



GUÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MIELES ARGENTINAS



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación

GUÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MIELES ARGENTINAS



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación

PRESENTACIÓN

Argentina se caracteriza por la calidad de sus mieles. Es un hecho!. Es reconocida a nivel internacional y puede ofrecer una gran variedad con distintas características y propiedades. Desde las mieles más claras hasta las más oscuras, dependiendo de las flores que dieron procedencia al néctar (origen botánico). Esta maravillosa variedad que nos ofrecen nuestras condiciones agroecológicas, representan la gran oportunidad de agregar valor a la apicultura argentina. Contamos con todo el conocimiento y talento de nuestros productores, ahora necesitamos mostrarlo y ofrecerlo al mundo con certezas de su origen y de sus cualidades. Así podremos ganar nuevos mercados externos y posicionar a las mieles de cada región en el mercado interno, esfuerzo que se ve potenciado por la incorporación de la Semana de la Miel al calendario nacional. Gran esfuerzo público privado que comienza a mostrar sus frutos.

Atendiendo a esta realidad la Secretaria de Gobierno de Agroindustria detectó la necesidad de trabajar en este aspecto para que el productor tenga nuevas herramientas que le permitan diferenciar su producto por calidad y que sea reconocido en consecuencia, generando otras alternativas de producción y de comercio. Este ha sido uno de los ejes y lineamientos del documento del Plan Estratégico 2030.

Esta guía, consensuada por un grupo de especialistas, los más reconocidos, a nivel nacional y que ha coordinado y desarrollado el INTA, es una herramienta muy importante para nuestro país e insumo imprescindible para lograr la caracterización de las mieles bajo una misma metodología, Es enorme el agradecimiento a este grupo de expertos que permite hoy contar con una herramienta más para la diferenciación y agregado de valor de nuestras mieles. Agradecemos el compromiso, esfuerzo y dedicación para lograr esta guía.

La diferenciación de nuestros alimentos es uno de los ejes abordados por la Secretaria de Agroindustria como elemento fundamental para esta etapa de la denominada globalización 4.0 donde el valor de los intangibles adquiere una fuerza enorme para potenciar nuestra oferta exportable. Así, nuestro Sistema informático de trazabilidad apícola es un ejemplo de esta nueva era y en el con el tiempo incorporaremos esta herramienta con las características de nuestras mieles para posicionarlas en el mundo. Trazaremos la miel tipificada y podremos darla a conocer a los consumidores del mundo. Este es nuestro gran desafío, y los invitamos a compartirlo!

MERCEDES NIMO
Directora Nacional de Alimentos y Bebidas

GUÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MIELES ARGENTINAS

Este documento es el resultado del trabajo interdisciplinario e interinstitucional de profesionales dedicados al estudio de distintos aspectos de la Caracterización de mieles de Apis mellifera.

› **Coordinadora**

Gurini, Laura Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA-PROAPI

› **Autoras**

Apablaza, Olga Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI
 Basilio, Alicia Universidad Nacional de Buenos Aires - UBA
 Ciappini, María Cristina Universidad Tecnológica Nacional - UTN Regional Rosario
 Fagúndez, Guillermina Universidad Autónoma de Entre Ríos - UADER - CONICET
 Gaggiotti, Mónica Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA
 Gutiérrez, Alicia (Profesional independiente)
 Salgado, Cristina R. Universidad Nacional del Nordeste - UNNE
 Instituto de Botánica del Nordeste - IBONE (UNNE- CONICET)
 Winter, Josefina Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI

› **Colaboradores**

Achával, Beatriz (Profesional independiente)
 Cabrera, Mirta Universidad Nacional de Formosa - UNaF
 Costa, Cristina Universidad Nacional de Córdoba - UNC
 Dedomenici, Ana Clara Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos (MAIBA)
 Dell Orco, Andrea Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI
 Elizondo, Andrea Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI
 Gurini, Laura Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA
 López, Carolina Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA
 Ohaco, Patricia Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI
 Sánchez, Ana Carina Universidad Nacional de Jujuy - UNJu
 Schreiber, Ezequiel Instituto Nacional de Tecnología Industrial - INTI
 Wanzenried, Rosana Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA

› **Las fotografías que ilustran la presente Guía fueron aportadas por:**

Apablaza, Olga. INTI Neuquén.
 Basilio, Alicia. FAUBA.
 Cabrera, Mirta. UNaF.
 Ciappini, Cristina. UTN, Fac. Reg. Rosario.
 Dedomenici, Ana Clara. MAIBA
 Fagúndez, Guillermina. CONICET.
 Francica, Karina. FAUBA.
 Gaggiotti, Mónica. INTA Rafaela.
 Melisa Geisa. IMBIV. UNC.
 Gurini, Laura. INTA Delta.
 López, Valeria. INTA Delta.
 Maldonado, Luis. INTA Famaillá.
 Sánchez, Ana C. UNJu.
 Tamame, Angélica. UNLPam.
 Varela, María S. UNMdP-INTA Balcarce.
 Winter, Josefina. INTI Neuquén.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	8
I. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	9
Introducción	9
Metodología	9
Método de muestreo	9
Métodos de análisis	10
Parámetros normados	10
Determinación del contenido de humedad	11
Determinación del contenido de minerales	11
Determinación de la Conductividad eléctrica	11
Determinación del contenido de cenizas	12
Determinación del perfil de minerales o elementos traza	12
Determinación de azúcares	12
Azúcares reductores y Sacarosa aparente	12
Perfil de azúcares/ Determinación de azúcares y relación fructosa/glucosa	12
Determinación de dextrinas totales	13
Determinación de la rotación específica	13
Determinación de la acidez	13
Determinación de la acidez libre, láctónica y total	13
Determinación del pH	14
Determinación del perfil de ácidos orgánicos	14
Determinación de la actividad diastásica	14
Determinación del hidroximetilfurfural (HMF)	14
Determinación de la actividad de la invertasa	15
Determinación del contenido de prolina	15
Determinación del color	15
Diferenciación entre miel de flores y miel de mielada o mezcla	17
Determinaciones relacionadas a propiedades bioquímicas y funcionales de la Miel	17
Determinación del contenido de aminoácidos libres	17
Determinación del contenido de prolina	17
Determinación del contenido de otros aminoácidos	18
Determinación de compuestos fenólicos	18
Determinación de la capacidad antioxidante	18
Bibliografía	19

II. ANÁLISIS POLÍNICO	21
Introducción	21
Metodología	22
Confección de patrones de referencia. Palinoteca	22
Muestreo	22
Procedimiento para la preparación del medio de montaje. Glicerina-gelatina	24
Procedimiento para polen con contenido celular. Técnica de Wodehouse (1935)	25
Procedimiento para polen sin contenido celular. Técnica de Erdtman (1960)	26
Estudios melisopalinológicos cualitativos	27
Muestreo	27
Procesamiento de muestras de miel. Técnica de Louveaux <i>et al.</i> (1978)	28
Identificación y conteo	29
Estudios melisopalinológicos cuantitativos	30
Método de la Inclusión de esporas foráneas (Moar, 1985, con modificaciones)	30
Cálculo e informe de resultados	31
Análisis melisopalinológicos cualitativos	31
Análisis melisopalinológicos cuantitativos	32
Aplicación del Análisis Polínico. Denominación/Caracterización/de las mieles	33
Origen Botánico	33
Origen Geográfico	33
Determinación de la precisión de los análisis	33
Otros métodos	33
Bibliografía	34
III. ANÁLISIS SENSORIAL	36
Introducción	36
Lugar de trabajo, condiciones y materiales	36
Lugar de trabajo y condiciones de ensayo para el panel	36
Materiales necesarios	37
Panel de evaluadores	37
Selección del Panel de Evaluadores	37
Entrenamiento del Panel de Evaluadores	38
Evaluación y Monitoreo del Panel de Evaluadores	39
Análisis Descriptivo Cuantitativo	39
Preparación de la Muestra	39
Ensayo	40
Expresión de Resultados	42
Otros Métodos de Evaluación Sensorial de Miel. Mediciones Instrumentales	43
Bibliografía	44

› ANEXO. RESOLUCIONES	45
RESOLUCIÓN 1051/94	
Tipificación por origen botánico	45
RESOLUCIÓN 274/95	
Tipificación por origen botánico. (Modificatoria de la Res. SAGyP N° 1051/94)	47
RESOLUCIÓN 111/96	
Habilitación, inscripción y funcionamiento de los laboratorios certificadores del origen botánico de la miel	49
Análisis Melisopalinológico	50

Índice de imágenes

1. Refractómetro	11
2. Conductímetro	11
3. Mufla	12
4. HPLC	12
5. Titulador automático	13
6. PHmetro	14
7. Espectrofotómetro	15
8. Colorímetros Lovibond, Pfund y Hanna	16
9. Preparación de material recolectado en el campo	22
10. Preparación de anteras para extraer el polen y observación con lupa	23
11. Glicerina-gelatina	24
12. Colección de referencia	26
13. Centrífuga y tubos para el centrifugado	27
14. Campana extractora de gases, para acetólisis	27
15. Elaboración de preparados	28
16. Observación de los preparados	28
17. Forma recomendada de recorrer el portaobjetos para garantizar el examen homogéneo del preparado	29
18. Granos de polen presentes en la miel, vistos al microscopio	29
19. Pastillas de esporas de <i>Lycopodium</i>	31
20. Lugar de trabajo. Cabinas	37
21. Entrenamiento del panel	38
22. Rueda de olores y aromas. Argentina (2013)	40
23. Ejemplo de Planilla para el registro de los resultados del Análisis Cuantitativo Descriptivo de Mieles	41
24. Ejemplo de informe de los resultados del Análisis Cuantitativo Descriptivo de Mieles	42
25. Nariz Electrónica. Instituto de Tecnología de Alimentos. INTA	43

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe en el ámbito mundial una creciente demanda de productos diferenciados y en este marco se inscribe la importancia de disponer de mieles caracterizadas, dado el reconocimiento por el consumidor de las diferentes características organolépticas.

Cuando se caracteriza una miel se describen aquellas cualidades que son propias del producto, permiten agregar valor y acceder a nuevos mercados.

Para la miel, esto se refiere fundamentalmente a identificarla como multi o monofloral o a asignarle una procedencia geográfica. La valorización se logra en la medida en que la miel caracterizada se convierte en una especialidad y se aparta de su condición de *commodity*.

Las características de la miel dependen de los néctares que le dieron origen, de las condiciones del suelo y el ambiente donde crecieron las plantas que aportaron esos néctares y de la época de la cosecha. La caracterización es un proceso integral que involucra tres tipos de análisis: Físico-químicos, Polínicos y Sensoriales.

Estos análisis se complementan entre sí y contribuyen a establecer el cumplimiento de las especificaciones, establecidas para su comercialización.

Para esto es necesario contar con muestras de tres o cuatro temporadas, y cubrir toda el área de obtención de la miel a caracterizar.

Si bien existen en Argentina resoluciones que definen cuándo una miel puede ser considerada como monofloral o multifloral, éstas se basaron en normativas y experiencias europeas, por lo que no se consideran las características de las mieles argentinas. Es entonces indispensable trabajar en la caracterización de las mismas, para obtener la información que debe ser incorporada.

Para ello es necesario contar con una metodología unificada, disponible para todos los equipos de trabajo que se propongan avanzar en los perfiles descriptivos de las mieles regionales.

La presente guía, considerada una herramienta para trabajar en la temática, consta de tres Capítulos, uno por cada tipo de análisis, y tiene en cuenta las metodologías de uso internacional, la expresión de resultados y la bibliografía de referencia de cada tema.

Incluye, además, un anexo con las resoluciones actualmente vigentes para la Tipificación por origen botánico y para la habilitación, inscripción y funcionamiento de los laboratorios certificadores del origen botánico de la miel.

I › ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

› Autores

Mónica Gaggiotti (INTA)

Josefina Winter (INTI)

María Cristina Ciappini (UTN Fac. Regional Rosario)

Alicia Gutiérrez (Profesional independiente)

Olga Apablaza (INTI)

› Colaboradores

Patricia Ohaco (INTI)

Andrea Elizondo (INTI)

Andrea Dell Orco (INTI)

Ezequiel Schneider (INTI)

› INTRODUCCIÓN

Como todo alimento, la miel está normada por el CODEX (CODEX STAN 12-1981, Norma revisada en 1987 y en 2001) y su homólogo en la República Argentina el Código Alimentario Argentino (Capítulo 10, Art 782 - Res 2256, 16.12.85 y 783), al cual se incorporó el Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de la Miel, mediante Resolución GMC N° 015/94 por Resolución MSyAS N° 003, 11.01.95.

Se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas 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 (Art.782 CAA).

La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente fructosa y glucosa, además de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas derivadas de la recolección. El color de la miel varía de casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, o total o parcialmente cristalizada.

Para la caracterización físico-química de la miel se presentan en esta guía los parámetros exigidos por la reglamentación nacional e internacional y otros no contemplados en las mismas, que ayudan a caracterizar la miel de acuerdo a su procedencia, y sus métodos de ensayo. Para todos ellos se deberá chequear cuál es la versión vigente, al momento de implementarla. Si existen diferentes metodologías, cada laboratorio utilizará la óptima, de acuerdo a sus capacidades analíticas.

› METODOLOGÍA

MÉTODOS DE MUESTREO

Las muestras deberán prepararse según alguno de los siguientes métodos:

- › AOAC Official Meth. 920.180. (1995).
- › IRAM 15929: 2016. Miel. Muestreo.
- › IRAM 15976: 2007. Miel. Preparación de la muestra de laboratorio.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se mencionan a continuación los métodos de ensayo para los parámetros normados y para aquellos, no normados, que contribuyen a diferenciar las mieles por su origen botánico.

PARÁMETROS NORMADOS

Estos parámetros están asociados a:

- › **Madurez:** humedad, azúcares reductores, sacarosa aparente, prolina.
- › **Frescura (edad de la miel y tratamiento térmico):** actividad de la diastasa, actividad de la invertasa, hidroximetilfurfural, color.
- › **Limpieza:** cenizas.
- › **Deterioro por fermentación:** humedad, acidez libre.
- › **Autenticidad:** dextrinas ajenas a la miel, jarabe de maíz de alta fructosa, glucosa comercial agregada, prolina, relación isotópica, rotación específica.

Los parámetros normados que se utilizan para la caracterización de mieles y los valores de referencia (o sus valores límites), según distintas normativas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Parámetros normados y sus valores límites

PARÁMETRO	CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO Capítulo X.	REGLAMENTO TÉCNICO MERCOSUR	CODEX ALIMENTARIUS CODEX STAN 12 - 1981
Humedad por refractometría	› Máximo 18 g/100 g	› Máximo 20 g/100 g	› Máximo 20 g/100 g
Cenizas	A 550-600 °C. › Miel de flores máximo: 0,6 g/100 g. › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores máximo: 1,0 g/100 g.	› Miel de flores máximo 0,6 g/100 g. › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores máximo: 1,0 g/100 g.	› No especifica
Azúcares reductores	Calculados como azúcar invertido › Miel de flores: mínimo 65 g/100 g. › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: mínimo 60 g/100 g.	Calculados como azúcar invertido › Miel de flores: mínimo 65 g/100 g. › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: mínimo 60 g/100 g.	Calculados como la suma de glucosa y fructosa › Miel de flores: mínimo 60 g/100g. › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: mínimo 45 g/100 g.
Sacarosa aparente	› Miel de flores: máximo 8 g/100 g › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máximo 10 g/100 g.	› Miel de flores: máximo 5 g/100 g. › Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores: máximo 10 g/100 g.	› Máximo 5 g/100g. › Excepciones: miel de <i>Medicago sativa</i> y de <i>Citrus spp.</i> : máximo 10 g/100 g.
Acidez libre	› Máximo 40 meq/kg	› Máximo 40 meq/kg	› Máximo 50 meq/kg
Actividad de la diastasa	› Mínimo 8 en la escala de Gothe. Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 unidades Gothe (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)	› Mínimo 8 en la escala de Gothe. Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 unidades Gothe (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)	› Mínimo 8 unidades en la escala de Schade. › Miel con un contenido bajo de enzima natural, mínimo 3 unidades Schade (siempre que el HMF sea < 15 mg/kg)
Hidroximetilfurfural	› Máximo 40 mg/ kg	› Máximo 40 mg/ kg	› Máximo 40 mg/kg
Dextrinas totales	› Miel de flores: máximo 3 g/100 g	› No especifica	› No especifica
Conductividad eléctrica	› No especifica	› No especifica	› Miel de flores: máximo 0,8 mS/cm. › Miel de mielada: mínimo 0,8 mS/ cm.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

La humedad de la miel es un importante factor de conservación. Miel con humedades superiores al 18% corren riesgo de fermentación, sobre todo cuando comienza la cristalización y los azúcares solidificados por este proceso tienden a decantarse en el fondo de los envases, produciéndose una separación de fases. El contenido de humedad depende del manejo y del ambiente.

- › AOAC Official Meth. 969.38B (1995) / J. Assoc. Public Analysts (1992) 28 (4) 183- 187 / MAFF Validated method V21 for moisture in honey (ambos métodos son idénticos).
- › IRAM 15931: 2018. Miel. Determinación de la humedad refractométrica. Harmonised Meth. of the International Honey Commission (2009) N° 1.



1 › Refractómetro

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MINERALES

El contenido de minerales de una miel depende principalmente de las especies botánicas que le dieron origen, de las características edáficas y de las condiciones climáticas del lugar de crecimiento de la flora melífera. Entre los minerales presentes se encuentran principalmente: potasio, calcio, sodio, azufre, magnesio, fósforo, hierro, manganeso, silicio y cobre. La determinación de la conductividad eléctrica y del contenido de cenizas permiten estimar el contenido de minerales de las mieles.

Determinación de la conductividad eléctrica

- › IRAM 15945: 2007. Determinación de la conductividad eléctrica.
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 2.



2 › Conductímetros

Determinación del contenido de cenizas

- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 3.
- › AOAC 920.181. 8. (1995).
- › IRAM 15932 (2018). Miel. Determinación de cenizas.

Determinación del perfil de minerales o elementos trazas (K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Mn, otros)

También se podrán cuantificar los diferentes cationes y aniones por separado. La metodología empleada dependerá de las capacidades analíticas del laboratorio. La digestión de la muestra se puede hacer por vía húmeda según AOAC 969.32 (1990) y la cuantificación de los cationes por espectrofotometría de absorción atómica.



3 › Mufla

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

El tipo de azúcares presentes en las mieles y sus cantidades dependen principalmente del origen botánico y del ambiente en el que crece el recurso floral. La velocidad de la cristalización de las mieles depende, entre otros factores, de la relación fructosa/glucosa. A menor contenido de fructosa, las mieles cristalizan más rápido. Por otro lado, el tamaño de los cristales a formarse, depende del tipo de azúcares que contiene la miel, del tiempo de cristalización y de la temperatura de almacenamiento.

Azúcares reductores y sacarosa aparente

- › IRAM 15934: 2018. Método de Fehling-Causse-Bonnans.
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009).
 - N° 7.1. Determination of apparent reducing sugars and apparent sucrose.
 - N° 7.2. Determination of sugars by HPLC.
- › Codex Alimentarius CAC/VOL III, supl. 2 sección 7.1, 1° Ed.

Perfil de azúcares. Determinación de azúcares y relación fructosa/ glucosa

- › AOAC 977.20 (1995). Perfil de azúcares.
- › IRAM 15946 (15/01/2008): Determinación del contenido de los sacáridos fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009). N° 7.2 Determination of sugars by HPLC (no determina azúcares reductores y sacarosa aparente. Cuantifica fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa y puede usarse para cuantificar otros azúcares).



4 › HPLC

Determinación de dextrinas totales

- › IRAM 15943: 2007. Miel. Determinación de dextrinas totales.

DETERMINACIÓN DE LA ROTACIÓN ESPECÍFICA

La rotación óptica es una propiedad que tienen los cuerpos para hacer girar el plano de la luz polarizada cuando ésta los atraviesa. En la industria de la miel, este parámetro suele ser utilizado para realizar diferenciaciones de las mieles de néctar, en general levógiras, de las mieles que se obtienen de mielada, que tienen un comportamiento dextrógiro.

- › IRAM 15950: 2006. Determinación de la rotación específica de la miel.
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 11.

DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ

La acidez natural de la miel proviene de los ácidos orgánicos presentes en ella. El principal ácido contenido en la miel es el glucónico, que se forma por acción de la enzima glucosa oxidasa, presente en la saliva de las abejas, sobre la glucosa. Como se genera a partir de las moléculas de glucosa del néctar, la acidez natural de una miel depende de la concentración inicial de la misma y, en definitiva, de su origen botánico.

Otros ácidos orgánicos que contribuyen a la acidez de la miel son el málico, butírico, cítrico, tartárico, piroglutámico, maleico, succínico, fórmico y oxálico. En las mieles fermentadas la acción de las levaduras transforma los alcoholes en ácido acético, produciendo un aumento de la acidez.

Determinación de la acidez libre, láctica y total

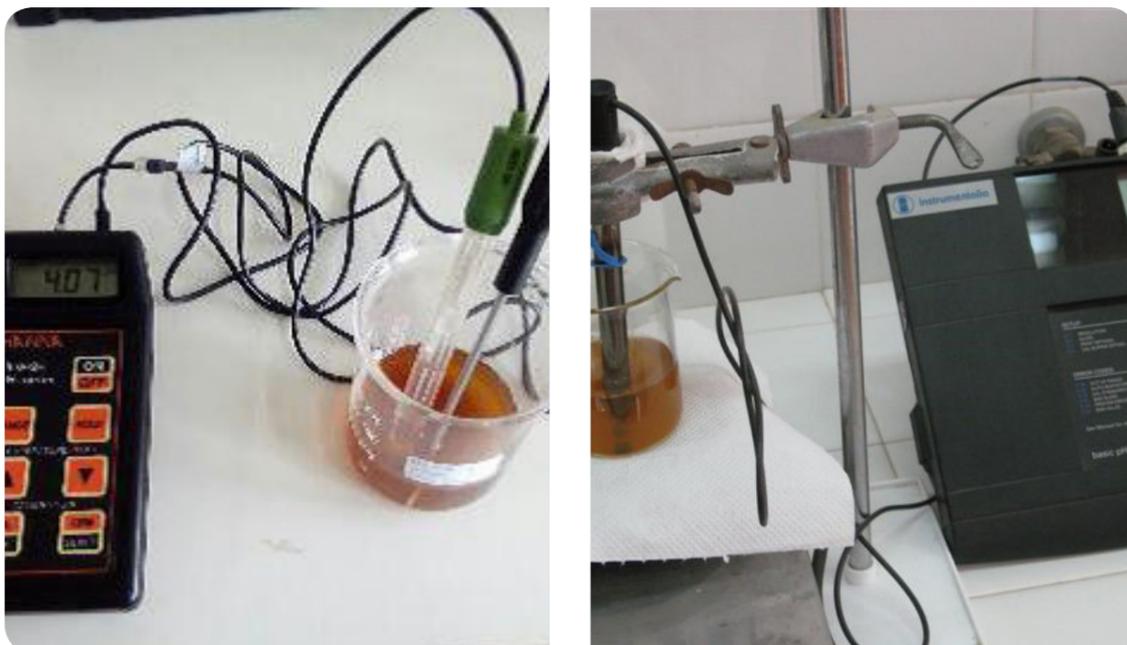
- › J. Assoc. Public Analysts (1992) 28 (4) 171-175 / MAFF validated method V 19 for acidity in Honey
- › IRAM 15933: 2013. Miel. Determinación de la acidez libre.
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 4.
- › AOAC 962.19. (1995). Acidez en miel (Acidez total: libre y láctica).



5 › Titulador automático

Determinación del pH

- › IRAM 15938: 2007. Miel. Determinación del pH.



6 › PHmetro

Determinación del perfil de ácidos orgánicos

- › HPLC (detector UV). Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009). IRAM.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIASTÁSICA

La actividad de la diastasa depende principalmente de las prácticas de procesamiento durante la extracción y el envasado, y de la edad de la miel. Un valor bajo de actividad de la diastasa indica que la miel fue sobrecalentada, pasteurizada o pasó mucho tiempo desde que fue cosechada.

- › AOAC 958.09. (1995).
- › IRAM 15939-1 .Determinación de la actividad diastásica. Parte 1 - Método DIN.
- › IRAM 15939-2 .Determinación de la actividad diastásica. Parte 2 - Método AOAC.
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 6.
- › AOAC Official Meth. 958.09. (1995).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

La temperatura influye directamente en la formación de HMF; las mieles de climas cálidos contienen naturalmente más HMF que las de climas templados o fríos.

- › AOAC Official Meth. 980.23 (1995).
- › IRAM 15937-1: 2007. Determinación del contenido de HMF. Parte 1: Método de Winkler.
- › IRAM 15937-2: 2007: Determinación del contenido de HMF. Parte 2: Método de White.
- › IRAM 15937-3: 2008: Determinación del contenido de HMF. Parte 3: Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 5.



7 › Espectrofotómetro



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA INVERTASA

La invertasa realiza muchas de las transformaciones químicas del néctar, cataliza la hidrólisis de sacarosa y glucósidos.

- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 9.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROLINA

La prolina, el aminoácido libre más importante de la miel, se encuentra en un porcentaje medio del 50-85% con respecto a los demás aminoácidos. Su contenido es un criterio de calidad referido a la maduración y en algunos casos permite detectar adulteraciones.

- › IRAM 15940: 2007. Parte 1: Método DIN, Parte 2: Método AOAC.
- › Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) N° 10.
- › IRAM 15940-2: 2007. Miel. Determinación de prolina. Parte 2: Método AOAC.
- › AOAC 979.20.

DETERMINACIÓN DEL COLOR

El color de una miel está relacionado con su contenido de minerales y fundamentalmente con los pigmentos vegetales del néctar; por lo tanto es característico de la/las fuente/s floral/es visitada/s por la abeja. Varía desde los tonos blancos hasta el ámbar oscuro, existiendo mieles rojizas, amarillentas, verdosas, aunque predominan los tonos castaño claro o ámbar.

En general, cuanto más oscura es una miel, mayor es su contenido en minerales y en compuestos fenólicos. Las mieles de mielada son generalmente más oscuras que la mayoría de las mieles de néctar.

- › IRAM 15941 - 1: 2007: determinación del color Lovibond.
- › IRAM 15941 - 2: 2007: determinación del color Pfund.
- › IRAM 15941 - 3: 2016: determinación del color mediante el colorímetro Hanna para miel.



8 › Colorímetro Lovibond



› Colorímetro Pfund



› Colorímetro Hanna

Comercialmente se utiliza una escala de colores que relaciona el color de la miel con la escala Pfund. (Tabla 2).

Tabla 2. Color de la miel y su relación con la escala Pfund

ESCALA INTERNACIONAL	COLOR PFUND (MM)
Blanco agua	<8
Extra blanco	8 a 17
Blanco	18 a 34
Ámbar extra claro	35 a 48
Ámbar claro	49 a 83
Ámbar	84 a 114
Oscuro	>114

DIFERENCIACIÓN ENTRE MIEL DE FLORES Y MIEL DE MIELADA O MEZCLA

Se denomina miel de mielada (o mielato), a la que procede principalmente de excreciones que los insectos succionadores (Hemiptera) dejan sobre las partes vivas de las plantas, o de secreciones de partes vivas de las plantas.

De acuerdo a la Directiva 2001/100/CE de la Unión Europea, los mielatos se caracterizan por tener una conductividad eléctrica superior a 0,8 mS/cm; alto contenido de cenizas, usualmente superior al 1%, contenido de minerales principalmente de potasio, magnesio, sodio, calcio, azufre y fósforo; altos valores de pH, mayor a 4,5, altos valores de acidez, especialmente de acidez libre, con valores medios 33,5 meq/kg y un contenido de humedad bajo, a partir de 14%.

› Conductividad eléctrica

El contenido de minerales de las mieles de mielada o de mezclas de mielada con mieles de néctares, generalmente es mayor al de las mieles de néctares puras. Esto se debe a que los mielatos provienen directamente de fluidos ricos en nutrientes, que la planta utiliza para su propia alimentación, entre ellos los minerales absorbidos desde el suelo.

› Rotación específica

Ya se mencionó que como la mayoría de las mieles de néctares contienen más fructosa que glucosa, tienen rotación específica negativa (son levógiras). Las mieles de mielada generalmente tienen menos fructosa y por lo tanto tienen rotación específica positiva (son dextrógiras).

DETERMINACIONES RELACIONADAS A PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE LA MIEL

La miel es utilizada desde la antigüedad como alimento, principalmente energético por su alto contenido de azúcares y en medicina tradicional, para el tratamiento de ciertas afecciones (Molan, 1992), debido a que posee un amplio espectro de actividades biológicas: antimicrobianas (Al et al., 2009; Alandejani et al., 2009; Isla et al., 2011), antioxidantes (Aljadi & Kamaruddin, 2004; Küçük et al., 2007; Isla et al., 2011) y anti-inflamatorias (Kim et al., 2002), entre las más importantes.

Dada la estrecha relación entre el origen botánico de las mieles, su composición química y las actividades biológicas, resulta evidente que éstas últimas se constituyen en elementos de diferenciación y pueden utilizarse como una estrategia para agregarles valor.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS LIBRES

Los aminoácidos de las mieles provienen de los néctares y/o de la mielada que les dieron origen, del polen presente en ellas y de secreciones salivales de las abejas.

La prolina es el aminoácido que generalmente se encuentra en mayor proporción. También pueden tener ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina, entre otros.

Aunque se presentan en cantidades pequeñas, se cree que los aminoácidos desempeñan un rol fundamental en el color, olor y aroma de las mieles durante su procesamiento y almacenamiento. Esto es debido a la reacción de los grupos amino de los aminoácidos con los carbonilos de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) para formar compuestos coloreados y numerosos productos volátiles, como consecuencia de la reacción de Maillard.

Determinación del contenido de prolina

Los métodos se mencionan en el punto "Determinación del Contenido de Prolina" en la página 15.

Determinación del contenido de otros aminoácidos

Existen varias metodologías: espectrofotometría de cadmio-ninhidrina, cromatografía líquida, electroforesis y otras en las que participan tanto las cromatografías como reacciones con dinitrofluorobenceno y fenilisotiocianato. La metodología usada dependerá de la capacidad analítica del laboratorio.

DETERMINACION DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El tipo de compuestos fenólicos y sus cantidades dependen del origen botánico de las mieles. Pueden ser ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides (flavonas, flavonoles y flavononas).

- > Compuestos fenólicos y flavonoides por HPLC (Vivar Quintana *et al.*, 1999).
- > Fenoles totales o Índice de Folin Ciocalteu (Prior *et al.*, 2005).
- > Compuestos flavonoides (Woisky y Salatino, 1998).

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de la miel depende de algunos factores como la fuente de néctar, factores ambientales y de procesamiento. Generalmente se considera que la variación de la capacidad antioxidante depende de la naturaleza cualitativa y cuantitativa de los grupos fenólicos que posea.

- > Ensayo de captura del radical 1,1-difenil picril hidracilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995).
- > TEAC o actividad capturadora del radical libre ABTS (Arnao *et al.*, 2001).
- > Poder reductor - FRAC (Benzie y Strain, 1996).
- > Actividad capturadora de radicales oxhidrilo - OH- (Halliwell, 1987).

> BIBLIOGRAFÍA

- > Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Boris, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. 2009. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112, 863-867
- > Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R., & Chan, F. 2009. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngology e Head and Neck Surgery*, 141, 114-118.
- > Aljadi, A. M., & Kamaruddin, M. Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513-518
- > AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 20th Edition. 2016. AOAC. Official Methods of Analysis 920.180. (1995).
- > AOAC. Official Methods of Analysis 969.38 B. (1995). /MAFF Validated method V21 for moisture in honey.
- > AOAC 969.32 (1990). Zinc en alimentos.
- > AOAC. Official Methods of Analysis 920.181. 8. (1995).
- > AOAC Official Methods of Analysis 977.20. (1995). Perfil de azúcares.
- > AOAC. Official Methods of Analysis 962.19 Acidez en miel (Acidez total: libre y láctica). AOAC. Official Methods of Analysis 958.09. (1995).
- > AOAC. Official Methods of Analysis 980.23. (1995). AOAC. Official Methods of Analysis 979.20. (1995).
- > Arnao, B. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*.
- > Benzie, Iris F.F.; Strain, J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay . *Analytical Biochemistry* 239 (1): 70-76.
- > Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. y Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmitt. Wissenschaft and Technologie* 28: p. 25-30.
- > CODEX Alimentarius-FAO. Disponible en: www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/
- > CODEX Alimentarius CAC/VOL III, supl 2 sección 7.1, 1º Ed.
- > Código Alimentario Argentino (CAA). Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- > Halliwell, B.; Gutteridge, J. y Aruoma, O. 1987. The desoxyribose method: a simple test tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 165: 215-219.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. Disponible en: <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°1. Determination of moisture refractometric method.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°2. Determination of electric conductivity.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°3. Determination of ash content.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°4. pH and free acidity.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°5. Hydroxymetilfurfural.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°6. Diastase.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission 2009. N°7.1 Determination of apparent reducing sugars and apparent sucrose. N°7. 2 Determination of sugars by HPLC.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°9. Determination of invertase activity.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°10. Determination of proline.
- > Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2009. N°11. Determination of specific rotation.

- › Normas IRAM: Disponibles en: <http://www.iram.org.ar/>
- › IRAM 15929: 2016. Miel. Muestreo
- › IRAM 15931: 2018. Miel. Determinación de la humedad. Método refractométrico. IRAM 15932: 2018. Miel. Determinación de cenizas.
- › IRAM 15933: 2013. Miel. Determinación de la acidez libre.
- › IRAM 15934: 2018. Miel. Determinación de azúcares. Método de Fehling-Causse-Bonnans.
- › IRAM 15937-1: 2007. Determinación del contenido de HMF. Parte 1- Método de Winkler.
- › IRAM 15937-2: 2007. Determinación del contenido de HMF. Parte 2- Método de White.
- › IRAM 15937-3: 2008. Determinación del contenido de HMF. Parte 3-Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- › IRAM 15938: 2007. Miel. Determinación del pH.
- › IRAM 15939-1: 2014. Determinación de la actividad diastásica. Parte 1 – Método DIN. IRAM 15939-2: 2016. Determinación de la actividad diastásica. Parte 2 – Método AOAC. IRAM 15940-1: 2007. Miel. Determinación de prolina. Parte 1: Método DIN.
- › IRAM 15940-2: 2007. Miel. Determinación de prolina. Parte 2: Método AOAC. IRAM 15941 – 1: 2007. Determinación del color Lovibond.
- › IRAM 15941 – 2: 2007. Determinación del color Pfund.
- › IRAM 15941 – 3: 2016. Determinación del color mediante el colorímetro Hanna para miel. IRAM 15943: 2007. Miel. Determinación de dextrinas totales.
- › IRAM 15945: 2007. Miel. Determinación de la conductividad eléctrica.
- › IRAM 15946: 2008. Miel. Determinación del contenido de los sacáridos fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- › IRAM 15950: 2006. Miel. Determinación de la rotación específica a 20° C IRAM 15976: 2007. Miel. Preparación de la muestra de laboratorio.
- › Isla, M.I., Craig, A., Ordóñez, R., Zampini, C., Sayago, J., Bedascarrasbure, E., Álvarez, A., Salomón, V., Maldonado, L. 2011. Physico-Chemical and Bioactive Properties of Honeys from Northwestern Argentina. *LWT- Food Science and Technology*. 44(9):1922-1930. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.04.003
- › Journal of the Association of Public Analysts. 1992. 28 (4): 183-187. 175 / MAFF validated method V 19 for acidity in Honey.
- › Kim EJ, Kwon KJ, Park JY, Lee SH, Moon CH, Baik EJ. 2002. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on LPS-induced neuronal death in mixed cortical neurons: associated with iNOS and COX-2. *Brain Res* 941:1-10.
- › Kūçük M, Kolayli S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem* 100:526-34
- › MERCOSUR/GMC/RES. N° 89/99. Reglamento Técnico Mercosur. Identidad y Calidad de la Miel. 27/3/2001.
- › Molan, P. 1992. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *BeeWorld*, 73, 5-76
- › Prior, R.L.; X. Wu, K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.
- › Unión Europea. Directiva 2001/100/CE del parlamento Europeo y Del Consejo.
- › Vivar-Quintana, A M; Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E; Rivas-Gonzalo, JC. 1999. Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. *Food Science and Technology International* 5: 347-352.
- › Woisky, R.G. & A. Salatino. 1998. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105
- › Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Boris, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. (2009). Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112, 863-867

II › ANÁLISIS POLÍNICO

› Autores

Cristina R. Salgado (UNNE- IBONE)
 Alicia M. Basilio (UBA)
 Guillermina Fagúndez (UADER-CONICET)

› Colaboradores

Cristina Costa (UNC)
 Beatriz Achával (Profesional independiente)
 Laura Gurini (INTA)
 Ana Clara Dedominici (MAIBA)
 Ana Carina Sánchez (UNJu)
 Rosana Wanzenried (INTA)
 Carolina López (INTA)
 Mirta Cabrera (UNaF)

› INTRODUCCIÓN

El análisis del contenido de polen es, conjuntamente con los análisis sensoriales y físico-químicos, imprescindible para caracterizar las mieles (Terrab *et al.* 2004). La miel contiene granos de polen y/o elementos de mielada tales como algas y esporas, que proporcionan una descripción indirecta del ambiente de donde proviene el producto. Por ello, el análisis melisopolinológico es importante para la determinación de los productos apícolas en relación con el origen geográfico y/o botánico.

Desde el primer análisis de polen en miel se han descrito diferentes metodologías. Con el fin de lograr resultados comparables entre los distintos grupos de trabajo, en 1970 el IBRA publica el trabajo de Louveaux *et al.* (1970). A partir de entonces la mayoría de los estudios se realizan de acuerdo con los métodos propuestos por la International Commission for Bee Botany (ICBB).

La flora melífera y los tipos de mieles, especialmente muchas monofloras, son bien conocidas y están caracterizadas para Europa (e.g. Persano Oddo *et al.*, 1995; Persano Oddo y Piro, 2004; Ricciardelli d'Albore, 1998; Maurizio y Louveaux, 1965), como así también el desarrollo de metodologías de procesamiento y estudio de las mismas (e.g. Low *et al.*, 1989; Lutier y Vaissière, 1993).

Los métodos descriptos en esta guía están basados en los propuestos por la ICBB, Louveaux *et al.* (1978) y Von Der Ohe *et al.* (2004), adaptados a la modalidad de trabajo desarrollada en nuestro país y consensuada por un grupo de investigadores con amplia experiencia en la temática.

Los métodos de ICBB son utilizados en la mayoría de los laboratorios europeos involucrados en el análisis rutinario de muestras comerciales de miel y son considerados adecuados para el propósito práctico de verificar si el espectro de polen obedece al origen botánico y geográfico declarado, confrontándolo con una miel patrón. El método propuesto por ICBB tiene limitaciones para la identificación de tipos de polen y para la precisión del resultado en el cálculo de su concentración.

Los granos de polen pueden procesarse mediante la técnica palinológica propuesta por Wodehouse (1935), que permite conservar el citoplasma; sin embargo no se distinguen claramente algunos detalles de valor diagnóstico de la esporodermis. Por otra parte, la técnica propuesta por Erdtman (1960), consiste en la digestión química del contenido celular y la intina. Facilita la observación detallada de las características específicas de la pared de los granos de polen, permitiendo mejorar las posibilidades de identificación.

La mayoría de los laboratorios de investigación considera imprescindible procesar las muestras mediante el proceso de acetólisis, antes de proceder a la identificación y conteo de los granos de polen. La acetólisis es una valiosa técnica para la caracterización de mieles, la identificación de polen desconocido,

el análisis de mieles de zonas poco estudiadas, o de muestras comerciales de procedencia geográfica incierta.

Para el análisis cuantitativo la técnica más usada en nuestro país es la propuesta por Moar (1985), donde se incorporan a la muestra esporas de *Lycopodium clavatum* L., que permiten calcular indirectamente la cantidad de granos de polen presentes en la miel por unidad de peso (10 g de miel).

En Argentina, existe una importante cantidad de estudios melisopolinológicos que muestran el origen botánico de las mieles y son valiosos como indicadores de la procedencia geográfica. Grupos de trabajo dedicados a esta temática se encuentran ubicados en distintas regiones de nuestro país.

> METODOLOGÍA

La identificación de los tipos polínicos presentes en una muestra se realiza por confrontación con material vegetal procedente de la zona de origen de la misma. Los preparados microscópicos conteniendo polen de las especies visitadas por las abejas en dicha región constituyen la colección de referencia, denominada Palinoteca.

CONFECCIÓN DE PATRONES DE REFERENCIA. PALINOTECA.

MUESTREO

Para realizar una correcta colección de referencia de polen será necesario contar con ejemplares determinados taxonómicamente por especialistas. Las mayores colecciones de plantas se encuentran en herbarios. Nuestro país cuenta con varios herbarios importantes en número de ejemplares y área de colección. Esas colecciones biológicas se encuentran en Institutos de investigación de Universidades Nacionales y/o CONICET. Se pueden mencionar por ejemplo:

Región NOA: Instituto Miguel Lillo (LIL),

Región NEA: IBONE (CTES),

Región Cuyo: IADIZA CRICYTME (MERL),

Región Centro: IMBIV (CORD),

Región Pampeana: Darwinion (SI), Museo Argentino de Ciencias Naturales MACN (BA), INTA Castelar (BAB).

Patagonia: Universidad Nacional del Comahue (DCRU).



9 > Preparación de material recolectado en el campo

Los pimpollos o anteras a punto de antesis deben obtenerse a partir de estas colecciones para realizar un preparado puro de referencia de las especies que crecen en las inmediaciones de los apiarios. También pueden realizarse preparados de referencia a partir de botones de flores frescas, pero en este caso deberá colectarse y herborizar un ejemplar del espécimen. El mismo tendrá que ser determinado y luego incorporado a una colección de plantas.



10 > Preparación de anteras para extraer el polen y observación con lupa



Recomendaciones y/o precauciones:

- > Contar con la autorización del curador o director para obtener material del herbario de una institución donde las plantas estén debidamente identificadas.
- > Tener criterio discrecional al extraer pimpollos o flores del ejemplar, sin deteriorar el material.
- > Los datos que acompañan al ejemplar deben ser volcados a un libro de registro que acompañe a la colección de referencia (Palinoteca). La misma debería tener una sigla que la identifique para que la colección pueda ser consultada.
- > Es conveniente renovar periódicamente los preparados de los patrones de referencia debido a que se deterioran con el paso del tiempo.
- > Registrar en una cartulina que el espécimen fue extraído de una muestra de botones florales para realizar preparados de polen (fecha, investigador, técnico, institución a la que pertenece, etc.).

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE MONTAJE: GLICERINA-GELATINA

Al iniciar la preparación de polen para una Colección de referencia, será necesario contar con un medio de montaje apropiado a tal fin.

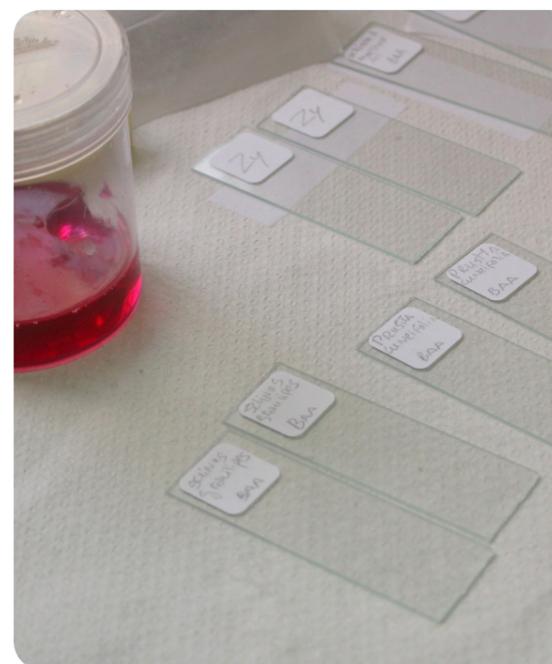
Insumos necesarios: 50 g de Gelatina sin sabor (grado alimenticio), 170 ml agua destilada, 150 ml glicerina, 7 g cristales de fenol.

Protocolo:

1. Disolver la gelatina a baño de María en el agua destilada agitando con varilla de vidrio.
2. Agregar la glicerina y los cristales de fenol.
3. Colocar en frascos de boca ancha y dejarlos destapados hasta que se enfríe, luego tapar y mantener en heladera. También se pueden usar goteros de vidrio que luego pueden ponerse a baño María para su uso.

Recomendaciones y/o precauciones:

- › La mezcla se solidificará al enfriarse y las burbujas de aire subirán a la superficie. Si quedaron muchas burbujas, conviene desechar la porción superior.
- › Pueden agregarse algunas gotas de colorante (fucsina) para mejorar el contraste de la exina al observar al microscopio, especialmente cuando se trata de exinas muy delgadas o granos de polen muy pequeños.
- › Para evitar contaminación se puede fraccionar en envases más pequeños. El uso de gotero simplifica controlar la cantidad a usar del medio de montaje
- › Los tratamientos químicos, los medios de montaje y el tiempo de almacenamiento de los preparados, afectan sensiblemente la forma y el tamaño de los granos de polen. Para una mayor información al respecto se puede consultar Reitsma (1969).



11 > Glicerina-gelatina

PROCEDIMIENTO PARA POLEN CON CONTENIDO CELULAR. TÉCNICA DE WODEHOUSE (1935)

Se utiliza para material fresco (ver Obs. 1) o material seco (de herbario). Mediante esta técnica los granos de polen conservan el contenido citoplasmático.

Materiales: alcohol absoluto, glicerina-gelatina, fucsina, portas y cubre-objetos. Parafina, etiquetas, agujas y mechero.

Equipo óptico: lupa binocular y microscopio óptico.

Protocolo:

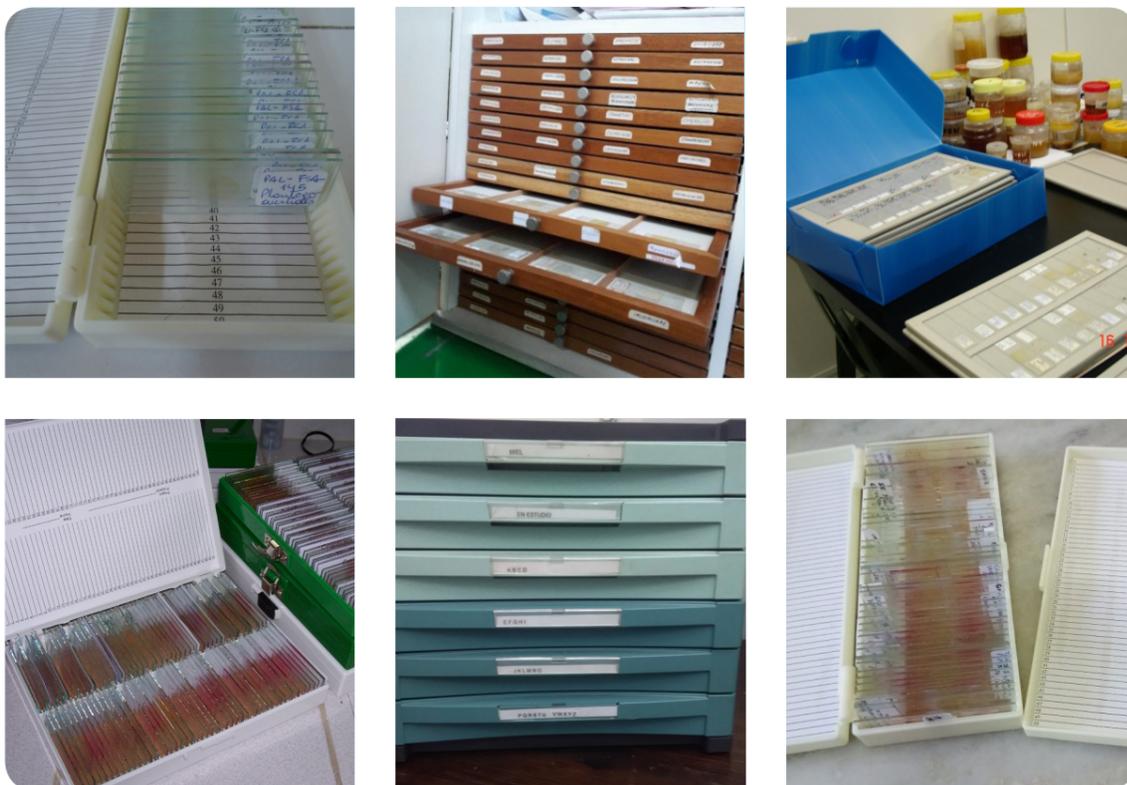
1. Separar las anteras y colocarlas sobre un porta-objetos.
2. Utilizando una aguja de sección separar, bajo lupa, los granos de polen, eliminando los trozos de tejidos más grandes.
3. Agregar una gota de alcohol absoluto y dejar evaporar.
4. Agregar una gota de colorante (fucsina en solución alcohólica) y un pequeño trozo de gelatina-glicerina. O utilizar gotas de glicerina-gelatina ya líquida que se puede manejar con el gotero.
5. Colocar a la llama del mechero, sin acercarlo demasiado, y retirarlo. Repetir la operación hasta que la glicerina-gelatina se funda (no debe dejarse mucho tiempo a la llama para no estropear el material). También se puede usar placa o plancha caliente.
6. Homogeneizar la preparación con aguja de disección, cuidando que no se formen burbujas, pues entorpecerían la observación del preparado.
7. Colocar el cubre-objetos y presionar con una aguja histológica o pinza desde el centro hacia los bordes para facilitar que las burbujas de aire se desplacen. Sellar con parafina líquida, colocar gotas de parafina líquida en los ángulos en los cuales quedará el cubre-objeto y luego colocar éste presionando con una pinza o aguja histológica o de disección.
8. Colocar la etiqueta identificatoria (ver Obs. 2).

Observación 1: Herborizar las plantas según las técnicas convencionales (Rodríguez y Rojas, 2006) y depositar los ejemplares identificados y fehacientemente determinados en un herbario que los preserve. Este herbario será la referencia de la colección palinológica y es necesaria su preservación.

Observación 2: Dado que toda esta información no entra en una etiqueta, usualmente se coloca el nombre de la especie y un número de registro que sería el de la Palinoteca, que debe estar en un Libro o acta de registro manuscrito y/o digital con toda la información del espécimen.

Recomendaciones y/o precauciones:

- › Las ventajas de la técnica: se pone en práctica con rapidez y es de bajo costo, además su aplicación no requiere el uso de campana de extracción de gases.
- › Desventajas de la técnica: no permite un análisis detallado de la esporodermis y los preparados pueden ser vulnerables al ataque de los hongos por lo que sería necesario reponerlos periódicamente.
- › Si se desea colorear la exina se puede agregar fucsina o verde de metilo a saturación en la preparación del medio de montaje.



12 > Colecciones de referencia

PROCEDIMIENTO PARA POLEN SIN CONTENIDO CELULAR. TÉCNICA DE ERDTMAN (1960)

Se realiza con material fresco o de herbario. Consiste en destruir el contenido citoplasmático y la intina de los granos mediante la acción de la mezcla acetolítica.

Insumos necesarios: ácido acético, anhídrido acético, ácido sulfúrico, fenol, agua destilada, agua-glicerinada al 50%, parafina, filtros con mallas de amplitud adecuada para el material, glicerina-gelatina, portas y cubreobjetos, marcador indeleble, etiquetas, aguja de disección, gradillas, papel de filtro, vasos de precipitado de 25 o 50ml, varillas de vidrio (delgadas), tubos cónicos para centrifuga de 10ml, probetas y mechero de alcohol o placa caliente.

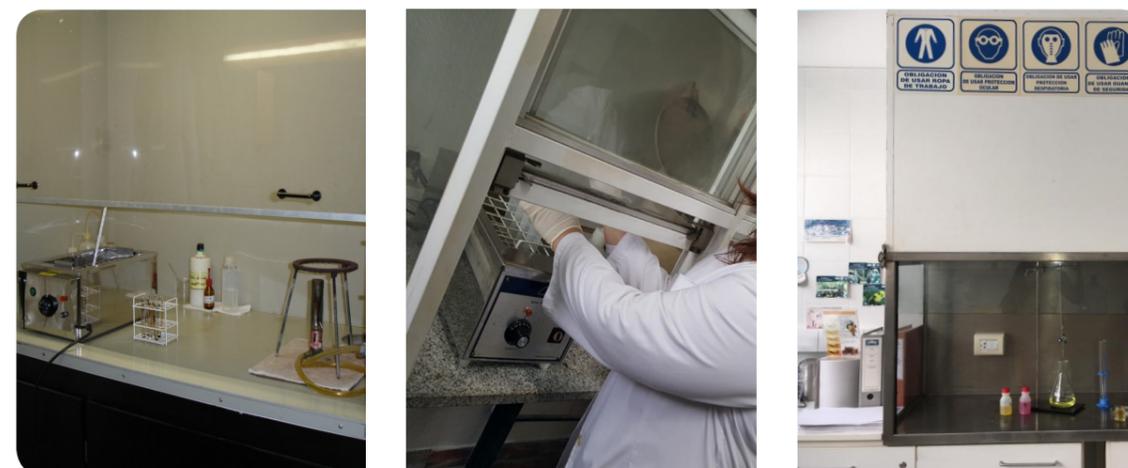
Equipamiento necesario: lupa binocular, campana extractora de gases, centrifuga (2500 r.p.m.), baño térmico, termómetro y microscopio óptico. Tener en cuenta que la velocidad puede variar en distintas gravedades e.g. equivalente a 1000 g. (Pendleton, 2006).

Recomendaciones y/o precauciones:

- > La mezcla acetolítica debe realizarse en el momento y NUNCA debe ponerse en contacto con agua.
- > Cuando se prepara la mezcla acetolítica colocar primeramente el anhídrido acético y luego agregar el ácido sulfúrico deslizándolo por las paredes de la probeta, nunca al seno del líquido para evitar una reacción exotérmica. Revolver con varilla de vidrio para homogeneizar la mezcla.
- > Preparar la mezcla acetolítica bajo campana extractora de gases, para evitar inhalar los gases y estar protegidos frente a posibles "salpicaduras" por fuertes reacciones.



13 > Centrifuga y tubos para el centrifugado



14 > Campana extractora de gases, empleada para acetólisis

ESTUDIOS MELISOPALINOLÓGICOS CUALITATIVOS

MUESTREO

La muestra de miel para realizar el análisis polínico deberá ser obtenida según las recomendaciones establecidas en ARTÍCULO 8° de la Resolución 274/95 de la SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN Tipificación por origen botánico (Modificatoria de la Res. SAGyP N° 1051/94). Ver ANEXO

Recomendaciones y/o precauciones:

- > Informar al solicitante del análisis que el proceso de toma de muestras es responsabilidad de quien envía la muestra.
- > El Laboratorio podría agregar una leyenda en sus Informes aclarando que el laboratorio no se responsabiliza por la toma de muestras

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE MIEL. TÉCNICA DE LOUVEAUX ET AL. (1978)

Insumos necesarios: ácido acético, anhídrido acético, ácido sulfúrico, fenol, agua destilada, agua-glicerina al 50%, parafina, filtros con mallas de amplitud adecuada para el material (100 micras), glicerina-gelatina, portas y cubreobjetos, marcador indeleble, etiquetas, aguja de disección y/o pinzas, pipetas Pasteur o capilares, gradillas, papel de filtro, vasos de precipitado, varillas de vidrio (delgadas), tubos cónicos para centrifuga de 10ml, probetas y mechero de alcohol o platina caliente.

Equipamiento necesario: lupa binocular, campana extractora de gases, centrifuga (2500 r.p.m. = 1000 g), baño térmico y microscopio óptico.

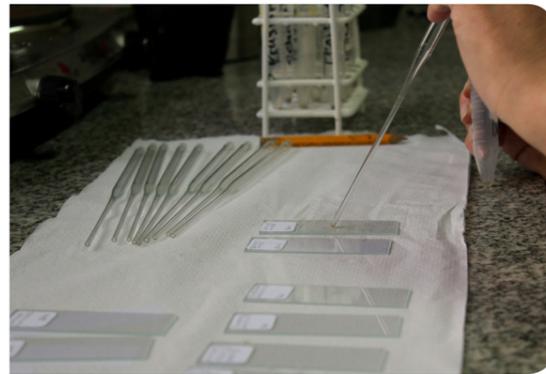
Protocolo:

1. Pesar 10 gramos de miel bien homogeneizada.
2. Agregar 20 cc de agua destilada, calentar a 40°Cy disolver removiendo con varilla de vidrio.
3. Centrifugar la solución de 5 a 10 minutos a 2000 ó 2500 rpm (600-800 g).
4. Eliminar el líquido sobrenadante dejando solamente el sedimento polínico en el fondo del tubo, mediante decantación.
5. Procesar el sedimento obtenido según las técnicas de Wodehouse (1935) o Erdtman (1960) (Obs. 3).

Observación 3: Para que los granos de polen sean comparables, el sedimento de polen obtenido a partir de las muestras de miel debe ser procesado bajo la misma técnica que lo han sido los preparados de referencia de la Palinoteca con la que cuenta el Laboratorio de análisis polínicos.



15 > Elaboración de preparados



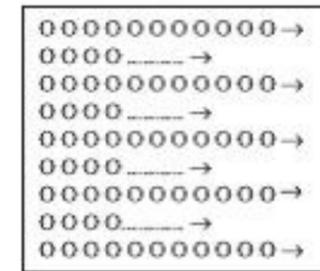
16 > Observación de los preparados



IDENTIFICACIÓN Y CONTEO

Procedimiento:

1. Examinar el preparado bajo el microscopio con el aumento más conveniente para identificar elementos en el sedimento (400x a 1000x).
2. Realizar un primer chequeo general para determinar los tipos principales y la distribución de granos de polen. Si la distribución del polen en el preparado no es homogénea, realizar un nuevo preparado.



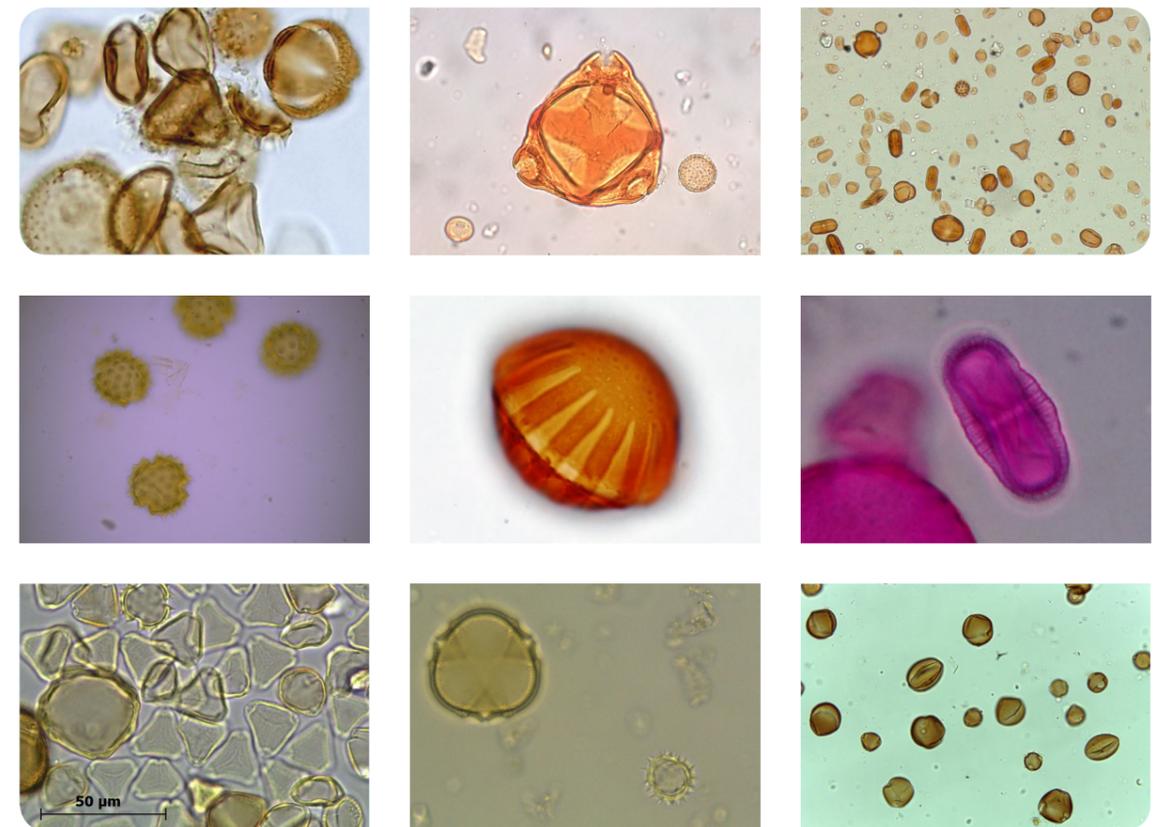
17 > Forma recomendada de recorrer el portaobjetos para garantizar el examen homogéneo del preparado.

3. Contar un mínimo de 300 granos de polen para la estimación de las frecuencias relativas, y entre 500 y 1000 mil granos para la determinación de las frecuencias relativas (Louveaux *et al.*,1978) o hasta 500 granos de polen (Von Der Ohe *et al.*, 2004).

4. Identificar y contar los granos de polen en grupos de 100, siguiendo 5 líneas equidistantes paralelas determinadas por los bordes superior e inferior del cubreobjeto y distribuidas desde el borde izquierdo al derecho del cubreobjeto, hasta contar 500 granos.

5. Continuar el conteo hasta 1000 granos siguiendo otras 5 líneas paralelas situadas entre las primeras 5. Distribuir los campos contados uniformemente a lo largo de las líneas.

6. Estimar la distancia entre campos a contar en relación con la densidad y distribución del polen en la preparación y el tamaño del campo de visión. Si la concentración de granos de polen es muy alta, los campos a contar deberán estar más espaciados, y si es escasa, más próximos entre sí.



18 > Granos de polen presentes en la miel, vistos al microscopio óptico.



Recomendaciones y/o precauciones:

- > Cuando se trate de muestras de miel procesadas sin acetólisis, anotar por separado: granos identificables, no identificables, rotos, elementos de mielada (HDE), gránulos, microcristales, levaduras, royas, impurezas (hollín, partículas, almidón, restos vegetales).
- > En el caso que algún tipo de polen aparezca sobre-representado en la muestra (e.g. *Eucalyptus*), realizar un segundo conteo que excluya este polen.
- > Sería recomendable contar granos de polen hasta que la curva de diversidad de tipos polínicos se vuelva asintótica. En mieles monoflorales frecuentemente sucede entre los 300 y 400 granos de polen contados, en tanto que en las poliflorales el conteo se extendería hasta 1000 granos.

ESTUDIOS MELISOPALINOLÓGICOS CUANTITATIVOS

MÉTODO DE LA INCLUSIÓN DE ESPORAS FORÁNEAS (MOAR, 1985, CON MODIFICACIONES)

Procedimiento:

1. Poner en un tubo cónico de 50 ml una o dos pastillas con esporas de *Lycopodium clavatum*.
2. Disolver las pastillas en 5 ml de solución de ácido acético 50% o bien HCL 10%. Agregar la solución lentamente, mezclando con varilla de vidrio hasta la disgregación. Si se genera espuma, verter gotas de etanol sobre ella para controlarla.
3. Agregar 10 g de miel y completar el volumen del tubo con agua destilada, o disolver las esporas en un vaso de precipitado y agregar la disolución al tubo conteniendo la miel disuelta en agua.
4. Centrifugar la muestra aproximadamente 15 min. a 1000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Proceder a lavar con ácido acético para iniciar la acetólisis y realizar el montaje.
7. Para la observación microscópica recorrer al menos 100 campos del preparado en líneas paralelas y equidistantes al borde del cubreobjeto. Se debe contar entre 1000 y 1200 granos de polen, y todas las esporas de *Lycopodium* presentes (Obs. 4).
8. El cálculo del número de granos de polen presentes en el volumen inicial de miel se obtiene con la siguiente fórmula: $Pm = \frac{Pr \times Lyr}{Lyi}$

donde **Pm** es el número de granos de polen en la cantidad inicial de miel, **Pr** es el número de granos de polen contados en el preparado, **Lyr** es el número de esporas de *Lycopodium* contadas en el preparado y **Lyi** es el número de esporas agregado inicialmente en las dos pastillas incorporadas a la muestra (Obs. 5). El fabricante indica la cantidad estimada de esporas de las pastillas de cada partida.

Observación 4: Se debería tener en cuenta cual es el **error estándar del recuento total** que cada investigador fija o determina como aceptable para su trabajo. Stockmarr (1971) establece un valor <7% de modo que se realiza conteo de ambas estructuras (polen/esporas) y se observa cómo va variando el valor del error estándar. e.g.: si se cuentan proporcionalmente casi en cantidades similares, se llega rápidamente a un valor <7%, conteo aproximado de 500 de cada uno. Pero si se trata de muestras de polen sub-o sobre representado se desbalancea el numero, e.g. pocas esporas, 250, y polen alrededor 1500 para que el error se mantenga >7%. No puede ser un valor fijo, ya que las características de las muestras no lo van a permitir siempre así.

La ecuación utilizada para el cálculo del error total es la establecida por Stockmarr (1971):

$$\text{ERROR TOTAL (\%)} = \pm 100 \sqrt{(\sigma_1/r_1)^2 + (\sigma_2/r_2)^2 + (\sigma_3/r_3)^2}$$

σ_1 : error estándar en r_1 : N° de esporas/pastilla.

$$\sigma_1 \approx \sigma^A; r_1 \approx \square$$

σ_2 : error estándar en r_2 : N° de granos de polen contados en la muestra.

$$\sigma_2 = \pm \sqrt{r_2}$$

σ_3 : error estándar en r_3 : N° de esporas de *Lycopodium* contadas en la muestra.

$$\sigma_3 = \pm \sqrt{r_3}$$

Observación 5: Para una miel "estándar" en la cual no se tiene referencia de polen sub-o sobre-representado (en cuyo caso se deberían disminuir o aumentar el número de pastillas). Las dos pastillas son para un valor de aproximadamente 20.000 esporas/pastillas. Si este valor llegara a cambiar en partidas futuras el número de dos no sería el adecuado.

Observación 6: Para el agregado de pastillas, corroborar la cantidad de esporas que contiene cada partida/lote. Los valores indicados previamente (2 pastillas) se refieren a pastillas conteniendo aproximadamente 10.000 esporas/pastilla.



19 > Pastillas de esporas de *Lycopodium*

CÁLCULO E INFORME DE RESULTADOS

ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICOS CUALITATIVOS

Procedimiento:

1. Calcular la frecuencia relativa para cada tipo de polen como su porcentaje con respecto al número total de granos de polen contado. Sólo si las cuentas se basaron en un total de por lo menos 1000 granos (Louveaux *et al.*, 1978) o hasta 500 (Von Der Ohe *et al.*, 2004) puede expresarse el resultado como porcentaje.
2. Recalcular la frecuencia relativa excluyendo el polen de las plantas anemófilas, de las plantas que no producen néctar o los tipos de polen sobre-representados si otras evaluaciones (por ejemplo el análisis sensorial), indican que el néctar correspondiente es insignificante en la muestra. Esta decisión solo puede tomarse en base a una gran experiencia práctica o datos fidedignos provenientes de la bibliografía.

- Identificar los tipos de polen por género o especie sólo cuando estos han sido fehacientemente determinados a nivel de género o especie. En caso contrario, agregar el término grupo o tipo delante del nombre científico, para indicar que el nombre se usa en un sentido más amplio o familia vegetal cuando se trate de grupos estenopolínicos (e.g. Poaceae).
- Establecer las clases de frecuencia según Louveaux *et al.* (1978) a partir de la determinación de las frecuencias relativas, para las que se requiere un conteo de 500 a 1000 granos (Von Der Ohe, 2004). Cuando los conteos son por debajo de 500 granos sólo se logra una estimación.

CLASES DE FRECUENCIA (LOUVEAUX ET AL., 1978)		Porcentaje (%)
D	Polen predominante	> 45
S	Polen secundario	16 - 45%
M	Polen de menor importancia	3 - 15%
T	Polen menor	>1 - <3%
+	Polen presente	<1%

Recomendaciones y/o precauciones:

- En Argentina la Resolución N° 274/95 (modificatoria de la Resol. N° 1051/94), ambas de la ex-Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación, define el porcentaje polínico mínimo para determinar la monofloralidad de la miel. Estas resoluciones han sido cuestionadas por diversos actores de la cadena productiva. Actualmente varias instituciones están trabajando en la caracterización de las mieles argentinas, lo que permitirá aportar fundamentos para su modificación.
- Para una interpretación correcta del origen botánico, es necesario tener en cuenta las características sensoriales y fisicoquímicas de la miel, y en algunos casos el número absoluto de granos de polen obtenido en el análisis cuantitativo. Otras fuentes de variabilidad del contenido polínico de la miel como el enriquecimiento secundario, terciario y cuaternario (Bryant & Jones 2001, Jones & Bryant 2004) requieren cautela en la interpretación de los resultados.

ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICOS CUANTITATIVOS

Según el contenido polínico las mieles se clasifican en 5 clases:

CLASE	GRANOS DE POLEN/10 G MIEL	TIPO DE MIEL ¹
I	< 20.000	polen sub-representado
II	20.000 - 100.000	polen normal
III	100.000 - 500.000	polen sobre-representado
IV	500.000 - 1.000.000	polen fuertemente sobre-representado o miel de prensado
V	> 1.000.000	casi exclusivamente miel de prensado

¹ Tomado de Persano Oddo, *et al.* (2000)

APLICACIÓN DEL ANÁLISIS POLÍNICO. DENOMINACIÓN / CARACTERIZACIÓN DE LAS MIELES

ORIGEN BOTÁNICO

La presencia de granos de polen de diferentes fuentes vegetales o elementos de mielada en los análisis polínicos de mieles contribuye de forma indirecta a determinar la procedencia botánica. Estos elementos presentes se expresan en clases de frecuencia en base a los porcentajes relativos al número de elementos contados. En general, la miel producida principalmente a partir del néctar de una planta es considerada monofloral, en tanto que aquellas en las que no predomina una especie sobre las demás, es considerada polifloral. Las mieles de flores normalmente contienen pocos elementos de mielada (HDE <1%).

Por otra parte las mieles producidas principalmente de mielatos contienen muchos elementos de mielada (HDE >3%). El porcentaje de polen de especies anemófilas suele ser mayor en las mieles de mielada que en las mieles de flores (Louveaux *et al.*, 1978).

ORIGEN GEOGRÁFICO

El conocimiento de tipos polínicos característicos o combinaciones de ellos (espectro polínico o patrón polínico) que están limitados a una determinada región o país, puede ser utilizado para caracterizar mieles desde el punto de vista geográfico (Tellería, 2001; Forcone y Andrada, 2007). La distribución fitogeográfica de las especies depende de las condiciones climáticas, edáficas y antrópicas. Mediante los datos microscópicos se puede conocer la procedencia geográfica de la miel (Louveaux *et al.*, 1978).

DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LOS ANÁLISIS

Se puede verificar el nivel de consistencia a través de la evaluación de *repetitividad* y *reproducibilidad* ISO 5725-4.

OTROS MÉTODOS

Actualmente las técnicas moleculares, como el código de barras de la vida (*metabarcoding*), permiten la identificación del polen en los productos de la colmena y en otros estudios relacionados con la polinización y los polinizadores (Matsuki *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2009; Park, 2012; Galimberti *et al.*, 2014; Guertler *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2015; Bruni *et al.*, 2017). Para este tipo de análisis son necesarios un protocolo de extracción que produzca plantillas de ADN de alta calidad para la amplificación a partir de la muestra, un conjunto de marcadores genéticos que puedan amplificarse con éxito en todas las plantas, una base de datos que contenga secuencias de referencia de los marcadores genéticos antes mencionados para la mayoría de las especies de plantas involucradas en el estudio, un método de secuenciación de alto rendimiento y el software apropiado para la identificación simultánea de varias especies en una sola muestra de polen mixta (Bell *et al.*, 2016).

El desarrollo de la metodología es encarada por diferentes grupos de trabajo y, a nivel local, la limitante parece ser lo poco en común que tiene esta técnica con respecto a todas las anteriores utilizadas para el análisis de relaciones tróficas en las redes de polinizadores-plantas, de forma que los técnicos e investigadores deberían reconvertir su orientación de trabajo, o bien formar equipos multidisciplinarios. El desafío de reunir una colección de referencia queda prontamente amortizado si se comprende que la misma tiene un uso muy amplio y posiblemente deba ser encarada como proyecto por una red de instituciones, tal como en otros países se desarrollaron (CBOL, 2009. www.boldsystems.org).

> BIBLIOGRAFÍA

- > Bell, K.; de Vere, N.; Keller, A.; Richardson, R. T.; Gous, A., Kevin S.; Burgess, K.S.; Berry J.; Brosi G. 2016. Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant-pollinator interactions. *Genome*, 59:629-640.
- > Bruni, I.; Galimberti, A.; Caridi, L.; Scaccabarozzi, D.; De Mattia, F. 2014. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chem DOL*: 10.1016/Journal food chemistry. 2014. 08.060.
- > Bryant, V.M.; Jones, G.D. 2001. The R-Values of honey: pollen coefficients, *Palynology*, 25: 11-28.
- > CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- > U.S.A. 106 (31): 12794-12797 Crossref, Medline. BOLD, www.boldsystems.org.
- > Erdtman, G. The acetolysis method. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54 pp. 561-564. 1960. in Moore, P. D.; Webb, J. A. & Collinson, M. E., *Pollen Analysis*.
- > Forcone, A. y Andrada, A. (ex aequo). 2007. Flora melífera de las regiones Pampeana Austral y Patagonia Extra-Andina. EDIUNS (Editorial de la Universidad Nacional del Sur), Bahía Blanca, 173 p.
- > Galimberti, A.; De Mattia, F.; Bruni, I.; Scaccabarozzi, D.; Sandionigi, A. 2014. A DNA Barcoding Approach to Characterize Pollen Collected by Honeybees. *PLOS ONE* 9 (10): e109363. doi:10.1371/journal.pone.0109363.
- > Guertler, P.; Eicheldinger, A.; Muschler, P.; Goerlich, O. & Busch, U. 2014. Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food chemistry*, 149, 302.
- > ISO 1994. International Organization for Standardization, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results, ISO Guide 5725-4. ISO, Geneva.
- > Jones, G.D. & Bryant, V. M. Jr. 2004. The use of ETOH for the dilution of honey. *Grana*, 43: 174-182.
- > Jun Wang, Michael M. Kliks S, Weiyue Qu, Soojin Jun, Gongyi Shi II and Qing X. Li 2009. Rapid Determination of the Geographical Origin of Honey Based on Protein Fingerprinting and Barcoding Using MALDI TOF MS J. *Agric. Food Chem.* 57 (21), pp 10081-10088
- > Louveaux, J; Maurizio, A. et G. Vorwohl. 1970. Méthodes de la Méliissopalynologie. Commission internationale de la botanique apicole de l'U.F.S.B. *Apidologie*, 1 (2) :211-227
- > Louveaux, J.; Maurizio, A. et G. Vorwohl. 1978. Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59 (4): 139-157.
- > Low, N.; Schweger C.; Sporns, P. 1989. Precautions in the use of melissopalynology. *J. Apic. Res.* 28: 50-54.
- > Lutier, P.M.; Vaissière, B.E. 1993. An improved method for pollen analysis of honey. *Rev.*
- > Paleobot. *Palynol.* 78: 129-144.
- > Maurizio, A.; Louveaux J. 1965. Pollens de plantes mellifères d'Europe. Union des groupements apicoles français. Paris.
- > Moar, N. T. 1985. Pollen Analysis of New Zealand Honey. *N. Z. Journal of Agricultural Research.* 28: 39-70.
- > Pendleton, M. 2006. Descriptions of melissopalynological methods involving centrifugation should include data for calculating Relative Centrifugal Force (RCF) or should express data in units of RCF or gravities (g)'. *Grana*, 45 (1): 71-72.
- > Persano Oddo, L.; Piazza, M.G.; Sabatini, A.G.; Accorti, M. 1995. Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26: 453-465.
- > Persano Oddo L.; Piro, R. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets, *Apidologie*, 35 (Suppl. 1): S38-S81.
- > Ricciardelli d'Albore, G. 1998. Mediterranean melissopalynology. Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi, Perugia.
- > Reitsma, T. 1969- Size modification of recent pollen grains under different treatments.
- > Review of Palaeobotany and Palynology 9: 175-202.
- > Richardson, R. T.; Lin, C.H.; Sponsler, D. B.; Quijia, J. O.; Goodell, K., & Johnson, R. M. 2015. Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3 (1), apps.1400066. doi:10.3732/apps.1400066
- > Rodríguez & Rojas. 2006. El herbario. Administración y manejo de colecciones botánicas. Herbarium Truxillense (Hut) Missouri Botanical Garden. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Ed. Rodolfo Vásquez.
- > Tellería, M.C. 2001. El polen de las mieles, un indicador de su procedencia botánica y geográfica. *Ciencia Hoy*. Vol. 11 (62): 63 - 66.
- > Terrab, A.; Recamales, A.F.; Hernanz D. & F.J. Heredia. 2004. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88: 537-542.
- > Von Der Ohe, W.; Persano Oddo, L.; Piana, M.L.; Morlot, M. and Martin, P. 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35 S18-S25
- > Wodehouse, R. P. 1935. Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw-Hill Book Company, New York Londres.

III › ANÁLISIS SENSORIAL

› Autores

María Cristina Ciappini (UTN Regional Rosario)

› INTRODUCCIÓN

La amplia variedad de flores que atrae a las abejas, origina mieles con una multiplicidad de colores, sabores y aromas, que los consumidores aprecian y eligen.

Estas características pueden ser evaluadas aplicando metodologías del análisis sensorial, con el fin de completar la caracterización por origen botánico o para el control de calidad, con el propósito de asegurar la correspondencia con un origen floral determinado.

En este interés por la aplicación del análisis sensorial en miel, pueden reconocerse dos objetivos interrelacionados: la caracterización y la valorización del producto. Por caracterización, se entiende encuadrar el producto en un tipo o estándar predefinido. También permite la detección de defectos en las prácticas agrícolas y en la conservación (fermentación, impurezas, off-flavors, humo, caramelizado) y es esencial en los estudios de preferencia de los consumidores.

Para establecer las características sensoriales de las mieles en relación a sus orígenes florales, la metodología sensorial analítica más apropiada es la de los perfiles descriptivos cuantitativos, tal como lo expresa la Norma IRAM 15980 (2014).

Esta técnica descriptiva requiere la conformación de un panel de evaluadores seleccionados y entrenados, que habrán de ser monitoreados periódicamente para evaluar su desempeño.

LUGAR DE TRABAJO, CONDICIONES Y MATERIALES

LUGAR DE TRABAJO Y CONDICIONES DE ENSAYO PARA EL PANEL

El lugar de trabajo del panel de evaluadores sensoriales corresponde a lo establecido en IRAM 20003 (2012).

Los evaluadores utilizarán cabinas individuales, que se encontrarán emplazadas en un lugar confortable, libre de olores extraños y ruidos, y/o cualquier otra contaminación ambiental que pudiera interferir con las determinaciones sensoriales. Deben contar con iluminación acorde a la tarea, pudiendo disponer de una lámpara de color rojo, para presentaciones que requieran enmascarar el color. Debe evitarse la iluminación solar directa.

Las paredes deben estar pintadas de color pastel, para no distraer o causar cansancio visual en los evaluadores, también se evitarán brillos y contrastes.

Los evaluadores deben abstenerse de fumar, comer o beber cualquier alimento o bebida, excepto agua, durante los 30 minutos previos a la prueba. También deben abstenerse de utilizar pasta dental y/o enjuague bucal muy aromático, elementos de higiene personal o cosmetología o cualquier otro material que pueda aportar aromas de algún tipo que interfieran en la prueba o contaminen el área de prueba, para el mismo período.



20 › Lugar de trabajo. Cabinas

MATERIALES NECESARIOS

Los evaluadores tendrán a su disposición agua potable y algún limpiador de paladar, como pan, galletas de agua sin sal o galletas de arroz, en cantidad necesaria para cada ensayo.

Para la presentación de las muestras, se recomienda utilizar copas de vidrio transparente incoloro, libre de estrías y burbujas (diámetro de la boca 50 mm, capacidad 160 ml), una por cada muestra y por cada evaluador; vasos descartables para agua, jarras para agua, agitadores para café, servilletas de papel, cucharas para postre de acero inoxidable, papel de aluminio para cubrir las copas, platos para postre descartables.

Conviene prever contar con algún presente, golosina o snack, para gratificar a los evaluadores.

PANEL DE EVALUADORES

SELECCIÓN DEL PANEL DE EVALUADORES

Es conveniente realizar una selección preliminar, basada en el interés y la voluntad de quienes desean participar. Los potenciales candidatos deberán completar un formulario con información personal, sobre su salud y expresar su grado de preferencia por los alimentos. Se evaluará su capacidad de comunicación, disponibilidad y motivación. En todos los casos, los datos registrados sobre las personas deberán cumplir con los requerimientos legales que pudieran regir.

Los candidatos a constituir el panel participarán de pruebas de selección, que comprenden ensayos destinados a evaluar el desempeño de sus sentidos sensoriales en la detección y reconocimiento de estímulos, que permiten evaluar su agudeza sensorial y su capacidad de discriminación (IRAM 20005-1: 1996).

Las pruebas se realizan en diferentes sesiones, en lugares debidamente acondicionados IRAM 20003: 2012 (ISO 8589: 2007), y comprenden:

- › Prueba de Reconocimiento de Gustos y Ordenamiento por Intensidad (IRAM 20005-1: 1996)
- › Ensayo de Reconocimiento y Descripción de Olores, para el cual se recomienda el método de presentación en tiras embebidas (IRAM 20006: 2004).
- › Prueba de Visión de Colores, utilizando el Test de Ishihara (1971) que permite detectar si una persona padece ceguera al color.
- › Ensayo de Descripción de Texturas, en la que se les suministran una serie de productos alimenticios a los candidatos, quienes habrán de describir las características de textura (IRAM 20005-1: 1996).

Se recomienda seleccionar a los candidatos que alcancen o superen el 65% del máximo puntaje posible en cada ensayo.

También es factible realizar la selección de evaluadores aplicando el método secuencial de triángulos (IRAM 20008: 2012), que permite evaluar la capacidad de los candidatos para diferenciar las características globales de los alimentos. Sin embargo, considerando que el propósito es conformar un panel para análisis descriptivo cuantitativo, se recomiendan los ensayos de agudeza sensorial, mencionados previamente.

ENTRENAMIENTO DEL PANEL DE EVALUADORES

El propósito de la etapa de entrenamiento es que los evaluadores logren familiarizarse con las técnicas sensoriales y con los productos a analizar, que desarrollen la habilidad para reconocer e identificar atributos y que perfeccionen la sensibilidad y la memoria, para realizar mediciones precisas y consistentes. Es importante desarrollar un lenguaje común, ampliar el vocabulario y concientizar a los sujetos, para que realicen juicios analíticos y no evaluaciones de preferencia.

Las sesiones de entrenamiento se llevan a cabo en lugares adecuados (IRAM 20003: 2012), de acuerdo a las directivas generales para la metodología de análisis sensorial (IRAM 20002: 2012) y con la coordinación de un líder de panel (IRAM 20017-1: 2013).

Los evaluadores prueban referencias asociadas a cada atributo sensorial y a un score en una escala. Se recomienda que las referencias sean preparadas con alimentos y que, preferentemente, puedan ser ingeridos por los evaluadores. Esta recomendación también se aplica para el entrenamiento en las familias y subfamilias de olores y aromas, para la que se utilizarán las referencias indicadas en la imagen 22 o las sugeridas en IRAM 15980, Anexo B (2014).

Finalmente, se presentan muestras control, que los evaluadores deben describir correctamente en al menos un 70%.

Se estima que la etapa de entrenamiento se extiende entre dos y cuatro meses, según la frecuencia de las sesiones. El número de miembros del panel no podrá ser inferior a siete (Piana et al., 2004).



21 ▸ Entrenamiento del panel

EVALUACIÓN Y MONITOREO DEL PANEL DE EVALUADORES

Cuando se considere que el entrenamiento ha concluido, el panel participará de un control, para evaluar su desempeño. Para ello, analizará al menos seis muestras, que se presentarán por triplicado, en un orden apropiadamente balanceado.

Los resultados de puntuación de cada evaluador y del panel serán analizados aplicando análisis de varianza (Johnson, 2004).

La variación significativa entre evaluadores indica la presencia de sesgos, es decir que uno o más de ellos otorgan puntajes consistentemente más altos o más bajos que los restantes. Se identificará el/los evaluadores que se alejan del desempeño esperado, quien/es deberán continuar con su entrenamiento.

Una variación significativa entre muestras indica que los evaluadores, como panel, están diferenciando exitosamente entre muestras. Una interacción significativa entre evaluadores y muestras indica que uno o más de los evaluadores están usando la escala en forma diferente de los otros. En algunos casos, la interacción entre evaluadores y muestras puede reflejar un desacuerdo respecto del ordenamiento de las muestras.

Si se desea evaluar simultáneamente el desempeño del panel para todos los atributos que se analizan en la miel, deberá recurrirse a herramientas de estadística multivariada (Johnson, 2004).

Es necesario controlar periódicamente la efectividad y el desempeño de los evaluadores. Para ello es apropiado realizar un control similar al propuesto anteriormente, que contemple todos los atributos o sólo algunos, a criterio del líder del panel.

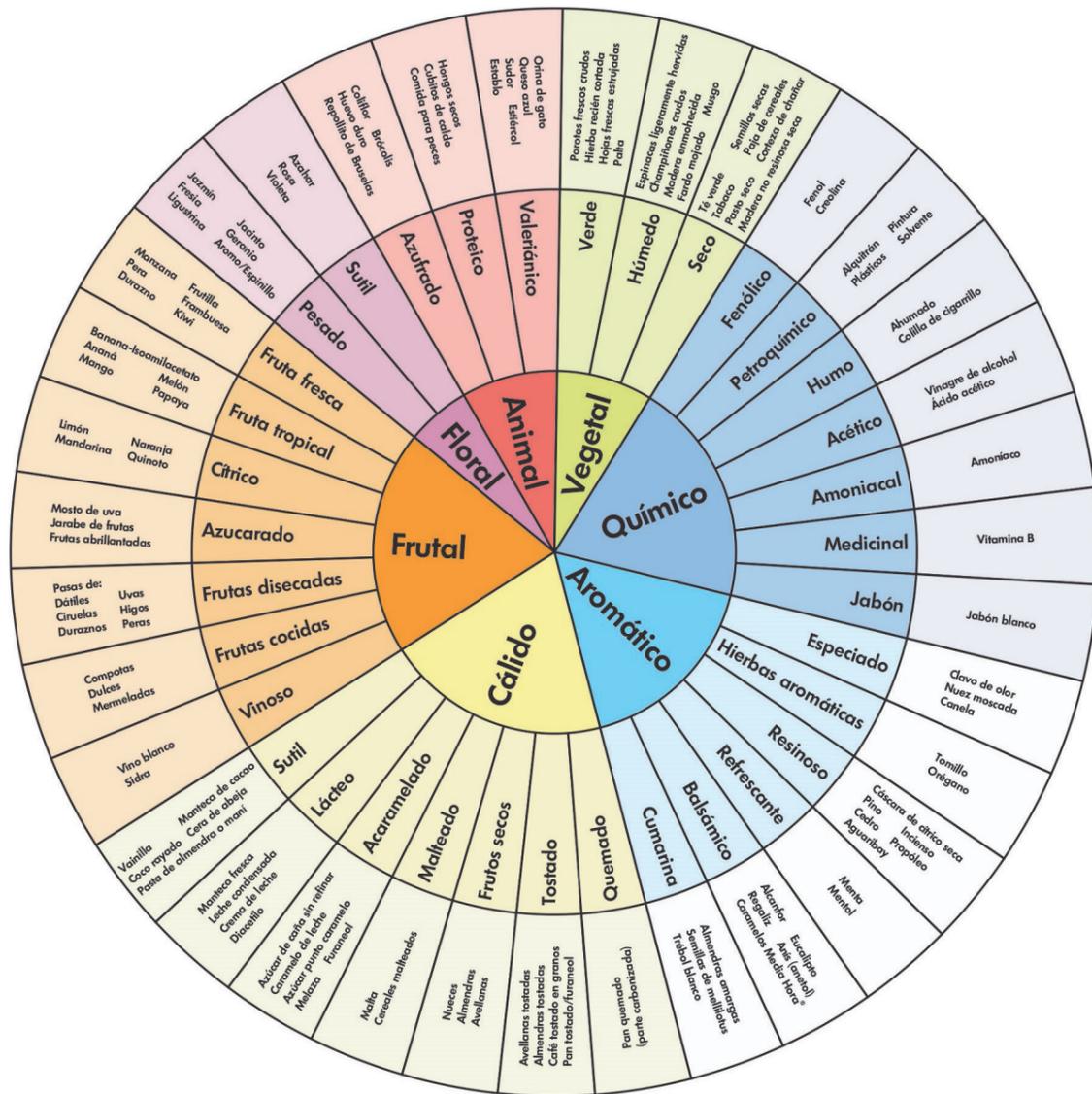
ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO

Se sugiere utilizar la Norma IRAM 15980 (2014). Podrán consultarse, además, otras Normas IRAM, referidas a métodos para establecer un perfil descriptivo (IRAM 20012: 1997; IRAM 20013: 2001; IRAM 20015: 2002), u otra bibliografía disciplinar.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se prepara una presentación individual para cada evaluador, colocando entre 30 y 40 g de miel en envases transparentes (ver Materiales necesarios), que se tapan y rotulan con un número aleatorio de tres cifras. Las muestras se preparan al menos 2 horas previas al ensayo, para su estabilización y para que se liberen los volátiles en el espacio de cabeza, y como máximo con 24 horas de anticipación. Terminada la prueba, las muestras deben desecharse.

Se recomienda presentar las muestras en el estado físico en el que se encuentran, conservando sus características de apariencia. Sin embargo, es necesario presentar una muestra en estado líquido para la evaluación del color. Para ello, si la miel estuviera parcial o totalmente cristalizada, se coloca una porción en un baño a no más de 56°C, hasta que se funda completamente. Una vez líquida, se vierte el producto en un tubo de ensayo de vidrio transparente de 8 mm de diámetro, con fondo plano y tapa roscada. Se le asigna el mismo número aleatorio de tres cifras con el que se rotuló la muestra de miel correspondiente en la copa.



22 › Rueda de olores y aromas. Argentina (2013)

ENSAYO

Los evaluadores prueban cada muestra y registran la intensidad que perciben para cada atributo (IRAM 20014: 1998). El registro puede hacerse en una planilla como la que se indica en la imagen N° 23.

Se procede a iniciar el análisis sensorial de la miel por la fase olfatoria, debiendo indicarse intensidad, familia/s y subfamilia/s del olor percibido. Para los atributos de apariencia, se observa la muestra en el recipiente y se toma una pequeña porción con un agitador para café y se evalúa la velocidad de caída (fluidez o viscosidad). Se esparce la muestra contra la pared del recipiente que la contiene, para apreciar la cantidad y el tamaño de los cristales (granulosidad).

Colocando aproximadamente 0,5 g de miel sobre la lengua y dejándola disolver, se miden los gustos dulce, amargo, ácido y salado; así como los aromas, que se clasifican de acuerdo a las familias y subfamilias, como se hizo con los olores.

Colocando una nueva porción de muestra en la boca, los evaluadores diferencian las sensaciones táctiles (viscosidad, granulosidad, aspereza, untabilidad, adhesividad, facilidad de disolución, etc.) y sensaciones trigeminales (astringencia, picantez, frescor, pungencia, etc.), si las hubiere. Finalmente, se evalúa la persistencia en la boca.

DESCRIPCION SENSORIAL DE MIELES

Nombre Cabina Fecha

Olor
0 1 2 3 4 5 6 7

Muestra	Descripción						
	Floral	Frutal	Cálido	Aromático	Químico	Vegetal	Animal ¿A qué huele?

Fluidez
0 1 2 3 4 5 6 7
No fluye Muy fluida

Granulosidad
Tamaño de cristales
0 1 2 3 4 5 6 7
Nula Muy fina Fina Media Grosera Muy Grosera

Cantidad de cristales
0 1 2 3 4 5 6 7
Ausencia Escasa Media Abundante Muy Abundante

Dulzor
0 1 2 3 4 5 6 7
Ausencia Débil Medio Intenso Muy Intenso

Otro gusto (salado, ácido, amargo) Intensidad (baja, media, alta)

Muestra	Aroma	Sensaciones táctiles en la boca	Sensaciones trigeminales

Persistencia
0 1 2 3 4 5 6 7
Nula Baja Media Larga

Granulosidad
0 1 2 3 4 5 6 7
Nula Muy fina Fina Media Grosera Muy Grosera

Intensidad del Color
0 1 2 3 4 5 6 7
Muy claro Claro Medio Oscuro Muy oscuro

Muestra	Ambac	Verdes	Rojas	Grises	Amarillas	Otras

23 › Ejemplo de Planilla para el registro de los resultados del Análisis Cuantitativo Descriptivo de Miel.

Entre muestra y muestra, el evaluador puede ingerir neutralizantes tales como agua, galletas de arroz o galletitas de agua sin sal. El agua debe ser insípida, libre de olores, preferentemente de dureza conocida (IRAM 20002: 2012).

Es recomendable que los evaluadores evalúen el color de la miel, observando especialmente los matices rojizos, verdosos, amarillos, grisáceos u otros que pudieran detectarse, sobre la muestra de miel original o fundida por calentamiento hasta desaparición de los cristales, como se indicó en el párrafo referido a preparación de la muestra.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El líder de panel calcula el promedio y el desvío estándar de los resultados cuantitativos informados por cada evaluador, sobre las repeticiones de una misma muestra y luego el promedio del panel.

Los resultados para cada muestra de miel suelen presentarse en un gráfico radial, como el que se muestra, a modo de ejemplo, en la imagen N° 24.

Para comparar muestras entre sí, los resultados se examinan estadísticamente por medio de alguna técnica apropiada de varianza múltiple o de estadística multivariada (Johnson, 2004). Se requieren al menos 15 muestras de cuatro cosechas sucesivas, para tener valores orientativos sobre las características sensoriales específicas de un origen floral.

DESCRIPCIÓN SENSORIAL DE LA MUESTRA	
Muestra N°	
Fecha de ingreso:	
EXAMEN VISUAL	
Estado Físico	Muestra con una cantidad muy abundante de cristales muy finos y fluidez baja
Color	Intensidad: media
EXAMEN OLFATIVO	
Intensidad del olor	Moderada
Descripción del olor	Químico (acético), animal
EXAMEN GUSTATIVO	
Gustos	Dulzor moderado Ácido, salado y amargo: ausencia
Aroma	Cálido (caramelo, café)
Persistencia	Entre baja y media, sin gusto residual

24 › Ejemplo de informe de los resultados del Análisis Cuantitativo Descriptivo de Mieles.

OTROS MÉTODOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE MIEL. MEDICIONES INSTRUMENTALES

Entre los instrumentos que se aplican para evaluar características sensoriales, se pueden citar texturómetros, colorímetros, narices y lenguas electrónicas. En su mayoría, los instrumentos se basan en imitar el funcionamiento de los sentidos humanos.

En relación a la miel, la principal medición instrumental relacionada con la textura es la determinación de la viscosidad. Otra característica que puede medirse instrumentalmente es el color, utilizando equipos que permiten establecer sus atributos: tono o matiz, saturación y luminosidad, aplicando el sistema triestímulo CIELab (L, a, b, C y h) o CIELuv (Terrab, *et al.*, 2002).

Instrumentos incorporados más recientemente son las narices y las lenguas electrónicas. Están dotadas de sensores químicos y de un programa quimiométrico de reconocimiento de modelos, que es capaz de comparar perfiles olfativos/aromáticos.

En las narices electrónicas, los sensores están constituidos por diferentes materiales (óxidos metálicos, polímeros conductores, cristales piezoeléctricos), que modifican sus propiedades eléctricas cuando interactúan con los compuestos volátiles, proporcionando una huella olfativa de la fracción detectada. En los últimos años, apareció un nuevo tipo de nariz electrónica, basado en la espectrometría de masas (HS-MS), que no requiere preparación de la muestra y cuyas mediciones no sufren interferencias. Sea cual sea el tipo de sensor empleado, se tratará de sistemas multisensores, con lo que la respuesta que se obtenga será una matriz de datos multidimensional, que las herramientas quimiométricas (análisis de agrupaciones, técnicas de clasificación, redes neuronales, análisis de componentes principales, análisis discriminante) se encargarán de transformar en información analítica de utilidad. Aunque no informa las características del olor o aroma, permite diferenciar alimentos por sus perfiles aromáticos. Para el caso de la miel, puede confirmar un origen floral o clasificar muestras de miel asociadas a un origen botánico o geográfico (Huang, L. *et al.*, 2015; Hong, E. J. *et al.*, 2011; Dymerski, T. *et al.*, 2014).



25 › Nariz Eelectrónica

En las lenguas electrónicas, los sensores se basan en membranas ion selectivas, membranas lípido/poliméricas o sensores de vidrio de calcogenuro, cuyos resultados se analizan también con métodos de estadística multivariada. Su uso ha permitido diferenciar mieles de acuerdo al polen predominante (Dias, L. *et al.*, 2008).

› BIBLIOGRAFÍA

- › Ciappini, MC. 2012. Sensory Analysis Applied to Bee Honey. Capítulo 2 en: Recent Contributions to Sensory Analysis of Foods. 21-32. Editor: Amalia Calviño, Kerala, India: Research Signpost. ISBN: 978-81-308-0472-9.
- › Dias, L., Peres, A., Vilas Boas, M. Rocha, M. Estevinho, L., Machdo, A (2008). An electronic tongue for honey classification. *Microchim Acta*, 163: 97-102.
- › Dymerski, T., Gębicki, J., Wardencki, W., Namieśnik, J. (2014). Application of an electronic nose instrument to fast classification of polish honey types. *Sensors*, 14(6), 10709-10724.
- › IRAM 15980: 2014. Miel. Análisis Sensorial. Guía general para establecer el perfil sensorial. Parte 1.
- › IRAM 20005-1: 1996 (ISO 8586: 2012). Análisis Sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte 1 – Evaluadores seleccionados.
- › IRAM 20003: 2012 (ISO 8589: 2007). Análisis sensorial. Guía general para la instalación de locales de ensayo.
- › IRAM 20006: 2004 (ISO 5496: 2006). Análisis sensorial. Iniciación y entrenamiento de los evaluadores en la detección y reconocimiento de olores.
- › Hong, E. J., Park, S. J., Lee, H. J., Lee, K. G., & Noh, B. S. (2011). Analysis of various honeys from different sources using electronic nose. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31(2), 273-279.
- › Huang, L., Liu, H., Zhang, B., Wu, D. (2015). Application of electronic nose with multivariate analysis and sensor selection for botanical origin identification and quality determination of honey. *Food and bioprocess technology* 8(2), 359-370.
- › IRAM 20008: 2012 (ISO 4120: 2004). Análisis Sensorial. Metodología. Ensayo Triangular.
- › IRAM 20002: 2012 (ISO 6658: 2017). Análisis Sensorial. Guía general para metodología.
- › IRAM 20017-1: 2013 (ISO 13300-1: 2006). Análisis Sensorial. Guía general para el personal de un laboratorio de análisis sensorial. Parte 1 - Responsabilidades del personal.
- › Johnson, D.E. 2004. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Int. Thomson Publishing, Madrid.
- › IRAM 20012: 1997 (ISO 6564: 1985). Análisis Sensorial. Metodología. Método para determinar el perfil de flavor.
- › IRAM 20013: 2001 (ISO 11036: 1994). Análisis Sensorial. Metodología. Perfil de textura.
- › IRAM 20015: 2002 (ISO 11035: 1994). Análisis Sensorial. Identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por el método multidimensional.
- › IRAM 20014: 1998 (ISO 4121: 2003). Evaluación de productos alimenticios mediante métodos que emplean escalas.
- › Ishihara, S. 1971. Test for Colour Blindness, Kanahara Shuppan, Kyoto.
- › Piana, M. L.; Persano Oddo, L.; Bentabol, A.; Bruneau, E.; Bogdanov, S.; Guyot Declerck, C. 2004. Sensory analysis applied to Honey: state of the art. *Apidologie*. 35, S26.
- › Terrab, A., Diez, M.J., Heredia, F.J. (2002). Chromatic characterisation of Moroccan honey by diffuse reflectance and tristimulus colorimetry. *Non uniform and uniform color spaces. Food Sci. Tech. Int.* 8(4): 189-195.

› ANEXO. RESOLUCIONES

› RESOLUCIÓN 1051/94 SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN Tipificación por origen botánico

Buenos Aires, 02 de diciembre 1994.

Visto el expediente N° 804.972/94 del registro de esta Secretaría en el cual se propicia establecer un sistema de clasificación de la miel teniendo como base su origen botánico, y considerando:

Que la apicultura es una actividad importante del sector agropecuario, ya que la República Argentina es uno de los principales países productores y exportadores de miel, generando ingresos de divisas genuinas para el país.

Que la exportación de dicho producto se realiza, tradicionalmente, a granel sin mayor diferenciación en su calidad.

Que las tendencias de los mercados internacionales se dirigen hacia el consumo de mieles con características propias.

Que entre los criterios de clasificación posibles se destaca el basado en el origen botánico de las mieles, dado que cada especie floral genera condiciones que satisfacen las exigencias de diferentes tipos de consumidores.

Que las mieles clasificadas por su origen botánico alcanzan mayores cotizaciones en el mercado internacional, lo que permitiría al apicultor incrementar la rentabilidad de su explotación.

Que por lo expuesto, resulta conveniente implementar un sistema de clasificación de la miel en base a su origen botánico.

Que el suscripto es competente para dictar el presente acto en virtud de lo dispuesto por el artículo 4º del Decreto N° 2692 del 23 de octubre de 1979.

Por ello, El Secretario de Agricultura, Ganadería y Pesca resuelve:

ARTÍCULO 1º.- Establécese un sistema de clasificación de la miel según el origen botánico, de acuerdo con las normas de la presente resolución. Su adopción será optativa.

ARTÍCULO 2º.- La clasificación se deriva del estudio de las características organolépticas, físico - químicas y microscópicas de la miel que permitan determinar el predominio de los néctares de las especies vegetales de las cuales proceden.

Para clasificar la miel según su origen botánico, se establecen las siguientes categorías:

- a. **Mieles de flores:** Es la miel obtenida principalmente de los néctares de las flores. Se distinguen:
 1. **Mieles Monoflorales o Uniflorales:** Cuando el producto proceda primordialmente de flores de una misma familia, género o especie y posea características organolépticas, físico - químicas y microscópicas propias.
 2. **Mieles Poliflorales, Multiflorales o Milflorales:** En su composición se encuentra el néctar de varias especies v egetales, sin que ninguna de ellas pueda considerarse predominante.
- b. **Miel de mielada:** Es la miel obtenida primordialmente a partir de secreciones de las partes vivas de las plantas o de insectos succionadores presentes en ellas.

ARTÍCULO 3°.- Se considerarán mieles monoflorales o uniflorales aquellas en cuya composición se encuentre, como mínimo, un CUARENTA Y CINCO POR CIENTO (45%) de polen de la misma familia, género o especie floral, y posea características organolépticas, físico - químicas y microscópicas propias, excepto las mieles que se mencionan a continuación:

- a. **Miel de citrus (Citrus sp.):** Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de veinticinco por ciento (25%) de granos de polen de citrus, permitiéndose hasta un veinte por ciento (20%) de humedad.
- b. **Miel de eucalipto (Eucalyptus sp.):** Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de setenta por ciento (70%) de granos de polen de dicha especie.
- c. **Miel de treboles (Trifolium sp):** Es aquella en cuya composición se encuentran presentes pólenes de melilotus, alfalfa (Medicago sativa) y lotus, en su conjunto alcanzando un valor mínimo de cuarenta y cinco por ciento (45%).
- d. **Miel de alfalfa (Medicago sativa):** Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de veinte por ciento (20%) de granos de polen de dicha especie.
- e. **Miel de melilotus:** Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de veinte por ciento (20%) de granos de polen de dicha especie.
- f. **Miel de lotus:** Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de veinte por ciento (20%) de granos de polen de dicha especie.

ARTÍCULO 4°.- Las mieles que se comercialicen indicando su origen botánico, deberán llevar impresos sobre los envases y/o en los rótulos adheridos, en lugar visible, una leyenda que indique su origen botánico, el número de partida identificatoria del laboratorio certificador y el número que le corresponde a dicho laboratorio en el registro respectivo.

ARTÍCULO 5°.- La certificación de la clasificación de la miel por origen botánico será realizada por laboratorios nacionales, oficiales o privados, inscriptos conforme con la Resolución N° 135 del 24 de agosto de 1987 del Servicio Nacional de Sanidad Animal.

ARTÍCULO 6°.- Las mieles con certificación de clasificación por origen botánico deberán cumplir con los requisitos básicos que establece el Código Alimentario Argentino.

ARTÍCULO 7°.- Los productores que requieran la certificación de clasificación de sus mieles por origen botánico conforme a las normas de la presente resolución, deberán suministrar, mediante declaración jurada, la siguiente información al laboratorio respectivo:

- a. Tipo de abeja.
- b. Ubicación de la colmena, apiario o área de acopio.
- c. Fecha de recolección.
- d. Período probable de entrada de néctar.
- e. Tipo de extracción (manual, centrífuga manual, a motor, etc.).
- f. Tipo de desoperculador, tanque de decantación, etc.
- g. Toda otra información que requiera el laboratorio.

ARTÍCULO 8°.- Los análisis que efectúen los laboratorios se harán de muestras de miel recién cosechadas, obtenida según el siguiente procedimiento:

- a. Se deben extraer cien (100) gramos de cada parte superior, media e inferior del recipiente de envasado (tambor).
- b. Las muestras así obtenidas deberán ser homogeneizadas.
- c. Posteriormente, se colocarán en tres (3) frascos de contenido no inferior a cincuenta (50) gramos, sellándolos y etiquetándolos en el lugar, así como el tambor muestreado.

Uno de los frascos será utilizado para realizar los análisis, otro quedará en poder del productor y el restante lo conservará el laboratorio durante dieciocho (18) meses como muestra de referencia.

ARTÍCULO 9°.- Cada laboratorio deberá formar una palinoteca de referencia. Los patrones polínicos de cada especie se realizarán siguiendo la técnica de Erdtman (1966).

ARTÍCULO 10°.- Los análisis cuantitativos para determinación del origen botánico de la miel se realizarán siguiendo la metodología de Maurizio (1979).

ARTÍCULO 11°.- Los análisis cualitativos para determinación del origen botánico de la miel se realizarán siguiendo la metodología de Louveaux, Maurizio y Worwohl (1978).

ARTÍCULO 12°.- Los laboratorios emitirán DOS (2) tipos diferentes de certificados, denominados "A" y "B", según que la muestra analizada haya sido extraída directamente por personal del laboratorio o por el productor, respectivamente.

ARTÍCULO 13°.- Regístrese, comuníquese y archívese.

FIRMADO

Ing. FELIPE C. SOLA

Secretario de Agricultura, Ganadería y Pesca Dirección de Industria Alimentaria S.A.G.P. y A.

miel@sagyp.mecon.gov.ar

Tel: (54 11) 4349-2061 / 2156

Fax: (54 11) 4349-2097

› **RESOLUCIÓN 274/95**
SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN
Tipificación por origen botánico
(Modificatoria de la Res. SAGyP N° 1051/94)

Buenos Aires, 06 noviembre 1995.

Visto el expediente N° 804.105/95 del registro de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y la Resolución N° 1.051 del 2 de diciembre de 1994; también del registro de esta secretaría, que establece un sistema de clasificación de la miel teniendo como base su origen botánico; y considerando:

Que la aplicación de la mencionada resolución ha demostrado la necesidad de modificar ciertas normas, así como la metodología usada, para poder responder así a las exigencias que caracterizan la demanda de los principales mercados internacionales.

Que la Delegación II de la Dirección de Asuntos Jurídicos del Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos ha tomado la intervención que le compete.

Que el suscripto es competente para dictar el presente acto en virtud de lo dispuesto por el artículo 4° del decreto 2.692 del 23 de octubre de 1979.

Por ello, El Secretario de Agricultura, Ganadería y Pesca resuelve:

ARTÍCULO 1°.- Sustitúyense los artículos 3°, 4°, 7°, 8°, 9° y 11° de la Resolución N° 1051 de fecha 2 de diciembre de 1994 del registro de esta Secretaría por los siguientes:

ARTÍCULO 3°.- Se considerarán mieles monoflorales o uniflorales aquellas en cuya composición se encuentre, como mínimo, un cuarenta y cinco por ciento (45%) de polen de la misma familia, género o especie floral, y posea características organolépticas, físico-químicas y microscópicas propias, excepto las mieles que se mencionan a continuación:

- a. **Miel de citrus: (Citrus sp):** Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de diez a veinte por ciento (10 a 20%) de granos de polen de citrus, permitiéndose hasta un veinte por ciento (20%) de humedad.

b. Miel de eucalipto (Eucalyptus): Es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de SETENT A POR CIENTO (70%) de granos de polen de dicha especie.

c. Miel de tréboles (Trifolium): Es aquella en cuya composición se encuentran presentes pólenes de melilotus, alfalfa (Medicago sativa) y lotus, en su conjunto alcanzando un valor mínimo de cuarenta y cinco por ciento (45%).

d. Miel de alfalfa (Medicago sativa): es aquella en cuya composición se encuentra un mínimo de veinte por ciento (20%) de granos de polen de dicha especie.

ARTÍCULO 4°.- Las mieles que se comercializan indicando su origen botánico deberán llevar impresos sobre los envases y/o en los rótulos adheridos, en lugar visible, una leyenda que indique su origen botánico, el número de partida identificatoria del laboratorio certificador y el número que le corresponde a dicho laboratorio en el registro respectivo. Los tambores de los que provenga la miel a analizar deberán estar identificados con un número indeleble, indicando así la partida a la que pertenecen.

ARTÍCULO 7°.- Los productores que requieran la certificación de clasificación de sus mieles por origen botánico conforme a las normas de la presente resolución, deberán suministrar, mediante declaración jurada, la siguiente información al laboratorio respectivo:

- Ubicación de la colmena, apiario o área de acopio.
- Fecha de recolección
- Período probable de entrada de néctar.
- Proceso de extracción usado (manual, centrífuga manual, a motor, etc.).
- Toda otra información que requiera el laboratorio.

ARTÍCULO 8°.- Los análisis que efectúen los laboratorios se harán de muestras de miel recién cosechadas, obtenida según el siguiente procedimiento:

- Se deben extraer cien (100) gramos de cada parte superior, media e inferior del recipiente de envasado (tambor).
- Las muestras así obtenidas deberán ser homogeneizadas.
- Posteriormente, se colocarán en tres (3) frascos de contenido no inferior a cincuenta (50) gramos, sellándolos y etiquetándolos en el lugar, así como el tambor muestreado.

Uno de los frascos será utilizado para realizar los análisis, otro quedará en poder del productor y el restante lo conservará el laboratorio durante doce (12) meses como muestra de referencia.

ARTÍCULO 9°.- Cada laboratorio deberá formar una palinoteca de referencia. Los patrones polínicos de cada especie se realizarán siguiendo las técnicas con o sin acetólisis (1966).

ARTÍCULO 11°.- Los análisis cualitativos para determinación del origen botánico de la miel y el análisis cuantitativo se realizarán siguiendo la metodología de Louveaux, Maurizio y Worwohl (1978).

ARTÍCULO 2°.- Derógase el artículo 10 de la resolución mencionada precedentemente.

ARTÍCULO 3°.- Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese.

FIRMADO

Ing. FELIPE C. SOLA
 Secretario de Agricultura, Ganadería y Pesca Dirección de Industria Alimentaria
 S.A.G.P. y A.
 miel@sagyp.mecon.gov.ar
 Tel: (54 11) 4349-2061 / 2156
 Fax: (54 11) 4349-2097

› RESOLUCIÓN 111/96

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

Habilitación, inscripción y funcionamiento de los laboratorios certificadores del origen botánico de la miel.

Buenos Aires, 1 de marzo de 1996

Visto el Expediente N° 800-005786/95 de la ex-Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, por el cual se propone normalizar la habilitación y funcionamiento de los laboratorios que certifiquen origen botánico de miel y, considerando

Que la República Argentina es uno de los principales países productores y exportadores de miel.

Que la exportación del mencionado producto se realiza, tradicionalmente a granel sin diferenciación en su calidad.

Que debido a la puesta en vigencia de la Resolución N° 1051 de fecha 2 de diciembre de 1994, modificada por Resolución N° 274 de fecha 6 de noviembre de 1995, ambas de la ex-Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, se implementa un sistema de clasificación de la miel en base a su origen botánico, la cual permite alcanzar mayores cotizaciones tanto en el mercado interno como externo, mejorando así la rentabilidad del producto.

Que se carece hasta el presente de una normativa que establezca la habilitación y el funcionamiento de los laboratorios certificadores del origen botánico de la miel.

Que la Delegación II de la Dirección General de Asuntos Jurídicos ha tomado la intervención que le compete.

Que el suscripto es competente para dictar el presente acto en virtud lo dispuesto por el Decreto N° 2773 de fecha 29 de diciembre de 1992.

Por ello, el Secretario de Agricultura, Pesca y Alimentación resuelve:

ARTÍCULO 1°.- La habilitación, inscripción y funcionamiento de los laboratorios certificadores del origen botánico de la miel estarán sujetos a las prescripciones de las presentes normas y de las que se indican en la Resolución N° 217 de fecha 7 de abril de 1995 del Servicio Nacional de Sanidad Animal, estando a cargo de la Gerencia de Laboratorios del citado Servicio Nacional el contralor de su cumplimiento.

ARTÍCULO 2°.- La certificación de la clasificación de la miel por origen botánico será realizada por laboratorios nacionales, oficiales o privados pertenecientes a la Red de Laboratorios autorizados a emitir resultados con validez oficial, conforme a la Resoluciones N° 135 del 24 de agosto de 1987 y N° 217/95 del Servicio Nacional de Sanidad Animal.

ARTÍCULO 3°.- El encargado o responsable del laboratorio deberá ser Biólogo, Ingeniero Agrónomo, Licenciado en Botánica, Licenciado en Ciencias Biológicas o acreditar títulos afines.

ARTÍCULO 4°.- Los laboratorios deberán estar provistos del siguiente instrumental:

- Microscopio óptico binocular, con condensador de campo con diafragma iris de apertura, con movimiento en altura para el ajuste del sistema según el principio de Koehler, diafragma de campo en la base del instrumento. Deberá contar con óptica acromática corregida al infinito, con las siguientes aperturas: (10 x 0,10); (40 x 0,45) y (100 x 1,25) (objetivo de inmersión).
- Centrífuga eléctrica.
- Balanza con menos de cero (0.00) de error en la pesada.
- Material de vidrio consistente en pipetas aforadas, vasos de precipitado, porta y cubre objetos, etc.
- Drogas de pureza reactiva para acetolizar el material, tales como ácido sulfúrico, anhídrido acético, ácido acético glacial, glicerina, etc.

ARTÍCULO 5°.- Los laboratorios deberán contar con una palinoteca fidedigna, con referencias a ejemplar de herbario, compuesta por doscientos cincuenta (250) preparados como mínimo, en la cual deberán encontrarse las especies que aparezcan como polen dominante y secundario en los informes que haya producido el mismo.

Para que un laboratorio pueda certificar la calidad de una miel monoflora de determinado origen botánico, deberá tener en su palinoteca de referencia el polen de la referida especie vegetal.

ARTÍCULO 6°.- Los laboratorios certificadores deberán guardar en archivo copia de todas las certificaciones que emitan por un plazo de tres (3) años y una porción de la miel analizada durante un período no inferior a un (1) año. Todas las certificaciones que emitan los laboratorios deberán estar avaladas por el protocolo tipo (Análisis Melisopalinológico) cuyo modelo como Anexo forma parte integrante de la presente resolución.

ARTÍCULO 7°.- Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese.

FIRMADO
Ing. FELIPE C. SOLA
Secretario de Agricultura, Ganadería y Pesca

› ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICO

Protocolo N°:

Fecha de entrada:

Fecha de análisis:

Laboratorio:

Solicitante:

Dirección:

Análisis requerido:

Identificación de la muestra:

Informe:

A.- Análisis cualitativo:

1. Presencia de polen Si No
2. Pólenes principales (hasta CINCO (5) tipos o especies con sus porcentajes)
3. Determinación de miel monoflora Si No Especie
4. Especies minoritarias características
5. Control de especies sospechadas
6. Determinación de todos los granos de polen presente

B. Análisis cuantitativo:

1. Clase cuantitativa según la técnica de Maurizio
2. Determinación, número y porcentajes por gramo de cada una de las especies
3. Número de granos contados
4. Método empleado para el análisis cuantitativo

Dirección de Industria Alimentaria
S.A.G.P. y A.
miel@sagyp.mecon.gov.ar
Tel: (54 11) 4349-2061 / 2156
Fax: (54 11) 4349-2097



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación