

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

## **NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.**

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

JUAN JOSÉ LINARES MARTÍNEZ, Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación con fundamento en los Artículos 35 fracción IV y XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 38 fracciones II y IX, 40 último párrafo, 41, 43, 44, 45, 46, 47 fracción IV, 52, 62, 63, 64, 73 y 74 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1, 2 inciso B fracción XVII, 17 fracciones I, XII y XXIII, 28 y 29 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, he tenido a bien expedir la presente:

### **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SAG/GAN-2017, PROPÓLEOS, PRODUCCIÓN Y ESPECIFICACIONES PARA SU PROCESAMIENTO**

#### **ÍNDICE**

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

#### **0. Introducción**

**0.1** El avance en el conocimiento y usos medicinales de propóleos a nivel nacional e internacional, ha generado un incremento en su consumo y como consiguiente una mayor demanda por la sociedad.

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

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

#### **1. Objetivo y campo de aplicación**

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

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

**1.3** Previo a la comercialización al interior del país, cada lote de propóleos importado, deberá ser analizado bajo las especificaciones establecidas en la presente norma, demostrado con los resultados de laboratorio oficial, laboratorios aprobados o autorizados por la Secretaría o laboratorios acreditados y aprobados en los términos de lo dispuesto por la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

**1.4** La aplicación de las disposiciones contenidas en esta Norma compete a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través de la Coordinación General de Ganadería, así como a las Delegaciones de la SAGARPA y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

## **2. Referencias**

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

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

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

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

## **3. Definiciones**

Para efectos de esta Norma, se entiende por:

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

**3.2 Compuestos fenólicos:** Son compuestos aromáticos, que, junto a los flavonoides, le confieren a los propóleos sus usos y aplicaciones biológicas; los principales compuestos fenólicos de los propóleos son: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido benzoico, ésteres de ácido caféico, como el CAPE (feniletil éster del ácido caféico, por sus siglas en inglés), entre otros.

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

**3.4 Flavonoides:** Compuestos orgánicos hidroxilados derivados de la 2-fenilbenzopiran-4-ona (también llamada 2-fenil-4H-cromen-4-ona), y sistemas reducidos en C2-C3 y/o C4 provenientes de exudados vegetales con múltiples aplicaciones.

**3.5 Impurezas:** Elementos ajenos a los propóleos, que han sido incorporados durante el proceso de recolección por las abejas y manipulación de éste (resto de insectos, madera, papel, basura, entre otros).

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

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

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

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

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

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

#### 4. Consideraciones generales

##### 4.1 Producción de propóleos.

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

##### 4.2 Recolección de propóleos.

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

#### 5. Especificaciones físicas, químicas y actividad antimicrobiana

##### 5.1 Especificaciones físicas.

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

##### 5.2 Especificaciones químicas.

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

Determinación cuantitativa	Parámetros
Compuestos fenólicos	Expresados como equivalentes de ácido gálico: mínimo 5% (peso/peso)
Flavonoides	Expresados como equivalentes de quercetina: mínimo 0.5% (peso/peso)
Actividad antioxidante (CA <sub>50</sub> )	Mínimo 100 microgramos/mililitro

### 5.3 Actividad antimicrobiana.

A todas las muestras deberán de realizarse análisis sobre la actividad antimicrobiana frente a los siguientes microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC), *Escherichia coli* (ATCC) y *Candida albicans* (ATCC), por ser algunos de los de mayor incidencia en la salud pública.

El laboratorio oficial, aprobado o autorizado, deberá emitir el resultado de la actividad antimicrobiana indicando el número de la cepa de referencia ATCC utilizada en el análisis.

## 6. Métodos de prueba

### 6.1 Acondicionamiento de la muestra.

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

### 6.2 Para las especificaciones físicas.

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

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

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

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

### 6.3 Para las Especificaciones químicas.

#### 6.3.1 Preparación del Extracto Etanólico de Propóleos (EEP).

Pesar una cantidad de 50 gramos de los propóleos en bruto, previamente acondicionada, añadir etanol al 70% en propóleo: disolvente 1:3 y dejar macerar por un período de 72 horas con agitación constante o extraer con baño ultrasónico por 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo filtrar y el filtrado se concentra (utilizando preferentemente un Rotovapor o a vacío), pasar el extracto a un envase ámbar, empleando la mínima cantidad de etanol al 70%, y dejar a sequedad utilizando una bomba de vacío. Debe conservarse en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

#### 6.3.2 Prueba cualitativa de flavonoides.

Para la detección de flavonoides se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Un color amarillo intenso es característico de los flavonoides.

##### 6.3.2.1 Preparación de reactivos.

Hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Pesar 10 gramos y disolver en 25 mililitros de agua destilada. Agitar después de enfriar y aforar a 50 mililitros.

##### 6.3.2.2 Procedimiento.

**a)** Pesar 200 miligramos de los propóleos en bruto o EEP y añadir 1 mililitro de etanol al 70% y mezclar perfectamente.

**b)** Añadir una gota de NaOH al 20% y observar un cambio de coloración que va del amarillo a naranja de acuerdo a la cantidad de flavonoides presentes.

#### 6.3.3 Prueba cualitativa de fenoles totales.

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

**6.3.3.1 Preparación de reactivos.**

Cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) al 10%: Pesar 1 gramo y disolver en 10 mililitros de agua destilada caliente, posteriormente aforar a 100 mililitros.

Etanol al 70%: Medir 72.9 mililitros de alcohol etílico al 96% y aforar a 100 mililitros con agua destilada.

**6.3.3.2 Procedimiento.**

a) Colocar 200 miligramos de los propóleos en bruto o EEP en un vaso de precipitados de 10 mililitros y añadir 1 mililitro de etanol al 70%.

b) Mezclar y agregar una gota de la solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 1% y observar el desarrollo de color.

c) En caso de la presencia de fenoles, se observará un precipitado y una coloración azul, verde, rojo, morado o negro.

**6.3.4 Índice de oxidación.**

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

**6.3.4.1 Preparación de reactivos.**

Permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0.1 N.

a) Pesar en vidrio de reloj, 3.2 g de  $\text{KMnO}_4$  sólido, pasar a un matraz Erlenmeyer de 1000 mL y adicionar 250 mL de agua destilada.

b) Tapar con un vidrio de reloj, calentar y agitar la solución hasta la disolución completa del sólido.

c) Agregar 250 mL de agua destilada y calentar hasta ebullición durante 15 min y mantener la solución caliente durante 1 h, sin ebullición.

d) Dejar enfriar la solución hasta temperatura ambiente durante 12 h y posteriormente filtrar por lana de vidrio o crisol de porcelana, no con papel, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 1000 mL, lavando el matraz Erlenmeyer empleado anteriormente y el material en el filtro, con la menor cantidad de agua destilada posible y aforar a 1000 mL.

e) Finalmente, el líquido filtrado se pasa a un frasco ámbar (bien limpio y exento de materia orgánica).

f) En caso de presentar precipitado, es necesario filtrar antes de su uso.

Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 20%. Colocar 30 mL de agua destilada en un matraz aforado de 100 mL colocado en un baño de hielo, agregar lentamente 21 mL de ácido sulfúrico concentrado al 96% y aforar con agua destilada. Precaución: la reacción libera calor. Precaución: la reacción libera calor.

**6.3.4.2 Procedimiento.**

a) Pesar 20 miligramos de los propóleos en bruto o EEP y añadir 5 mililitros de etanol al 70%.

b) Añadir 95 mililitros de agua destilada, agitar hasta homogeneizar la mezcla y filtrar a gravedad.

c) Tomar 10 mililitros de esta solución y aforar a 100 mililitros con agua destilada.

d) Tomar 2 mililitros de la solución diluida y añadir 1 mililitro de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20% y agitar un minuto.

e) Añadir una gota de  $\text{KMnO}_4$  0.1 N, sin tocar las paredes.

f) Cronometrar y registrar el tiempo en que tarda en desaparecer el color rosa del  $\text{KMnO}_4$ .

**6.3.5 Compuestos fenólicos: método de Folin-Ciocalteu.**

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

**6.3.5.1 Preparación de reactivos.**

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

Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20%: Disolver 20 gramos de carbonato de sodio anhidro en 70 mililitros de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 100 mililitros con agua destilada.

#### 6.3.5.2 Procedimiento.

Trazado de la curva de calibración.

a) A partir de la solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL).

b) A cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mililitro.

#### 6.3.5.3 Preparación de las muestras.

Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 microlitros de ésta y agregar 750 microlitros de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

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

a) Tomar 1 mililitro de cada concentración y añadir 6 mililitros de agua destilada.

b) Adicionar 500 microlitros de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos.

c) Adicionar 1.5 mililitros de la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y aforar con agua destilada hasta un volumen de 10 mililitros, se observará un cambio de color a azul.

d) Esperar 2 horas a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.

e) Graficar la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico.

f) Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico/g de extracto o en porcentaje (%).

#### 6.3.6 Cuantificación de flavonoides.

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

##### 6.3.6.1 Preparación de reactivos.

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

Tricloruro de aluminio,  $\text{AlCl}_3$  (2%): Disolver 2 gramos de cloruro de aluminio en agua destilada y aforar a 100 mililitros con agua destilada con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.

##### 6.3.6.2 Preparación de la muestra.

Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 microlitros de ésta y agregar 750 microlitros de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

##### 6.3.6.3 Procedimiento

###### 6.3.6.3.1 Preparación de la curva de calibración:

A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener concentraciones seriadas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90  $\mu\text{g/mL}$  (ppm).

###### 6.3.6.3.2 Preparación del blanco de muestra.

Tomar 1 mililitro de la solución del EEP (0.05 mg/mL) y agregar 1 mililitro de metanol grado reactivo.

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

a) Adicionar a cada tubo, 1 mililitro de la solución de  $\text{AlCl}_3$ , esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-VIS.

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

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

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

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

**6.3.7.1 Preparación de reactivos.**

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

Solución de DPPH• (100 µM). Pesar 2 miligramos, disolver y aforar a 50 mililitros con metanol grado reactivo. Conservar protegido de la luz y en refrigeración.

**6.3.7.2 Preparación de la muestra.**

Pesar 10 miligramos del EEP y disolver en metanol grado reactivo, aforar a 10 mililitros.

Las concentraciones a preparar y a evaluar son en un rango de 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 250 µg/mL.

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

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

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

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

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

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

$\% \text{ de reducción} = (\text{Absorbancia del DPPH}\bullet) - [\text{Absorbancia de la mezcla (DPPH}\bullet + \text{ compuesto problema)}] * 100$

**6.4 Para la actividad antimicrobiana.****6.4.1 Método de difusión en agar.**

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

**6.4.1.1 Preparación de reactivos.**

Estándar No. 0.5 de MacFarland: añadir 500 microlitros de sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>) y aforar a 100 mililitros de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.36 N.

**6.4.1.2 Microorganismos de referencia.**

**a)** Bacterias:

*Staphylococcus aureus*: ATCC.

*Escherichia coli*: ATCC.

**b)** Levadura:

*Candida albicans*: ATCC.

**6.4.1.3. Medio de cultivo.**

Para conservación y preparación del inóculo:

Para bacterias: Caldo Müeller-Hinton (MH).

Para levadura: Caldo Dextrosa Sabouraud (SDA).

Se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

Para el método de difusión en agar

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

Se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

**6.4.1.4 Preparación de la muestra.**

Pesar 160 miligramos del EEP y disolver en 100 microlitros de etanol al 70%.

**6.4.1.5 Preparación de la suspensión de microorganismos.**

a) Tomar una asada de las colonias sembradas del microorganismo a evaluar y sumergirla en 5 mililitros de caldo Müeller-Hinton para bacterias o caldo Sabouraud para levaduras.

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

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

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

e) La comparación de la turbidez se realiza a 625 nm en el espectrofotómetro y la absorbancia debe de ser entre 0.08 – 0.10.

**6.4.1.6 Preparación de sensidiscos.**

Se emplearán discos de papel Whatman No. 5, de 5 mm de diámetro (previamente esterilizados). Los discos se impregnarán con 10 microlitros de la solución de EEP (160 mg/100 µL) para que tengan una concentración de 16 miligramos de EEP y se dejarán secar a temperatura ambiente por 24 horas.

**6.4.1.7 Procedimiento.**

a) A partir del inóculo con una concentración de  $1-5 \times 10^6$  UFC/ mL, realizar con un hisopo estéril un sembrado masivo sobre las placas de agar MH para bacterias y levaduras.

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

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

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

e) Como control negativo se emplearán discos impregnados con 10 microlitros de etanol al 70%.

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

**6.4.1.8 Resultados.**

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

**6.4.1.9 Interpretación.**

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

**7.1 Evaluación de la conformidad.**

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

**7.2** Los resultados emitidos por los laboratorios serán válidos para los propóleos de los productores solicitantes que provengan de un mismo lote y lugar de recolección y la vigencia de los resultados será de un año.

**8. Sanciones**

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

**9. Concordancia con normas y lineamientos internacionales**

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

**10. Bibliografía**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**10.12** Bankova, Vassia, *et al.*, (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, Journal of Apicultural Research, DOI: 10.1080/00218839.2016.1222661.

#### **11. Disposiciones transitorias**

**Artículo único.** La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor a los 180 días siguientes al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Ciudad de México, a 31 de agosto de 2017.- El Director General de Normalización Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Juan José Linares Martínez**.- Rúbrica.