento el cuidado y el bienestar de éstas, para garantizar la producción de alimentos y la protección de la diversidad biocultural propia de México.

4.2 El apicultor deberá utilizar colmenas tecnificadas en buen estado que garanticen el correcto manejo y cuidado de las abejas para minimizar el daño a las colonias.

4.3 El apicultor deberá revisar sus apiarios con una periodicidad de quince días como máximo, llevando registro de sus actividades por colmena y apiario que se exhibirá en una bitácora, para detectar y atender las necesidades nutricionales, alteraciones en la biología y comportamiento de las abejas, entre otras.

4.4 El apicultor deberá realizar un correcto manejo integral de las colonias, que permita contar con abejas sanas, nutridas y vigorosas, para prevenir cualquier factor que ponga en riesgo el desarrollo de las abejas y las características propias de la miel.

4.5 El apicultor, así como los integrantes de la cadena productiva apícola (acopiadores, envasadores, distribuidores, exportadores e importadores), deberán cumplir los ordenamientos de la Ley Federal de Sanidad Animal y su reglamento, y aquellos otros que en materia de inocuidad, trazabilidad, buenas prácticas de producción, manufactura y envasado de miel que publique la Secretaría.

4.6 El apicultor deberá cumplir los ordenamientos de la Modificación a la NOM-001-ZOO-1994. Campaña Nacional Contra la Varroasis de las abejas, la NOM-002-SAG/GAN-2016. Actividades técnicas y operativas aplicables al Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana, y aquellos otros que en control de plagas y enfermedades apícolas publique la Secretaría.

4.7 El apicultor deberá cumplir los ordenamientos de la NOM-001-SAG/GAN-2015. Sistema Nacional de Identificación Animal para Bovinos y Colmenas y las que en identificación de colmenas publique la Secretaría.

4.8 A petición de parte, o cuando lo determine necesario, la Secretaría podrá inspeccionar los apiarios para constatar el cumplimiento de la presente norma.

5. Características, clasificación y designación de la miel

5.1 El producto denominado miel que se comercialice o pretenda comercializarse dentro del territorio nacional, de origen nacional o de importación, en cualquiera de sus presentaciones deberá cumplir las disposiciones de la presente norma.

5.2 La miel que se produzca, bajo sistemas vinculados a procesos de certificación, como la miel orgánica, deberá ajustarse a las disposiciones de la presente norma y a aquellas que para efectos de la certificación corresponda, determine la Secretaría o sus órganos desconcentrados.

5.3 La miel no deberá contener ningún ingrediente adicional, debe estar libre de fragmentos de insectos, así como de cualquier otra materia extraña; no deberá haber comenzado a fermentar (excepto en mieles de mangle), o producir efervescencia.

5.4 La miel no deberá contener ningún aditivo como colorante, saborizantes, conservadores e inhibidores microbianos.

5.5 La miel no deberá adulterarse, por ejemplo con agua, glucosa, fructosa, melazas, almidones, gomas, dextrinas, o cualquier otro tipo de azúcares o jarabes.

5.6 La miel no deberá someterse a ningún tratamiento químico o bioquímico que influya en su cristalización.

5.7 Para la descristalización solamente podrán ser utilizados métodos físicos de calentamiento, la miel no deberá superar los 40 °C.

5.8 La miel de forma natural podrá encontrarse en estado líquido, con presencia parcial o total de cristales y en panal.

5.9 La miel puede designarse con el nombre de la región geográfica o topográfica; de igual forma podrá designarse por su origen floral o de plantas si procede total o principalmente de esas fuentes en particular; esta diferenciación siempre deberá realizarse con base en tres clases de análisis, (sensoriales, físico-químicos y palinológicos). La diferenciación por origen botánico deberá hacerse con base en las características de cada miel descritas en dos clases de publicaciones (revistas científicas arbitradas y cuando no exista tal publicación, se deberá basar en memorias de congresos, preferentemente nacionales).

5.10 La procedencia de la miel puede ser verificada mediante el análisis polínico de la miel (identificación de las mieles, basado en la presencia significativa de determinados tipos de granos de polen que correspondan a la vegetación de origen).

6. Especificaciones de la miel

6.1 Sensoriales: la miel no debe tener signos de fermentación, (excepto la miel de mangle) ni sabores y olores absorbidos de materias extrañas durante su producción, extracción, sedimentación, filtración, envasado y/o almacenamiento, y deberá presentar las siguientes características:

6.1.1 Color: propio característico derivado de la vegetación de origen, variable de: blanco agua, extra blanco, blanco, ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y oscuro.

6.1.2 Olor: Propio característico derivado de la vegetación de origen.

6.1.3 Sabor: Propio característico derivado de la vegetación de origen.

6.1.4 Consistencia: Fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada.

6.2 Físicas y químicas: la miel debe cumplir con las siguientes especificaciones físicas y químicas.

6.2.1 Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas). Mínimo 60 g/100g

6.2.2 Contenido de sacarosa % (g/100g). Máximo 5.00 %.

6.2.4 Contenido de Humedad % (g/100g). Máximo 20.00 %;

6.2.4.1 Contenido de Humedad para miel de mangle % (g/100g). Máximo 21.00 %;

6.2.5 Sólidos insolubles en agua % (g/100g). Máximo 0.1%.

6.2.6 Conductividad eléctrica (mS/cm). Máximo 0.80 ms/cm.

6.2.7 Ácidos libres, Máximo 50.00 meq/kg.

6.2.8 Hidroximetilfurfural (HMF) de miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical. Máximo 80.00 mg/kg.

6.2.9 Hidroximetilfurfural (HMF) de miel en general. Máximo 40.00 mg/kg.

6.2.10 Índice diastásico de miel en general. 8 unidades Schade mínimo.

6.2.11 Índice diastásico de miel con bajo contenido de enzimas naturales y un contenido de HMF no superior a 15mg/Kg. 3 unidades Schade mínimo.

6.3 Contaminantes y residuos tóxicos: el producto regulado por la presente norma se ajustará a las disposiciones del Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, los cuales se encuentran regulados por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, y aquellos otros que para tal efecto publique la Secretaría.

7. Toma de muestras

7.1 Debe efectuarse de manera aleatoria y estadísticamente representativa por lote.

7.1.2 Miel líquida: se debe agitar o mezclar hasta conseguir homogenizar y después efectuar la toma de muestra en diferentes niveles con utensilios estériles.

Ya en laboratorio, si la miel tiene gránulos, meter el envase cerrado en baño de agua, sin sumergirlo, y calentar durante 30 minutos a 313 K (40 °C), si es necesario, hacer llegar la temperatura a 318 K (45 °C) hasta que la miel se licúe, es esencial agitar de vez en cuando. Tan pronto como la muestra se licúe, mezclar perfectamente y enfriar a temperatura ambiente. Es importante señalar que cuando lo que se desea determinar es el hidroximetilfurfural, no se debe sobrecalentar la miel para no alterar el resultado.

7.1.3 Miel en panal: Si el panal está operculado, cortar la parte superior y separar completamente la miel del panal filtrándola por tamiz, malla No. 40 (0.500 mm por 0.500 mm). Si algunas porciones del panal o de cera pasan a través del tamiz, calentar la muestra durante 30 minutos a 313 K (40 °C) y filtrar a través de una estopilla. Si la miel en el panal está granulada, calentar hasta que la cera se licúe, remover, agitar y separar la cera.

7.1.4 En productos a granel, tomar la muestra de varios puntos del contenedor para obtener una muestra representativa. La preparación y dilución de la muestra para la realización de los análisis de la cuenta total, mohos y levaduras se deben realizar conforme a lo establecido en la norma NOM-110-SSA1. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

7.2 Identificar la muestra con el nombre o denominación del producto, nombre del fabricante, país de origen, fecha de producción y lote.

8. Métodos de prueba

Para determinar las especificaciones de la miel que se establecen en la presente Norma Oficial Mexicana, se deben aplicar los métodos de prueba que se indican a continuación:

8.1 Determinación de materia extraña en miel.

8.1.2 Material

8.1.2.1 Embudo de Hirsch o Buchner para filtración al vacío.

8.1.2.2 Caja de Petri.

8.1.2.3 Aguja de disección.

8.1.2.4 Papel de filtración rápida del No. 8 para conteo o rayado a lápiz con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.

8.1.2.5 Material común de laboratorio.

8.1.2.6 Tamices de tela 10 XX. Hechos a partir de seda con número de malla/línea XX y espesor de hilo 10. Someter a ebullición la tela antes de cortarla. Efectuar un rayado con líneas paralelas separadas aproximadamente de 5 a 7 mm, utilizando una pluma con tinta permanente y cortada en círculos de 85 mm de diámetro.

8.1.3 Reactivos

8.1.3.1 Agua destilada (H₂O).

8.1.3.2 Ácido nítrico concentrado (HNO₃).

8.1.4 Equipo e instrumentos de medición

8.1.4.1 Balanza granataria con una precisión de 0.1 g.

8.1.4.2 Equipo de filtración al vacío.

8.1.4.3 Microscopio binocular estereoscópico con objetivos que pueden ser de 3,6,7 y 10 X y oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 X respectivamente.

8.1.4.4 Lámpara para el microscopio o luz natural equivalente.

8.1.4.5 Parrilla de calentamiento.

8.1.5 Procedimiento

Mezclar la muestra completamente y disolver 200 g en 200 mL de agua caliente (no más de 40° C), acidificada con 5 ml de ácido nítrico. Filtrar de una sola vez a través de papel filtro colocado en el embudo Hirsch o Buchner. Lavar con una pequeña cantidad de agua. Colocar el papel filtro en una caja de Petri y examinar al microscopio utilizando una luz lo suficientemente intensa para que muestre los detalles en el papel filtro. Contar explorando con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea, voltear y explorar cada pieza del material pues algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan. No contar material dudoso.

Procedimiento alternativo: Disolver 200 g de muestra en 500 mL de agua caliente (no más de 40° C). Filtrar de una vez a través de un tamiz de tela 10 XX colocado en un embudo de Hirsch o Buchner. Examinar al microscopio como se describió anteriormente.

8.1.6 Cálculos y expresión de resultados.

Reportar la presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor o cualquier otra materia extraña encontrada en 200 g de la muestra.

8.2 Método melisopalinológico

Este método provee información acerca del origen botánico y geográfico de las mieles. Además de ser una herramienta para detectar contaminación por hollín, polvo, levaduras y otras partículas generalmente no presentes en la miel. En teoría, el origen geográfico y botánico puede ser determinado en cualquier miel cuyo polen no haya sido removido por filtración (*i.e.* mediante el empleo de filtros de diatomita).

8.2.1 Análisis microscópico cualitativo y cuantitativo

Este método se basa en la concentración de palinomorfos contenidos en la miel, previamente diluida en agua. Los palinomorfos son acetolizados siguiendo el método propuesto por Erdtman (1960). Cabe destacar que la técnica de acetólisis deberá aplicarse para hacer la identificación de los granos de polen de las plantas, ya que los granos de polen sin acetolizar, y debido al protoplasma que contienen, no permiten ver la estructura y ornamentación de la exina del grano que es donde radican los elementos para hacer una determinación verás.

8.2.2 Material

8.2.2.1 Vasos de precipitado

8.2.2.2 Tubos cónicos para centrífuga (de 100, 50 y 15mL de capacidad)

8.2.2.3 Probetas (de 10, 25, 50 y 100 mL)

8.2.2.4 Pipetas Pasteur

8.2.2.5 Portaobjetos (de 25 x 75 mm)

8.2.2.6 Cubreobjetos (de 22 x 22 mm)

8.2.2.7 Etiquetas (de 13 x 19 mm)

8.2.2.8 Palillos

8.2.2.9 Agua destilada

8.2.3 Reactivos y soluciones

8.2.3.1 Ácido sulfúrico (químicamente puro)

8.2.3.2 Anhídrido acético (químicamente puro)

8.2.3.3 Ácido acético glacial (químicamente puro)

8.2.3.4 Gelatina en polvo para uso en laboratorio

8.2.3.5 Glicerina

8.2.3.6 Fenol líquido

8.2.3.7 Fucsina ácida**8.2.3.8 Ácido clorhídrico (químicamente puro)****8.2.3.9 Mezcla acetolítica****8.2.3.10 Esmalte o Laca transparente**

8.2.3.11 La solución de mezcla acetolítica se prepara en probeta con anhídrido acético y ácido sulfúrico en proporción 9:1 respectivamente. Para preparar 10 ml de mezcla acetolítica, adicionar inicialmente nueve mililitros de anhídrido acético y posteriormente agregar cuidadosamente (deslizándolo lentamente por las paredes), un mililitro de ácido sulfúrico.

8.2.3.12 La glicerogelatina se prepara pesando 14 g. de gelatina; medir con probeta 66 ml de glicerina, 2 ml de fenol y 38 ml de agua destilada. Mezclar la gelatina con la glicerina empleando un agitador magnético. Luego, adicionar el agua y continuar mezclando durante 20 minutos. Posteriormente, agregar el fenol sin dejar de agitar, hasta que se incorpore bien (aproximadamente 10 minutos) a continuación separar una porción de la glicerogelatina para ser teñida con fucsina ácida al 0.5%. Finalmente, dejar fundiendo la gelatina a 40°C durante 12 h. Una vez fundida la gelatina, retirarla del calor, dejarla enfriar y conservarla bien tapada en un lugar fresco y seco.

8.2.4 Equipo e instrumentos de medición

8.2.4.1 Fotomicroscopio óptico con contraste de fases.

8.2.4.2 Colección palinológica de referencia.

8.2.4.3 Catálogos y artículos especializados.

8.2.4.4 Listados florísticos regionales y locales.

8.2.4.5 Centrífuga (de 2500 a 3000 rpm).

8.2.4.6 Campana de extracción.

8.2.4.7 Baño María.

8.2.4.8 Agitador magnético.

8.2.4.9 Parrilla (40°C).

8.2.5 Muestreo y preparación de la muestra

Una muestra de laboratorio para análisis melisopalínológico deberá consistir de 100 a 200 g de miel.

8.2.5.1 Transformación de la muestra de laboratorio en una muestra de ensayo

En caso de mieles líquidas, se deben homogeneizar por medio de agitación. Si la muestra está sucia con cera o restos de abejas, entonces se deja reposar, para que por densidad, las impurezas se congreguen en la superficie, luego estas serán removidas. Posteriormente se homogeniza la muestra y se toman de 30 a 50g, para su procesamiento.

Cuando las muestras de miel están cristalizadas, se derriten mediante ligero calentamiento en baño María a 40°C. Sin embargo, si la muestra está sucia con cera o restos de abejas, después del calentamiento se dejan reposar, para que por densidad las impurezas se concentren en la superficie, luego estas serán removidas. Posteriormente se homogeniza la muestra y se toman de 30 a 50 g para su procesamiento.

Si la miel se encuentra en un fragmento de panal. El panal deberá ser cuidadosamente desoperculado, se revisará detenidamente, para extraer con una pipeta la miel de las celdillas que contengan exclusivamente este recurso, o bien, el panal se oprime con la ayuda de un colador para poder obtener la miel por gravedad; si se encuentran restos de cera, se deja reposar para que se acumulen en la superficie. Posteriormente se homogeniza la muestra y se toman de 30 a 50 g para su procesamiento. Si el panal está cristalizado, se puede someter a calentamiento (no más de 40° C) con posterior reposo para que la cera se solidifique y pueda retirarse.

8.2.6 Procedimiento**8.2.6.1 Acetólisis**

Tomar de 30 a 50 gramos de miel y mezclarla con 50 ml de agua caliente (temperatura máxima 40°C), luego centrifugar la muestra por 10 minutos a 2500 rpm Posteriormente se decanta el sobrenadante y el sedimento (que contiene los granos de polen) es deshidratado con ácido acético glacial y concentrado nuevamente por centrifugación a 2500 rpm Después se decanta el sobrenadante y se agrega al sedimento 2.5

ml de mezcla acetolítica, y el tubo se mantiene en baño María a 70 °C durante 10 minutos, agitándolo constantemente. Finalmente se detiene la reacción con ácido acético glacial. Es importante señalar que acorde a la región donde provenga la miel, podrá variar el tiempo de exposición a la mezcla acetolítica, ya que la exina de algunas plantas es muy sensible a la mezcla y puede ser destruida.

Nuevamente se concentra la muestra por centrifugación y se enjuaga varias veces con agua destilada, hasta neutralizar, concentrando la muestra entre cada lavada a 2500 rpm.

8.2.6.2 Muestras acetolizadas con pastillas marcadoras.

Una vez concentrados los granos de polen y previo a la acetólisis se agrega una pastilla marcadora (de *Lycopodium*). Posteriormente, se deshace dicha pastilla añadiendo ácido clorhídrico (al 10%) y se neutraliza la muestra con agua destilada. Por último, se concentra el material a 2500 g y se procede a la acetólisis.

8.2.6.3 Preparación de laminillas acetolizadas

Preparar en una plancha un portaobjetos con gelatina glicerizada a temperatura menor o igual a 40° C. Por otro lado, homogeneizar la muestra de polen (sedimento que quedó en los tubos) con una pipeta Pasteur y colocar una gota sobre la gelatina ya derretida, mezclarlas lentamente con un palillo hasta que ambas se incorporen, luego colocar el cubreobjetos. Utilizando laca o esmalte transparente y con ayuda de un pincel se sella el borde de todo el cubre objetos y se etiqueta la laminilla adecuadamente con su número de catálogo.

8.2.6.4 Preparación de laminillas no acetolizadas

Paralelamente a la técnica de acetólisis es recomendable la elaboración de laminillas no acetolizadas, ya que la acetólisis destruye hifas de hongos, algas, levaduras y algunos granos de polen que son útiles para evaluar el tipo de miel. Con este fin, pesar 30g de miel y aforar a 50 mL con agua destilada caliente (temperatura máxima 40 °C). Centrifugar la solución por 10 minutos a 2500 rpm y decantar el sobrenadante líquido.

Enjuagar una vez más con 10ml de agua destilada para retirar los azúcares que aún pudieran existir de la miel y centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm, decantar nuevamente el sobrenadante líquido. Posteriormente agregar 1 mL de glicerogelatina teñida con fucsina al 0.5% en el tubo que contiene la pastilla y homogeneizar la muestra por resuspensión con una pipeta Pasteur, a continuación tomar 100 microlitros y colocarlos sobre el portaobjetos y extender la muestra con un cubreobjetos. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente y sellar con esmalte o laca transparente con la finalidad de hacerla perdurable, finalmente etiquetar la laminilla adecuadamente con su número de catálogo.

8.2.6.5 Realización del análisis microscópico

La determinación del origen botánico y geográfico se basa en la identificación taxonómica y conteo de los granos de polen acetolizados y naturales, así como otras partículas en la miel. La identificación se realiza empleando literatura especializada y por comparación con muestras palinológicas de la colección de referencia, resguardadas en la palinoteca del Laboratorio de Palinología del Instituto de Geología de la UNAM. Existen tres grados de precisión en el conteo de granos de polen presentes en el sedimento obtenido de la miel. Además, hay casos de mieles especiales:

8.2.6.5.1 Estimación: Se basa en la identificación y conteo de 100 granos de polen.

8.2.6.5.2 Determinación de frecuencias de clases: En este caso se identifican y cuentan de 200-300 granos de polen.

8.2.6.5.3 Conteo expresado en porcentajes: Es necesario la identificación y el conteo de 500 granos de polen, para la obtención de porcentajes.

8.2.6.5.4 Conteo en mieles con escaso sedimento: Para estos casos especiales, se pueden contar 50, 100-150 o 600 granos de acuerdo al grado de precisión requerido.

8.2.6.5.5 Conteo en miel de mieladas: En los casos de mieles de mieladas, producidas a partir de plantas que presentan nectarios extraflorales, se registran escasos granos de polen. Por lo que el conteo de 50 a 600 granos es suficiente.

8.2.6.5.6 Otros elementos en las mieladas consisten en esporas e hifas de hongos y algas. Una hifa multicelular, o complejos de esporas o algas se cuentan como un solo elemento.

8.2.6.5.7 Polen de plantas polinizadas por viento o que no presenten nectarios: Anotar separadamente aquellos palinomorfos provenientes de plantas polinizadas por viento o plantas que estén reportadas como carentes de nectarios.

8.2.6.5.8 Fungosporas patógenas, Esporas de Uredinaceae (royas), Ustilaginaceae y Peronosporaceae: Se cuentan separadamente si están contenidas en apreciable cantidad. Todo esto se debe a que algunas veces las abejas colectan fungosporas en sus corbículas.

8.2.7 Expresión de resultados

Los resultados son presentados en tablas o en gráficas con su explicación detallada y análisis de las mismas, para lo cual se emplea la siguiente terminología:

8.2.7.1 Términos para la presentación de frecuencias

8.2.7.1.1 “Muy frecuente” Para granos de polen que constituyen más del 45% del total.

8.2.7.1.2 “Frecuente” Para granos de polen que constituyen 16-45% del total.

8.2.7.1.3 “Raros” Para granos que constituyen 3-15% del total.

8.2.7.1.4 “Esporádicos” Para granos que constituyen menos del 3%.

8.2.7.2 Términos para la presentación de clases de frecuencias.

8.2.7.2.1 Polen predominante: Más del 45% de los granos contados.

8.2.7.2.2 Polen secundario: 16-45% de los granos contados.

8.2.7.2.3 Polen de menor importancia: 3-15% de los granos contados.

8.2.7.2.4 Polen menor: Menos del 3% de los granos contados.

8.2.7.3 Polen con baja representatividad

Cuando se cuentan 500 granos de polen, las frecuencias son expresadas en porcentajes con una aproximación del 1%. En el caso de granos de polen con presencia menor al 1%, solo debe ser citado como “presente”.

8.2.7.4 Plantas anemófilas y otras plantas carentes de nectarios

8.2.7.4.1 Los siguientes términos deben emplearse:

8.2.7.4.2 Muy frecuente: Mayor del 45% del total.

8.2.7.4.3 Frecuente: 16-45%

8.2.7.4.4 Raro: 3-15%

8.2.7.4.5 Esporádico: Menos del 3% de los granos contados.

8.2.7.5 Cálculo de cantidad absoluta de granos de polen

Por medio del empleo de pastillas marcadoras, cuyo contenido de esporas de *Lycopodium* es conocido, se puede calcular la cantidad total de granos de polen por unidad de volumen. Para lo cual se emplea la siguiente fórmula:

$$P_{conc} = \frac{\text{esporas adicionadas}}{\text{esporas contadas}} \times \frac{\text{polen contado}}{\text{volumen de miel}}$$

Donde P_{conc} : Es la cantidad absoluta de granos de polen

8.2.8 Interpretación

8.2.8.1 Origen geográfico

El origen geográfico puede ser establecido por la presencia de polen característico que está limitado a cierta región. Sin embargo, la región a la cual la miel pertenece puede ser determinada por la combinación de ciertos granos de polen y los detalles pueden ser encontrados en literatura especializada (floras y catálogos palinológicos).

8.2.8.2 Origen botánico

La miel es derivada de diferentes recursos de plantas, las cuales pueden ser deducidas de las frecuencias del polen. Cuando la miel es producida por una única planta, su polen predomina por lo que es denominada miel unifloral o monofloral (con un taxón dominante $\geq 45\%$), cuando la miel es producida por varias plantas se denomina miel multifloral, sub-clasificándose en: (a) las oligoflorales dominadas por dos o más taxones de una familia de plantas con 16-44 %, (b) biflorales, con dos taxones relevantes de diferentes familias botánicas

presentes del 16 al 44 % y (c) las estrictamente multiflorales, con tres o más taxones de diferentes familias con porcentajes $\geq 10\%$. El polen de plantas anemófilas y sin nectarios queda excluido cuando se calculan los porcentajes. Los casos especiales están constituidos por:

8.2.8.2.1 Polen sobrerrepresentado: Algunos casos de sobrerrepresentación de granos de polen lo constituyen *Myosotis*, y *Mimosa pudica*.

8.2.8.2.2 Polen subrepresentado: Algunos granos de polen que pueden estar subrepresentados se presentan en una lista. Si la frecuencia de cualquiera de ellos es tan alta como el porcentaje señalado, entonces la miel es considerada principalmente de ese recurso (monofloral). *Citrus* 10-20%; *Salvia* 10-20%; *Tilia* 20-30%; *Medicago* 20-30%. El polen de *Epilobium* y *Cucurbitaceae* también están subrepresentadas.

8.2.8.3 Cantidad absoluta por unidad de volumen

La cantidad absoluta de granos de polen, fungosporas y algas debe estar basada por lo menos en un conteo de 500 elementos, considerando la cantidad exacta de miel procesada, empleando la fórmula previamente citada. Lo que permite establecer los siguientes grupos:

8.2.8.3.1 Grupo I: miel con menos de 20,000 granos de polen en 10 g.

8.2.8.3.2 Grupo II: entre 20,001 y 100,000 granos de polen en 10g.

8.2.8.3.3 Grupo III: de 100,001 a 500,000 granos de polen en 10g.

8.2.8.3.4 Grupo IV: de 500,001 a 1,000,000 de granos de polen en 10 g.

8.2.8.3.5 Grupo V: más de 1,000,000 de granos de polen en 10g.

8.3 Determinación del contenido de humedad método refractométrico.

Este método se basa en el cambio de dirección que sufren los rayos luminosos en el límite de la separación de dos medios, en los cuales es distinta la velocidad de propagación.

8.3.1 Reactivos

8.3.1.1 Alcohol.

8.3.1.2 Éter de petróleo.

8.3.1.3 Bromo naftaleno.

8.3.2 Equipo e instrumentos de medición

Refractómetro de Abbe (calibrado)

8.3.3 Muestreo y preparación de la muestra

La miel se prepara para la toma de muestra como se indica en el punto 1.2

8.3.4 Procedimiento.

Colocar el refractómetro en una posición tal que difunda la luz natural o cualquier otra forma de luz artificial, que pueda utilizarse para iluminación. Hacer circular agua a 293 K (20 °C) a través de los prismas. Limpiar el refractómetro cuidadosamente con alcohol y éter de petróleo antes de hacer la lectura.

Para cargar el refractómetro, abrir el doble prisma girando el tornillo correspondiente y poner unas gotas de muestra sobre el prisma, cerrar y ajustar finalmente. Verificar la exactitud de refractómetro con agua a 293 (20 °C). A esta temperatura, el índice de refracción del agua es de 1,3330, o bien utilizar la placa de cuarzo que viene con el equipo, usando bromo naftaleno. Al efectuar la lectura hacer las correcciones necesarias.

Mover el brazo giratorio del aparato hacia adelante y hacia atrás hasta que el campo visual se divida en dos partes, una luminosa y otra oscura. La línea divisoria entre esas dos partes, se le conoce como "línea margen". Ajustar la línea margen y leer directamente el índice de refracción.

Nota: Este método incluye también a los refractómetros manuales (o portátiles), en los cuales únicamente se coloca la muestra y se observa a contraluz para tomar la lectura directamente; para el caso de refractómetros digitales, seguir las instrucciones del manual de operación.

8.3.5 Cálculos y expresión de resultados

Obtener el porcentaje correspondiente de humedad (porcentaje m/m) utilizando el Apéndice A de los presentes criterios técnicos. Si la determinación se hace a una temperatura diferente de 293 K (20 °C), corregir la lectura a la temperatura patrón de 293 K (20 °C), de acuerdo a las siguientes correcciones:

8.3.5.1 Para temperaturas superiores a 293 K (20 °C), sumar 0,00023 por cada K (°C).

8.3.5.2 Para temperaturas inferiores a 293 K (20 °C), restar 0,00023 por cada K (°C).

8.3.6 Informe de la prueba.

Reportar el resultado cómo % de humedad.

8.4 Determinación de glucosa y sacarosa

8.4.1 Método de glucosa - oxidasa

La enzima glucosa oxidasa a un pH determinado, actúa sobre la glucosa oxidándola con formación de ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno, éste por acción de la peroxidasa deja libre oxígeno activo que se hace reaccionar con la o-toluidina formando un complejo colorido que absorbe en la región visible a 530 nm.

8.4.1.1 Materiales

8.4.1.1.1 Matraz volumétrico de 100 ml.

8.4.1.1.2 Tubos de ensaye de 18X150 mm.

8.4.1.1.3 Pipeta volumétrica de tipo "A".

8.4.1.1.4 Material común de laboratorio.

8.4.1.2 Reactivos

8.4.1.2.1 *Glucosa oxidasa*: Tipo II, purificada de 15 000 20 000 u/g Sigma Chemical Co. G-6125 o equivalente.

8.4.1.2.2 *Peroxidasa*: Tipo I. P 8125.

8.4.1.2.3 *Diclorhidrato de o-toluidina*

8.4.1.2.4 *Solución de glucosa oxidasa – peroxidasa*: En 200 mL de solución reguladora de pH 7.6, disolver 60 mg de glucosa oxidasa y 16 mg de peroxidasa. Agregar una solución de 135 mg de diclorhidrato de o-toluidina en 260 mL de agua destilada. Guardar en refrigeración en frasco oscuro. De ser necesario, filtrar antes de usar. Esta solución es estable por 6 semanas a 4 °C.

8.4.1.2.5 *Solución reguladora tris pH 7.6*: Disolver 48.44 g de tris (hidroximetil) aminometano en 500 mL de agua destilada, añadir 384 mL de ácido clorhídrico 0.8 M; ajustar el pH a 7.6 si es necesario y aforar a un litro con agua destilada.

8.4.1.2.6 *Ácido clorhídrico 4.0 N*: En 500 mL de agua destilada agregar 330 mL de HCl concentrado (densidad = 1.19 g/mL, pureza = a 37.2 %) moviendo constantemente y aforar a un litro con agua destilada.

8.4.1.2.7 *Ácido clorhídrico 6.0 N*: En 500 mL de agua destilada agregar 494 mL de HCl concentrado (densidad = 1.19 g/mL, pureza = a 37.2 %), moviendo constantemente y aforar a un litro con agua destilada.

8.4.1.2.8 *Ácido clorhídrico 0.8 N*: En 200 mL de agua destilada agregar 66 mL de HCl concentrado (densidad = 1.19 g/mL, pureza = a 37.2 %), moviendo constantemente y aforar a un litro con agua destilada.

8.4.1.2.9 *Hidróxido de sodio 5 N*: Disolver 200 g de NaOH (reactivo analítico libre de carbonatos y humedad) en 500 mL de agua destilada y aforar a un litro con agua destilada.

8.4.1.2.10 *Solución patrón de glucosa 0.1 mg/ml*: En un matraz volumétrico de 250 mL, disolver 25 mg de glucosa (reactivo analítico) con 25 ml de agua. Calentar hasta ebullición durante 2 minutos y enfriar a temperatura ambiente y aforar al volumen con agua destilada.

8.4.1.2.11 *Indicador de fenolftaleína 0.1%*: En 50 mL de etanol disolver 0.1 g de fenolftaleína y llevar a 100 ml con etanol.

8.4.1.3 Equipo e instrumentos de medición

Espectrofotómetro VIS

8.4.1.4 Procedimiento

Pesar un gramo de miel (con precisión de ± 0.0003 g) anotando el peso exacto, disolver en agua destilada, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y completar el volumen con agua destilada. Diluir una alícuota de 5.0 mL en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. En cada uno de dos tubos de ensaye de 18X150 mm pasar con pipeta 2 porciones de 2.0 mL de la muestra diluida tomados con una pipeta volumétrica de tipo "A".

En una gradilla poner un tubo con 2.0 mL de agua, seguido de un tubo conteniendo 2.0 mL de la solución patrón de glucosa, 2 tubos conteniendo la muestra diluida y otro tubo con 2.0 mL de solución patrón de glucosa. Repetir esta secuencia si se realizan más determinaciones. Agregar a cada tubo 5.0 mL del reactivo

de glucosa-oxidasa (manteniendo a temperatura ambiente) a intervalos apropiados dependiendo de la técnica de medición que se va a emplear (por ejemplo, de 30 a 60 segundos cuando se utilizan celdas de flujo; para celdas normales serán necesarios tiempos más largos) comenzando con un tubo de agua que será el testigo de reactivos. Después de 60 minutos de la adición del reactivo, agregar al primer tubo 0.15 mL de ácido clorhídrico 4 N, mezclar perfectamente con un agitador vórtex.

Continuar con la misma secuencia de tiempo en las otras soluciones. Ajustar el cero del instrumento con el tubo que contiene agua y determinar la absorbancia del contenido de cada tubo a 530 nm un minuto después de la adición del ácido, empleando celdas de vidrio de 1 cm de paso de luz.

8.4.1.5 Cálculos y expresión de resultados

Para determinar el % en peso de glucosa se hará de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\mu\text{g de glucosa antes de la hidrólisis} = \frac{(\text{Absorbancia de la muestra}) \times (\mu\text{g del estándar})}{(\text{Absorbancia del estándar})}$$

$$\% \text{ de glucosa} = \frac{(\mu\text{g de la glucosa antes de la hidrólisis}) \times (2.5)}{(\text{g de muestra})}$$

Donde 2,5 = Es el factor $20(\text{factor de dilución}) \times 250 (\text{volumen fracción}) / (1000\text{ig}) \times 2 (\text{volumen en tubo})$

8.4.2 Método de hidrólisis (para obtención de sacarosa)

En un matraz de 50 mL poner 25 mL de la solución de miel, agregar 5,0 mL de ácido clorhídrico 6 N y poner en baño de agua a 333 K (60 °C) por 17 minutos, enfriar la solución a temperatura ambiente y neutralizar con hidróxido de sodio 5 N y ácido clorhídrico 0.8 N, utilizando fenoltaleína como indicador.

Una vez que la muestra ha sido hidrolizada, se llevará a cabo la determinación de acuerdo al método 8.4.1 que se utilizó para la determinación de glucosa; emplee 3 tubos para la muestra y 2 para estándar.

8.4.2.1 Cálculos y expresión de resultados

Para determinar el % en peso se hará de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\mu\text{g de glucosa después de la hidrólisis} = \frac{(\text{Absorbancia de la muestra después de la hidrólisis}) (\mu\text{g del estándar})}{(\text{Absorbancia del estándar})}$$

$$\% \text{ de sacarosa (referido en \% glucosa)} = \frac{(\mu\text{g de la glucosa después de hidrólisis} - \mu\text{g glucosa antes de hidrólisis}) \times (0.02375)}{(\text{g de muestra})}$$

Donde 0.02375 es el factor = $\mu\text{g de glucosa} \times 1.9 \times 10^{-6} \times (\frac{1}{2}) \times 250 \times 100$; $\mu\text{g glucosa} \times 1.9 = \mu\text{g sacarosa}$;

$10^{-6} = \mu\text{g} / \text{g}$; $\frac{1}{2} = 2 \text{ mL analizados}$; $250 \text{ mL muestra diluida}$; $100 = \text{para convertir a \%}$.

8.4.2.2 Informe de la prueba.

Reportar como:

8.4.2.2.1 % de azúcar invertido.

8.4.2.2.2 % de sacarosa.

8.4.2.2.3 % glucosa.

8.4.3 Método de Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC), para la determinación de glucosa, sacarosa y fructosa.

El método se basa en determinar el contenido de azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de índice de refracción (IR). La identificación se efectúa mediante los tiempos de retención, y la cuantificación se realiza según el método del estándar externo a través de las áreas de los picos o bien la altura de los mismos. Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa: cantidad de azúcares que contiene la miel, expresada en g/100g.

8.4.3.1 Material

8.4.3.1.2 Filtros para jeringa de 13 mm x 0.45 μm PTFE

8.4.3.1.3 Espátula acanalada.

8.4.3.1.4 Equipo de filtración**8.4.3.1.5** Insertos de 250 µl.**8.4.3.1.6** Jeringas de 1.0 ml**8.4.3.1.7** Matraces volumétricos clase A de 10 y 100 ml.**8.4.3.1.8** Matraz kitazato de 1000 ml.**8.4.3.1.9** Membranas para filtración de 47 mm de diámetro, 0.2 µm.**8.4.3.1.10** Microespátula.**8.4.3.1.11** Micropipetas de 10 a 100 y de 100 a 1000 µl.**8.4.3.1.12** Probeta de 1000 ml.**8.4.3.1.13** Puntas para micropipetas de 2 a 100 y de 100 a 1000 µl.**8.4.3.1.14** Agitadores Magnéticos**8.4.3.1.15** Vial para automuestreador de vidrio de 2 ml, con tapa y septa.**8.4.3.1.16** Columna de gel de sílice modificados con grupos amino de longitud de 25 cm de 4.6 mm x 5 µm o equivalente.**8.4.3.2. Equipo****8.4.3.2.1** Balanza analítica.**8.4.3.2.2** Balanza granataria.**8.4.3.2.3** Baño de ultrasonido con desgasificador.**8.4.3.2.4** Bomba de vacío.**8.4.3.2.5** Tamiz de 0.5 mm.**8.4.3.2.6** Cromatógrafo de líquidos equipado con bomba ternaria o cuaternaria, detector de índice de refracción, automuestreador.**8.4.3.3. Reactivos****8.4.3.3.1** Acetonitrilo grado HPLC.**8.4.3.3.2** Agua grado HPLC.**8.4.3.3.3** Estándar certificado de fructosa.**8.4.3.3.4** Estándar certificado de glucosa.**8.4.3.3.5** Estándar certificado de sacarosa.**8.4.3.3.6** Metanol, grado HPLC.**8.4.3.4 Soluciones****8.4.3.4.1** Fase Móvil: Mezclar 800 ml de Acetonitrilo HPLC y 200 ml de agua, agitar y desgasificar, filtrar.**8.4.3.5 Estándares****8.4.3.5.1** Solución Stock: Pesar aproximadamente 100 + 0.1 mg de los estándares de Fructosa, Glucosa y Sacarosa. Disolver en 4 ml de agua grado HPLC y transferir a un matraz de 10 ml, que contenga 2.5 ml de metanol. Aforar con agua grado HPLC y vaciar a un frasco ámbar y guardarlo. La solución estándar es estable por 4 semanas a 4°C ± 1°C, o seis meses a -18°C ± 2°C.**8.4.3.6 Procedimiento****8.4.3.6.1** Miel líquida o cristalina sin impurezas: Homogenizar la muestra para ensayo.**8.4.3.6.2** Miel líquida o cristalizada con impurezas: Eliminar las impurezas de la miel (como ceras, resto de vegetales o de abejas), a temperatura ambiente ya sea mediante un tamiz de 0.5 mm o manualmente mediante una espátula.**8.4.3.6.3** Miel en panales: Si el panal está cerrado, primero debe ser desoperculado; a continuación, con ayuda de un tamiz de 0.5 mm, la miel sin calentar se debe separar completamente del panal.

NOTA. Si la miel está cristalizada, se puede calentar en baño maría hasta 40°C.

8.4.3.7 Preparación de la solución de muestra.

8.4.3.7.1 Pesar 5 g ± 1 mg de miel en un vaso de precipitados; sin calentar, disolver en alrededor de 40 ml de agua. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz de 100 ml en el cual se han agregado previamente 25 ml de metanol. Aforar el matraz con agua y agitar hasta homogenizar completamente.

8.4.3.8 Parámetros cromatográficos

8.4.3.8.1 Fase móvil: 80: 20 acetonitrilo:agua

8.4.3.8.2 Columna: 25 cm de 4.6 mm x5 µm con grupo NH₂

8.4.3.8.3 Velocidad de flujo: 1.3 ml / min.

8.4.3.8.4 Volumen de inyección: 20 µl

8.4.3.8.5 Temperatura de columna: 30°C.

8.4.3.8.6 Temperatura de detector: 35°C.

8.4.3.8.7 Tipo de detector: Índice de Refracción.

8.4.3.8.8 Tiempo de corrida: 30 min, mismo que puede variar según el tipo de muestra.

8.4.3.8.9 Lavar el sistema por 30 minutos a 80:20 (acetonitrilo:agua).

8.4.3.9 Inyección en el equipo HPLC

8.4.3.9.1 Filtrar una alícuota de la solución stock de estándares, con acrodiscos de PTFE y encapsular en viales de 2 ml. Preparar el equipo de HPLC e inyectar

8.4.3.9.2 Filtrar una alícuota de la solución de muestra de miel, con acrodiscos de PTFE y encapsular en viales de 2 ml. Preparar el equipo de HPLC e inyectar.

8.4.3.10 Cálculos

8.4.3.10.1 Comprobación cualitativa: La comprobación cualitativa de los sacáridos a determinar, se realiza a través de la comparación de los tiempos de retención de la muestra respecto de la correspondiente solución estándar.

8.4.3.10.2 Determinación cuantitativa: La determinación cuantitativa se realiza mediante la integración de las áreas de los picos o de las alturas de los mismos referidas al valor correspondiente de la solución estándar.

8.4.3.11 Expresión de resultados

Calcular g de azúcar de 100 g de miel de cada uno de los azúcares a determinar, fructosa, glucosa, sacarosa, que está dado por la siguiente ecuación (método del valor estándar externo):

$$W = A1 \times V1 \times m1 \times 100$$

$$A2 \times V2 \times m0$$

Donde:

W = gramos (g) de cada azúcar determinado en 100 g de miel.

A1 = Área o altura del pico del azúcar correspondiente en la solución de la muestra, en unidades de área, longitud o integración.

A2 = Área o altura del pico del azúcar correspondiente en la solución de estándar, en unidades de área, longitud o integración.

V1 = Volumen total de la solución de la muestra, en mililitros (ml)

V2 = Volumen total de la solución estándar, en mililitros (ml)

m1 = Cantidad de azúcar correspondiente contenida en V2, en gramos (g).m0 = Cantidad de muestra pesada, en gramos (g).

8.5 Determinación de acidez**8.5.1 Método Potenciométrico**

El método se basa en la titulación potenciométrica del contenido de iones de hidrógeno, utilizando una solución de hidróxido de sodio valorada hasta un pH de 8.5, adicionando después 10 mL del mismo hidróxido de sodio y titulando con ácido clorhídrico 0.05 N hasta un pH de 8.3.

8.5.1.1 Materiales

8.5.1.1.1 Bureta de 25 mL

8.5.1.1.2 Pipeta volumétrica de 10 mL

8.5.1.1.3 Vaso de precipitado de 250 mL

8.5.1.1.4 Agitador magnético

8.5.1.2 Reactivos

8.5.1.2.1 Hidróxido de sodio grado reactivo

8.5.1.2.2 Ácido clorhídrico grado reactivo

8.5.1.3 Equipos e instrumentos de medición

8.5.1.3.1 Potenciómetro

8.5.1.3.2 Balanza Analítica

8.5.1.4 Preparación de soluciones

8.5.1.4.1 Solución de hidróxido de sodio 0.05 N: Pesar 0,2 g de NaOH (GR), disolver en agua destilada y llevar a volumen de 100 mL.

8.5.1.4.2 Solución de ácido clorhídrico 0.05 N: En 200 mL de agua destilada agregar 4.07 mL de HCl concentrado (densidad 1.19 g/mL, pureza 37.6 %) moviendo constantemente. Llevar a volumen de 1000 mL con agua destilada.

8.5.1.5 Procedimiento

En un vaso de precipitado de 250 mL pesar 10 g de miel, agregar 75 mL de agua destilada libre de dióxido de carbono, disolver mezclando por medio de un agitador magnético. Introducir el electrodo del potenciómetro en la solución, tomar el pH. Titular con NaOH 0.05 N a una velocidad aproximada de 5 mL / minuto deteniendo la adición cuando el pH sea de 8,5 inmediatamente después agregar 10 mL de hidróxido de sodio 0,05 N. Titular por retroceso con ácido clorhídrico 0.05 N hasta alcanzar un pH de 8.3. Hacer un testigo con 75 mL de agua destilada libre de dióxido de carbono.

8.5.1.6 Cálculos y expresión de resultados

Los datos se expresan en miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel (meq/kg)

Acidez libre = $\frac{(\text{mL de hidróxido de sodio } 0.05 \text{ N de la muestra}) - (\text{mL de hidróxido de sodio del blanco}) \times 50}{\text{g de muestra}}$

Lactona = $\frac{(10 - \text{mL de ácido clorhídrico } 0.05 \text{ N}) \times 50}{\text{g de muestra}}$

Acidez total = Acidez libre + Lactona

8.5.1.7 Informe de la prueba.

Reportar como miliequivalentes de ácido/kg

8.5.2 Método volumétrico

Se basa en el proceso de neutralización de un ácido mediante un hidróxido en presencia de Fenolftaleína como indicador.

8.5.2.1 Material

8.5.2.1.1 Bureta de 25 mL

8.5.2.1.2 Matraz erlenmeyer de 125 mL

8.5.2.1.3 Vaso de precipitado de 100 mL

8.5.2.1.4 Agitador magnético**8.5.2.2** Reactivos**8.5.2.2.1** Hidróxido de sodio grado reactivo**8.5.2.2.2** Fenolftaleína grado reactivo**8.5.2.2.3** Agua destilada**8.5.2.3** Equipos e instrumentos de medición

Balanza Analítica

8.5.2.4 Preparación de soluciones

8.5.2.4.1 Hidróxido de sodio 0.1N: Pesar 4.5 g de hidróxido de sodio, disolver con agua destilada libre de CO₂, dejar enfriar y reposar 24 h; al día siguiente llevar a volumen de 1000 mL y valorar.

8.5.2.4.2 Indicador de fenolftaleína al 1%: Pesar 1 g de fenolftaleína, disolver en etanol y llevar a volumen de 100 ml.

8.5.2.5 Procedimiento

Pesar 5 g de muestra disolver con 75 mL de agua destilada libre de CO₂. Agregar 0.3 mL de fenolftaleína. Titular con NaOH 0.1N La titulación se concluye cuando se obtiene un vire levemente rosáceo del indicador en la muestra de miel.

8.5.2.6 Cálculos y expresión de resultados

Los datos se expresan en miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel (meq/kg)

8.6 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de la miel está definida como aquella obtenida al medir una solución de 20 g de materia seca de miel en 100 mL de agua destilada a 20°C, utilizando una celda de conductividad eléctrica. La determinación de la conductividad eléctrica se basa en la medición de la resistencia eléctrica; la cual es recíproca a ésta. Los resultados se expresan en miliSiemens por centímetro (mS.cm⁻¹) en un rango de 0.1-3 mS.cm⁻¹.

8.6.1 Reactivos**8.6.1.1** Agua destilada o de calidad similar.

8.6.1.2 Solución de cloruro de potasio (KCl) 0.1M. Disolver 7.4577 g de cloruro de potasio previamente secado a 130°C, en agua destilada y aforar en un matraz volumétrico de 1000 mL. La solución debe ser preparada el mismo día de uso.

8.6.2 Equipos**8.6.2.1** Conductímetro, rango más bajo de 10⁻⁷S.**8.6.2.2** Celda de conductividad, electrodo doble platinado (electrodo de inmersión).**8.6.2.3** Termómetro con graduación hasta 0.1°C.**8.6.2.4** Baño María con control de temperatura (20 ± 0.5°C).**8.6.2.5** Matraz volumétrico de 100 mL y 1000 mL.**8.6.2.6** Vaso de precipitados de 100 mL.**8.6.3** Procedimiento**8.6.3.1** Determinación de la constante de celda

Si la constante de celda de conductividad es desconocida, proceder de la siguiente manera:

8.6.3.1.1 Conectar la celda de conductividad al conductímetro y enjuagar la celda con abundante solución de cloruro de potasio.

8.6.3.1.2 Transferir 40 mL de la solución de cloruro de potasio a un vaso de precipitados y poner al baño de agua para alcanzar una temperatura de 20°C.

8.6.3.1.3 Sumergir la celda en la solución de cloruro de potasio junto con un termómetro. Hacer la lectura de conductancia de la solución en miliSiemens cuando la solución se haya estabilizado a 20°C.

8.6.3.1.4 Enjuagar el electrodo con agua destilada después de la determinación de la constante de celda.

8.6.3.1.5 Mientras no se esté usando, el electrodo debe mantenerse en agua destilada para evitar su envejecimiento.

Calcular la constante de celda K, utilizando la fórmula siguiente:

$$K = 11.691 \times 1/G$$

Donde:

K es la constante de celda en cm^{-1}

G es la conductancia eléctrica en miliSiemens, medida con la celda de conductividad

11.691 es la suma del valor promedio de la conductividad eléctrica de agua recién destilada en miliSiemens por centímetro y la conductividad eléctrica de una solución al 0.1M de cloruro de potasio a 20°C.

8.6.3.2 Preparación de la solución de la muestra de miel

8.6.3.2.1 Pesar una cantidad de miel equivalente a 20.0 g de miel anhidra y disolver en agua destilada.

8.6.3.2.2 Transferir la solución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con agua destilada.

8.6.3.2.3 Verter 40 mL de la solución de miel en un vaso de precipitado de 100 mL y poner al baño de agua para alcanzar 20°C.

8.6.3.2.4 Enjuagar la celda de conductividad con lo que resta de la solución de la muestra.

8.6.3.2.5 Sumergir la celda de conductividad en la solución de la muestra.

8.6.3.2.6 Hacer la lectura de la conductancia en miliSiemens después de que la temperatura se haya equilibrado.

Nota: La mayoría de los conductímetros son de corriente continua. Para evitar resultados falsos por los efectos de polarización, el tiempo de medición debe ser lo más corto posible. Si la determinación se lleva a cabo a una temperatura diferente, se puede usar un factor de corrección para el cálculo del valor a 20°C; para temperaturas superiores a 20°C restar el 3.2% del valor por cada °C, y para temperaturas menores a 20°C sumar el 3.2% del valor por cada °C.

8.6.4 Cálculo y expresión de resultados

Calcular la conductividad eléctrica de la solución de miel utilizando la siguiente fórmula:

$$S_H = K \cdot G$$

Donde:

S_H es la conductividad eléctrica de la solución de miel en miliSiemens por centímetro

K es la constante de celda por centímetro

G es la conductancia en miliSiemens.

Se expresa el resultado más cercano a 0.01 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

8.7 Determinación de color (Escala Pfund)

8.7.1 Equipos e instrumentos de medición

Colorímetro Pfund (Escala 0-144 mm)

8.7.2 Procedimiento

Tomar una muestra de miel y colocarla directamente en la cubeta del colorímetro cubriéndola totalmente. Determinar el color de la muestra de miel comparándola contra la escala Pfund.

8.7.3 Cálculos y expresión de resultados

El resultado se debe emitir de acuerdo a la escala del aparato, y aplicar la corrección marcada para cada lectura conforme al siguiente cuadro:

Color	Graduación en mm
Blanco agua	0 - 8
Extra blanco	9 - 16
Blanco	17 - 34
Ámbar extra claro	35 - 50
Ámbar claro	51 - 84
Ámbar	85 - 114
Obscuro	115 - 140

8.8 Determinación de sólidos insolubles en agua

Disolver 20 g de miel en una cantidad adecuada de agua destilada a 353 K (80 °C) y mezclar, filtrar a través de un crisol fino de vidrio sinterizado "Shoot" (tamaño del poro de 15-40 μ) previamente secado y tarado a peso constante, lavar a fondo con agua caliente a 353 K (80 °C) hasta eliminación de los azúcares. Dejar secar el crisol durante una hora a 408 K (135 °C), enfriar y pesar con aproximación de 0.1 mg.

8.8.1 Cálculos

$$\% \text{ sólidos insolubles en agua} = \frac{\text{peso de sólidos insolubles} \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

8.9 Determinación del contenido de azúcar reductor

El método es una modificación del procedimiento de Lane y Eynon (1923), que consiste en reducir la modificación de Soxhlet de la solución de Fehling titulándola, en el punto de ebullición, con una solución de los azúcares reductores de la miel, utilizando azul de metileno como indicador interno. Para lograr la máxima exactitud en este tipo de determinación, es preciso que la reducción de la solución de Fehling durante el proceso de normalización y en la determinación de los azúcares reductores en la solución de miel se realice a volumen constante. Por lo tanto, es esencial efectuar una titulación preliminar para determinar el volumen de agua que debe añadirse antes de realizar las determinaciones para satisfacer este requisito.

8.9.1 Reactivos y soluciones

Modificación de Soxhlet de la solución de Fehling:

8.9.1.1 Solución A: Disolver 69.28 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) con agua destilada hasta obtener 1 litro de solución. Conservar durante un día antes de efectuar la titulación.

8.9.1.2 Solución B: Disolver 346 g de tartrato de potasio y sodio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 100 g de hidróxido de sodio (NaOH) con agua destilada hasta obtener 1 litro. Filtrar la solución con un filtro de asbesto preparado.

8.9.1.3 Solución patrón de azúcar invertido (10 g/l): Pesar exactamente 9.5 g de sacarosa pura, añadir 5.0 mL de ácido clorhídrico (HCl puro al 36.5 por ciento p/p, aproximadamente) y diluir con agua hasta obtener unos 100 mL; conservar durante varios días esta solución acidificada a la temperatura ambiente (alrededor de 7 días a 12 – 15 °C, o 3 días a 20 - 25 °C) y diluir después hasta 1 litro. (El azúcar invertido acidificado al 1.0 por ciento permanece estable durante varios meses). Neutralizar un volumen apropiado de esta solución con solución de hidróxido de sodio 1 N (40 g/L) inmediatamente antes de utilizarla y diluir hasta obtener la concentración necesaria (2 g/L) para la normalización. Disolver 2 g en agua destilada y diluir hasta 1 litro.

8.9.1.4 Crema de alúmina: Preparar una solución saturada fría de alumbre (sulfato de aluminio y potasio, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$) en agua. Añadir hidróxido de amonio agitando constantemente hasta obtener una solución alcalina al tornasol, dejar que el precipitado se sedimente; lavar por decantación con agua hasta que el agua procedente de los lavados, tratada con solución de cloruro de bario (12%) muestre sólo ligeros indicios de sulfato. Verter el agua sobrante y conservar la crema restante en una botella taponada.

8.9.2 Equipos e instrumentos de medición

8.9.2.1 Parrilla eléctrica con control de temperatura.

8.9.2.2 Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

8.9.3 Preparación de la muestra de ensayo

8.9.3.1 *Primer procedimiento (aplicable a mieles que pueden contener sedimentos).*

8.9.3.1.1 Tomar una muestra de 25 g (P1) de la miel homogeneizada, pesarla exactamente y ponerla en un matraz volumétrico de 100 mL; añadir 5 mL de crema de alúmina, diluir con agua a 20 °C hasta completar el volumen y filtrar.

8.9.3.1.2 Diluir 10 mL de esta solución con agua destilada hasta obtener 500 mL (solución diluida de miel).

8.9.3.2 *Segundo procedimiento.*

8.9.3.2.1 Pesar cuidadosamente una cantidad representativa de unos 2 g (P2) de la muestra de miel homogeneizada, disolver con agua destilada y diluir en un matraz graduado hasta obtener 200 mL de solución (solución de miel).

8.9.3.2.2 Diluir 50 mL de la solución de miel con agua destilada hasta obtener 100 mL (solución diluida de miel).

8.9.4 Normalización de la solución de Fehling modificada

Normalizar la solución A modificada de Fehling, de forma que 5.0 mL exactamente, mezclados con 5.0 mL, aproximadamente, de la solución B de Fehling, reaccionen por completo con 0.005 g de azúcar invertido, añadido en forma de 25 mL de solución diluida de azúcar invertido (2 g/L).

8.9.5 Titulación preliminar

Al final de la titulación de la reducción, el volumen total de los reactivos añadidos debe ser de 35 mL. Esto se consigue añadiendo el volumen adecuado de agua antes de comenzar la titulación. Puesto que en los criterios de composición de la norma para la miel se especifica que ésta debe contener más de 60% de azúcares reductores (calculados como azúcar invertido), es necesaria una titulación preliminar para determinar que el volumen de agua que es preciso añadir a una muestra dada para que permita asegurar que la reacción se realice a volumen constante. Para calcular el volumen de agua que hay que añadir, se resta de 25 mL del volumen de solución diluida de miel empleado en la titulación preliminar (X mL).

Verter con una pipeta volumétrica 5.0 mL de la solución A de Fehling en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, y añadir aproximadamente 5 mL de la solución B de Fehling. Añadir 7.0 mL de agua destilada, un poco de piedra pómez en polvo, u otro regulador adecuado de la ebullición, y adicionar con una bureta unos 15 mL de solución diluida de miel. Calentar la mezcla sobre una tela metálica y mechero o sobre una parrilla de calentamiento hasta lograr la ebullición. Mantener en ebullición moderada durante 2 minutos. Añadir 1.0 mL de solución acuosa de azul de metileno al 0.2 %, sin interrumpir la ebullición, y completar la titulación durante un tiempo total máximo de ebullición de 3 minutos, con pequeñas adiciones repetidas de solución diluida de miel, hasta que el indicador pierda el color. Se debe observar el color del líquido sobrenadante. Tomar nota del volumen total de solución de miel (X mL) que se ha utilizado.

8.9.6 Determinación

Calcular la cantidad de agua que es necesario añadir para que, al final de la titulación, el volumen total de los reactivos sea de 35 mL; para ello, restar de 25 mL la titulación preliminar (X mL) Verter con una pipeta 5.0 mL de la solución A de Fehling en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, y añadir aproximadamente 5.0 mL de la solución B de Fehling.

Añadir agua destilada (25 - X mL), un poco de piedra pómez en polvo u otro regulador adecuado de la ebullición y, de una bureta, todo el volumen, menos 1.5 mL de la solución diluida de miel determinada en la titulación preliminar. Calentar la mezcla sobre una tela metálica y mechero o sobre una parrilla de calentamiento, hasta lograr la ebullición y manteniéndola en forma moderada durante 2 minutos. Añadir 1.0 mL de solución de azul de metileno al 0.2 por ciento sin interrumpir la ebullición hasta los 3 minutos, con pequeñas adiciones repetidas de solución diluida de miel, hasta que el indicador pierda el color. Tomar nota del volumen total de solución diluida de miel. La diferencia entre titulaciones duplicadas no debe ser mayor de 0.1 mL.

8.9.7 Cálculo y expresión de los resultados

Cuando se haya empleado el primer procedimiento (8.9.3.1):

$$C = \frac{25}{P1} \times \frac{1000}{Y1}$$

Cuando se haya empleado el segundo procedimiento (8.9.3.2):

$$C = \frac{2}{2} \times \frac{1000}{Y1}$$

P2 Y2

Donde:

$C = g$ de azúcar invertido por 100 g de miel

$P1 =$ peso (g) de la muestra de miel empleada según el procedimiento

$P2 =$ peso (g) de la muestra de miel empleada según el procedimiento

$Y1 =$ volumen (mL) de solución diluida de miel consumida durante la determinación efectuada según procedimiento

$Y2 =$ volumen (mL) de solución diluida de miel consumida durante la determinación efectuada según el procedimiento.

8.9.8 Criterios de aceptación y rechazo

Para la exactitud y la reproducibilidad de la determinación, es esencial establecer para cada muestra individual cual es el volumen de agua necesario para obtener un volumen total de mezcla reactiva en mL.

En la siguiente tabla se presentan algunos volúmenes típicos que es posible encontrar en la titulación preliminar para los contenidos de incremento del azúcar invertido indicados, en el supuesto de que la muestra de ensayo (primer procedimiento) pese unos 25 g o que la muestra de ensayo (segundo procedimiento) pese aproximadamente 2 g.

Por ciento de azúcar invertido y relación de agua destilada que se debe añadir.

CONTENIDO DE AZÚCAR INVERTIDO (%)	VOLUMEN DE AGUA DESTILADA QUE SE DEBE AÑADIR (mL)
60	8.3
65	9.6
70	10.7
75	11.6

8.10 Determinación de hidroximetilfurfural (HMF)

8.10.1 Método Winkler

8.10.1.1 Reactivos y soluciones

8.10.1.1.1 Agua grado cromatográfico.

8.10.1.1.2 Ácido acético glacial grado reactivo.

8.10.1.1.3 Isopropanol grado reactivo.

8.10.1.1.4 Para- toluidina especial para análisis de hidroximetilfurfural.

8.10.1.1.5 Ácido barbitúrico.

8.10.1.1.6 Estándar de hidroximetilfurfural con una pureza de 99 % aproximadamente.

8.10.1.2 Material

8.10.1.2.1 Frasco color ámbar de 100 y 1000 mL.

8.10.1.2.2 Gradilla para tubos de ensayo.

8.10.1.2.3 Matraz Erlenmeyer de 125 mL.

8.10.1.2.4 Matraces volumétricos de 50, 100 y 250 mL.

8.10.1.2.5 Papel filtro Whatman.

8.10.1.2.6 Pipeta de 250 mL.

8.10.1.2.7 Pipeta volumétrica de 1, 2 y 5 mL.

8.10.1.2.8 Tubos de ensayo de 18 x 150 mm.

8.10.1.2.9 Vaso de precipitado de 100 mL.

8.10.1.3 Equipos e instrumentos de medición

8.10.1.3.1 Espectrofotómetro ultravioleta visible

8.10.1.3.2 Agitador Vórtex**8.10.1.3.3** Balanza Analítica**8.10.1.3.4** Baño María**8.10.1.3.5** Pipeteador automático ó propipeta**8.10.1.3.6** Refrigerador**8.10.1.4 Preparación de soluciones**

8.10.1.4.1 Ácido barbitúrico 0.5 %: Pasar por un matraz volumétrico de 100 mL, 500 mg de ácido barbitúrico, disolver en aproximadamente 70 mL de agua destilada en baño María, enfriar y completar hasta el volumen.

8.10.1.4.2 p-toluidina 10 %: Disolver en un matraz volumétrico de 100 mL, 10 g de p-toluidina con 50 mL de isopropanol, calentando suavemente en baño maría, enfriar, agregar 10 mL de ácido acético glacial y llevar al volumen con isopropanol. Dejar reposar 24 horas antes de usar. Guardar en frasco ámbar en refrigeración.

8.10.1.5 Preparación de estándares

Solución stock de HMF: Pesar 20 mg aproximadamente de estándar de hidroximetilfurfural, diluir con agua destilada y llevar a volumen de 100 mL.

8.10.1.6 Preparación de la curva estándar de HMF

Preparar diluciones de HMF que contengan 1, 2, 3, 4, y 5 µg/mL, agregar 5.0 mL de p-toluidina y 1.0 mL de ácido barbitúrico, agitar por 1 ó 2 minutos. Transferir rápidamente a celdas de 1.0 cm de paso de luz y leer la absorbancia a 550 nm cuando haya alcanzado su máximo desarrollo de color (1 a 4 minutos), utilizando agua tratada de igual manera como en el testigo.

8.10.1.7 Preparación de la muestra y determinación

Disolver 10 g de miel con 20 mL de agua, tomar con pipeta 2 alícuotas de 2.0 mL de solución de miel y agregar a cada uno 5.0 mL de p-toluidina. A uno de los tubos agregar 1.0 mL de agua (testigo) y al otro 1.0 mL de ácido barbitúrico, agitar por 1 o 2 minutos. Transferir rápidamente a celdas de 1 cm y leer la absorbancia de la muestra a 550 nm, ajustando a cero con el testigo.

8.10.1.8 Cálculos y expresión de los resultados

Determinar el contenido de HMF interpolando el valor de absorbancia obtenida en la gráfica preparada con las absorbancias de la curva de calibración o utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{mg de HMF/100 g de miel} = \frac{(\text{Absorbancia de la muestra}) (10)}{\text{g de muestra}} \times 19.2$$

Dónde: 19.2 = Factor de extinción molar del HMF

8.10.2 Método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HMF método HPLC)

El Hidroximetilfurfural (HMF) es determinado en una solución acuosa de miel limpia y filtrada, usando un HPLC de fase reversa con detector UV, las señales de las muestras son comparadas con soluciones estándares de concentración conocida.

8.10.2.1 Material

8.10.2.1.1 Matraz volumétrico clase "A" de 50 mL y 100 mL.

8.10.2.1.2 Sistema de filtración con membranas 0.45 µm.

8.10.2.1.3 Acrodiscos de 0.45 µm.

8.10.2.1.4 Viales con tapa de teflón para HPLC.

8.10.2.1.5 Tubos de centrifuga de polipropileno con tapón de rosca.

8.10.2.1.6 Matraz Kitazato.

8.10.2.1.7 Pipetas clase "A".

8.10.2.1.8 Micropipeta volumen adecuado.

8.10.2.2 Reactivos

8.10.2.2.1 Agua HPLC.

8.10.2.2.2 Metanol HPLC.**8.10.2.2.3 Estándar de 5-Hidroximetil-2-furancarbaldehído (HMF).****8.10.2.3 Equipos e instrumentos de medición****8.10.2.3.1 Sistema de cromatografía de líquidos.****8.10.2.3.2 Sistema de bombas.****8.10.2.3.3 Detector de UV-Visible o arreglo de diodos de longitud de onda variable.**

8.10.2.3.4 Columna HPLC de 250 x 4.6 mm o 125 x 4.6 mm empacada con ODS (C18) de 5 mm de tamaño de partícula.

8.10.2.3.5 Inyector manual o automuestreador con loop de 20 mL.**8.10.2.3.6** Sistema de desgasificación por helio, membrana de vacío, ultrasonido o agitación.**8.10.2.3.7** Graficador, integrador electrónico o estación de datos con el software cromatográfico apropiado.**8.10.2.3.8** Agitador mecánico.**8.10.2.3.9** Balanza Analítica.**8.10.2.4 Preparación de soluciones**

Estándar stock: Cuidadosamente pesar 10 mg del estándar de referencia de Hidroximetilfurfural dentro de un matraz ámbar de 100 mL con tapón, disolver y llevar a volumen con agua destilada, tapar y agitar.

8.10.2.5 Preparación de la curva estándar de HMF

Preparar una matriz de soluciones acuosas con concentraciones de 1, 2, 5, y 10 mg/L estas soluciones se tienen que preparar el día de su uso; filtrar cada uno de los estándares dentro de los viales usando un acrodisco de 0.45 µm tapar el vial con septa de teflón.

8.10.2.6 Preparación de la muestra

Cuidadosamente pesar 10 g de la muestra de miel disolver en aproximadamente 25 mL de agua destilada y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL diluir a volumen con agua destilada, filtre la solución a través de una membrana 0.45 µm, esta solución está lista para leer en el cromatógrafo.

8.10.2.7 Procedimiento

Fijar los siguientes parámetros cromatográficos de acuerdo con el manual de operación del equipo:

8.10.2.7.1 Flujo: 0,5 mL/min**8.10.2.7.2** Fase móvil: Agua 90%, Metanol 10%.**8.10.2.7.3** Longitud de onda: 285 nm**8.10.2.7.4** Volumen de inyección: 20 mL**8.10.2.7.5** Tiempo de análisis: aproximadamente 7 minutos.

8.10.2.7.6 Correr la fase móvil a través del sistema a un flujo de 0.5 mL/min hasta obtener una línea base estable. Inyectar 20 mL de cada una de las soluciones patrón. Obtener el cromatograma de cada una de ellas. Elaborar una curva de calibración, graficando el área del pico en función de la concentración. Ajustar la curva por medio de mínimos cuadrados (regresión lineal). De la misma forma inyectar las muestras filtradas y obtener su cromatograma. Identificar el pico correspondiente a HMF comparando el tiempo de retención contra el obtenido en las soluciones patrón. Calcular la concentración a partir de la curva de calibración. Asegurarse de que las concentraciones de HMF de las muestras caen dentro del intervalo de la curva de calibración. De no ser así, efectuar la dilución correspondiente y volver a analizar.

8.10.2.8 Cálculos y expresión de resultados

De la ecuación de la recta obtenida: $y = mx + b$

Donde:

$y =$ área del pico correspondiente al HMF en la muestra.

$m =$ pendiente,

$x =$ concentración de HMF en la muestra (mg/L).

$b =$ ordenada al origen.

Despejar X para obtener la concentración de HMF en la muestra y aplicar la siguiente fórmula:

mg/kg de HMF = (Conc. de HMF en la muestra) (50) (factor de dilución 10)

8.11 Determinación de la actividad de la diastasa

Se basa en el método de Schade y otros (1958), modificado por White y otros (1959) y por Hadorn (1961).

8.11.1 Reactivos y soluciones

8.11.1.1 Solución primaria de yodo: Disolver 8.8 g de yodo reactivo analítico, en 30 ó 40 mL de agua que contenga 22 g de yoduro de potasio reactivo analítico, y diluir con agua destilada en un matraz aforado de 1 litro, aforar a volumen.

8.11.1.2 Solución de yodo 0.0007 N: Disolver 20 g de yoduro de potasio reactivo analítico en un matraz volumétrico de 500 mL con 30 ó 40 mL de agua destilada. Añadir 5.0 mL de solución primaria de yodo y aforar al volumen. Preparar una solución nueva cada dos días.

8.11.1.3 Amortiguador de acetato -pH 5.3: Disolver 87 g de acetato de sodio trihidratado ($\text{Na CH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 400 mL de agua destilada, añadir unos 10.5 mL de ácido acético glacial disolver en un poco de agua destilada y completar hasta 500 mL. Ajustar el pH a 5.3 con acetato de sodio o ácido acético, según el caso, utilizando un potenciómetro.

8.11.1.4 Solución de cloruro de sodio 0.5 M: Disolver 14.5 g de cloruro de sodio (NaCl), reactivo analítico, en agua destilada hervida, y completar hasta 500 mL transferir a un frasco ámbar con tapón hermético; el tiempo de conservación está limitado por la formación de moho.

8.11.1.5 Solución de almidón:

8.11.1.5.1 Preparación de almidón soluble: En un matraz cónico sumergido en un baño de agua, y provisto de un refrigerante de reflujo, hervir durante una hora 20 g de fécula de papa, en una mezcla de 100 mL de etanol al 95% y 7.0 mL de ácido clorhídrico 1 M. Enfriar, filtrar a través de un crisol filtrante con placa cerámica y tamaño de los poros de 90 a 150 μm ; lavar con agua hasta que el agua de lavado no dé reacción a los cloruros. Dejar escurrir perfectamente y secar el almidón al aire a 35 °C. El almidón soluble debe conservarse en un frasco de vidrio ámbar con tapón hermético.

8.11.1.5.2 Determinación del contenido de humedad del almidón soluble: Pesar con exactitud una cantidad de, aproximadamente, 2 g de almidón soluble y extenderla formando una capa delgada sobre el fondo de un pesafiltros (diámetro de aproximadamente 5 cm). Secar durante una hora y media a 130 °C. Dejar enfriar en un desecador y pesar de nuevo. La pérdida de peso respecto de 100 g representa al contenido de humedad. El contenido de humedad de dicho almidón debe ser de 7-8 % m/m, según la humedad del aire en que se ha secado la muestra.

8.11.1.5.3 Preparación de la solución de almidón: Emplear un almidón con un índice de azul comprendido entre 0.5 – 0.55 (Unidades de absorbancia = índice de azul) utilizando una celda de vidrio de 1 cm de paso de luz; para determinar el índice de azul utilícese el método descrito más adelante. Pesar una cantidad de almidón equivalente a 2.0 g de almidón anhídrido. Mezclar con 90 mL de agua en un matraz cónico de 250 mL. Llevar rápidamente a ebullición, agitando la solución cuando sea posible, calentando sobre una parrilla eléctrica o utilizando mechero con malla de alambre grueso preferiblemente con el centro de asbesto. Hervir con suavidad durante 3 minutos, tapar y dejar enfriar espontáneamente hasta la temperatura ambiente. Trasvasar a un matraz volumétrico de 100 mL en un baño de agua a 40 °C hasta que el líquido alcance esa temperatura, y completar hasta volumen a 40 °C.

8.11.2 Método para determinar el índice de azul del almidón

Disolver, por el método anterior, una cantidad de almidón equivalente a 1 g de almidón anhídrido; enfriar la solución, añadir 2.5 mL de solución amortiguadora de acetato y completar el volumen de 100 mL del matraz volumétrico. Mezclar en un matraz volumétrico de 100 mL, 75 mL de agua destilada, 1 mL de ácido clorhídrico 1 M y 1.5 mL de solución de yodo 0.02 N. A continuación, añadir 0.5 mL de solución de almidón y completar con agua hasta el volumen. Dejar reposar una hora en la oscuridad y leer después en un espectrofotómetro a 660 nm, empleando una celda de vidrio de 1 cm de paso de luz, y un testigo que contenga todos los reactivos, excepto la solución de almidón. La lectura en la escala de absorbancia = índice de azul.

8.11.3 Equipos e instrumentos

8.11.3.1 Baño de agua a 40 \pm 0.2 °C.

8.11.3.2 Espectrofotómetro que permita leer a 660 nm.

8.11.4 Muestreo y preparación de las muestras

La muestra de miel se prepara como se indica en el punto 7.1.2, sin calentar.

8.11.5 Preparación de las muestras de ensayo

Solución de miel: pesar 10.0 g de miel en un vaso de precipitados de 50 mL y añadir 5.0 mL de solución amortiguadora de acetato y 20 mL de agua destilada para disolver la muestra. Disolver completamente la

muestra agitando la solución fría. Adicionar 3.0 mL de solución de cloruro de sodio en un matraz aforado de 50 mL, pasar a este matraz la muestra de miel disuelta y completar el volumen hasta 50 mL.

Es esencial que la miel haya sido mezclada con la solución amortiguadora antes de entrar en contacto con el cloruro de sodio.

8.11.6 Normalización de la solución de almidón

Calentar la solución de almidón a 40 °C y con una pipeta adicionar 5 mL de esta solución en 10 mL de agua a 40 °C, mezclar bien. Mediante una pipeta, verter 1.0 mL de esta última solución en 10 mL de solución de yodo 0,0007 N, diluida con 35 mL de agua y mezclar bien. Leer la absorbancia a 660 nm contra un testigo de agua, utilizando una celda de vidrio 1 cm. La absorbancia debe ser de 0.760 ± 0.020 . En caso necesario, ajustar el volumen de agua añadido hasta la absorbancia exacta.

8.11.7 Determinación de la absorbancia mediante una pipeta

Verter 10 mL de solución de miel en una probeta graduada de 50 mL y colocar ésta en un baño de agua a 40 ± 2 °C, justo con el matraz que contiene la solución de almidón. Transcurrido 15 minutos, adicionar con una pipeta 5.0 mL de solución de almidón en la solución de miel, mezclar y poner en marcha un cronómetro. A intervalos de 5 minutos, tomar porciones de 1.0 mL y adicionarlas con 10 mL de solución de yodo 0.0007 N. Mezclar. Determinar inmediatamente la absorbancia a 660 nm en el espectrofotómetro, empleando una celda de 1 cm. Seguir tomando porciones de 1.0 mL a intervalos hasta lograr una absorbancia menor de 0.235.

8.11.8 Cálculos y expresión de los resultados

Representar gráficamente la absorbancia en función del tiempo (minutos) sobre un papel cuadrulado. Trazar una línea recta que una por lo menos los tres últimos puntos de la gráfica, para determinar el momento en que la mezcla de reacción alcanza la absorbancia de 0.235. Dividir 300 por el tiempo en minutos para obtener el índice de diastasa (ID). Este índice expresa la actividad de la diastasa en mililitros de solución al 1 por ciento hidrolizada por la enzima contenida en 1 g de miel, en 1 hora, a 40 °C. Este índice de diastasa corresponde al índice de la escala de Gothe.

Actividad de la diastasa = mililitros de solución de almidón (1 %) / gramos de miel / hora a 40 °C.

8.12 Determinación de dextrinas

8.12.1 Procedimiento

En una cápsula de porcelana disolver, con aproximadamente 4.0 mL de agua, 8 g de miel (4 g para miel oscura), transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, en caso de quedar residuos en la cápsula, disolver con 2.0 mL de agua, agregar esta solución al matraz y lavar la cápsula con 2 porciones de 1.0 mL de agua, agregar 5.0 a 6.0 mL de alcohol absoluto antes de cada decantación.

Llevar el matraz al volumen con alcohol absoluto, agitado constantemente. Dejar que las dextrinas se sedimenten y el líquido sea claro. Decantar el líquido claro a través de papel filtro y lavar el residuo del matraz con 10 mL de alcohol, pasando los lavados a través del filtro. Disolver las dextrinas en el matraz con agua hirviendo y filtrar en el papel ya usado, lavar recibiendo el filtrado en una cápsula tarada conteniendo arena seca, el matraz y el filtro varias veces con pequeñas porciones de agua caliente. Evaporar en baño de agua seca hasta peso constante a 343 K (70 °C) bajo una presión de aproximadamente 50 mm de mercurio.

Disolver las dextrinas con agua y llevar a volumen conocido con agua, usando 50 mL de agua por cada 0.5 g de precipitado. Determinar los azúcares reductores antes y después de la inversión.

8.12.2 Cálculos y expresión de los resultados

Calcular el peso de azúcar invertida después de la inversión y el de sacarosa.

Cálculos para dextrinas:

$$\text{g de dextrinas} = \text{g del filtrado} \times (\text{g azúcares reductores} + \text{g azúcar invertida} + \text{sacarosa})$$

$$\% \text{ de dextrinas} = \frac{\text{g de dextrinas}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

8.13 Determinación de las características sensoriales

8.13.1 Preparación de la muestra

Las muestras se pueden preparar en dos diferentes formas.

8.13.1.1 Muestra de miel líquida

Esta preparación debe utilizarse para evaluar las características gustativas olfativas en la forma en que son percibidas por el consumidor. Se colocan alrededor de 30 a 40 g de la muestra en un vaso de cristal que luego se cubre con una tapa (por ejemplo, caja de Petri o papel de aluminio). La miel se debe transferir de tal manera que se minimice cualquier alteración debida a la manipulación. La temperatura de la muestra debe

estar entre 18 y 25 ° C. La evaluación debe realizarse dentro de las 24 h posteriores a la preparación de la muestra. La cantidad de 30 a 40 g se recomienda para un vaso de prueba con una capacidad total de aproximadamente 130 ml. Se pueden usar recipientes de diferentes dimensiones, manteniendo la relación muestra / volumen cerca de 1 / 4 –1 / 5.

8.13.1.2 Muestra de miel cristalizada.

La muestra debe diluirse cuando se considere que características como el estado físico y tipo de cristalización puede afectar negativamente la reproducibilidad del método. La dilución es para evaluar las características olfativas y la conformidad con un perfil botánico. La muestra se prepara de la siguiente manera: una porción de la muestra se diluye con agua destilada o con bajo contenido de minerales, en proporciones de 1 parte de agua a 5 partes de miel (en peso), de modo que el contenido final de agua de la mezcla es de aproximadamente 30%. La mezcla se homogeniza, si todavía están presentes algunas partes cristalizadas, es posible calentar la solución en un recipiente cerrado en baño maría a no más de 40°C, hasta que los cristales de azúcar estén completamente disueltos. Posteriormente la muestra se coloca en un vaso de cristal y se sigue el procedimiento descrito para la muestra de miel líquida.

8.13.2 Evaluación

8.13.2.1 Condiciones generales

El evaluador deberá abstenerse de fumar, usar pasta de dientes, enjuagues bucales, perfumes o comer y solo podrá beber agua durante los 30 minutos previos a la evaluación. Entre cada evaluación de muestras, deben transcurrir al menos 30 minutos.

8.13.2.2 Evaluación de las características olfativas.

En el caso de muestras de miel líquida, con la ayuda de un agitador de vidrio o plástico, ésta se deberá extender sobre la superficie de un vaso de cristal, para fomentar la liberación de sustancias volátiles; el olor se evaluará inmediatamente después. En el caso de muestras de miel cristalizada una vez diluida, es suficiente hacer girar la muestra en el vaso de cristal para estimular la liberación de sustancias volátiles. El evaluador deberá inhalar durante unos segundos sobre la parte superior del vaso. El olor debe evaluarse inmediatamente después de haber extendido o hecho girar la miel después de 10 a 20 segundos. Antes de evaluar por segunda vez la muestra, se deberá esperar 20 segundos como mínimo, para percibir todo el olor.

8.13.2.3 Evaluación de las características gustativas

Se toma una muestra de 1 a 2 g de miel con una cuchara desechable o de acero inoxidable. Se deberá dejar que la miel se disuelva en la boca antes de ser tragada lentamente, de modo que se pueda percibir el sabor, el aroma (intensidad y calidad), la persistencia, cualquier sabor posterior y otras sensaciones en la boca. La evaluación se enfocará sobre los aspectos gustativos y no en la consistencia de la muestra. Se debe permitir que transcurran al menos 2 minutos antes de una segunda degustación de la misma muestra, para que las papilas gustativas se recuperen antes de volver a probar, a fin de detectar detalles que pueden no haberse detectado la primera vez. Entre cada evaluación de muestras, deben transcurrir al menos 30 minutos y deberá enjuagarse la boca con agua.

8.14 La Secretaría, previa opinión técnica del Subcomité Especializado en Ganadería, podrá autorizar métodos de prueba diferentes a los establecidos en la presente Norma, cuando se demuestre evidencia científica u objetiva necesaria que compruebe que con la metodología planteada se permite identificar jarabes de azúcar derivado de diferentes vegetales, edulcorantes sintéticos y sus mezclas diseñadas para ocultar la adulteración de la miel, debido al desarrollo de métodos sofisticados de adulteración. Dicha autorización será mediante Acuerdo publicado en el Diario Oficial de la Federación, el cual deberá ser presentado para su aprobación ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria.

9. Etiquetado

9.1 El etiquetado deberá sujetarse a lo establecido en la *NOM-145-SCFI-2001 Información comercial-etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones* y en la *NOM-051-SCFI/SSA1-2010-Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria*. Además el producto que sea etiquetado como miel, al momento de ser envasado deberá cumplir con lo indicado en la presente Norma Oficial Mexicana y especificar su país de origen. En caso de mezclas que contengan miel procedente de diferentes países, se debe especificar la proporción.

10. Miel como ingrediente

10.1 Los productos que ostenten contener miel como ingrediente, ésta deberá cumplir las especificaciones establecidas en la presente Norma.

11. Evaluación de la conformidad

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

11.2 Considerando el cumplimiento de los numerales 4.1 al 4.8 relacionados con la producción de miel a nivel nacional, para la comercialización no será necesario presentar los análisis de laboratorio. Cuando por conocimiento o sospecha de adulteración, el o los particulares requieran constatar las características del producto, los gastos que se originen por concepto de envío y análisis de muestras de miel, serán cubiertos por el solicitante y en su caso por quien resulte infractor de la presente Norma.

12. Sanciones

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

13. Bibliografía

13.1 Codex Stan 12-1981, Rev. En 1987 y 2001.

13.2 Manual de Apicultura Básica. SAGARPA 2001.

13.3 CONABIO 2008. Mieles Peninsulares y Diversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad-Corredor Biológico Mesoamericano-México. México.

13.4 Directiva 2001/110/CE del Consejo de la Unión Europea, relativa a la miel, publicada el 20 de diciembre de 2001.

13.5 Bogdanov S., Martin P. and Lüllmann C. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*. Extra issue 1: 59.

13.6 María Piana, Livia Oddo, Antonio Bentabol, Etienne Bruneau, Stefan Bogdanov, *et al.* Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, Springer Verlag, 2004, 35 (Supl. 1), pp.S26- S37. DOI: 10.1051 / apido: 2004048. hal-00891892

14. Disposición transitoria

Artículo único. La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 190 días naturales siguientes al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Ciudad de México, a 14 de febrero de 2020.- El Subsecretario de Alimentación y Competitividad de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, **Víctor Suárez Carrera**.- Rúbrica.