



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría  
en Tecnología de los Alimentos.**

Maestrando  
***Bqco. Ramón Alejandro Martínez***

## **Influencia del almacenamiento de miel de Yateí sobre las propiedades antimicrobianas y parámetros de calidad**

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster  
en Tecnología de los Alimentos”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora  
***Mgter. Amada Beatriz Pucciarelli Román***  
Co-Director  
***Dr. Luis Brumovsky***

**Posadas, Misiones 2013**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-  
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS QUIMICAS Y NATURALES**

**MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

***INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO DE MIEL DE YATEI  
SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y PARÁMETROS  
DE CALIDAD***

**Tesista: Bqco. Ramón Alejandro Martínez**

**Director: Mgter. Amada Beatriz Pucciarelli Román**

**Co-director: Dr. Luis Brumovsky**

**JUNIO 2013.**

**Posadas – Misiones- Argentina**

*Dedicatoria*

A mi viejo Ramón, que me enseñó sobre el esfuerzo y no le pude decir Gracias!!

A Maria de Itati.

**Nosotros aprobamos la tesis de Maestría de Ramón Alejandro Martínez.**

\_\_\_\_\_

Dr. Oscar Alfredo Garro.

Evaluador Externo – Universidad Nacional  
del Chaco Austral.

-----

Fecha

\_\_\_\_\_

Mgter. Miriam Alicia Garcia

Evaluador Interno – Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

-----

Fecha

\_\_\_\_\_

Dra. Maria Alicia Martos.

Evaluador Interno – Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

-----

Fecha

\_\_\_\_\_

Mgter. Amada Beatriz Pucciarelli Román

Director de Tesis – Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

-----

Fecha

\_\_\_\_\_

Dr. Luis A. Brumovsky

Co-Director de Tesis – Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

-----

Fecha

CALIFICACION: Elaboración de Tesis:.....

CALIFICACION: Defensa de Tesis.....

### *Agradecimientos*

- A Rosina, Alejo y Josefina por su acompañamiento a pesar de las horas ausente.
- A toda mi familia.
- Al CEDIT por haber financiado esta investigación.
- Al Laboratorio de Aguas y Alimentos del Ministerio de Salud, al DINCYT y al Laboratorio de Bromatología de la Municipalidad de Posadas, por haberme facilitado sus instalaciones para el desarrollo de las tareas analíticas.
- Al Laboratorio de Microbiología “Dr. Fernando Benassi” y su equipo humano por haber colaborado en el desarrollo del proyecto.
- A la Mgter. Amada “Mima” Pucciarelli por la dirección de la Tesis y sobre todo por su insistencia.
- Al Dr. Luis Brumovsky por su aporte en las correcciones del informe.
- A todos los que “por las buenas o las malas” me han traído hasta acá.

## RESUMEN

*Tetragonisca angustula*, es una abeja de la subfamilia Meliponidae conocida tradicionalmente como Yateí. Su miel se diferencia de la miel producida por *Apis mellifera* por ser menos viscosa, más ácida, poseer dulzura y aromas particulares, además, a esta miel se atribuyen cualidades antimicrobianas, por lo que en la provincia de Misiones aumenta permanentemente el número de productores que la comercializan. Debido a las características diferenciales que presenta esta miel respecto de la *Apis mellifera* es importante conocer su comportamiento en diferentes condiciones de almacenamiento, a los fines de conservar las características de la miel y asegurar el producto como inocuo.

El objetivo del trabajo fue determinar la influencia de temperatura, tipo de envase y tiempo de almacenamiento de la miel de Yateí sobre las propiedades antimicrobianas, parámetros de calidad microbiana y fisicoquímicos como pH, Hidroximetilfurfural, contenido de humedad, acidez y contenido de diastasa.

El melado se realizó por escurrimiento natural y con jeringas. La metodología utilizada para la determinaciones microbiológicas y fisicoquímicas está basada en el Código Alimentario Argentino (CAA) y en la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Las propiedades antimicrobianas se evaluaron por metodología de difusión en agar Mueller Hinton.

El efecto antimicrobiano ha sido variable según las cepas estudiadas del género *Staphylococcus aureus*; en tanto, los recuentos microbiológicos hallados resultaron por sobre los estándares normativos vigentes durante las primeras etapas del proceso de conservación, especialmente los recuentos de Mohos y levaduras ( $> 10^2$  UFC/g). Los parámetros fisicoquímicos con variaciones más significativas fueron la acidez ( $t_0$ : 42,5 meq ácido/kg miel), contenido de humedad ( $t_0$ : 26 %). La temperatura de conservación es un factor que incide en la calidad de la miel, siendo la temperatura de refrigeración la más adecuada a los fines de mantener estándares cercanos a los de miel de *Apis mellifera* y evitar los efectos de la fermentación característica de este tipo de miel; en cambio la temperatura ambiente es mejor para mantener el poder antimicrobiano frente a algunos microorganismos. No se encontró diferencia significativa entre envases de conservación de plásticos versus vidrio.

## ABSTRACT

*Tetragonisca angustula* is a subfamily Meliponidae bee traditionally known as "Yateí". Its honey is unlike honey produced by *Apis mellifera* to be less viscous, more acidic, and having a particular sweetness and aromas, also antimicrobial qualities are attributed to this honey attributed to this honey antimicrobial qualities, so that in the province of Misiones it permanently increases the number of producers in the market.

Due to the different characteristics presented in this honey of *Apis mellifera* it is important to understand its characteristic? their behavior under different storage conditions, in order to preserve the characteristics of honey and ensure the product as safe.

The objective was to determine the influence of temperature, type of packaging and storage time on Yateí honey's antimicrobial properties, microbial quality and physicochemical parameters such as pH and physicochemical, hydroxymethylfurfural (HMF) moisture content, acidity and diastase content .

The syrup was made by natural runoff and with syringes. The methodology used for microbiological and physicochemical determinations are based on the Argentine Food Code (CAA) and the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). The antimicrobial properties were evaluated by Mueller Hinton agar diffusion methodology.

The antimicrobial effect was variable according to the strains of *Staphylococcus aureus*, meanwhile, microbiological counts were found above regulatory standards in effect during the early stages of the conservation process, especially mold and yeast counts ( $> 10^2$  CFU/g). The physicochemical parameters with significant variations were heartburn (to: 42.5 meq acid/kg honey), and moisture content (to 26 %). The storage temperature is a factor that affects the quality of the honey. The cooling temperature is being most suitable for the purposes of maintaining standards close to those of *Apis mellifera* honey and avoid the effects of the fermentation characteristic of this type of honey, whereas the room temperature is best to maintain antimicrobial power against some microorganisms. No significant difference was found between plastic containers versus glass conservation.

## TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABLAS.....	III
<b>CAPITULO I</b>	
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. La miel.....	2
I.2. Cadena productiva.....	3
I.3. Alcances y definición del problema.....	3
I.4. Objetivos.....	5
I.4.1. Objetivos generales.....	5
I.4.2. Objetivos específicos.....	5
I.5. Justificación.....	6
<b>CAPITULO II</b>	
II.-ANTECEDENTES.....	7
II.1. Las abejas.....	7
II.2. La miel.....	11
II.2.1. Características fisicoquímicas y microbiológicas.....	11
II.2.2. Parámetros fisicoquímicos.....	14
II.2.2.1.Humedad .....	16
II.2.2.2.Actividad diastásica.....	17
II.2.2.3.Acidez.....	17
II.2.2.4. Hidroximetilfurfural (HMF).....	19
II.2.2.5. pH.....	19
II.2.3. Composición polínica.....	19
II.2.4. Calidad microbiológica.....	19
II. 2.5. Poder antimicrobiano.....	25
II.2.6. Compuestos Activos de la Miel.....	29
II.3. Tipos de colmena Arquitectura del nido.....	29
II.4. Sistemas de extracción.....	34
II.5. Conservación.....	35
II.6. Envasado.....	39
<b>CAPITULO III</b>	
III.1- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL / METODOLOGIA	42
III.1.1.Calidad microbiológica.....	43
III.1.1.1. Preparación de las diluciones decimales.....	43
III.1.1.2. Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales.....	44
III.1.1.3. Recuento de mohos y levaduras.....	46
III.1.2. Propiedades antimicrobianas.....	47
III.1.2.1. Determinación de la capacidad inhibitoria.....	48
III.1.3. Parámetros fisicoquímicos.....	48
III.1.3.1.pH.....	48

III.1.3.2.Acidez.....	48
III.1.3.3.Hidroximetilfurfural.....	48
III.1.3.4.Humedad.....	49
III.1.3.5.Diastasa.....	49
III.1.4.Análisis Estadístico de los Datos.....	49
III.2- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
III.2.1. Calidad microbiológica.....	50
III.2.1.1. Recuento de Aerobios Mesófilos Totales.....	50
III.2.1.2. Recuento de mohos y levaduras.....	51
III.2.2. Parámetros fisicoquímicos.....	53
III.2.2.1. Acidez libre.....	53
III.2.2.2. Humedad.....	56
III.2.2.3. pH.....	58
III.2.2.4. Diastasa.....	60
III.2.2.5. Hidroximetilfurfural (HMF).....	62
III.2.3.Poder antimicrobiano.....	64
III.3.-CONCLUSIONES.....	70
III.4.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	71
<b>CAPITULO IV</b>	
IV.- TRABAJOS FUTUROS.....	80
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO N° 1. Tablas de ANOVA.....	81
ANEXO N° 2. Datos de mediciones de variables.....	84

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Abejas meliponidas con su reina.....	8
FIGURA 2: Distribución mundial de los melipónidos .....	9
FIGURA 3: Abeja Yatei y piquera con abejas.....	10
FIGURA 4: Formación de ácido gluconico por acción de la glucosa oxidasa.....	18
FIGURA 5: Estructura del nido de meliponas.....	31
FIGURA 6: Modelos de cajas para criadero y producción de miel y polen de melipónidos.....	32
FIGURA 7: Estructura en caja del criadero y producción de miel y polen.....	33
FIGURA 8: Sistemas de melado.....	35
FIGURA 9: Figura 9: Diagrama del Flujo de la Producción de Miel.....	35
FIGURA 10: Mapa de la Provincia de Misiones. Ubicación de Obera.....	43
FIGURA 11: Diagrama de Flujo de Diluciones seriadas.....	44
FIGURA 12: Diagrama de preparación de placas para el recuento de Bacterias aerobias Mesófilas Totales.....	46
FIGURA 13: Diagrama para el recuento en placa de Mohos y Levaduras.....	47
FIGURA 14: Variaciones en el recuento de aerobios mesofilos totales en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	50
FIGURA 15: Medias e Intervalo de 95% LSD para Aerobios Mesofilos Totales.....	51
FIGURA 16: Variaciones en el recuento de mohos y levaduras en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	52
FIGURA 17: Medias e Intervalo de 95% LSD para Mohos y Levaduras.....	53
FIGURA 18: Variación de la acidez en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	54
FIGURA 19: Medias e Intervalo del 95% LSD para Acidez/tiempo.....	55
FIGURA 20: Medias e Intervalo del 95% LSD para Acidez/temperatura.....	55
FIGURA 21: Fotografía mieles conservadas a temperatura ambiente.....	56
FIGURA 22: Variaciones en el contenido de humedad (%) en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	56
FIGURA 23: Medias e Intervalo del 95% LSD para Humedad/tiempo.....	57

FIGURA 24: Medias e Intervalo del 95% LSD para Humedad/temperatura.....	58
FIGURA 25: Variaciones del pH en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	59
FIGURA 26: Medias e Intervalo del 95% LSD para pH/tiempo...	60
FIGURA 27: Medias e Intervalo del 95% LSD para pH/temperatura.....	60
FIGURA 28: Variación en la actividad diastásica (ND) en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	61
FIGURA 29: Medias e Intervalo del 95% LSD para diastasa/tiempo.....	62
FIGURA 30: Medias e Intervalo del 95% LSD para diastasa/temperatura.....	62
FIGURA 31: Variaciones de HMF (mg/kg de miel) en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	63
FIGURA 32: Medias e Intervalo del 95% LSD para HMF/tiempo.....	64
FIGURA 33: Medias e Intervalo del 95% LSD para HMF/temperatura.....	64
FIGURA 34: Variación del poder antimicrobiano ante CEPA 2 en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	65
FIGURA 35: Variación del poder antimicrobiano ante CEPA 3 en el tiempo según condiciones de almacenamiento.....	66
FIGURA 36: Imágenes de placas con halos de inhibición.....	67
FIGURA 37: Medias e Intervalo del 95% LSD para Halo muestra pura/temperatura de conservación para CEPA N° 2. ....	68
FIGURA 38: Medias e Intervalo del 95% LSD para Halo muestra pura/tiempo (CEPA N° 2).....	68
FIGURA 39: Medias e Intervalo del 95% LSD para Halo muestra pura/tiempo (CEPA N° 3).....	69

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Composición de la miel.....	13
TABLA 2: Parámetros fisicoquímicos estándares sugeridos para la miel melipónidos, comparados con estándares oficiales de la Comisión Alimentaria Codex para miel <i>Apis mellifera</i> .....	14
TABLA 3: Resumen de la composición de mieles de abejas sin aguijón.....	15
TABLA 4: Microorganismos informados en mieles.....	22
TABLA 5: Niveles de microorganismos informados en mieles. ....	22

# ***CAPITULO I***

## I- INTRODUCCIÓN

Las abejas Yateí (*Tetragonisca angustula*) son pequeñas, no poseen aguijón, son sociales, viven en colonias y producen miel en forma similar a la abeja común (*Apis mellifera*). Pertenecen a la Super familia Apoidea donde se encuentra la familia Apidae, que se divide a su vez en 4 subfamilias, donde la subfamilia Apinae alberga a las abejas del genero *Apis*, y la subfamilia Meliponinae incluye a los melipónidos como *Tetragonisca angustula* (Camargo y Menezes,1992; Michener, 2000)

Las abejas de la subfamilia Apinae presentan escasa diferenciación, en cambio las pertenecientes a la subfamilia Meliponinae tienen una gran diferenciación conociéndose cerca de 500 especies de las cuales la gran mayoría se encuentran en América del Sur y Central. En Argentina se las encuentra en las provincias de Misiones, Chaco, Formosa y Corrientes (Nogueira-Neto, 1970; Crane, 1992).

La meliponicultura ha existido en América desde tiempos prehispanicos tanto con fines medicinales como alimentarios. Su desarrollo decreció drásticamente con la introducción de *Apis mellifera* dada la alta productividad de miel de la abeja extranjera que desplazó rápidamente a las abejas nativas. Su desarrollo ha cobrado nuevo impulso en los últimos tiempos como fuente generadora de recursos económicos y como promotora de la diversidad biológica, debido al papel que desempeña en la polinización cruzada, siendo responsables de la fecundación de más del 98 % de los árboles y arbustos nativos (Heard, 1999).

La meliponicultura tiene una ventaja relativa sobre la apicultura tradicional por el escaso riesgo que representa el manejo de este tipo de abejas por carecer las mismas de aguijón y por su buena adecuación a la convivencia en el ambiente humano. A ello se suma también los buenos precios que se registran en el mercado para la miel de melipónidos. Además, su desarrollo se ve favorecido por el buen desempeño de los melipónidos en las tareas de polinización por visitar este tipo de abejas una mayor variedad de plantas que las pertenecientes al género *Apis*. Estos factores hacen que la actividad sea una buena opción al momento de pensar en una alternativa para la diversificación productiva.

## **I.1- LA MIEL: Características generales de las mieles de Apis y de Yateí. Propiedades microbiológicas, fisicoquímicas**

Las propiedades, características y composición de la miel de *Apis mellifera* han sido ampliamente estudiadas y se conocen con gran profundidad, pero esta información es muy escasa para los melipónidos, sobre todo debido a la gran diferenciación de los mismos, lo que hace difícil conocer puntualmente y con suficiente peso científico las características de la miel producida por una especie en particular (Vit y Col., 1994).

Se han caracterizado las mieles de las abejas sin aguijón provenientes de diferentes especies de melipónidos, existiendo entre ellas grandes variaciones según el parámetro estudiado pero presentando algunas características en común (Vit y Col., 1998).

La miel de los melipónidos presenta diferencias significativas con la miel de *Apis mellifera* fundamentalmente en sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas, siendo características su mayor contenido de humedad y su mayor acidez. (Vit y Col., 1994; De Almeida, 2002; Souza y Col., 2006). Las normativas y recomendaciones de calidad de miel, tanto internacionales como regionales han sido desarrolladas tomando como estándar la miel producida por *Apis mellifera* y establecen como límite superior para el contenido de humedad valores que rondan el 20 %, bajo la premisa de que contenidos de humedad superiores permiten la proliferación microbiana predisponiendo el producto a la fermentación, lo que es inaceptable para este tipo de miel. (Codex, 1981; MERCOSUR, 1994).

Las mieles de los melipónidos presentan contenidos de humedad por sobre este valor límite siendo característicos valores que rondan entre el 23 y el 30 %, estos valores de contenido de agua permiten una fermentación característica de la miel de Yateí, que se origina ya en las vasijas de producción de la miel en la colmena y aumentan la acidez de la misma, registrándose característicamente valores de 45 a 60 meq/kg de miel, mientras que los límites establecidos por la normativa se ubican alrededor de 40 meq/kg de miel ( Vit y Col., 1994; De Almeida , 2002, Souza y Col., 2006)

## **I.2- CADENA PRODUCTIVA: condiciones de envasado, temperatura de conservación, tipos de envase**

El alto contenido de humedad de este tipo de mieles hace que su manipulación y condiciones de conservación deban ser adecuadamente estudiados, ya que sus características difieren marcadamente de las de la miel de *Apis mellifera*, para la cual se conocen las condiciones más adecuadas y rentables de conservación y comercialización. El mantenimiento de los alimentos en condiciones adecuadas de conservación hace que sus propiedades, tanto organolépticas como nutricionales, se mantengan constantes hasta la llegada al consumidor asegurando así un producto apetecible y seguro. Además, adecuadas condiciones de conservación evitan también pérdidas económicas por descomposición del producto y posibles accidentes alimentarios (Jay, 1992).

El amplio desarrollo que ha tenido la apicultura ha generado para dicha actividad toda una tecnología productiva que tiene conocimientos técnicos desarrollados desde el manejo de la abeja hasta la comercialización del producto abarcando las propiedades de la miel, sus métodos de envasado, su estabilidad en el tiempo, sus condiciones de conservación y sus sistemas de manufactura a los fines de obtener un producto seguro para el consumidor.

Todas estas áreas del conocimiento se encuentran con escaso desarrollo con base científico para la meliponicultura, fruto del abandono en que cayó la actividad frente a la producción apícola por la limitada capacidad productiva de la abeja, sumado a ello, las prácticas de manejo tradicional de melipónidos se convierten hoy en inaceptables por la existencia de nuevas prácticas de manejo de los productos alimenticios (Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura) debiendo validarse científicamente nuevas metodologías de manejo de la abeja y del producto a fin de adecuarlos a lo estándares internacionales existentes.

## **I.3- ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.**

Misiones por las características únicas de su ecosistema natural, reflejado en su variada flora, ha tenido tradicionalmente la presencia de la meliponicultura en las chacras de los

colonos a modo de autoproducción o de “hobbie”. Hoy día, la rentabilidad del producto hace que se haya incrementado enormemente el número de personas interesadas en desarrollar la actividad con una visión comercial, lo que hace que la provincia de Misiones pueda constituirse en poco tiempo en productora de una miel de características diferenciadas, constituyendo la actividad de la meliponicultura una opción viable para el productor regional en el marco de la existente política de diversificación productiva.

En la provincia desde el año 2004 y con el apoyo y la promoción de diferentes estamentos gubernamentales se realizan variados encuentros entre productores de miel de Yateí y técnicos relacionados con la actividad, con el objetivo de aumentar la capacitación de los productores en áreas como las Buenas Practicas Apícolas y de Manufactura para obtener un producto de mayor calidad. En estos encuentros los técnicos reciben también las inquietudes de los productores en diversas áreas de su interés entre los que figuran fundamentalmente los temas relacionados con: condiciones de salubridad en el melado, manejo y envasado de la miel; propiedades organolépticas de la miel, diferenciación de otras mieles; propiedades físicoquímicas requeridas para establecer calidad y adulteración; usos medicinales y nutricionales de la miel de Yateí, variación de calidad durante almacenamiento; control de calidad y registro en el sistema alimentario nacional.

El desarrollo de todas estas áreas del conocimiento, necesarias para una producción con criterio de calidad, precisa de información generada con metodología científica a los fines de poder validar y generalizar las prácticas utilizadas y encontradas como más adecuadas. A la fecha, las prácticas de manejo de colmenas, melado, envasado y conservación del producto son realizadas por cada productor según su saber y su creencia por no contarse con suficiente conocimiento científico en estas áreas. Información con dichas características es escasa para la meliponicultura, y por ello se vuelve de fundamental importancia el desarrollo de conocimientos científicos en esta temática.

En nuestra provincia hay estudios que abarcan aspectos ecológicos, fito geográficos, estacionales, que influyen sobre la producción de miel. Se han comenzado también emprendimientos para determinar las características físico-químicas y microbiológicas

de la miel, pero hasta el presente existe escasa información científica acerca del comportamiento del producto en diferentes condiciones de almacenamiento y con diferentes tipos de envasado.

El aumento de investigaciones en áreas relacionadas a la meliponicultura es también necesario a los fines de contar con un bagaje de información respaldatoria para avanzar en la inclusión de este producto en las normativas regionales.

## **I.4- OBJETIVOS**

### **I.4.1- OBJETIVOS GENERALES**

Determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento de la miel de Yateí sobre las propiedades antimicrobianas y parámetros de calidad microbiana y fisicoquímicos.

### **I.4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar la influencia de: temperatura, tipo de envase y tiempo de almacenamiento de la miel sobre:
  - Propiedades antimicrobianas.
  - Nivel de contaminación microbiana.
  - pH
  - Contenido de Humedad.
  - Hidroximetilfurfural.
  - Acidez libre.
  - Contenido de diastasa.
  
- Determinar la mejor combinación temperatura – tiempo – tipo de envase, que permita un óptimo almacenamiento de la miel de Yateí, sin que varíe su calidad y propiedades antimicrobianas.

## **I.5- JUSTIFICACION**

Desde el año 2004, los productores de miel de Yateí de Misiones, solicitan asistencia y apoyo técnico en los distintos temas relacionados con la cría de melipónidos, producción y conservación de esta miel, teniendo en consideración las características diferentes que presenta con respecto a la miel de *Apis*, y que actualmente la producción de esta miel, se desarrolla en diferentes modalidades según usos y costumbres propios de cada productor, existiendo diferentes tipos de colmenas en uso y diferentes métodos de melado y manejo de la colmena.

El conocimiento del comportamiento de la miel de Yateí durante el almacenamiento es fundamental para poder avanzar en cualquier intento de comercialización del producto. Las características diferenciales de la miel de melipónidos respecto de la *Apis mellifera* nos estimula a conocer profundamente su comportamiento en diferentes condiciones de almacenamiento, a los fines de establecer a ciencia cierta las mejores condiciones de conservación para el mantenimiento de las características de la miel y asegurar el producto como inocuo.

El conocimiento de la estabilidad de la miel de Yateí, a través de la evaluación de diferentes tecnologías de conservación constituye también una información necesaria y fundamental al momento de solicitar la inclusión de esta variedad de miel en las normativas nacionales y regionales, además de permitir aumentar la vida útil del producto y reducir costos de los sistemas de conservación.

Los resultados de la investigación brindarán al productor y a los entes de promoción de esta actividad, importante información, necesaria para asegurar la calidad y seguridad del producto que llega al consumidor disminuyendo las pérdidas económicas por alteración.

## ***CAPITULO II***

## II- ANTECEDENTES

### II.1- LAS ABEJAS.

Las abejas son insectos que pertenecen a la Super familia Apoidea y a la familia Apidae, esta se divide a su vez en 4 subfamilias donde la subfamilia Apinae alberga a las abejas *Apis mellifera*, y la sub familia Meliponidae (o Meliponinae) incluye a los melipónidos como *Tetragonisca angustula* (Godoy y Feversani, 2005).

Existe una extensa discusión acerca de la clasificación y ubicación taxonómica de las diferentes especies de abejas, sobre todo a nivel de familias, subfamilias, tribus y géneros y subgéneros. Las abejas de este género se diferencian de las *Apis mellifera* al nivel de las subfamilias y se ubican dentro de la subfamilia Meliponinae (Camargo y Menezes, 1992), renombrada como Meliponini (Michener, 2000). Otra clasificación las ubica en la subfamilia Apinae, tribu Apini y subtribu Meliponina (Silveira, 2002).

Reino: Animal

Clase: Insecta

Orden: Himenóptera: (abejas, hormigas y avispas)

SUPER FAMILIA APOIDEA----- abejas

Familia APIDAE----- 4 subfamilias ----Apineos

---- Meliponineos.

----Bombylineos.

---- Euglossineos.

Dentro de los meliponineos existen innumerable cantidad de especies organizadas en tribus, como Meliponini, Trigonini, que incluye a *Tetragonisca angustula* (Moure, 1951).

Las tres primeras subfamilias desarrollan conductas sociales avanzadas. Dentro de los Apineos la principal especie es la *Apis mellifera*, introducida cerca del 1830 en el continente americano. Esta especie debido a diferentes condiciones regionales desarrolla grupos de individuos originando “razas geográficas”. Así podemos encontrar la abeja negra o alemana (*Apis mellifera mellifera*), la abeja amarilla o italiana (*Apis mellifera ligústica*), la abeja carniola (*Apis mellifera cárnica*), la abeja caucásica (*Apis mellifera caucásica*), la abeja africana (*Apis mellifera adansonii o scutellata*). Esta última ha sido introducida en el continente americano en el año 1956 originando

posteriormente a la denominada abeja africanizada (Camargo y Menezes, 1992; Godoy y Ferversani, 2005).

Las abejas de la sub familia Apinae presentan escasa diferenciación, en cambio las pertenecientes a la subfamilia Meliponinae tienen una gran diferenciación conociéndose alrededor de 500 especies distribuidas mayoritariamente en América del Sur y Central, y en Argentina se las encuentran en las provincias del norte del país como Misiones, Chaco, Formosa y Corrientes (Crane, 1985).

Las hembras de las 4 subfamilias presentan corbículas, que son pequeñas concavidades en las patas traseras para transportar polen (Fig.1). Los machos de todas las subfamilias no poseen aguijón, si lo presentan las hembras excepto en los melipónidos (Heard, 1999)



Figura 1: Abejas melipónidas con su reina

Los melipónidos son abejas que se desarrollan en climas tropicales o subtropicales templados encontrándose en la mayoría de las regiones con tales características, su adaptación a climas diferentes es muy difícil habiéndose realizado intentos en Europa y diversos puntos del planeta sin mucho éxito (Fig. 2).

La especie que mejor se adapta a otras condiciones climáticas es *Tetragonisca angustula* (Yateí) que adquiere especial importancia por su importante papel en la polinización al visitar gran número de plantas. Adicionalmente la abeja Yateí es caracterizada como el melipónido de mejores hábitos higiénicos por el tipo de material que colecta para la realización del nido. Otros melipónidos utilizan para dicha tarea incluso excretas de animales lo que deriva en una alta contaminación de los productos

(miel, polen, propóleos) con bacterias coliformes y el riesgo asociado de existencia de microorganismos patógenos (Nogueira-Neto, 1997).

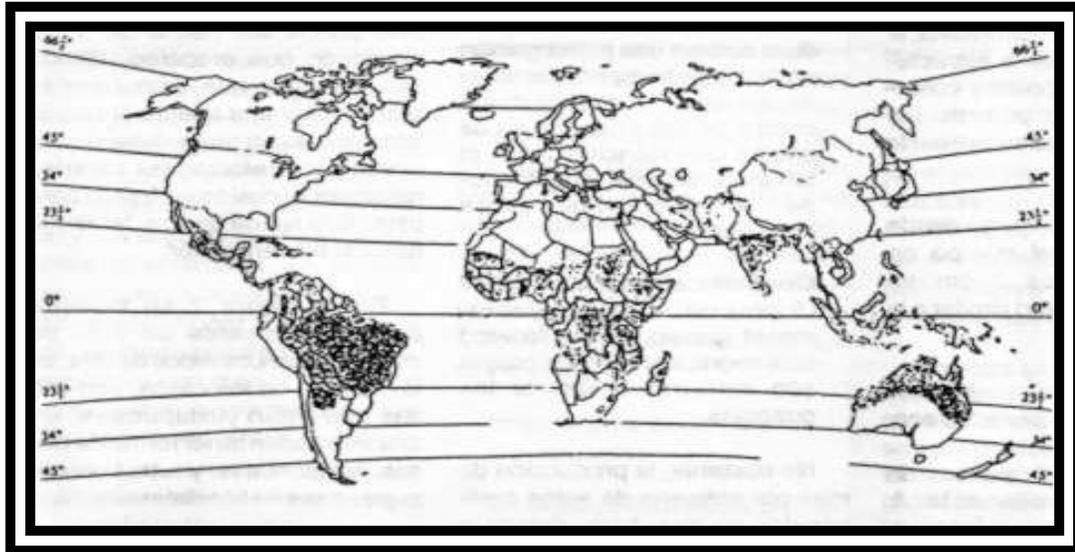


Figura 2: Distribución mundial de los melipónidos .

Estos melipónidos son pequeños, miden un poco más de medio centímetro y tienen el abdomen dorado. Nidifican en lugares diversos, desde huecos de árboles, hormigueros abandonados, y en los más variados lugares donde encuentran espacio y seguridad suficiente para el desarrollo de la colonia (Fig. 3). Posiblemente debido a una conducta de adaptación, es común observarlas colonizando hábitats urbanos disponibles en las construcciones civiles (postes, paredes, muros, cajas de luz, armarios, tumbas, etc.). La entrada al nido, denominada piquera, es un tubo de cera clara, porosa, generalmente impregnado de resina para defenderse de invasores ocasionales. Algunas centinelas por lo general permanecen volando alrededor de la piquera custodiándola (Nogueira-Neto, 1997)



Figura 3: Abeja Yateí y piquera con abejas

La meliponicultura ha existido en América desde tiempos prehispánicos tanto con fines medicinales como alimentarios, existen registros del año 1722, de la crianza de melipónidos por las tribus pre hispánicas (Ximénez, 1967).

Su desarrollo decreció drásticamente con la introducción de *Apis mellifera* dada la alta productividad de miel de la abeja extranjera que desplazó rápidamente a las abejas nativas. Su desarrollo ha cobrado nuevo impulso en los últimos tiempos como fuente generadora de recursos económicos y como promotora de la diversidad biológica, debido al papel que desempeña en la polinización cruzada, siendo responsables de la fecundación de más del 98 % de los árboles y arbustos nativos (Heard, 1999).

La miel de estas abejas es muy aprovechada por los indígenas por ser sumamente sabrosa y por el uso medicinal que se le da sobre todo a nivel oftalmológico. En nuestro país no es tan conocida, como en México, donde desde el año 1998 existe registro legal para la comercialización de sus productos (Perez-Perez y Col., 2007)

La meliponicultura tiene una ventaja relativa sobre la apicultura tradicional por el escaso riesgo que representa el manejo de este tipo de abejas por carecer las mismas de aguijón y por su buena adecuación a la convivencia en el ambiente humano (Fonseca y Col., 2006) A ello se suma también los buenos precios que se registran en el mercado para la miel de melipónidos. Además, su desarrollo se ve favorecido por el buen desempeño de los melipónidos en las tareas de polinización por visitar este tipo de abejas una mayor variedad de plantas que las pertenecientes al género *Apis*. Estos

factores hacen que la actividad sea una buena opción al momento de pensar en una alternativa para la diversificación productiva.

## **II.2- LA MIEL**

### **II.2.1.- Características fisicoquímicas y microbiológicas**

A lo largo de la historia existen numerosas referencias de la gran importancia y de los numerosos usos que se ha dado a la miel como producto indispensable y de primera necesidad. En la cultura maya se la utiliza para hacer licores y vino de miel (aguamiel), en África se utiliza en fabricación de cerveza (Gentry, 1982). También se le atribuyen numerosas propiedades medicinales comprobadas en diferentes trabajos científicos que destacan su poder energizante, laxante, hepatoprotector, antibacteriano y cicatrizante (Humbel, 2004).

La producción mundial de miel de *Apis mellifera* ronda las 1.309.656 Tn., China es el principal productor, seguido de Estados Unidos y Argentina con 90.000 Tn (FAOSTAT DATABASE, 2004).

La miel es conocida por el hombre desde la prehistoria, utilizando primero colmenas silvestres y luego desarrollando colmenares. La cría de las abejas en los colmenares fue introducida inicialmente en la zona mediterránea de Europa. Existen muchas especies productoras de miel pero a los fines de producción industrial se destinan las especies pertenecientes al género *Apis: mellifera, dorsala, lingustica* (Salamanca Grosso y Col., 2001).

La miel está constituida por el néctar y exudados sacaríneos de las plantas, libado, modificado y almacenado por las abejas en los colmenares. El néctar es una solución acuosa azucarada, segregada a nivel de los órganos glandulares de las plantas, que pueden ser florales o extraflorales (Serrano y Col., 1994a)

Las abejas *Apis mellifera* extraen el néctar de las flores y lo almacenan en su saco de miel, depositándola luego en las celdas abiertas, hexagonales, estas son bien ventiladas y producen una pérdida de agua hasta un 18 – 20 %. Una vez terminado este acondicionamiento las abejas sellan las celdas con una capa de cera (Montes, 1966). La miel es esencialmente una solución acuosa concentrada de azúcar invertido, que contiene además una serie compleja de otros hidratos de carbono, enzimas,

aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, granos de polen, etc. (Belitz y Grosch, 1997)

La recomendación mundial en alimentos es el Codex Alimentarius, que en su norma destinada a miel, Codex Stan 12-1981 la define según:

“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 y añeje”.

La tercera parte de esta norma involucra a mieles producidas por otras especies de abejas.

Regionalmente las características de la miel están definidas a través de las Normas MERCOSUR, que han sido internalizados y agregadas al Código Alimentario Argentino en su Artículo 783 (Capítulo X) la que define a la miel como: “ el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en las panales de la colmena” .

Las principales características que definen una miel son: el color, el aroma, el flavor y la composición química.

La composición de la miel es muy variable, dependiendo de la composición del néctar, las condiciones climáticas y el origen floral; como muestra la Tabla 1 la composición general de la miel de *Apis mellifera* es:

**Carbohidratos (73-83 %)** que constituyen el principal componente de la miel y son Fructosa (30,9 - 44,3 %), Glucosa (22,9 - 40,8 %), Sacarosa (0,8 - 1,0 %), Maltosa (0,5 - 2,8 %), Isomaltosa (0,5 - 1,8%), Turanosa (0,5 - 1,5%)

**Agua:** el contenido normal esta entre 14,5 y 18 %, valores superiores pueden producir la fermentación de la miel.

**Constituyentes minoritarios:** menos del 1,5 % del peso seco.

Ácidos orgánicos: (0,6 %), ácido glucónico (principal), acético, butírico, cítrico, fórmico, láctico, málico, succínico.

Compuestos nitrogenados (0,4 %): Proteínas (0,3 %), aminoácidos (0,05 - 0,1 %), enzimas (amilasa, glucosaoxidasa)

Minerales: (0,1 %) potasio, fósforo, calcio, sodio, magnesio.

Una composición general podría describirse según: Fructosa (35-45 %), glucosa (30-35 %), agua (17-21 %), cenizas (0,09-0,3 %), prótidos (0,04 -0,2 %), minerales (0,1-0,2 %) (Benedetti y Pieralli, 1990).

Tabla 1: Composición de la miel

Componentes	Valor promedio
Fructosa (%)	38,2
Glucosa (%)	32,0
Sacarosa (%)	1,38
Maltosa (%)	6,8
Otros azúcares (%)	3,1
Humedad (%)	17,2
pH	3,91
Acidez libre (mEq/kg)	22,03
Lactona (mEq/kg)	7,11
Acidez total (mEq/kg)	29,12
Cenizas (%)	0,17
Índice de diastasa	20,80

(Adaptado de White 1978).

La menor solubilidad de la glucosa en agua, respecto de la fructosa determina que el mayor contenido de glucosa de las mieles se asocie a su mayor tendencia a granularse. (Ojeda De Rodriguez, 2004).

Una característica importante que se aprecia en mieles de melipónidos es la composición mayoritariamente de fructosa que determina una menor tendencia de estas a la granulación, sobre todo, teniendo en cuenta la capacidad de la fructosa de aumentar la solubilidad de la glucosa en la miel (Crane, 1975). En el fenómeno de cristalización también esta involucrada la relación glucosa/contenido acuoso que al hacerse mayor acelera los fenómenos de cristalización (White y Col., 1962).

## II.2.2.- Parámetros fisicoquímicos

El Codex Alimentarius reserva la definición de miel para la producida por *Apis mellifera*, otras legislaciones, como el Código Alimentario Argentino, no hacen ninguna referencia al tipo de abeja productora, pero los parámetros característicos utilizados son los correspondientes a la miel de *Apis mellifera*.

La caracterización fisicoquímica de las diferentes mieles generalmente se realiza a partir de algunos parámetros establecidos en los métodos armonizados de la Comisión Europea de mieles como ser humedad, cenizas, acidez libre, actividad diastásica, hidroximetilfurfural, azúcares reductores y otros (Bogdanov y Col., 1997)

Ante esta realidad y en la búsqueda de caracterizar a la miel de melipónidos se han sugerido patrones propios para la miel de melipónidos considerando diversos géneros como representativos de los diversos grupos. De esta tarea surgen algunas variantes respecto a los parámetros utilizados para mieles de *Apis mellifera* como ser: incrementar el contenido máximo de agua de 20 a 30 %, disminuir el contenido de azúcares reductores de 65 a 50 g/100g de miel, incrementar el límite máximo de acidez de 40 a 85 meq/Kg de miel. Sin embargo, se sugiere mantener los límites de cenizas y HMF según se observa en la Tabla 2. (Vit y Col., 2004).

Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos estándares sugeridos para la miel de melipónidos, comparados con estándares oficiales de la Comisión Alimentaria Codex para miel de *Apis mellifera*

	<i>Apis mellifera</i>	Melipona	Scaptotrigona	Trigona
Contenido de agua (g/100 g)	Max 20,0	Max 30,0	Max 30,0	Max 30,0
Azúcares reductores (g/100 g)	Min. 65,0	Min 50,0	Min 50,0	Min 50,0
Sacarosa (g/100 g)	Max 5,0	Max 6,0	Max 2,0	Max 6,0
Acidez meq /Kg)	Max 40,0	Max 70,0	Max 85,0	Max 70,0
Cenizas (g/100 g)	Max 0,5	Max 0,5	Max 0,5	Max 0,5
HMF (mg/kg)	Max 40,0	Max 40,0	Max 40,0	Max 40,0
Actividad diastásica (ND)	Min 8,0	Min 3,0	Min 3,0	Min 7,0

(Adaptado de Vit P.y Col., 2004).

Numerosos estudios encuentran resultados acordes con los parámetros recomendados por Vit y Col., (2004), así la evaluación de las características de miel de melipónidos

(*Melipona mandacaia*) en Brasil encuentra valores acordes a los recomendados para parámetros como humedad (28,78 %) y acidez (43,5 meq/kg), destacando la amplia variabilidad entre las muestras analizadas (Alves y Col., 2005).

Se han realizado diversas recopilaciones de trabajos que reflejan la composición de mieles de melipónidos. Existen en ellos gran variabilidad en los valores hallados para los diferentes parámetros debido a las diferentes especies, la variabilidad geográfica y polínica y metodología analítica. La Tabla 3 muestra datos de la recopilación realizada por Souza y colaboradores que toman parámetros prioritarios y los comparan con los establecidos para miel de *Apis mellifera* (Souza y Col., 2006).

Tabla 3: Resumen de la composición de mieles de abejas sin aguijón

Especie	Nº de muestras	Parámetros fisicoquímicos						
		pH	Acidez libre meq/kg	Actividad diastásica (ND)	HMF (mg/kg)	Azúcares reductores (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Humedad (g/100 g)
Meliponini	152	3,81	44,8	6,7	14,4	66,0	2,3	26,7
Melipona spp.	97	3,82	41,8	3,1	16	69,1	2,2	27,2
otras Meliponini	55	3,80	49,6	16,2	11,9	63,8	2,5	26,0
M. asilvai	11	3,27	41,6		2,4	68,9	4,7	29,5
M. compressipes	15	3,72	36,6	4,5	17,1	70,5	2,5	23,8
M. favosa	20		49,9	1,9	9,1	71,2	1,7	24,8
M. mandacaia	20	3,27	43,5		5,8	74,8	2,9	28,8
<b>T. angustula</b>	<b>39</b>	<b>3,93</b>	<b>49,7</b>	<b>20,5</b>	<b>13,3</b>	<b>63,1</b>	<b>2,3</b>	<b>24,7</b>

(Adaptado de Souza y Col., 2006)

En la evaluación de las características fisicoquímicas de la miel de diversas especies de melipónidos de Guatemala se evidenció una gran variabilidad según el parámetro estudiado. En la mayoría de los casos los límites se adecuaron a las recomendaciones de Vit y col. (2004) para la miel de melipónidos. Los valores discordantes fueron hallados para especies poco estudiadas de melipónidos como *Plebeia* sp. y *G. acapulconis*. (Dardon y Enriquez, 2008). Similares resultados se hallaron en otros estudios realizados sobre 8 especies de melipónidos, encontrándose también una buena adecuación a los estándares recomendados por Vit y Col (2004) para los parámetros fisicoquímicos. En

los mismos se encuentra para *T. angustula* valores más altos de acidez a los recomendados (Enriquez y Dardon, 2006).

Estudios realizados en Brasil sobre mieles de *Melipona mandacaia* determinaron tenores de humedad en las mismas del orden del 29 % independientemente de la humedad ambiental de la zona de captura. La composición en azúcares reductores fue del orden del 65 al 82 %. (Alves y Col., 2005).

La miel de meliponas posee menor concentración de azúcares y cantidades similares de glucosa y fructosa siendo este factor responsable de su alta higroscopicidad y su capacidad de no cristalizar. Se encontró también un 3 % de sacarosa asimilable a los límites establecidos por la normativa de 6 % como máximo. La acidez promedio estuvo alrededor de 40 mg/kg de miel, límite máximo establecido para mieles de *Apis mellifera*. (Alves y Col., 2005).

#### **II.2.2.1.- Humedad**

La miel se encuadra tradicionalmente entre los alimentos de humedad intermedia, aunque el estado del agua en la miel esta sujeto a variaciones que pueden ocurrir durante el almacenamiento como los fenómenos de cristalización, que producen un aumento del contenido de agua en las capas superiores (Gomez y Cabezas, 1990). Por su alta higroscopicidad, la capa superficial de miel tiende a captar agua del medio ambiente hasta alcanzar un equilibrio (White, 1975; Serrano y Col, 1994b).

Por ello las mieles almacenadas en ambientes húmedos presentan un mayor contenido acuoso (Sanz y Gradillas, 1995). El contenido de agua de las mieles puede oscilar entre un 13 y 25 %, la normativa regional vigente establece un máximo de 20 % de humedad para la miel *Apis mellifera* (Código Alimentario Argentino, Cap. X)

El contenido de humedad condiciona el color, palatabilidad, sabor y solubilidad de la miel, pero fundamentalmente predispone a la miel a la colonización microbiana fundamentalmente fúngica (Finola y Col., 2007).

El mantenimiento de mieles de *Apis mellifera* en ambientes con humedades relativas superiores el 60 %, ha demostrado una absorción neta de agua por parte de las mieles debido a su alta higroscopicidad por su composición en hidratos de carbono (Salamanca Grosso y Col., 2001).

Este parámetro influye decisivamente en la conservación ya que es el medio en el que se llevarán a cabo la mayoría de las reacciones de transformación y alteración.

La fermentación de las mieles depende de la contaminación inicial, el tiempo y temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad, siendo éste, el factor principal (Sanz, 1995; White 1975)

Oliveira (2005), encontró que la humedad de las mieles de las diferentes especies de melipónidos se ubica en el orden de 28,78 +/- 2,73 %. Los valores de azúcares reductores son similares a los encontrados para la miel *Apis*, con preponderancia de glucosa y fructosa. La sacarosa hallada tuvo un valor medio de 2,91 % (Alves y Col., 2005).

Estudios en la provincia de Misiones hallaron valores de entre 21,5 y 27 % de contenido acuoso. (Pucciarelli y Col., 2009)

#### **II.2.2.2.-Actividad diastásica**

La enzima más importante de la miel es indudablemente la invertasa, encargada de hidrolizar la sacarosa dando como productos glucosa y fructosa (White 1975).

Estudios señalan tres enzimas de mayor importancia en la miel, la invertasa, la amilasa o diastasa y la glucosa oxidasa (Huidobro y Simal, 1984), tanto la amilasa como la invertasa pueden utilizarse como indicadores de estrés o envejecimiento de la miel y diferentes trabajos indican variaciones en la conveniencia en la utilización de una u otra de ellas. (White y Kushnir, 1964; Takenaka y Echigo, 1974; Krause y Krause, 1991) La normativa regional utiliza el índice de diastasa como indicador de envejecimiento de las mieles (Código Alimentario Argentino, Cap. X)

#### **II.2.2.3.-Acidez**

La acidez protege a la miel de la colonización microbiana y contribuye con el flavor aunque en gran medida es enmascarada por los azúcares. Durante mucho tiempo fue atribuida al ácido fórmico adicionado por las abejas, aunque hoy se conoce gran cantidad de ácidos que forman parte de la miel como acético, cítrico, málico, láctico, oxálico, succínico, fosfórico, glucónico y otros, siendo el glucónico el principal ácido de la miel (Fig. 4). Estos ácidos en las mieles se forman a partir de la acción enzimática fermentativa debida a las secreciones glandulares de la abeja (Sanz y Triguero, 1970).

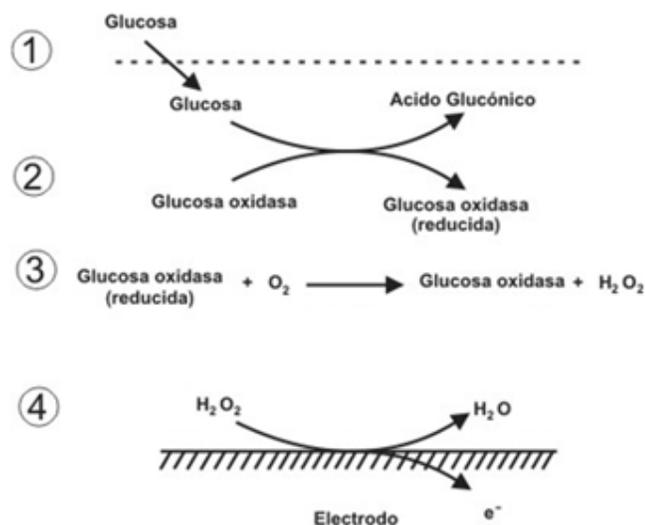


Figura 4: Formación de ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa

Los diferentes orígenes de las mieles y de los ácidos en estas generan una gran variabilidad en la composición ácida de las mieles (Cherchi y Spaneda, 1994). En la fracción ácida se pueden distinguir tres componentes: la acidez láctónica, la libre y la total que es la suma de las anteriores. La acidez láctónica está constituida básicamente por las lactonas del ácido glucónico en equilibrio con este a través de la acción de la enzima glucosaoxidasa que originan ácidos cuando la miel se alcaliniza (White 1978).

La acidez de la miel se relaciona también con el contenido de glucosa de la misma. La glucosa se transforma por la acción de la enzima D- glucosa oxidasa en ácido glucónico que constituye entre el 70 y 90 % de los ácidos de la miel. Este proceso de transformación produce peróxido de hidrógeno importante componente de la acción antimicrobiana de la miel (De Mera y Angert, 2004; Fangio y Col., 2007).

La acidez hallada para miel de *Melipona mandacaia* varía de 18,5 a 62,5 mEq/kg de miel. (Alves y Col., 2005; Alves y Col., 2006).

Estudios realizados por Cherchi y Spaneda mostraron un aumento de la acidez durante el envejecimiento de la miel por el mantenimiento de la actividad enzimática, independientemente del método de conservación (Cherchi y Spaneda, 1994).

#### **II.2.2.4.- Hidroximetilfurfural (HMF)**

El calentamiento y envejecimiento de la miel motiva también la producción de hidroximetilfurfural por deshidratación de hexosas, este se descompondrá en ácido levulínico y fórmico que aumentarán los niveles de acidez (ICMSF, 2001).

Esta reacción se encuentra favorecida por condiciones ácidas de la muestra, de esta manera, la acidificación del medio acelera la descomposición de hexosas con formación de HMF. Este comportamiento ha sido descrito por varios autores (Castro Vázquez y Col., 2008; Ramírez Cervantes y Col., 2000; White, 1964; Takenaka, 1974), y establece la utilidad de este indicador para evaluar el envejecimiento de las mieles.

#### **II.2.2.5.- pH**

El pH de las mieles de melipónidos ha sido evaluado en diversos estudios y se han hallado valores que se ubican entre 3,16 y 3,48 similares a los hallados en estudios para *Apis mellifera*, cuyos valores oscilan entre 3 y 4, aunque este parámetro no se halla incluido entre los establecidos en los lineamientos de calidad para miel de *Apis mellifera* (Vit y Col., 1994; Barth y Col., 2005; Enriquez y Dardon, 2006; Souza y Col., 2006).

#### **II.2.3.- Composición polínica**

El Código Alimentario Argentino establece criterios diferenciales para las mieles según su composición monofloral o multifloral (Código Alimentario Argentino, Cap. X).

Estudios en Brasil han reportado como los principales géneros de polen encontrados en las mieles de melipónidos a: *Acacia polyphylla*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Citrus*, *Eucalyptus*, *Mircia Brassicaceae*, *Mimosa caesalpinifolia*, (Almeida, 2002; Barth, 2004, Alves y Col., 2006).

La evaluación de nueve especies de melipónidos en Guatemala determinó una gran variabilidad de la composición polínica de *T. angustula* respecto a otras especies de melipónidos, hallándose 21 especies polínicas en las muestras evaluadas y 18 en las correspondientes a *T. angustula* (Dardon y Enriquez, 2008).

#### **II.2.4.- Calidad microbiológica**

La caracterización microbiológica de las mieles incluye en la mayor parte de las normativas vigentes; un recuento total en placa, que suministra un indicador general de

la calidad microbiológica de la miel; la determinación de bacterias coliformes, utilizado como indicador del estado sanitario del producto que puede incluir la búsqueda de *Escherichia coli* como fuerte asociación a contaminación fecal. Incluyen también el recuento de mohos y levaduras útil para determinar el nivel de contaminación y predecir la vida útil de la miel (Snowdon y Cliver, 1996). Algunas normas pueden incluir la búsqueda de algunos patógenos, como formas vegetativas de *Salmonella*, que pueden sobrevivir en la miel (Tysset y Durand, 1973), o la investigación de bacterias formadoras de esporas como *Bacillus* o *Clostridium* (Snowdon y Cliver, 1996). Desde el interés industrial podemos ubicar a los microorganismos en tres grupos:

1. Microorganismos hallados comúnmente en las mieles (algunas levaduras y bacterias formadoras de esporas).
2. Microorganismos que indican calidad sanitaria y comercial (coliformes y levaduras).
3. Microorganismos que bajo ciertas condiciones (germinación, crecimiento y falta de tratamiento al alimento) pueden causar enfermedades.

Existen dos fuentes principales de contaminación de la miel, las fuentes primarias involucran el polen, el tracto digestivo de las abejas, el polvo y el néctar. El polen puede ser la fuente principal de estos microorganismos, incluso sobre el suelo, llegando de esta manera a través del contacto directo con la abeja y por ella a otros insectos no contaminados en la colonia. De hecho los microorganismos descritos en la miel se condicionan ampliamente con los descritos en las abejas. Del contenido intestinal de las abejas probablemente lleguen a la miel miembros de la familia de *Bacillus*. Entre los mohos el más generalmente hallado es del género *Aspergillus* spp (Snowdon y Cliver, 1996; Finola y Col., 2007).

El aire y el polvo son importantes fuentes de diversas especies de *Bacillus*, *Clostridium* y *Micrococcus*

Las fuentes secundarias de contaminación parecen ser las principales responsables de la contaminación de la miel, entre las que se encuentran, el aire, manipuladores, contaminación cruzada y equipamientos. Las fuentes secundarias de contaminación pueden ser adecuadamente controladas a través de las Buenas Prácticas de Manufactura (Guía de BPA y M, 2003).

El desarrollo de mohos puede darse fundamentalmente en la superficie de los envases, ciertas experiencias confirman la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir

pero no desarrollarse en las mieles. Altos recuentos de mohos pueden deberse a contaminaciones recientes de fuentes secundarias sobre las que se produce el crecimiento para la posterior inoculación (Crane, 1985; Morse y Hooper, 1985; Piana y Col., 1991). Las levaduras son osmófilas y capaces de mantener la capacidad de desarrollarse en las condiciones ácidas y de baja actividad acuosa de la miel, y son responsables de la fermentación de la miel. Esto se ve facilitado por condiciones como alto contenido acuoso, moderada temperatura de conservación y altos contenidos de levaduras. Usualmente la fermentación se da en micro ambientes como la superficie de los envases donde los contenidos acuosos son superiores al promedio de la miel envasada. *Saccharomyces* spp., es la principal levadura hallada en mieles. La concentración de levaduras en las mieles es proporcional al contenido de humedad. (Tysset y Rautlin de la Roy, 1974; Root, 1983; Rosa y Col., 2003).

Con excepción de la investigación de *Clostridium botulinum* existe escasa documentación acerca de la presencia de bacterias en la miel, tanto en cantidad como en caracterización de los géneros de microorganismos que en ella pueden desarrollarse, a pesar de sus factores de protección como el alto contenido de azúcares, pH bajo, actividad antimicrobiana a través de peróxido de hidrógeno, derivados fenólicos, flavonoides (Midura y Col., 1979; Nakano y Col., 1989; Snowdon y Cliver, 1996; Dallagnol, 2007).

Algunos de los microorganismos descritos se observan en la Tabla 4.

Diversos estudios han hallado recuentos totales en placa de hasta 5.000 UFC /g. Como el género más frecuentemente descrito se encuentran a miembros de los *Bacillus*, se han informado también aislamientos de *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* spp (Schapovaloff y Col., 2009; Pucciarelli y Col., 2009).

La Tabla 5 muestra diversos informes acerca de los principales microorganismos en mieles, que describen como la flora predominante a los mohos y las levaduras

Tabla 4: Microorganismos informados en mieles.

Bacterias	Hongos	
	Levaduras	Mohos
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Atichia</i>
<i>Bacteridium (sic)</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettsia alvei</i>
<i>Bacterium (sic)</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronsporaceae</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Schwannniomyces</i>	<i>Tripasporium</i>
<i>Proteus</i>	<i>Trichosporan</i>	<i>Uredianaceae</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Torula</i>	<i>Ustilaginaceae</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Torulopsis</i>	
	<i>Zygosaccharomyces</i>	

(Adaptado de Snowdon y Col., 1996)

Tabla 5: Niveles de microorganismos informados en mieles.

Estudio	Ensayo						
	Recuento estándar en placa	<i>E. coli</i>	Levaduras	Mohos y levaduras	Mohos	Levaduras Osmofílicas	<i>Clostridium</i> Anaerobios
Nakano y col. (1989)	0-260			0-300			1-132
Piana y col. (1991)	1-55				1-43	1-3500	0.1 - 1
Root (1983)			0.1 - 10 <sup>6</sup>				
Tysset y col (1970)	25-1600			0-2500			0
Tysset y Rousseau (1981)	3-9500			0-2500		0-10500	
Datos industriales (1990)*	170-8500	< a 3	< a 10		< a 10		

\* *Coliformes* = Menor a 3, *Salmonella* = 0

(Adaptado de Snowdon y col. 1996)

En la evaluación de la capacidad de supervivencia de bacterias Gram negativas en la miel se encuentra que diversos géneros bacterianos, inoculados a muestras de miel, sobreviven tan solo unos pocos días incluso en diluciones de miel del 50 %. Diversos

informes indican que a la temperatura de 20 °C la pérdida de viabilidad se da hasta en 40 días mientras que en condiciones de refrigeración a 10 °C esta supervivencia puede llegar hasta los 2 años (Tysset y Durand, 1973). En las bacterias formadoras de esporas las investigaciones desarrolladas indican que no existe disminución en los recuentos hasta los 100 días de almacenamiento independientemente de las condiciones (Kokubo y Col., 1984; Nakano y Col., 1989).

En conclusión, mohos y levaduras y bacterias formadoras de esporas son habituales en la miel en bajos recuentos (Tysset y Rautlin de la Roy, 1974). Las formas vegetativas de bacterias patógenas no han sido descritas en miel, pero inoculadas pueden permanecer viables un tiempo prolongado, sobre todo en condiciones de refrigeración (Snowdon y Cliver, 1996).

Investigaciones acerca de indicadores microbiológicos en mieles argentinas han encontrado recuentos de mohos y levaduras del orden de las 10 UFC/g, menores a los establecidos en la normativa vigente para el MERCOSUR. Se reporta también la existencia de bacterias sulfito reductoras del género *Clostridium* spp. en 70 % de las muestras evaluadas (Finola y Col., 2007).

El Código Alimentario Argentino establece en el Capítulo X, Artículo 783 (RESOLUCION GMC N° 015/94) los siguientes criterios microbiológicos para miel:

Coliformes totales/ g: (n=5, c=0, m=0)

Salmonella spp.- Shigella spp /25g: (n=10, c=0, m=0)

Hongos y levaduras UFC/g: (n=5, c=2, m=10, M=100)

Donde n: representa el número de muestras a ser analizadas.

c: es el número de muestras que pueden encontrarse fuera del límite establecido.

m: es el límite superior para calificar a la muestra como aceptable.

M: es el límite superior en los planes de tres categorías para calificar a una muestra como marginalmente aceptable.

Los mohos y las levaduras osmófilas representan las formas más abundantes y son los responsables de la fermentación que incrementa la acidez cuando existen elevados niveles de humedad, mayores al 21 %. (Finola y Col., 2007).

En la miel de Yateí se han hallado recuentos considerables de levaduras que corresponden a las siguientes especies: *Starmerella meliponinarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorulla* spp. Y *Zygosaccharomyces bisporus-like*. La levadura *S.*

*meliponinarium* es una especie recientemente descrita aislada a partir de muestras de abejas adultas, de la miel, del polen, el néctar, etc de *Tetragonisca angustula*. Se describe una cercana relación entre el microorganismo y el insecto dada su alta aparición en diversas muestras de miel, y polen, estimándose una posible función en la alimentación de estos melipónidos. Las levaduras constituyen una importante fuente de proteínas y vitaminas para otros insectos, por ello podrían cumplir una función similar en su asociación con *T. angustula* (Teixeira y Col., 2003).

No obstante las levaduras *Aureobasidium pullulans* y *Rhodotorulla spp.* son entidades asociadas con plantas y flores en general, y se cree que representan flora transitoria, transportada por las abejas. El género *Zygosaccharomyces* es altamente osmotolerante, *Z. rouxii* puede crecer sobre substratos azucarados a una actividad del agua igual a 0,62. Estas levaduras son agentes deteriorantes de alimentos azucarados y se las considera contaminantes comunes cuya presencia disminuye la calidad del alimento (Rosa y Col., 2003).

Dentro de las bacterias comúnmente aisladas en las mieles, están las formas esporuladas de resistencia bacteriana, como las especies de los géneros *Bacillus sp.* y *Clostridium sp.* Las formas vegetativas no suelen encontrarse debido a las condiciones desfavorables que inhiben su desarrollo. En mieles frescas se pueden encontrar algunas formas vegetativas y un recuento elevado estaría indicando contaminación reciente (Iurlina y Fritz, 2005). La evaluación de levaduras en 29 mieles de *T. angustula*, del estado de Minas Gerais en Brasil, durante el año 2001, determinó en 18 de ellas la presencia de *Starmerella meliponinarum*, además se describe la existencia asociada de diversas especies del género *Candida* a las 16 muestras de mieles de *Melipona quadrifasciata*. El recuento de levaduras de las muestras de miel de *T. angustula* estuvo en el orden de  $2,6 \times 10^4$  UFC/gr, lo que indica la capacidad del microorganismo de desarrollarse a expensas de los azúcares de la miel. La alta presencia de la asociación de las levaduras con diversos géneros de melipónidos indicaría una relación mutualista entre ambas (Rosa y Col., 2003).

En la evaluación microbiológica de 14 muestras de mieles de melipónidos de la familia de los *Trigonineos*, que incluye a *Tetragonisca angustula*, obtenidas de manera estéril, se hallaron recuentos de mohos y levaduras de hasta un orden de  $10^4$  UFC/g. De igual manera De Almeida-Anacleto halló recuentos del orden de  $10^2$  a  $10^4$  UFC/g para mieles

de meliponíneos en Brasil, (De Almeida-Anacleto, 2007; De Almeida Souza y Col., 2009). Estudios realizados en la provincia de Misiones informan recuentos de aerobios mesófilos del orden de  $10^4$  UFC/g y recuentos de coliformes totales menores a 3 NMP/g en 40 muestras de miel de Yateí analizadas. Se observó también la presencia de *Clostridium* sulfito reductores en un 30 % de las muestras analizadas. Para los mohos y levaduras se encontraron recuentos promedios del orden de  $10^3$  UFC/g. No se detectó en este trabajo la presencia de *E. coli* ni de *Salmonella* spp (Pucciarelli y Col., 2009; Schapovaloff, 2009).

## II. 2.5.- Poder antimicrobiano

La miel tiene una probada capacidad antimicrobiana, la que es conocida desde la antigüedad y ha sido convenientemente documentada desde hace más de un siglo.

Esta capacidad está mediada por diversos factores, entre ellos podemos nombrar los intrínsecos como, su pH, contenido de humedad, bajo potencial de oxidación-reducción (debido a los azúcares reductores presentes) y contenido de nutrientes. Además de estos factores, se han identificado diversos mecanismos de acción asociados a componentes con capacidad antimicrobiana propia. También es destacable el aporte de la viscosidad de la miel contra las ondas de convección que podrían diseminar microorganismos y como barrera a la disolución del oxígeno (De Mera y Angert, 2004).

A estos mecanismos se asocian también algunos factores extrínsecos con marcada influencia en la capacidad de desarrollo de microorganismos en la miel, como ser: temperatura y humedad relativa de almacenamiento, y la presencia de gases ambientales (Jay, 1992). Los mecanismos de actividad antimicrobiana de la miel pueden dividirse en dos grupos: uno de ellos caracterizado como sensible a la luz y el calor, y originado por el peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa. El otro grupo caracterizado como no peroxídico, no es sensible a los factores luz y calor, y está compuesto por varios factores como la acción de la lisozima, flavonoides, actividad osmótica, pH bajo y otros con diferentes aportes. Se ha hallado buena correlación entre la acidez libre y total con la actividad antibacteriana de las mieles de *Apis mellifera*. Acorde con otros informes que atribuyen la mayor parte de la actividad no peroxídica a

la fracción ácida que además tiene su origen en la abeja (Bogdanov, 1997). El mismo informe indica diferencias no significativas por el origen floral.

Molan, (1992), ha asociado esta capacidad antimicrobiana fundamentalmente a cuatro componentes que son: el efecto osmótico, la acidez de la miel, el peróxido de hidrógeno presente por acción de la glucosa oxidasa y una serie de factores fitoquímicos no totalmente descriptos. La mayor actividad ha sido asociada a los factores peroxídicos, pero los no peroxídicos adquieren importancia al utilizarse la miel como terapéutico en humanos, por la presencia de catalasa en los tejidos (Molan, 1992).

Schepartz y Subers, (1966) identificaron como el principal responsable de la actividad antimicrobiana de la miel al peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa oxidasa de las glándulas hipo faríngeas de las abejas. De similar manera el polen proveniente de las plantas sería el responsable de los niveles de catalasa en la miel, aunque su efecto disminuye mucho en el néctar; de esta manera el nivel de compuestos peroxídicos estaría determinado por los niveles de glucosa oxidasa de la miel. Del análisis de diferentes compuestos provenientes de la miel (polen, propóleo, cera, miel) surgen diversas actividades no peroxídicas asociadas principalmente a compuestos fenólicos (ácido cinámico y benzoicos sustituidos y flavonoides). La baja concentración de estos compuestos en la miel deriva en atribuirle a los mismos escasa actividad antimicrobiana en la miel comparada con la actividad peroxídica. Destacable es la posibilidad de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y los ácidos benzoicos para dar peroxiácidos, mucho más estables que el peróxido e inalterables a la acción de la catalasa. Los ácidos peroxicarboxílicos presentan una actividad antimicrobiana mucho mayor que el peróxido sobre todo a pH bajo como los encontrados en la miel, es decir con pH de 3,9 (Roderick, 2000).

Las mieles de melipónidos son así también conocidas amplia y popularmente, desde la época de los indios guaraníes, por sus propiedades medicinales, esto mismo se repite en otros países de centro y Sudamérica donde se conoce desde épocas remotas la utilización de esta miel para el tratamiento de afecciones cutáneas, respiratorias y oculares (Nogueira-Neto, 1970).

Los estudios realizados en el tema refieren una marcada actividad antimicrobiana, para la miel de los melipónidos, pero con una gran variabilidad entre estas mieles y las cepas bacterianas evaluadas.

El poder antimicrobiano no es propiedad exclusiva de las mieles sino que otros compuestos elaborados por las abejas presentan propiedades similares, como por ejemplo, el propóleos, la cera y la jalea real. Experiencias realizadas sobre propóleos de melipónidos han encontrado en éstos elevadas actividades antimicrobianas y antioxidantes. Destacable es que estas capacidades se presentan asociadas a bajas concentraciones de flavonoides, los que se presentan generalmente como mediadores en las respuestas inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Manrique y Santana, 2008).

En Argentina se han realizado investigaciones sobre muestras de miel de *Apis mellifera* frente a *Escherichia coli* a los fines de evaluar su acción antimicrobiana, encontrándose gran susceptibilidad pero con marcadas diferencias entre muestras. Al tratarse con catalasa las muestras, para eliminar el peróxido de hidrogeno presente se evidenció aun actividad antimicrobiana asociada a factores no peroxídicos y posiblemente relacionada a componentes del polen. Esto refuerza los datos existentes de una actividad antimicrobiana polifactorial en las mieles (Fangio y Col., 2007).

Temaru y Col., (2007), han encontrado resultados similares evaluando de manera similar mieles de diversas especies de melipónidos, frente a diferentes géneros bacterianos (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*). Los resultados muestran diferentes niveles de inhibición entre las diversas muestras ensayadas y variaciones según el microorganismo ensayado. También se encontró un importante poder antimicrobiano no asociado al peróxido de hidrógeno al tratar las mieles con catalasa (Temaru y Col., 2007)

Dardon y Enriquez (2008), realizaron estudios sobre diversos géneros de melipónidos en Guatemala, demostraron un claro efecto antimicrobiano sobre diversas especies microbianas. En todos los casos se observó una importante variabilidad en el poder antimicrobiano de la miel estudiada, dependiendo de la especie de abeja productora y exhibiendo una mayor resistencia para *S. typhi* y *C. albicans*. Se identificaron tipos polínicos correspondientes a la familia Myrtaceae, uno de cuyas especies es responsable de la actividad antimicrobiana de la miel de manuka, aunque su existencia no se correspondió con la mayores actividades antimicrobianas (Dardon y Enriquez, 2008).

Miorin y Col. (2003), evaluaron la comparación de la actividad antimicrobiana de mieles y polen de *Apis mellifera* versus *Tetragonisca angustula* frente a cepas de *S. aureus*, encontrándose buena actividad antimicrobiana de ambas en los dos productos

para las cepas estudiadas. También se evaluó mediante HPLC los diferentes compuestos involucrados en ambos casos identificándose gran cantidad de compuestos fenólicos y algunos no identificados relacionados con flavonoides y ácidos fenólicos. Los resultados indican también una mayor actividad antimicrobiana en los propóleos que en las mieles (Miorin y Col., 2003).

Investigaciones realizadas en nuestra región han encontrado resultados similares para la variabilidad de la acción de la miel de melipónidos frente a diversos géneros bacterianos (Dallagnol, 2007; Novak, 2008).

Existen creencias folclóricas acerca de un mayor poder antimicrobiano de la miel de melipónidos respecto a las abejas importadas del Viejo Mundo. Estudios comparativos de ambos tipos de mieles no han encontrado diferencias significativas en su poder antimicrobiano aunque han descrito para la miel de Yateí una alta variabilidad en su acción según la región de donde provenga la miel y según la cepa a la que se enfrente, describiendo una mayor sensibilidad de las levaduras respecto de las bacterias ensayadas (De Mera y Angert, 2004).

La acidez de la miel, así como el pH han sido considerados también como factores asociados y estudios realizados han hallado en algunos casos mejoría en el poder antimicrobiano al fermentar las mieles durante cierto periodo de tiempo, aumentando con ello la acidez de la misma (Bogdanov, 1997; Barth y Col., 2005).

Las células de *Salmonella enteritidis*, incubadas en diferentes diluciones de miel, presentan menor adherencia a células epiteliales del tracto gastrointestinal respecto de controles de células de la bacteria sin dicho tratamiento. Este resultado puede deberse a diversos factores como ser: inhibición mecánica no específica, alteración de la carga electrostática externa o la hidrofobicidad de la bacteria (factores considerados fundamentales para el proceso de adhesión), destrucción de la bacteria por algún factor involucrado (Alnaqdy y Col., 2005).

Esto se condice con otros informes donde se reporta la utilización de miel para el tratamiento de otras patologías gastrointestinales infecciosas, como gastritis, duodenitis, ulceración gástrica (Costa-Neto y Pacheco, 2005).

### **II.2.6.- Compuestos activos de la miel**

Diversas condiciones de almacenamiento y tratamiento han sido evaluadas para estudiar la variación en la capacidad antioxidante de las mieles de *T. angustula*. En ellas se evidenció el proceso fermentativo en las mieles mantenidas a temperatura de 30 °C el cual no se manifestó en aquellas que fueron conservadas a temperatura de refrigeración o sometidas a procesos de pasteurización. El proceso fermentativo se asoció a un aumento de la acidez y una disminución de los contenidos de carbohidratos y presentó un mayor efecto antioxidante que las mieles no fermentadas. Surge así la visión de mantener mieles de melipónidos a temperatura ambiente para aumentar propiedades antioxidantes y conservarlas en refrigeración para mantener sus propiedades organolépticas (Perez-Perez y Col., 2007).

Los antioxidantes son efectivos en bajas concentraciones y ayudan a inactivar los radicales libres; por eso se estudia la capacidad antioxidante de los alimentos y de los medicamentos. La miel es básicamente una solución concentrada de azúcares cuya actividad antimicrobiana se debe a varios factores: su elevada osmolaridad, la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa presente en la miel y diferentes compuestos activos (compuestos fenólicos principalmente) proveniente de la flora recorrida por las abejas. Su actividad antimicrobiana y antioxidante se debe entonces a factores dependientes de la producción de peróxido por la glucosa oxidasa de la miel y factores no peroxídicos, los que aparentemente tendrían gran importancia y podrían variar ampliamente según los tipos polínicos presentes en la miel. Los polifenoles participan en el sistema antioxidante de la miel reforzado por la vitamina C y la catalasa (Molan, 1992; Roderik, 2000).

### **II.3.- TIPOS DE COLMENA. ARQUITECTURA DEL NIDO**

En la naturaleza los nidos de los melipónidos usualmente se ubican en huecos que se encuentran en el ambiente, como árboles, termiteros, hormigueros abandonados, etc., que pueden proporcionarle seguridad a la colmena. Asociadas al ambiente antropizado las colmenas pueden ubicarse en postes, muros, armarios, cajas, etc. Los materiales utilizados son cera, resina y barro (Godoy y Ferversani, 2005).

En la estructura del nido puede identificarse la entrada tubular del mismo, denominada usualmente piquera, elaborada a partir de cera y resina, y que puede ser única o doble,

esta es continuada por el túnel de ingreso y que desembocan generalmente cerca de la zona de cría del nido. Esta zona está formada por las células de cría organizada en discos horizontales superpuestos, usualmente siete, y separados y sostenidos por columnas. Cada disco cuenta con alveolos de aproximadamente 1,5 mm de diámetro, el disco central tiene un diámetro de 60 mm y los discos extremos miden alrededor de 20 mm de diámetro. La cámara de cría se encuentra rodeada por una capa multilaminada de cera y resina denominada “involucro” cuya función principal es el mantenimiento de la temperatura necesaria para el desarrollo larval. Si las condiciones de temperatura del espacio donde se ubica el nido son estables este involucro puede estar ausente (Kerr y Col., 1996).

Las celdas de cría son ovoides y se conectan usualmente a otras seis celdas sin compartir necesariamente las paredes (Crane, 1992; Chiari y Col., 2002).

Las abejas de la tribu Meliponini no presentan celdas reales las que si existen en otras tribus como las Trigonini.

En contacto con las paredes exteriores del nido se halla también capas de cerumen que realizan el aislamiento de la colonia del medio ambiente.

Fuera de la región de cría se encuentran los pots donde se guarda el alimento de la colmena, estos están contruidos de cera o cerumen y tienen forma ovoide o cilíndrica. Suelen disponerse de manera semicircular alrededor del área de los más cercanos a ésta suelen contener polen, y los más alejados miel. Los pots se ubican de manera desordenada y superpuesta, pudiendo encontrarse también aislados en función del espacio disponible, (Fig. 5). Pueden encontrarse también depósitos de desechos de tamaño y composición variable dentro del nido, generalmente son provisorios (Nogueira-Neto, 1997; Godoy y Ferversani, 2005).

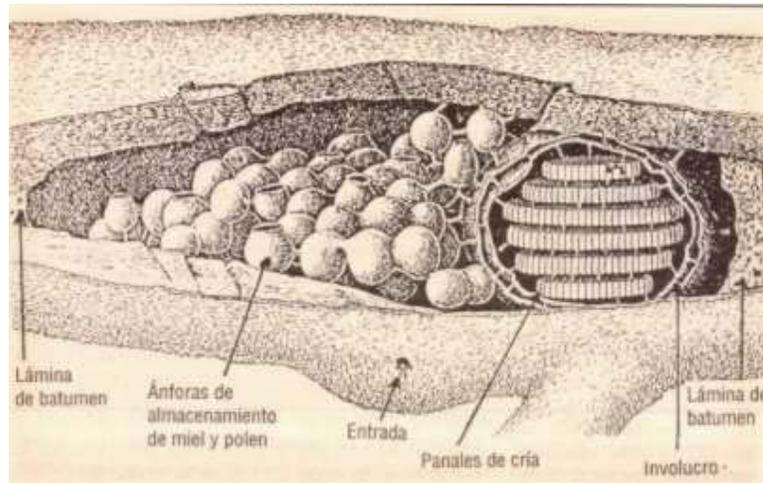


Figura 5: Estructura del nido de meliponas

Se han desarrollado “colmenas racionales” diseñadas en base a necesidades de mayor higiene en la producción y manipulación, además, a la eficiencia térmica de las colmenas. Existen innumerables modelos de colmenas racionales, por ejemplo modelos Giuliani, Fritzen, Nogueira Neto, Kerr, Capel etc. La mayoría de ellas llevan a un diseño con separación interna en dos áreas, una de ellas destinada a la cría, y la otra para la producción de miel y polen, ambas separadas por un tabique y conectadas por un orificio; existiendo variaciones respecto a la orientación vertical u horizontal de la colmena. Para el área de depósito de la colmena se han desarrollado diversos modelos, incluyendo algunas alzas móviles horizontales, que permiten retirar las vasijas, realizar la extracción y devolver el alza a su lugar. En todos los casos las colmenas se construyen de madera dura que garantice resistencia a la intemperie y un adecuado aislamiento térmico. Las dimensiones de cada área de la colmena deben ser adecuadas para asegurar la termorregulación de la colmena, (Fig. 6).



Figura 6: Modelos de cajas para criadero y producción de miel y polen de melipónidos (Godoy y Ferversani, 2005).

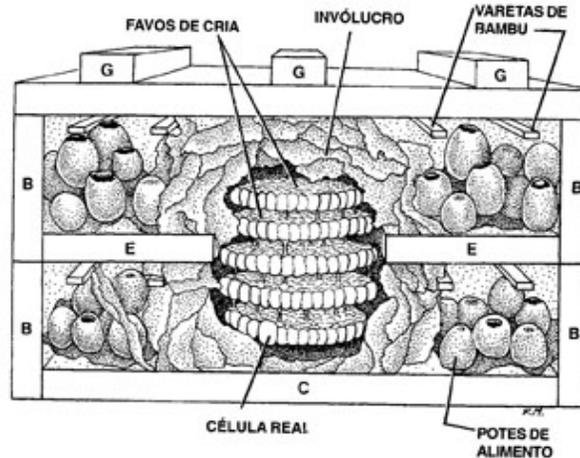


Figura 7: Estructura en caja del criadero y producción de miel y polen

Las características de las colmenas utilizadas deben estar acorde a la zona de producción. Es destacable la acción de la abeja de sellar las hendiduras existentes en la colmena (uniones entre los paneles de madera), con cera y resina, para lograr el aislamiento de la misma del medio ambiente. Las condiciones adecuadas de la colmena son fundamentales para permitir la supervivencia de la misma y para optimizar la producción de miel. En la evaluación de diversos modelos de colmena en Brasil se encontraron resultados que fueron desde la desaparición de la colonia hasta una producción cercana a los 500 g en seis meses, en ninguno de los modelos evaluados se alcanzó resultados referidos a una producción de kilogramo de miel en dicho periodo (Chiari y Col., 2002).

Especial importancia adquiere también la ubicación de la colmena, la misma debe estar a resguardo de los rayos directos del sol y de los vientos, y debe tener acceso a fuentes de agua y a una zona de floración importante, lo que le permitirá a la abeja tener acceso a la fuente de néctar. También es importante que estén sobre el nivel del suelo para evitar el ataque de posibles plagas rastreras, como hormigas o cucarachas. Se debe tener en cuenta que el radio de vuelo de los melipónidos varía de 500 a 2.500 metros, según la especie, mientras que en el caso de abejas *Apis*, este es cercano a los 5.000 metros, permitiéndole acceder a fuentes de néctar más lejanas.

La obtención de las colmenas tradicionalmente se hizo recuperándolas directamente del ambiente natural y trasladándolas incluso en sus habitáculos naturales (troncos) al ambiente humano. Actualmente existen sistemas de captura de colmenas a través de la

oferta de recipientes adecuados para la nidificación, ubicados cerca de colonias ya existentes y con oferta de alimento, y su posterior traslado. Se utilizan además sistemas de división de colmenas (trasiego), a partir de los paneles de cría asegurando el traslado de una reina en cada porción (aprovechando la existencia de más de una reina en cada colmena) y traspasando también parte de los potes con polen y miel (Godoy y Ferversani, 2005).

Los individuos en las colonias pueden clasificarse en tres tipos, reinas, hembras y machos. Las reinas son las encargadas de la postura de los huevos.

Las operarias están encargadas de realizar la totalidad de las tareas de la colmena, también ponen huevos pero de ese huevo nace siempre un macho, sólo los huevos fecundados (puestos por la reina) dan origen a hembras.

Los machos o zánganos son básicamente los encargados de fecundar a la reina, al contrario de lo que sucede en *Apis mellifera*, estos también se alimentan de flores, trabajan con cerumen y deshidratan el néctar.

#### **II.4.- SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.**

Según lo expuesto por productores locales, tradicionalmente se ha utilizado el método del prensado y del escurrido para la obtención de la miel de los melipónidos. Este sistema lleva asociada una alta contaminación del producto por todos los componentes extras existentes en las ánforas.

Esto es corroborado en la comparación de los estándares microbiológicos alcanzados por mieles obtenidas a través de diferentes sistemas de extracción, donde las muestras obtenidas por escurrimiento presentaban recuentos de hongos y levaduras muy superiores a las mieles obtenidas por métodos asépticos (Oliveira, 2005; Souza, 2006, Pucciarelli; 2009)

El método de extracción se mejora con la utilización de colmenas racionales con sectorización del área de producción y con la obtención de paneles de vasijas cuya parte superior pueda eliminarse y obtenerse el producto por inversión de la placa de vasijas. Esta práctica asocia aún la posibilidad de caída de algún residuo en el producto durante la inversión.

Las prácticas de mayor calidad higiénica involucran la utilización de las colmenas racionales asociadas a sistemas de extracción por vacío del producto mediante jeringas

o bombas mecánicas, aunque involucran un mayor tiempo de operación (Nogueira-Neto 1997).



Figura 8: Sistemas de melado

**II.5.- CONSERVACIÓN**

El mantenimiento de las propiedades de los alimentos por periodos de tiempo cada vez más largos es uno de los mayores desafíos de la industria alimentaria. Para ello se utilizan diversas herramientas como ser producción primaria, diversos procesos de producción, variaciones en el envasado y otros.

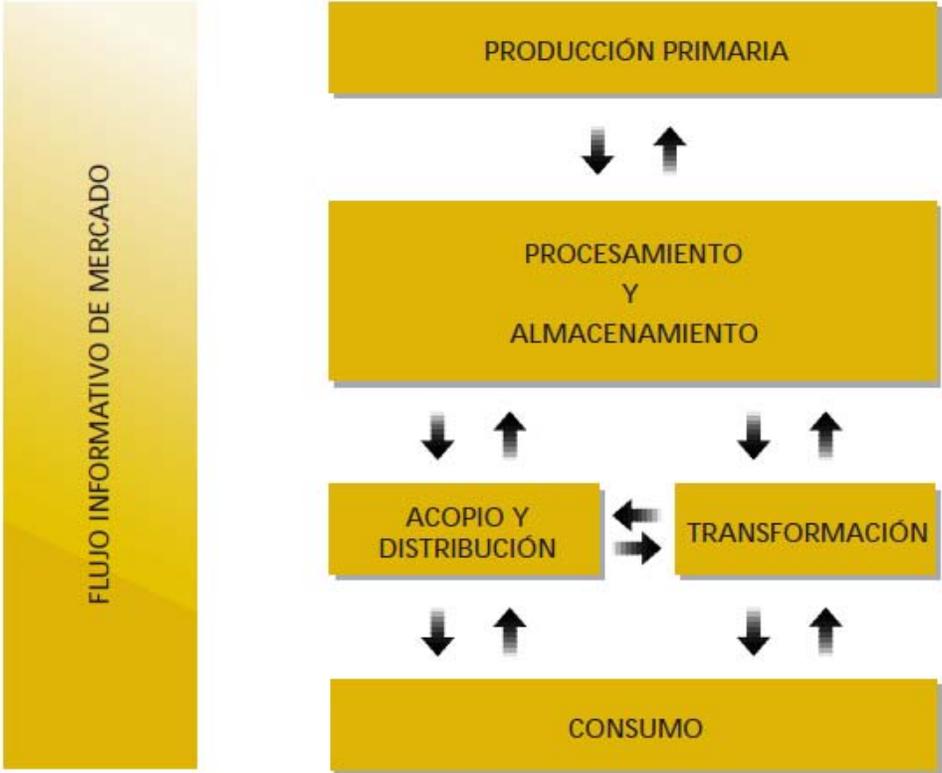


Figura 9: Diagrama del flujo de la producción de miel

La miel no escapa a estas condiciones y dentro de su procesamiento tradicional existen pasos especialmente destinados a prolongar su vida útil. El primer punto de importancia se encuentra en el manejo primario de la abeja y la colmena. La zona de manejo de las colmenas debe encontrarse en zonas libres de polución, ya que la abeja puede trasladar a la miel por contacto directo todos aquellos contaminantes que existan en el ambiente. También debe tenerse en cuenta una posible mortandad de abejas por intoxicaciones agudas con algún contaminante ambiental.

En la etapa de la producción primaria (Fig. 9), se debe tener en cuenta los tiempos de carencia para la aplicación de posibles tratamientos veterinarios, los sistemas de alimentación que pueden redundar en contaminación de la miel con adulterantes como jarabe de maíz de alta fructosa, etc. Así también el uso de compuestos ácidos como ácido fórmico o láctico para el combate de plagas (barroa) determina un aumento de la acidez de la miel (Detroy, 1979).

En la etapa de procesamiento de la miel adquieren especial importancia las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) ya que a partir de este punto aparece el factor de la manipulación del producto. Estas son herramientas que permiten asegurar una adecuada calidad del producto final, a partir de la evaluación de los posibles peligros asociados al producto y delinear mecanismos de control de los mismos (Guía de BPA yM, 2003).

En el procesamiento industrial es fundamental evitar las posibles contaminaciones secundarias del producto. Para ello es fundamental contar con infraestructura edilicia adecuada y procedimientos de limpieza y desinfección que permitan asegurar una adecuada higiene.

El proceso para mieles de *Apis* incluye el desoperculado de las alzas y la extracción por centrifugación de la miel seguida del filtrado de la misma. Luego esta puede ser nuevamente centrifugada para eliminar posibles restos de cera. También es factible someterla a un tratamiento térmico a los fines de facilitar su fluidificación que permite una mejor manipulación. Así mismo pueden realizarse tratamientos térmicos para la eliminación de microorganismos patógenos, como la pasteurización (Ramirez Cervantes y Col., 2000; Shafiur Rahman, 2003).

El tratamiento térmico de las mieles es un factor central para mantener la calidad de las mismas. Un tratamiento térmico inadecuado redundaría en pérdida de calidad del producto lo cual se ve evidenciado por la disminución de la actividad enzimática de la miel y por

aumentos de los niveles de hidroximetilfurfural (HMF), ya que este se produce por deshidratación fundamentalmente de fructosa en medio ácido (Ramirez Cervantes y Col., 2000)

El envasado del producto también juega un rol fundamental para el periodo de vida útil del mismo, así, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) establece los siguientes tiempos de vida útil para la miel según el tipo de envase.

- Para envases de vidrio con tapa de rosca: dos años.
- Para envases de plástico con tapa de rosca: 1 año.
- Para envases de plástico con tapa termosellada: 6 meses.

(Guía de BPA y M, 2003. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Gobierno de la República Argentina.)

El envasado de la miel permite disminuir el acceso del oxígeno a la miel y evita los ciclos de vaporización y condensación de agua, que pueden causar dilución local de azúcares y posibilitar el desarrollo de microorganismos.

Las condiciones de almacenamiento del producto también tienen gran importancia para el mantenimiento de sus características. En las mieles es fundamental mantenerlas a temperaturas inferiores a 20 °C y con humedades relativas menores al 60 %. El no cumplimiento de estas premisas redundará en la afectación de la calidad del producto y la alteración de parámetros como el contenido de humedad, la acidez de la miel y el contenido de HMF (Detroy, 1979; Crane, 1985). Diversos estudios indican que la temperatura es el principal factor a controlar para mantener las características de la miel. Así, el tratamiento de la miel a una temperatura de 55 °C por diversos tiempos demuestra que los periodos más prolongados de calentamiento, provocan acciones nocivas al producto en algunos indicadores como la actividad diastásica, la acidez y el HMF (Ramirez Cervantes y Col., 2000)

En la evaluación del efecto de diferentes temperaturas de tratamiento térmico sobre muestras de mieles monoflorales, seguido mediante los niveles de HMF y la actividad de la enzima invertasa, se observa el inicio de la acción deletérea a partir de los 35 °C y esta se va incrementando según se aumenta la temperatura.

Karabournioti y Zervalaki (2001), observaron algún grado de resistencia al efecto térmico según el tipo de miel monofloral involucrada, y concluyen que la capacidad del

HMF es la mejor evaluación sobre el efecto nocivo del tratamiento térmico sobre la miel por no estar éste presente en el producto fresco.

Diversos tratamientos tecnológicos pueden realizarse sobre las mieles a los fines de prolongar su tiempo de vida útil, particularmente en el caso de las mieles de melipónidos dada su alto contenido acuoso.

Da Silva Sodre y Col. (2008), evaluaron el efecto de tratamientos de pasteurización y deshumidificación respecto de un estándar conservado en heladera para mieles de melipónidos, y observaron que a través de un panel de análisis sensorial los catadores no hallaron diferencias significativas para la aceptabilidad de la miel. Solo el parámetro fluidez fue captado como diferente para las muestras deshumidificadas (Da Silva Sodre y Col., 2008). Estas metodologías influyen directamente en el contenido de humedad de las mieles, que es el principal factor de alteración de las mieles de melipónidos (Moraes y Col., 1989; Fonseca y Col., 2006).

Las propiedades organolépticas de la miel dependen de factores intrínsecos de la misma como su composición en azúcares y componentes volátiles, pero también de su procesamiento y condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, la calidad de las mieles disminuye durante el almacenamiento y es particularmente afectada por la temperatura de almacenamiento, pudiendo afectar parámetros como el HMF la actividad enzimática y los niveles de acidez.

Castro Vázquez y Col. (2008), evaluaron el efecto del almacenamiento de mieles (*Apis*) de citrus durante 12 meses, a diferentes temperaturas y observaron un marcado aumento del HMF a 40 °C y disminución de la actividad diastásica. El mismo efecto se evidenció almacenando la miel a 10 °C y a 20 °C pero en mucha menor cuantía. También observaron un ligero aumento en la acidez y ninguna variación en el contenido de humedad. Un especial comportamiento se da con los azúcares de la miel, que durante el almacenamiento, evidenciaron una marcada disminución de los monosacáridos a las tres temperaturas evaluadas, donde el efecto fue mucho mayor a 40 °C. Este descenso se ve justificado en el aumento de los derivados por deshidratación de los monosacáridos, como los polímeros formados por las reacciones de Maillard; y en la formación de disacáridos, sobre todo maltosa, cuya concentración se incrementa en gran cantidad durante el almacenamiento, dada la acción de glucosidasas presentes en la miel y su acción a pH bajo (Castro Vázquez y Col., 2008).

## **II. 5.- ENVASADO**

El envasado tiene como misión fundamental contener y proteger los alimentos, para ello existen numerosas alternativas de materiales, cada uno con propiedades particulares y adaptables al tipo de alimento que se busque preservar.

Teniendo en cuenta que el envase ideal no existe, los envases utilizados deben cumplir con una serie de requisitos para poder ser utilizados:

Toxicidad cero

Visibilidad del producto

Control de gases y humedad

Estabilidad en un amplio rango de temperatura

Precio adecuado

Resistencia mecánica

Cierre adecuado.

De todo esto surge que la elección del envase supone un compromiso entre las diversas propiedades del envase (Shafiur Rahman, 2003).

Históricamente los dos materiales para la fabricación de envases fueron el metal y el vidrio. Ambos siguen siendo de gran uso en la actualidad y aplicados a diferentes tipos de alimentos, el enlatado proporciona gran capacidad de barrera entre el alimento y el ambiente y se utiliza ampliamente en todos aquellos alimentos que sean biológicamente estables asociado a un tratamiento térmico. El vidrio es considerado como el envase ideal para una gran variedad de alimentos dada su inalterabilidad ante la mayoría de las sustancias, la posibilidad de mantener visible al alimento, su buena resistencia mecánica y propiedades de barrera, su adaptabilidad a diversos diseños y la posibilidad de ser reciclado. Tiene como debilidad su fragilidad y el efecto que produzca la luz sobre el alimento.

En el último siglo se han desarrollado fundamentalmente los materiales plásticos para el envasado, dada su alta variabilidad según el polímero y la tecnología utilizada sumada a su menor costo unitario y su posibilidad de ser reciclados. Estos factores hacen que los polímeros plásticos vayan sustituyendo progresivamente a los materiales tradicionales de envasado.

La combinación de las diversas variables (monómero, conformación, combinación de monómeros, etc.) en la síntesis de los polímeros permite lograr diversas propiedades

para el envasado (resistencia mecánica, propiedades de barrera, transparencia u opacidad, producción de laminas y Films, etc).

El polipropileno es un polímero que posee forma regular y puede obtenerse de manera altamente ordenada logrando así una elevada cristalinidad, dureza y resistencia al calor. Posee excelentes propiedades de barrera anti humedad y frente a los gases ordinarios permitiendo además la utilización de termo sellado.

En el uso de polímeros adquiere gran importancia la posibilidad de transmisión del envase al alimento de productos posiblemente tóxicos. Por ello las normativas alimentaria vigentes establecen rigurosos límites para los materiales utilizados en el envasado de alimentos (Shafiur Rahman, 2003).

Un estudio indica la importancia del material del envase en los cambios sufridos por el alimento durante el almacenamiento a 4 °C, mostrando como material ideal al vidrio y estableciendo la necesidad de soluciones de compromiso para diferentes polímeros dependiendo del tiempo de almacenamiento y de las características de la matriz alimentaria (Saint- Eve y Col., 2008).

Gran importancia tiene el comportamiento del polímero a las diferentes temperaturas Durante el almacenamiento la miel sufre diferentes procesos, el más característico es la cristalización producida por su composición en azúcares y evitada a través de tratamientos térmicos que pueden poner en riesgo otras propiedades de la misma.

La temperatura de almacenamiento tiene claro efecto deletéreo sobre varias propiedades de la miel, como ser un aumento en la concentración de HMF, aumento en la acidez, disminución de la actividad diastásica conforme aumenta la temperatura de almacenamiento hasta aproximadamente 40 °C y se prolonga el tiempo de conservación. También se evidencian diferencias notorias en el contenido de compuestos volátiles relacionados con propiedades sensoriales del producto. El contenido de humedad y el pH no muestran marcadas diferencias en el almacenamiento en envases de vidrio. La composición de azúcares se ve también modificada encontrándose una disminución en la concentración de monosacáridos y un aumento de los disacáridos como la maltosa. Estas diferencias son menos evidentes a temperaturas cercanas a los 20 °C (Castro Vázquez, 2008). Moreira y Col. (2007), evaluaron los cambios en la miel durante el almacenamiento por 6 meses, en condiciones tropicales de temperatura (35 - 40 °C), encontrando modificaciones en la acidez, la actividad diastásica y el contenido de HMF

similares a otras referencias. No se hallaron variaciones en el contenido de humedad lo que indica un buen comportamiento del envase de vidrio utilizado para estas condiciones (Moreira y Col., 2007).

En contraposición a esto, otros estudios del almacenamiento indican una posible reversión de disacáridos a monosacáridos en determinadas condiciones, además se observa la importancia del proceso de cristalización de las mieles en la pérdida de calidad de las mismas. (Cavia y Col., 2002).

El alto contenido acuoso de las mieles de melipónidos determina la búsqueda de diferentes estrategias de conservación del producto, así se plantean la utilización de tratamientos térmicos y la deshumidificación para mejorar la comercialización de las mismas. En la evaluación sensorial de mieles sometidas a estos tratamientos versus mieles mantenidas en refrigeración se observó una buena aceptabilidad de las mieles tratadas, aunque se registraron diferencias en algunos atributos como la viscosidad (Da Silva Sodre y Col., 2008).

En el almacenamiento en envases de diferentes polímeros, de jugo de frutillas, durante 1 año se observa que envases de PVC y PET presentan pérdidas similares de componentes aromáticos a los de envases de vidrio (Ducruet y Col., 2001).

## ***CAPITULO III***

### III.1.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL / METODOLOGIA

Para el estudio intensivo de los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y antimicrobianos bajo diversas condiciones de conservación, las muestras estudiadas fueron tomadas de una sola colmena y en un solo proceso de melado para tener un único valor inicial de los parámetros estudiados.

Las muestras, se obtuvieron de una colmena racional sin paneles para las ánforas, proveniente de la zona suburbana de la localidad de Oberá, ubicada en la zona centro de la provincia de Misiones (Fig. 10). La colmena “representativa” pertenece a un productor cuyas mieles obtuvieron, en investigaciones previas, resultados estándares adecuados de calidad microbiológica.

El melado se llevo a cabo en el mes de octubre de 2008.

El melado se realizó de manera similar a la utilizada en el proceso tradicional de melado referido por los productores locales, por escurrimiento natural y con jeringas, evitando la compresión de la colmena. Todo el producto obtenido fue almacenado en un recipiente estéril para su homogenización.

En el laboratorio, la muestra inicial fue dividida en dos muestras. Cada una fue fraccionada posteriormente en cantidades iguales de envases estériles, de vidrio y polipropileno translúcido, con tapas a rosca, colocando idénticas cantidades de la miel en cada recipiente. La experiencia para ambas muestras fue desarrollada en paralelo y los recipientes correspondientes a cada muestra, fueron colocadas en las diferentes condiciones de almacenamiento, esto es, temperatura ambiente y temperatura de refrigeración (7 - 10 °C).

La muestra inicial, o sea, la del tiempo 0 (to), se analizo inmediatamente.

Se conservaron los distintos frascos cerrados durante 15, 90, 120 y 180 días. Las determinaciones a los distintos tiempos de conservación se realizaron por duplicado

En cada caso se evaluó sobre cada muestra:

a) la variación de la calidad de su flora microbiana, por recuento de microorganismos mesófilos totales y recuento de hongos filamentosos y levaduras.

b) la variación del poder antimicrobiano contra cuatro cepas del género *Staphylococcus*.

c) pH, el contenido de humedad, la acidez libre, el hidroximetilfurfural (HMF) y la actividad diastásica.

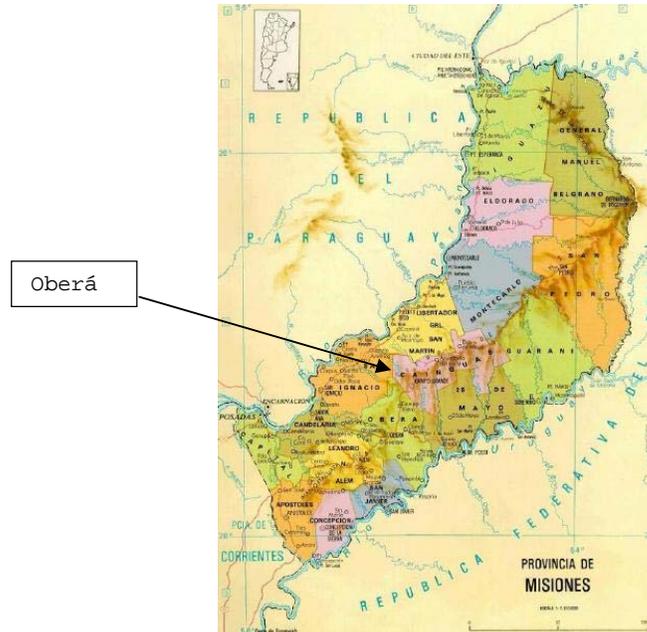


Figura 10: Mapa de la provincia de Misiones. Ubicación de Oberá

### III.1.1 CALIDAD MICROBIOLÓGICA

#### III.1.1.1.- Preparación de las diluciones decimales:

La preparación de las diluciones decimales tiene por finalidad diluir la flora microbiana de la muestra, para poder efectuar su posterior recuento microbiológico. Para preparar las diluciones seriadas, se dispuso de una serie de tubos con tapón, con agua de peptona al 0,1 % estéril.

Se suspendió un gramo de la miel, adecuadamente homogeneizada, en un tubo con 9 ml de agua de peptona al 0,1 %, obteniéndose así una dilución de 1:10 ( $10^{-1}$ ). Luego de homogeneizar adecuadamente se traspa 1 ml de la solución al tubo siguiente para obtener la siguiente dilución decimal. El proceso se repite tantas veces como diluciones decimales se desee obtener (Fig. 11).

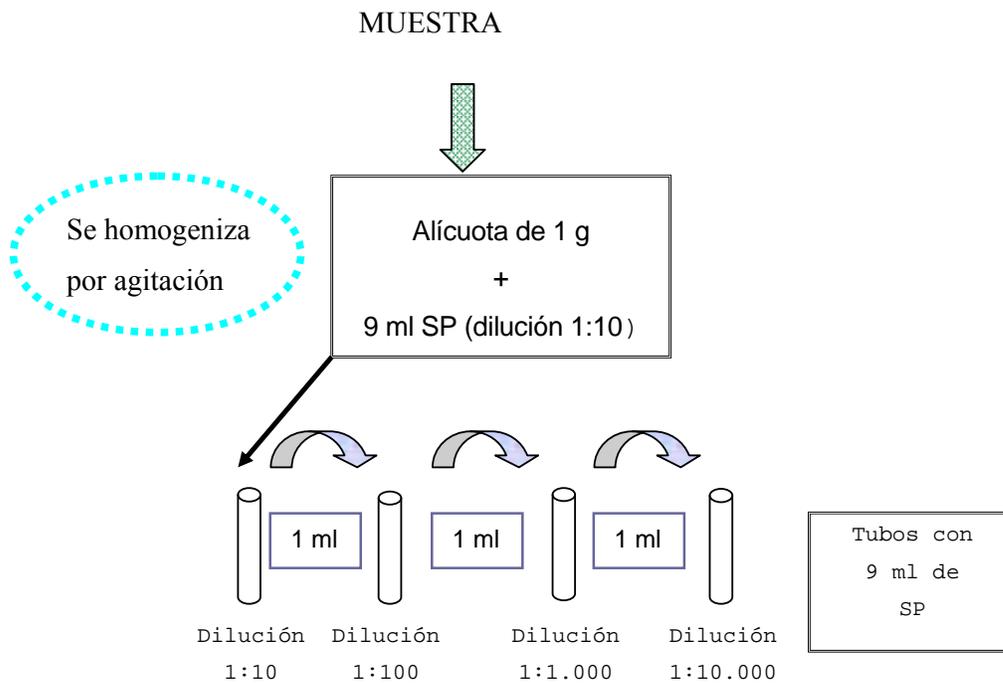


Figura 11: Diagrama de Flujo de Diluciones seriadas

### III.1.1.2.- Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales

Se utilizó la metodología de siembra en masa o profundidad. Se sembró 1 ml de muestra de cada una de las diluciones preparadas en placas de Petri estériles colocando luego, 12 a 15 ml de medio de cultivo (Agar Plate Count), fundido y previamente enfriado a 46 °C, a cada placa de Petri inoculada, (Fig. 12). Se taparon las placas y se mezclaron cuidadosamente el contenido de cada una de la forma siguiente:

- a) se imprimen a la placa 5 movimientos de vaivén en una dirección;
- b) se hace girar la placa 5 veces en el sentido de las agujas del reloj;
- c) se vuelven a imprimir 5 movimientos de vaivén en una dirección normal a la primera;
- d) se hace girar la placa 5 veces en el sentido contrario a las agujas del reloj.

Se dejó solidificar a temperatura ambiente sobre una superficie horizontal. Luego se incubaron en la estufa regulada a  $35 \pm 1$  °C durante 24 a 48 h. Pasado ese tiempo, se

examinaron las placas de Petri y se realizó el recuento en las placas que contenían entre 30 y 300 colonias en un contador de colonias (Quebec).

Se calculo el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra mediante la Ecuación (1):

$$N = \frac{\sum c}{(n1+0,1 \times n2) \times d \times Vs} \text{ UFC/g} \quad (1)$$

Donde:

N = número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g);

$\sum c$  = suma de las colonias contadas en las placas de Petri de diferentes diluciones;

n1 = número de placas de Petri con colonias entre 5 y 150 en la primera dilución;

n2 = es el número de placas de Petri con colonias entre 5 y 150 en la segunda dilución;

d = factor de dilución correspondiente a la primera dilución

Se redondea el resultado final, expresándolo bajo notación científica, con dos cifras significativas, por ejemplo:  $1,5 \times 10^2$  UFC/g.

Para el redondeo se tuvo en cuenta las directivas siguientes:

- a) Si la tercera cifra significativa es menor que 5, se la anula sin modificar la segunda cifra significativa.
- b) Si la tercera cifra significativa es mayor que 5, se la anula y se aumenta la segunda cifra significativa en una unidad del mismo orden.
- c) Si la tercera cifra significativa es igual a 5, se la anula sin modificar la segunda cifra significativa si ésta fuese par o se le suma 1 si fuese impar.

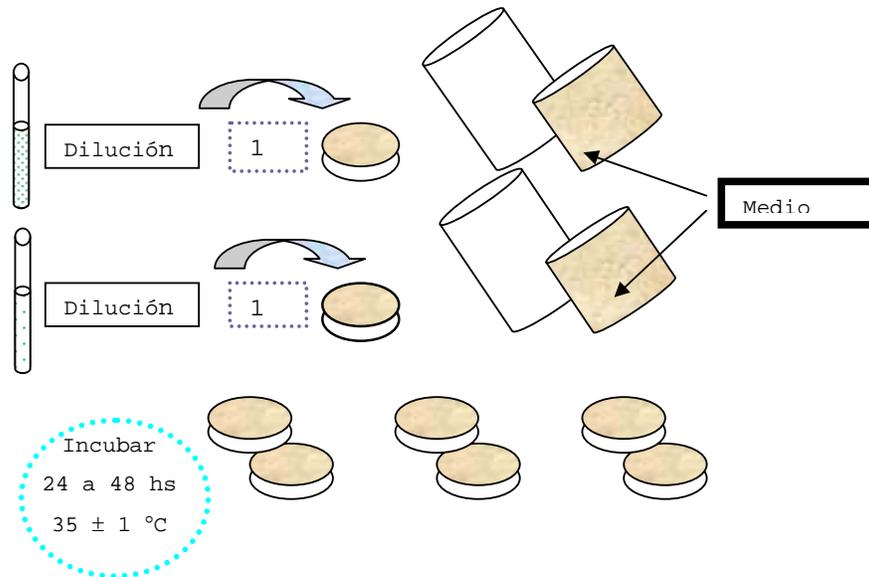


Figura 12: Diagrama de preparación de placas para el recuento de bacterias aerobias mesófilas totales

### III.1.1.3.- Recuento de mohos y levaduras

Se procedió de idéntica manera que para el recuento de bacterias aerobias mesófilas totales, utilizando el medio de cultivo (agar – cloranfenicol – extracto de levadura – glucosa), fundido y previamente enfriado a  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se preparó una placa control, en la que no se agrega muestra (Fig N° 13)

Se colocaron las placas sin invertir a  $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se incubaron durante 5 días.

Después de la incubación, se contaron las colonias diferenciando las de levadura de las de hongos filamentosos según su morfología. La identificación de colonias dudosas se realizó por observación microscópica.

Para realizar el recuento se seleccionaron las placas de dos diluciones consecutivas que contengan entre 5 y 150 colonias, se calculó el número promedio de levaduras y hongos, según la fórmula:

El recuento se realizó utilizando la Ecuación 1, expresando el recuento en UFC/g

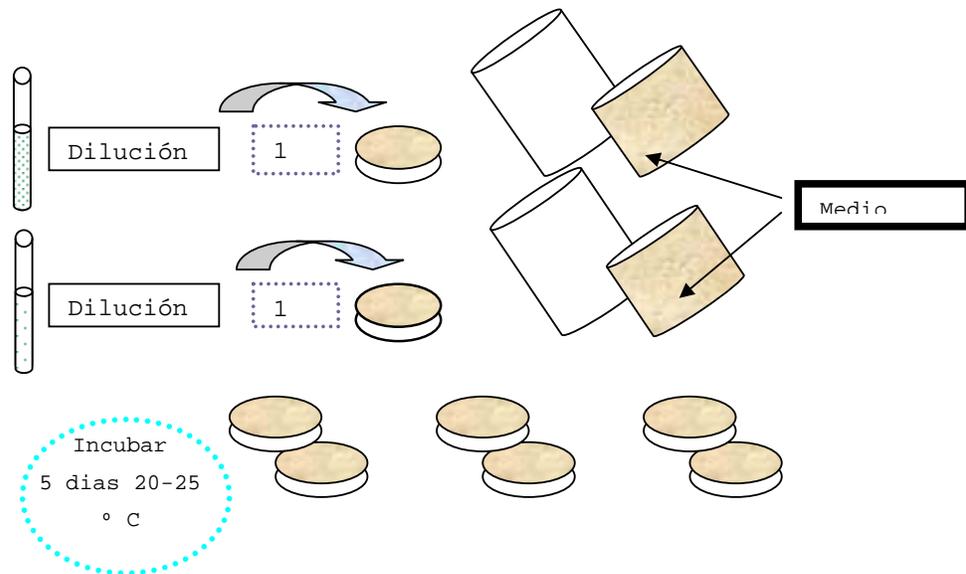


Figura 13: Diagrama para el recuento en placa de Mohos y Levaduras

### III.1.2.- PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

La variación de las propiedades antimicrobianas de la miel de Yateí durante su almacenamiento a distintas temperaturas, se realizó contra 4 cepas del género *Staphylococcus aureus* aisladas de diferentes fuentes:

Cepa 1. *Staphylococcus aureus* aislamiento salvaje de producto cárnico.

Cepa 2: *Staphylococcus aureus* aislamiento salvaje de alimento lácteo.

Cepa 3: *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Cepa 4: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

De todas las cepas se realizó un pool de reserva que se conservó a temperatura de congelación, previo a las pruebas una muestra del pool se reactivó en placas de agar BHI, incubadas a 37 °C por aproximadamente 18 horas para obtener cultivos en fase de crecimiento logarítmico y ser ensayados en las pruebas de capacidad inhibitoria.

### **III.1.2.1.- Determinación de la capacidad inhibitoria**

Se utilizó el método de difusión en agar. A partir de las placas de BHI en las que se reactivaron las cepas de *Staphylococcus* spp., se realizó una suspensión de las mismas en solución fisiológica estéril. La suspensión de la cepa se corresponde al patrón establecido para el 0,5 de Mc Farland, a los fines de obtener un inóculo de aproximadamente  $10^6$  - $10^8$  UFC/ml.

Con cada suspensión se estriaron en tres sentidos las placas conteniendo agar Mueller Hinton, solidificados y secadas a 40 °C, con un espesor de 4 mm. Una vez realizado el césped, se practicó hacer los pocillos con sacabocados estéril con orificios de 0,7 mm de diámetro en el agar.

Se realizaron diluciones de la miel, luego, se inocularon 50 µl de cada una de las muestras puras y sus diluciones en los pocillos practicados en el agar. Se dejó absorber la dilución al agar durante 10 minutos, se incubaron las placas invertidas durante 24 horas a 35 +/- 1° C, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición mediante regla y lupa.

### **III.1.3.- PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS**

#### **III.1.3.1.- pH**

El pH de las muestras se determinó potenciométricamente utilizando un pHmetro marca HANNA H99161 y un electrodo FC202D. Previo a cada batch de determinaciones se procedió a calibrar el equipo con tres estándares de pH 4, 7 y 10.

#### **III.1.3.2.- Acidez:**

La acidez de las diferentes muestras de miel se determinó titulométricamente siguiendo el punto final de manera potenciométrica hasta un pH 8,3 utilizando fenolftaleína como indicador (PHmetro HANNA H99161 y un electrodo FC202D. Método AOAC 15th. Ed., 1990, **962.19**)

#### **III.1.3.3.- Hidroximetilfurfural:**

La determinación de hidroximetilfurfural se basó en el método de White (1969) que determina la absorbancia a 284 nm de una muestra de miel, en la cual se destruye con bisulfito de sodio el cromóforo de HMF. La diferencia de absorbancia entre la muestra

clarificada (sin bisulfito de sodio) y la de referencia (con bisulfito de sodio), se asemeja a la banda de absorción del HMF entre 250 y 360 nm, con un máximo a 284 nm (Método AOAC 15th. Ed., 1990, **980.23**)

#### **III.1.3.4.- Humedad:**

Método refractométrico. Se determinó el índice de refracción de las muestra de miel previamente homogeneizada con un refractómetro ABBE a 20 °C y realizando la transformación a través de las tablas de Chataway y revisadas por Wedmore (1955). (método AOAC 15th. Ed., 1990, **969.38 B**),

#### **III.1.3.5.- Diastasa:**

La determinación se basa en el método de Schade (1958), modificado por White y col. (1959) y por Hadorn (1961). donde se aprovecha la capacidad de la enzima de hidrolizar el almidón. La cuantificación se realiza midiendo la absorbancia a 660 nm del complejo coloreado yodo-almidón .

#### **III.1.4.- Análisis estadístico de los datos**

Para el análisis estadístico de la influencia de los diversos factores y su posible interacción, se utilizó el Análisis de varianza de más de un factor a través del paquete estadístico del programa Statgraphics Plus 5.1. Statpoint Technologies. Inc. Warrenton VA.USA. Posteriormente se realizó un test de menor diferencia de medias (LSD) para la comparación de los factores.

## III.2- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.2.1.- CALIDAD MICROBIOLÓGICA

#### III.2.1.1.- Recuento de Aerobios Mesófilos Totales:

Al momento de ser cosechada, los análisis microbiológicos de la muestra analizada presentaron un recuento de aerobios mesofilos totales de  $3,6 \times 10^3 \pm 4,2 \times 10^2$  UFC/g (Fig. 14), siendo este valor menor al exigido por las normativas europeas para la miel de *Apis mellífera*. El recuento fue superior a los determinados en otros trabajos para meliponas y esta diferencia puede radicar en las diferentes modalidades de toma de muestra ya que en este caso el proceso de melado se realizó de manera similar al utilizado por los productores y no exclusivamente con jeringas estériles como en otros trabajos realizados sobre el tema (Dallagnol, 2007; Pucciarelli y Col., 2009; Schapovaloff, 2009).

Los factores tiempo, temperatura y envase mostraron diferencias significativas en el recuento de aerobios para un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0,05$ ) (Fig. 15). Se observó un descenso en los recuentos a los 120 días de almacenamiento en todas las condiciones ensayadas, y se mantuvo una tendencia descendente a los 180 días de almacenamiento.

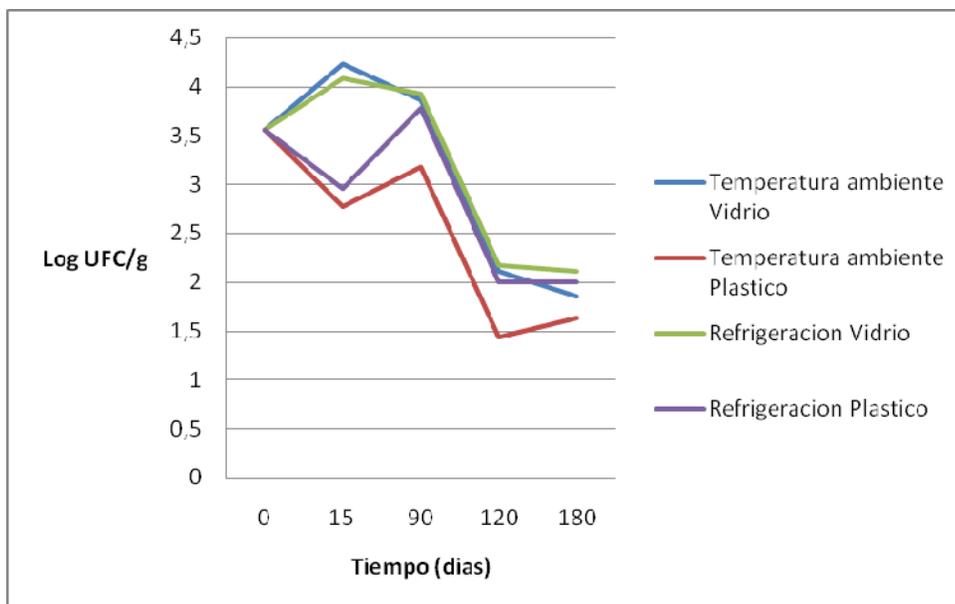


Figura 14: Variaciones en el recuento de aerobios mesofilos totales en el tiempo según condiciones de almacenamiento.

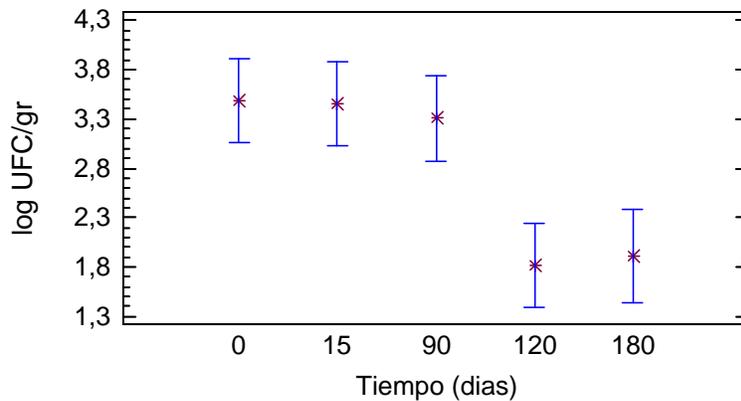


Figura 15: Medias e Intervalo de 95% LSD para aerobios mesofilos totales

### III.2.1.2.- Recuento de mohos y levaduras

El recuento de mohos y levaduras fue al momento inicial de  $9,5 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$  UFC/g (Fig. 16), valor que supera los estándares de calidad establecidos por la normativa de  $M=1 \times 10^2$  UFC/g (Código Alimentario Argentino, Cap. X)

Los recuentos de mohos y levaduras mostraron diferencias significativas para un nivel de confianza del 95 % sólo para el efecto del tiempo ( $p < 0,05$ ), observándose una disminución significativa en los recuentos a los 90 días de almacenamiento (Fig. 17). Cabe destacar que a partir de los 90 días de almacenamiento en adelante, en los envases ensayados a temperatura ambiente, no se evidenció desarrollo de colonias de mohos y levaduras en los controles microbiológicos, mientras que en los envases mantenidos en refrigeración estos microorganismos se mantuvieron viables con tendencias descendentes.

Este comportamiento puede justificarse en las condiciones ácidas observadas a partir de este tiempo en la miel conservada a temperatura ambiente, lo que determinaría la inviabilidad de estos microorganismos. Al mismo tiempo los recuentos de microorganismos aerobios mesofilos se mantuvieron viables, lo que podría deberse a la existencia de microorganismos formadores de esporas o de poblaciones aerobias resistentes a las condiciones ácidas de la matriz. En varios trabajos realizados con mieles de Yateí, se han encontrado presencia de microorganismos esporulados

aeróbicos y anaeróbicos como *Bacillus* spp y *Clostridium* spp (Snowdon y Cliver, 1996; Salamanca Grosso y Col., 2001; Iurlina y Fritz., 2005; Dallagnol, 2007; Pucciarelli y Col., 2009; Schapovaloff. 2009).

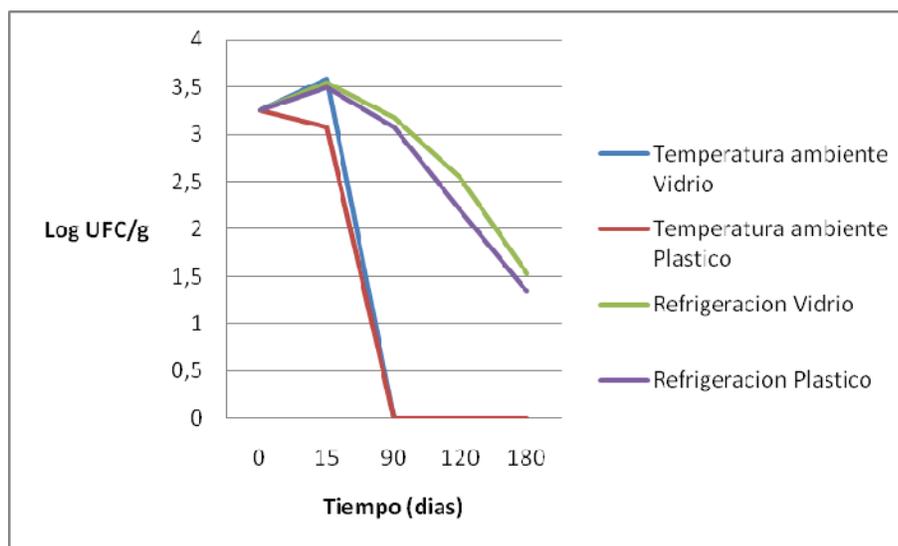


Figura 16: Variaciones en el recuento de mohos y levaduras en el tiempo según condiciones de almacenamiento

Se observó también un efecto significativo de la interacción entre el tipo de envase y la temperatura de conservación ( $p < 0,05$ ) donde se observa que a temperatura ambiente hay menor desarrollo en el envase plástico lo que se invierte a temperatura de refrigeración.

El mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos en mieles a temperatura de refrigeración respecto a las conservadas a temperatura ambiente ha sido referenciado en diversos trabajos (Tisset y Col., 1973; Kokubo y Col., 1984; Nakano y Col., 1989; Snowdon y Col., 1996).

En los mismos se evidencia también el mantenimiento de los recuentos de microorganismos hasta aproximadamente los 100 días de almacenamiento, similar al tiempo de conservación en el que se observaron disminuciones en ambos recuentos en el presente trabajo.

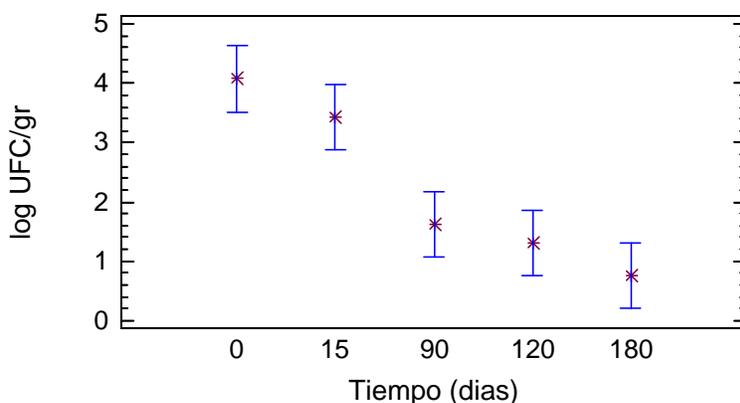


Figura 17: Medias e Intervalo de 95% LSD para Mohos y Levaduras

### III.2.2.- PARAMETROS FISICOQUÍMICOS

#### III.2.2.1- Acidez libre

La acidez libre de la muestra ensayada fue al momento del melado de  $42,5 \pm 3,53$  meq acido/ kg de miel (Fig. 18), valor por sobre los estándares establecidos como límite para la miel en las normativas vigentes (Código Alimentario Argentino, Cap. X), pero coincidente con los diferentes estudios realizados para mieles de melipónidos (Vit y Col., 2004; Souza y Col., 2006; Pucciarelli y Col., 2009).

De los factores ensayados el tiempo ( $p < 0,05$ ) y la temperatura ( $p < 0,05$ ) mostraron efectos significativos para un nivel de significación del 95 % (Fig. 19 y Fig. 20 respectivamente).

También mostraron efecto para el mismo nivel de significación las interacciones entre el tiempo y la temperatura ( $p < 0,05$ ) y entre el envase y la temperatura ( $p < 0,05$ ).

El tipo de envase utilizado no mostró efectos significativos para un nivel de significación del 95 %.

A los 15 días de almacenamiento la acidez de la muestra aumentó en todas las condiciones ensayadas, alcanzando valores cercanos a los 50 meq/kg miel para las muestras conservadas en refrigeración, mientras que la acidez para las muestras conservadas a temperatura ambiente alcanzó valores cercanos a 120 meq/kg de miel.

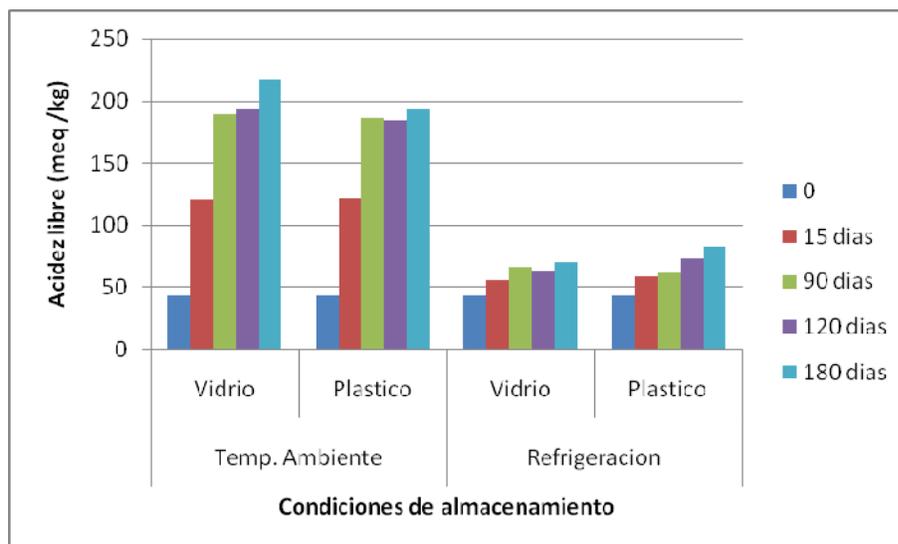


Figura 18: Variación de la acidez en el tiempo según condiciones de almacenamiento

La producción de ácidos de las mieles esta dada por la acción enzimática de la glucosa oxidasa y por los procesos fermentativos desarrollados por los microorganismos presentes en la matriz. La temperatura de refrigeración permite reducir la velocidad de ambos fenómenos y de esta manera obtener en las muestras aumentos acotados de los niveles de acidez. En este punto las muestras conservadas a temperatura ambiente mostraban claras señales de fermentación como producción de espuma y gas.

Sanz y Gradillas (1995) y White (1975), describieron que la fermentación de las mieles depende de la contaminación inicial, el tiempo y temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad, siendo éste, el factor principal.

La miel ensayada en este trabajo mostró niveles de humedad cercanos al 26 %, valor superior a lo referenciado como límite de contenido de humedad para la inhibición de la fermentación (20 %) y que figura en la normativa nacional (CAA).

La humedad alta de la muestra asociada a la carga microbiológica alta y al efecto de la temperatura, justifican el desarrollo de la fermentación y el aumento de la acidez en las muestras conservadas a temperatura ambiente (Fig. 21).

En los controles posteriores se observó el mantenimiento de la acidez en las muestras conservadas en refrigeración y aumentos en las muestras conservadas a temperatura ambiente llegando a valores cercanos a los 200 meq/kg de miel a los 180 días de almacenamiento.

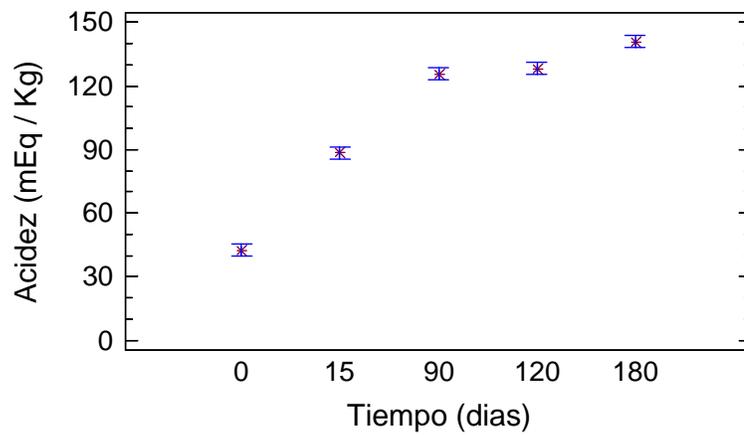


Figura 19: Medias e Intervalo del 95% LSD para Acidez/tiempo

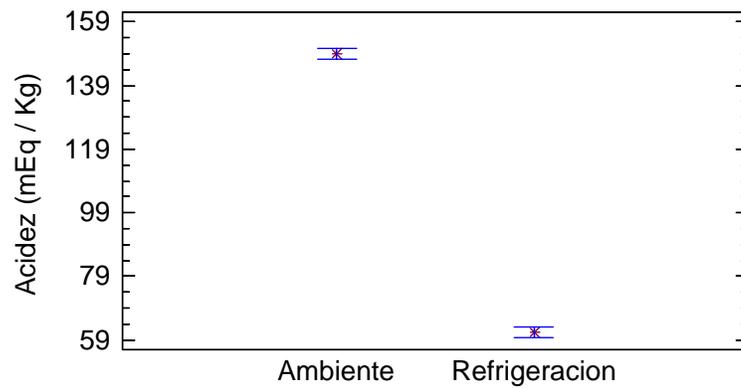


Figura 20: Medias e Intervalo del 95% LSD para Acidez/temperatura



Figura 21: Fotografía mieles conservadas a temperatura ambiente

### III.2.2.2.- Humedad

Las mieles de melipónidos tienen la característica de presentar humedades mayores a las correspondientes a mieles de *Apis mellifera*. Al momento del melado, la muestra analizada presento un contenido de humedad de  $26 \pm 0,11$  % (Fig. 22), muy superior al 20 % autorizado por las normativas vigentes para miel. (Código Alimentario Argentino, Cap. X).

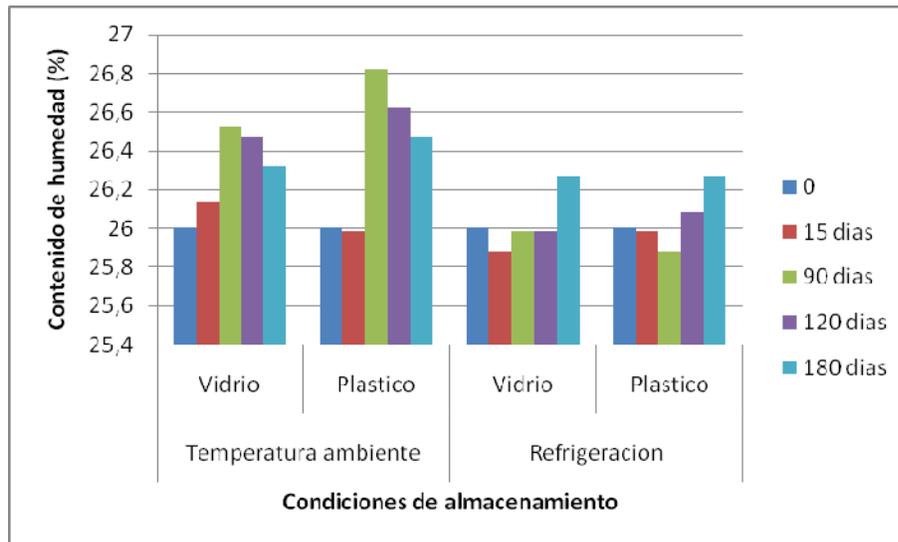


Figura 22: Variaciones en el contenido de humedad (%) en el tiempo según condiciones de almacenamiento.

De los factores ensayados el tiempo ( $p < 0,05$ ) y la temperatura ( $p < 0,05$ ) mostraron efectos significativos para un nivel de significación del 95 % (Fig. 23 y Fig. 24 respectivamente).

Se observó un efecto de la interacciones entre el tiempo y la temperatura ( $p < 0,05$ ) para el mismo nivel de significación.

El tipo de envase utilizado no mostró efectos significativos para un nivel de significación del 95 %.

El alto contenido de humedad es concordante con informes previos para mieles de melipónidos (Vit y Col., 2004; Souza y Col., 2006; Pucciarelli y Col., 2009).

Para el caso de las mieles conservadas a temperatura ambiente se observó un aumento de los contenidos de humedad hacia los 90 días de almacenamiento que descendió posteriormente. Este comportamiento no se verificó en las muestras conservadas en refrigeración. Estos resultados pueden deberse a la variabilidad de las condiciones de

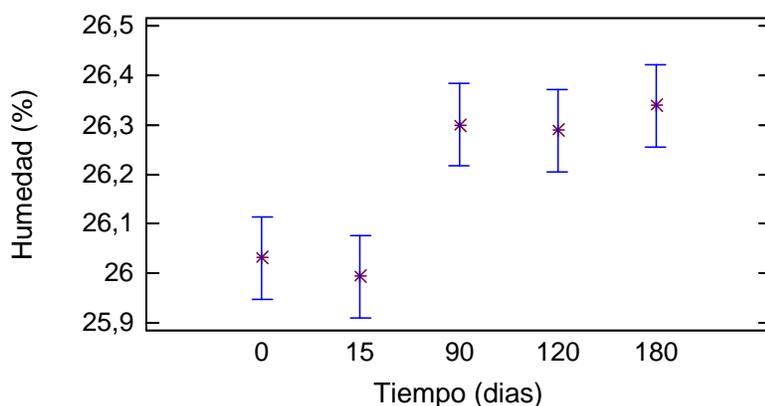


Figura 23: Medias e intervalo del 95% LSD para humedad/tiempo

temperatura y humedad a las que se sometieron a las muestras conservadas a “temperatura ambiente”. Estudios realizados con mieles de *Apis mellifera* han encontrado que al exponer las mismas a humedades ambientales superiores al 60 % se evidencia la absorción de agua por parte de la miel coincidiendo con los resultados encontrados (Salamanca Grosso y Col., 2001).

Estos resultados concuerdan con experiencias que indican que las mieles de melipónidos sometidas a condiciones de humedad ambiente del 40 % y temperaturas cercanas a los 30 °C, menores a 60 %, muestran un descenso neto en sus contenidos de humedad (Moraes y Col., 1989; Fonseca y Col., 2006).

Comparando exclusivamente los contenidos de humedad iniciales y a los 180 días de almacenamiento se encuentra que el único factor con efecto significativo para un nivel

de significación del 95 % es el tiempo ( $p < 0,05$ ), eliminándose el efecto de la temperatura.

Cabe destacar que pese a que el análisis estadístico muestra diferencias significativas en las variaciones de humedad estas son solo de entre un 2 y un 3 % en el transcurso de tiempo estudiado.

Se observa finalmente un aumento neto de humedad en todas las condiciones ensayadas, que puede verse sustentado en varios factores como ser la liberación de moléculas de agua en reacciones dadas en la miel, aunque este efecto es teóricamente considerado como despreciable, además de una posible transferencia de humedad del ambiente a la miel a través del cierre defectuoso de los frascos con tapa a rosca.

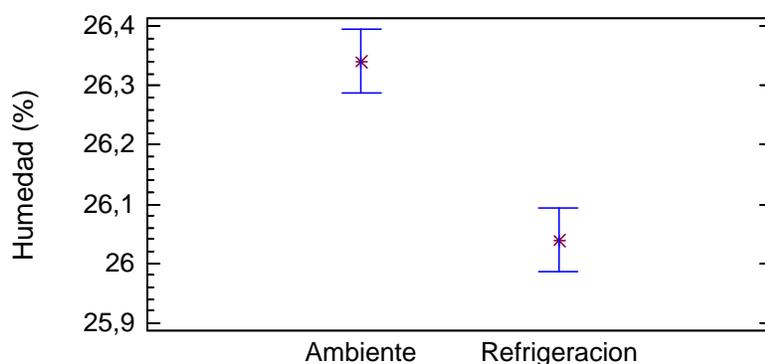


Figura 24: Medias e intervalo del 95% LSD para humedad/temperatura

### III.2.2.3.- pH

El pH registrado en la muestra al momento de la cosecha fue de  $4,02 \pm 0,02$  similar a los valores registrados para mieles de *Apis*. Estos valores han sido informados por estudios previos (Vit y Col., 2004; Souza y Col., 2006; Pucciarelli y Col., 2009).

A los 15 días de almacenamiento se observó que este valor del pH sufrió un descenso significativo en todas las condiciones ensayadas (Figura 25). Este comportamiento concuerda con el aumento de la acidez libre observado en el mismo periodo de tiempo.

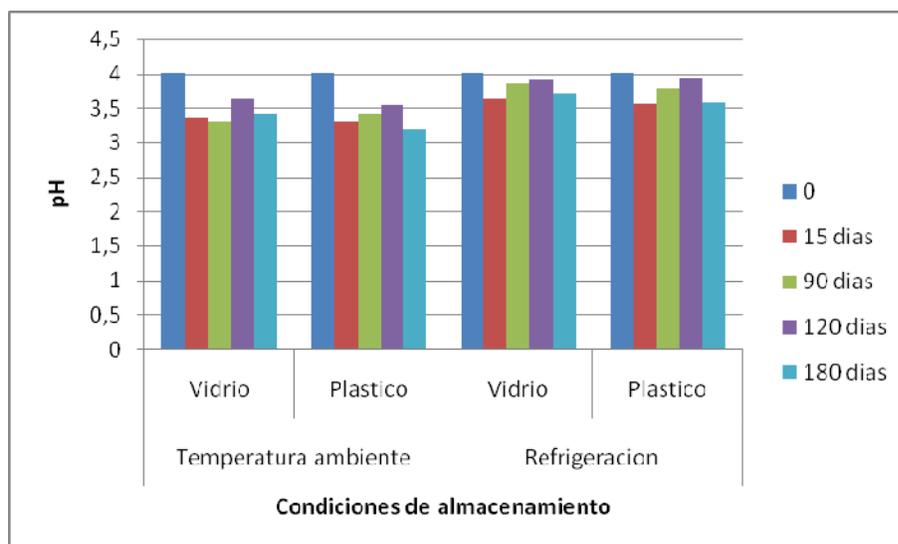


Figura 25: Variaciones del pH en el tiempo según condiciones de almacenamiento

En los controles posteriores el pH de las muestras de miel mostró valores mas bajos, sobre todo en las muestras conservadas a temperatura ambiente, este efecto es concordante con el aumento de la acidez libre de las mieles conservadas a temperatura ambiente que mostraron claros signos de fermentación.

Para las condiciones evaluadas el tiempo y la temperatura (Fig. 26 y Fig.27) mostraron efectos para un nivel de significación del 95 %. ( $p < 0,05$ ), se observó también un efecto significativo para la interacción tiempo-temperatura. ( $p < 0,05$ )

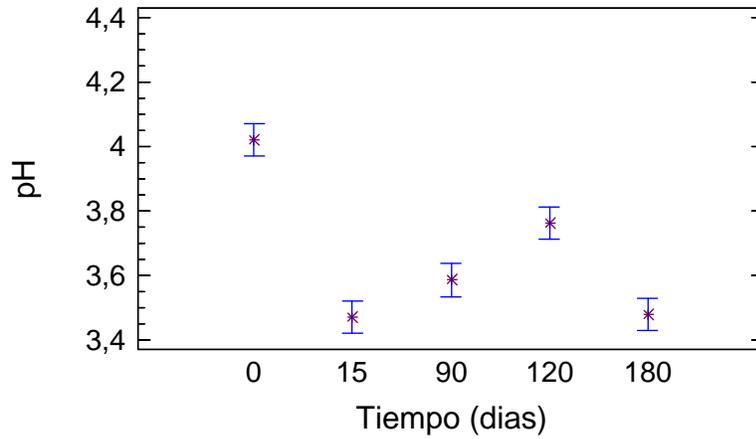


Figura 26: Medias e intervalo del 95% LSD para pH/tiempo

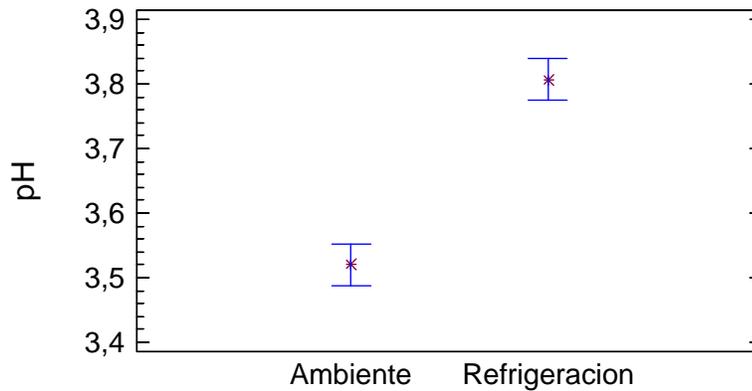


Figura 27: Medias e intervalo del 95% LSD para pH/temperatura

#### III.2.2.4. Diastasa

La muestra analizada al tiempo inicial registro una actividad diastásica de Nro. de diastasa  $42,7 \pm 1,08$ , valor superior al mínimo exigido por la normativa vigente, el mismo es de 8 en la escala de Gothe, esta unidad es coincidente con el numero de diastasa (Código Alimentario Argentino, Cap. X).

A los 15 días de almacenamiento se observó en todas las condiciones ensayadas un descenso en la actividad enzimática, siendo más pronunciada en las muestras conservadas a temperatura ambiente (Fig. 28).

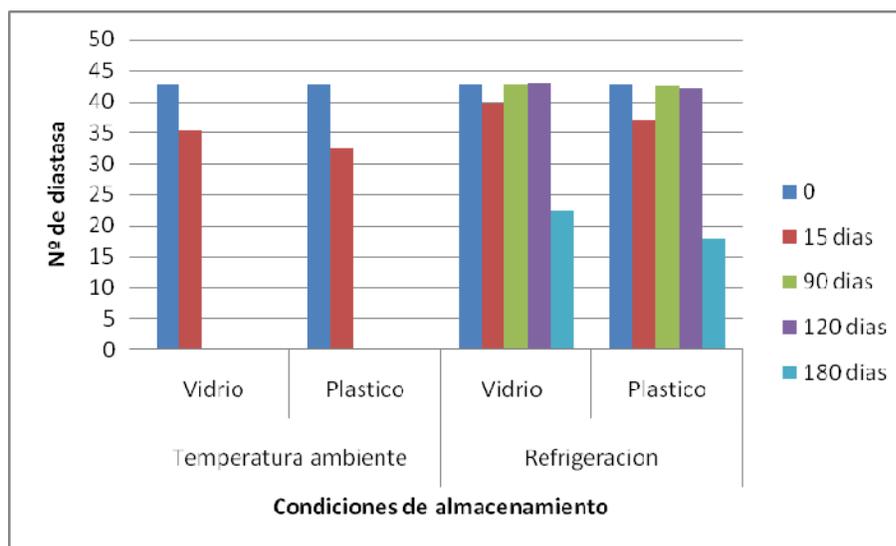


Figura 28: Variación en la actividad diastásica (ND) en el tiempo según condiciones de almacenamiento

En los controles posteriores de las muestras conservadas a temperatura ambiente se observó la desaparición total de la actividad enzimática. Este fenómeno es compatible con la modificación del pH de las muestras que determina cambios en la estructura enzimática produciendo la pérdida de la actividad.

La disminución de la actividad diastásica fue mucho menor en las muestras conservadas en refrigeración, dado que las modificaciones de las propiedades de estas mieles fueron mucho menores. A pesar de ello la actividad enzimática presentó un comportamiento decreciente hasta los 180 días de almacenamiento, pero adecuándose en todo momento a lo establecido por las normativas vigentes. Estos resultados coinciden con diferentes informes (Castro Vázquez y Col., 2008; Ramírez Cervantes y Col., 2000; White, 1964; Takenaka, 1974).

Para las condiciones evaluadas el tiempo y la temperatura (Fig. 29 y Fig. 30), mostraron diferencias para un nivel de significación del 95 %. ( $p < 0,05$ ), se observó también un efecto significativo para la interacción tiempo-temperatura ( $p < 0,05$ ).

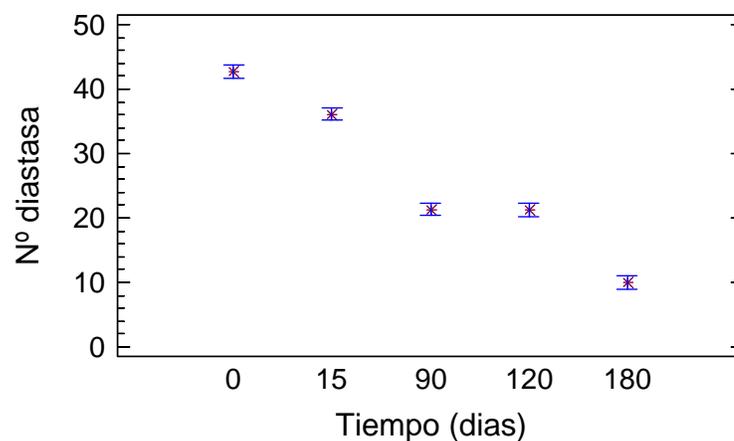


Figura 29: Medias e intervalo del 95 % LSD para Nº diastasa/tiempo

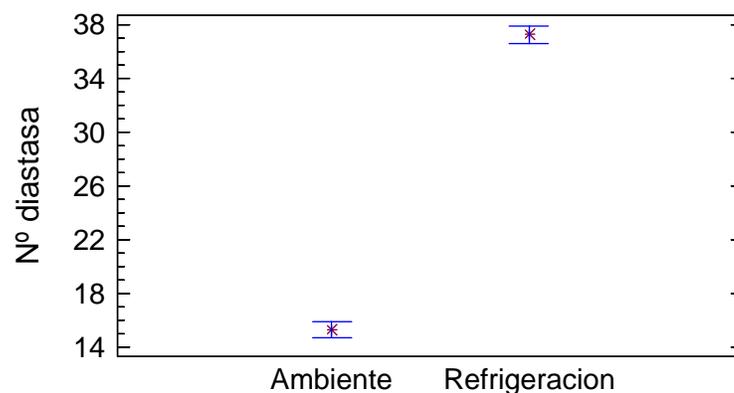


Figura 30: Medias e intervalo del 95% LSD para diastasa/temperatura

### III.2.2.5.- Hidroximetilfurfural (HMF)

Al momento del melado la muestra ensayada mostró un valor de  $3,72 \pm 2,09$  mg/kg, muy inferior a los valores exigidos por la normativa vigente que establece un límite de 40 mg/kg de miel. (Código Alimentario Argentino, Cap. X). Todas las condiciones ensayadas mostraron tendencias ascendentes para el HMF hasta los 180 días de almacenamiento (Fig. 31), sin superar los límites normativos.

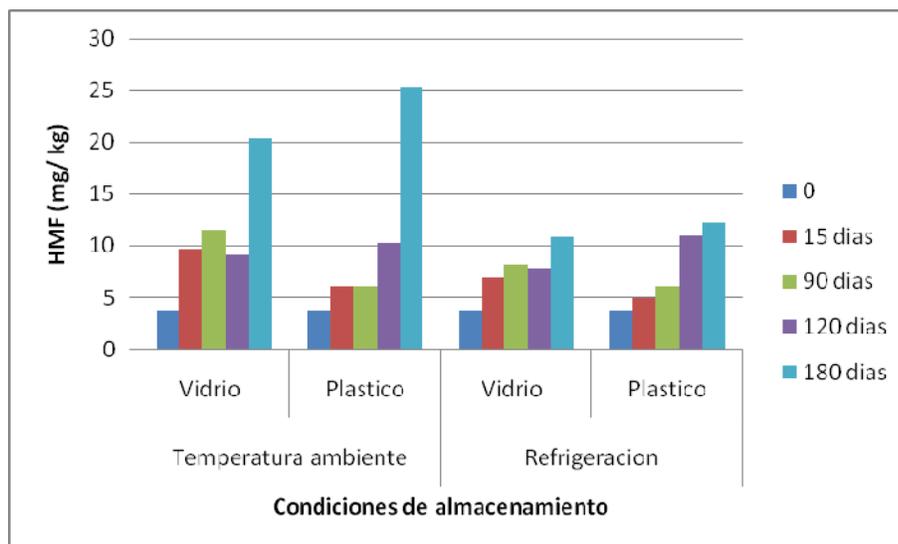


Figura 31: Variaciones de HMF (mg/kg de miel) en el tiempo según condiciones de almacenamiento

Los aumentos fueron superiores en las muestras conservadas a temperatura ambiente, lo que es justificable dadas las condiciones ácidas de dichas muestras lo que favorece la formación de furfurales a partir de los azúcares. Al desarrollarse las experiencias durante el verano la temperatura ambiente superior a 30 °C incide también en el aceleramiento de las reacciones de formación. Este aumento ha sido descrito por varios autores (Castro Vázquez y Col., 2008; Ramírez Cervantes y Col., 2000; White, 1964; Takenaka, 1974), y establece la utilidad de este indicador para evaluar el envejecimiento de las mieles.

Para las condiciones evaluadas el tiempo y la temperatura (Fig. 32 y Fig. 33), mostraron efectos para un nivel de significación del 95 % ( $p < 0,05$ ), se observó también un efecto significativo para la interacción tiempo-temperatura. ( $p < 0,05$ ).

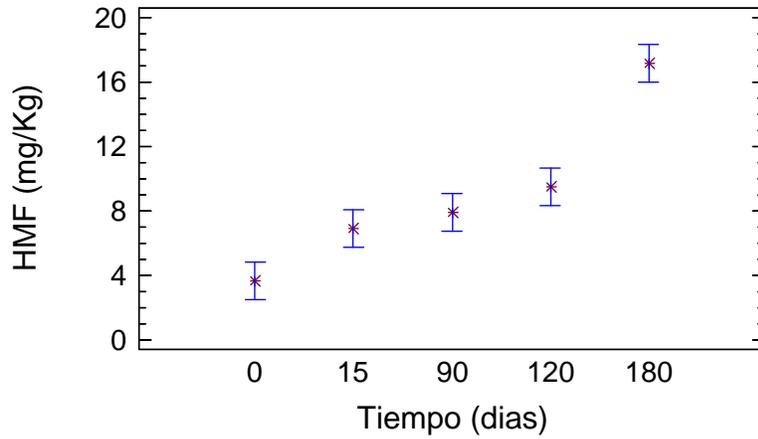


Figura 32: Medias e intervalo del 95% LSD para HMF/tiempo

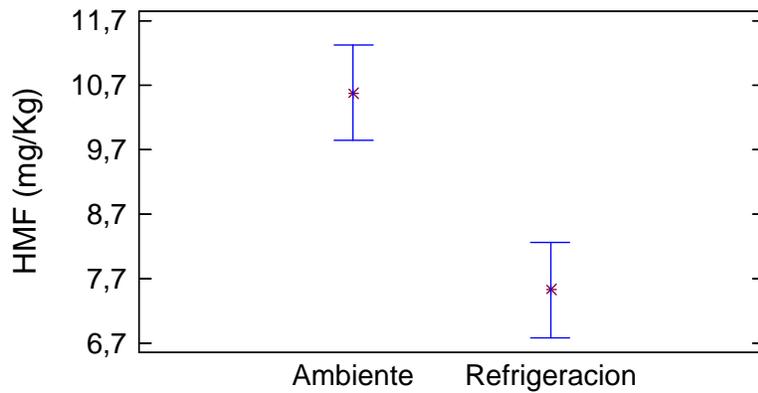


Figura 33: Medias e intervalo del 95% LSD para HMF/temperatura

### III.2.3.-PODER ANTIMICROBIANO

La evaluación del poder antimicrobiano de la miel frente a diversas cepas de *Staphylococcus aureus* mostró comportamientos variables. El aislamiento de cepas salvajes de productos cárnicos, y la cepa ATCC 6538 no mostraron sensibilidad a la acción de la miel al momento del melado ni en ninguna de las condiciones ensayadas.

El aislamiento salvaje de producto lácteo (CEPA 2) y la cepa ATCC 25923 (CEPA 3), mostraron sensibilidad variable según se observan en las Figuras 34 y 35 respectivamente.

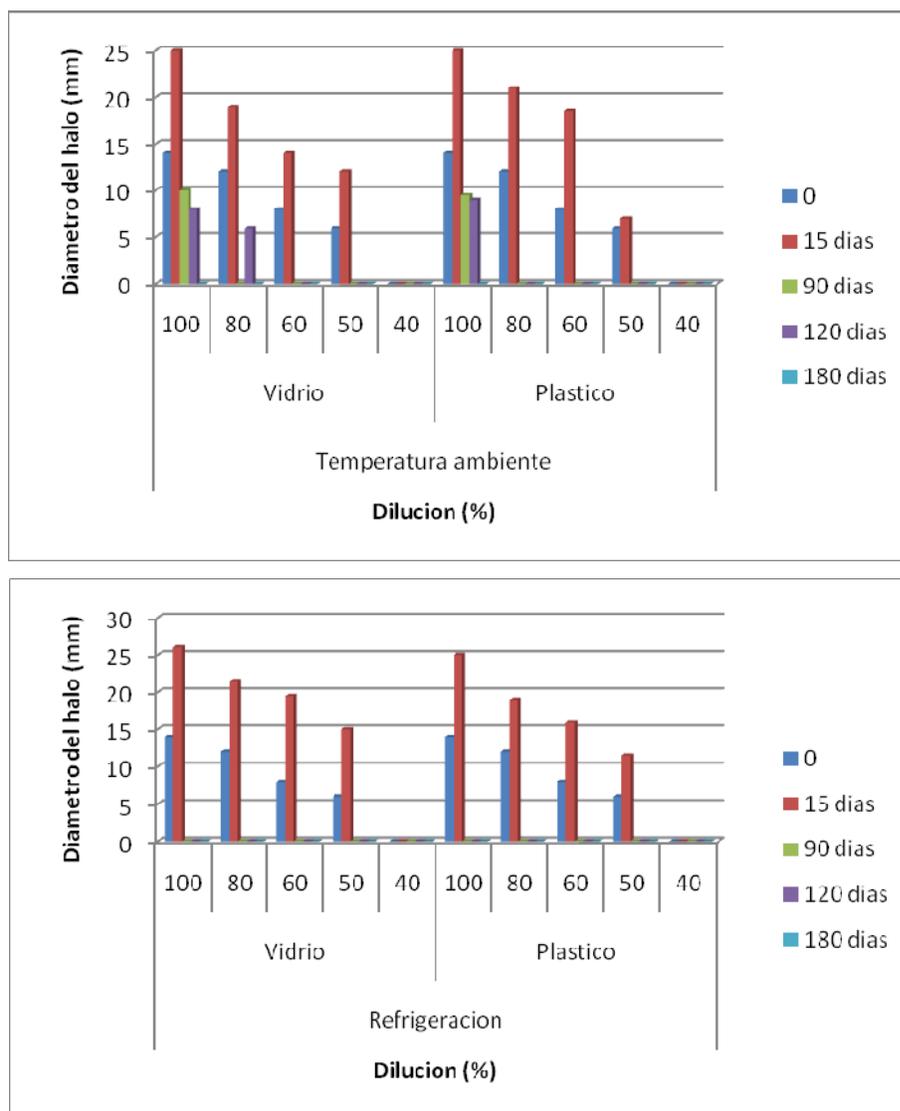


Figura 34: Variación del poder antimicrobiano ante CEPA 2 en el tiempo según condiciones de almacenamiento

Al momento del melado, ambas cepas mostraron frente a la muestra pura de miel halos de inhibición de aproximadamente 13 mm y diámetros menores según la dilución evaluada (Fig. 36)

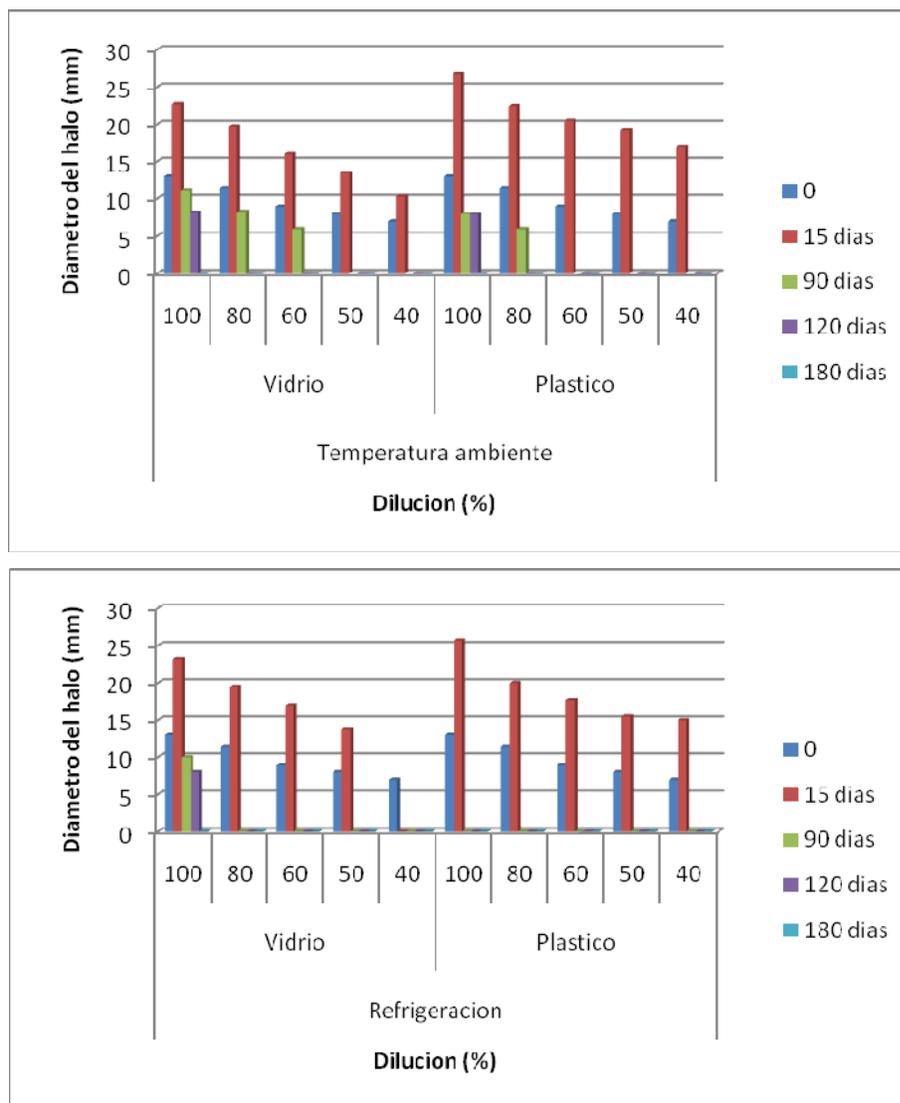


Figura 35: Variación del poder antimicrobiano ante CEPA 3 en el tiempo según condiciones de almacenamiento.

Esta variabilidad de la sensibilidad de las diferentes cepas a la acción de la miel ha sido documentada en diversos trabajos (Novak, 2008; Dallagnol, 2007; Miorin y Col., 2003). La temperatura de almacenamiento produjo diferencias significativas en el poder antimicrobiano de la miel solo frente a la CEPA2 para un nivel de significación del 95 % ( $p < 0,05$ ) (Fig. 37).

Para las condiciones ensayadas el tiempo fue el único factor que tuvo incidencia en el poder antimicrobiano para un nivel de significación del 95 % ( $p < 0,05$ ) frente a ambas cepas sensibles (Fig. 38 y 39).

A los 15 días de almacenamiento se observó un aumento de la capacidad inhibitoria de las mieles frente a las dos cepas sensibles, para todas las condiciones de almacenamiento. Este aumento de las propiedades antimicrobianas puede asociarse a la aparición de factores antimicrobianos que tengan relación con la disminución del pH y el aumento de la acidez de la miel según han sido descritos por varios investigadores (Perez-Perez y Col., 2007; Manrique y Col., 2008; Roderick, 2000; Bogdanov, 1997; Molan, 1992).



Figura 36: Imágenes de placas con halos de inhibición.

En los controles posteriores se observó un constante y rápido descenso de las propiedades antimicrobianas en todas las condiciones ensayadas. Las muestras conservadas en refrigeración presentaron escasos efectos inhibitorios ante las cepas ensayadas a partir de los 90 días de almacenamiento, mientras que las muestras almacenadas a temperatura ambiente mantuvieron su poder por un periodo mayor.

El mantenimiento del poder antimicrobiano en las muestras conservadas a temperatura ambiente refuerza la posición de la existencia de factores asociados a la fermentación de la miel que aportan al poder antimicrobiano de las mieles.

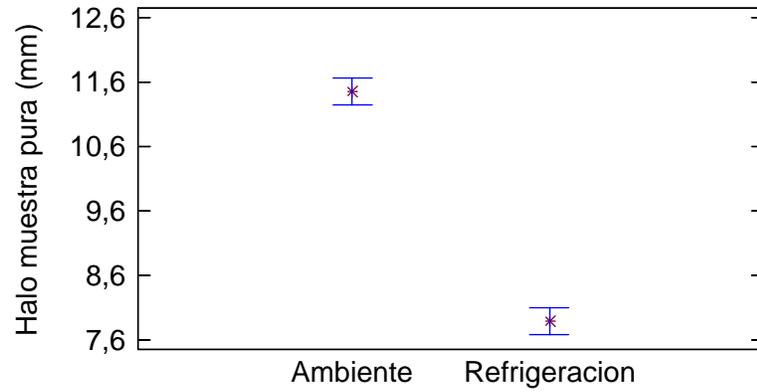


Figura 37: Medias e intervalo del 95 % LSD para halo muestra pura/temperatura de conservación para CEPA 2.

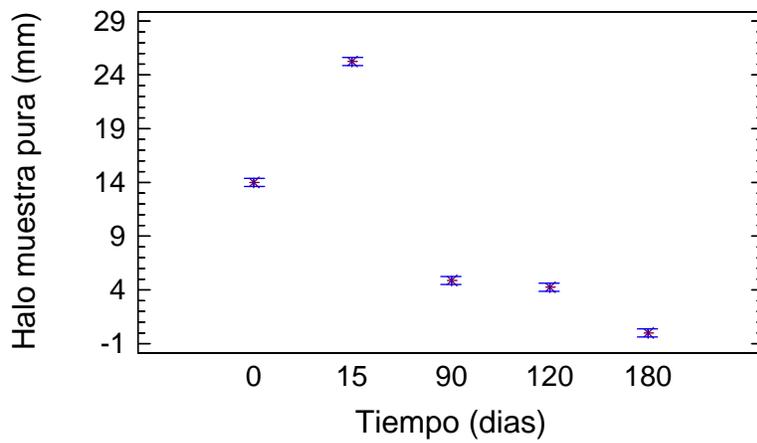


Figura 38: Medias e intervalo del 95 % LSD para halo muestra pura/tiempo (CEPA 2)

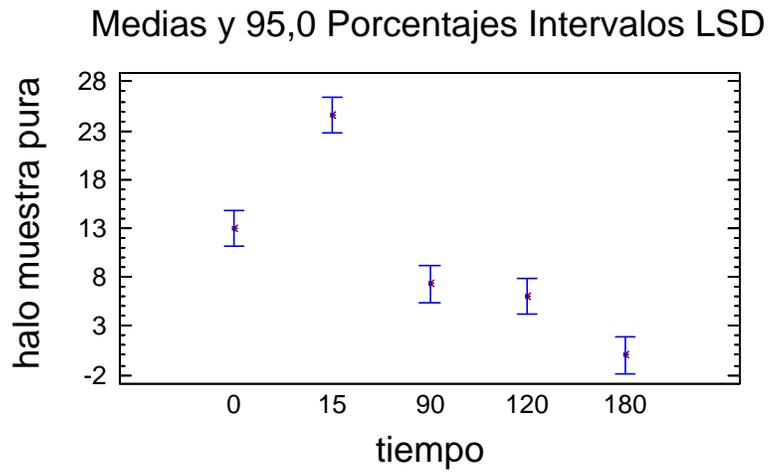


Figura 39: Medias e intervalo del 95 % LSD para halo muestra pura/tiempo (CEPA 3)

### III.3.-CONCLUSIONES

1. Los envases ensayados no mostraron diferencias para ninguno de los parámetros evaluados para un nivel de significación del 95 % hasta los 180 días de almacenamiento.

2. La mejor condición para el mantenimiento de las propiedades de la miel de Yateí es la refrigeración de la misma.

3. La miel de Yateí muestra su mayor capacidad inhibitoria a los 15 días de almacenamiento y con la utilización del producto puro, independientemente de las condiciones de temperatura. La conservación a temperatura ambiente permite mantener las propiedades antimicrobianas por un periodo mayor de tiempo.

4. La sensibilidad de los microorganismos a la miel de Yateí muestra un comportamiento variable según la cepa evaluada.

5. A fin de minimizar la contaminación del producto y reducir los recuentos microbianos es necesario mejorar el diseño de las colmenas y las metodologías de melado.

6. La utilización de estándares de calidad basados en miel de *Apis mellifera* determinan la imposibilidad, de las mieles de melipónidos, de cumplir con la normativa vigente en parámetros característicos como acidez libre y contenido de humedad. Es necesario adoptar recomendaciones internacionales para estándares en miel de melipónidos a fin de poder incluir este producto diferenciado en la normativa nacional y del Mercosur.

### III.4.- Referencias Bibliográficas

- Alnaqdy, A. (2005). Inhibition effect of honey on the adherence of Salmonella to intestinal epithelial cells in vitro. En: International Journal of Food Microbiology. 103, p. 347-351.
- De Almeida, D. (2002). Especies de abelha (Hymenoptera, Apoidea e tipificacao dos meis por elas produzidos e marea de cerrado do municio de Pirassununga, Estado de Sao Paulo, Piracicaba. Brasil. Proc. 8º Int, Conf. On Tropical bees and VI Encontro sobre Abelhas. p. 585.
- Almeida-Anacleto, D. (2007). Recursos Alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponeos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo. Tesis. Doutorado em entomologia. Escola Superior de Agricultura. Universidade de Sao Paulo.
- Alves, R.; Carvalho, C.; Souza, B. (2006) Espectro polínico de amostras de mel de Melipona mandacaia Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae). En: Acta Sci., Biol. Sci. 28, p. 65-70.
- Alves, R.; Carvalho, C.; Souza, B.; Sodré, G.; Marchini, L. (2005) Características físico-químicas de amostras de mel de Melipona mandacaia Smith (Hymenoptera: Apidae). En: Ciência e Tecnologia de Alimentos. 25, p. 644-650.
- Barth, M. (2004). Melissopalynology in Brasil, a review of polen análisis of Honey propolis and polen loads of bees. En: Sci. Agric. 61, p.342-350.
- Barth, M.; Maiorino, C.; Benatti, A.; Bastos, D. (2005). Determina o De Par metros Físico-Químicos E Da Origem Bot nica De Méis Indicados Monoflorais Do Sudeste Do Brasil. En: Ciencia y Tecnologia de los Alimentos. Campinas. Vol 25, N  2, p. 229 – 233.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997). Química de los Alimentos Ed. Acribia, p. 152-173; 923-955
- Benedetti, L.; Pieralli, L. (1990) .Apicultura.Ed. Omega. P. 90-91,150-154,305-309)

- Bogdanov, S.; Martin, P.; Lullmann, C. (1997). Harmonized methods of the European Honey Commission. En: *Apidologie*. 37, p.480-486.
- Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the Antibacterial Substances in honey. En: *Food Science and Technology*. Vol 30, p. 748 – 753.
- Camargo, J. y Menezes, P. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae); a mini-review: En: *Apidologie*. 23, p.509-522.
- Castro Vázquez, L.; Diaz Marotto, M.; Gonzalez Viñas, M.; De la Fuente, E.; Perez Coello, M.( 2008). Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, p. 1999 – 2006.
- Cavia, M.; Fernandez Muiño, M.; Gomez Alonso, E.; Montes Perez, M.; Huidobro, J.; Sancho, M. (2002). Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation.En: *Food Chemistry*. 78, p. 157-161.
- Cherchi, A. y Spaneda, L. (1994). Solid Phase extraction and high performance chromatographic determination of organic acids in Honey. En: *Journal of chromatography*. 669, p. 59-64.
- Chiari, W.; Attencia, V.; Toledo Fritzen, A.; Arnaut de Toledo, V.; Terada, Y.; Ruvolo- Takasusuku, M.; Buranelo Toral, F.; Paiva, G. (2002). Avaliacao de diferentes modelos de colmeias para abelhas jatai. (*Tetragonisca angustula Latreille, 1811*). En: *Acta Scientiarum*. Maringa v 24, n 4, p. 881-887.
- Codex Stan 12-1981
- Código Alimentario Argentino, Cap. X. Disponible en [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar) Capturado 06/2010.
- Código Alimentario Argentino. Tomo II. Metodología Analítica Oficial.
- Costa Neto, E. y Pacheco, J. (2005). Utilização medicinal de insetos no povado de Pedra Branca, Santa Teresina, Bahia, Brasil. En: *Biotemas*, 18 (1), p. 113 – 133.
- Crane, E. (1975). Honey. A comprehensive survey. En: *International Bee Research Asociation (IBRA)*. Ed. Heinemann. Londres. p. 439–488.

- Crane, E. (1985). El Libro de la miel. Marilus Coso Ed. Breviarios del Fondo de Cultura económica.
- Crane, E. (1992). The past and present status of beekeeping with stingless bees. En: Bee World. 73, p. 29-42.
- Da Silva Sodre, G.; Carvalho, C.; Fonseca, A.; Alvez, R.; Souza, B. (2008). Perfil sensorial e aceitabilidade de méis de abelhas sem ferrão submetidos a processos de conservação. En: Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Campinas. 28, p. 72-77.
- Dallagnol, A. (2007) Caracterización Comparativa De Las Propiedades Antimicrobianas y Calidad Microbiológica de la miel de Yateí. Informe Final. Posadas, Misiones. CEDIT.
- Dardon, M.; Enriquez, E. (2008). Caracterización físicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. En: Revista Interciencia. Vol 33, Nº 12, p. 916-922.
- De Almeida Souza, B.; Marchini, L.; Dos Santos Dias, C.; Od-Souza, M.; Lopez de Carvalho, C.; De Oliveira Alvez, R. (2009). Avaliacao microbiológica de amostras de mel de trigonineos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. En: Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Campinas. Vol 29, nº 4, p.798 – 802.
- Demera, J.; Angert, R. (2004). Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica”. En: Apidologie. 35, p. 411-417.
- Detroy, B. (1979). Elaboración, envase y distribución de la miel en la Apicultura de los Estados Unidos. S.E. Mc Gregor, editor.
- Ducruet, V.; Fournier, N.; Saillard, P.; Feigenbaum, A.; Guichard, E. (2001) Influence of packaging on the aroma stability of strawberry syrup durin shelf life. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, p. 2290-2297.
- Enriquez, E. y Dardon, M. (2006). Caracterización de la miel de melipónidos de distintas regiones biogeográficas de Guatemala. En: Resúmenes de Investigaciones Área Técnica. P. 3-8.

- Fangio, M.; Iurlina, M.; Fritz, R. (2007). Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. En: Revista Argentina de Microbiología. 39, p. 120-123.
- FAOSTAT DATABASE. 2004. Disponible en <http://faostat.fao.org/faostat/servlet>. Capturado 06/2010.
- Finola, M.; Lasagno, M.; Marioli, J. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. En: Food Chemistry .100, p. 1649 – 1653.
- Fonseca, A.; Sodré, G.; Lopes de Carvalho, C.; Oliveira Alves, R.; Almeida Souza, B.; Silva, M.; Oliveira, G.; Machado, C.; Clarton, L. (2006). Qualidade do mel de abelhas sem ferrão: uma proposta para boas práticas de fabricação. Serie Meliponicultura N° 05, p 70 .
- Gentry, C. (1982). La apicultura de pequeña escala. Manual. Edit. Pierce Corp. Barcelona. p.13-14.
- Godoy, F.; Feversani, S.; CEDIT. (2005). Miembros de la Asociación de Productores de Yateí de Misiones. Características y cría de las Yateí y otras meliponas. Disponible en [www.culturaapicola.com.ar](http://www.culturaapicola.com.ar). Capturado 06/2010.
- Gomez, R.; Cabezas, L. (1990). Determinación y cálculo de la actividad de agua en diferentes muestras de miel. En: Alimentaria. Marzo, p. 33-36.
- Guía de Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura. (2003). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Gobierno de la República Argentina. Disponible en [www.culturaapicola.com.ar](http://www.culturaapicola.com.ar). Capturado 06/2010.
- Heard, T. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. En: Annual Review of Entomologia. 44, p. 183-206.
- Heinemann, L.; Morse, R.; Hooper, T. (1985). The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping. E.P. Dutton, Inc, NY.
- Huidobro, J. y Simal, J. (1984), Parámetros de calidad de la miel, índice de diastasa, Offarm. 3, p. 705.
- Humbel, L. (2004). Apiterapia, una solución integral de la salud en un espíritu de desarrollo sostenible. En: Vida Apícola. 128, p. 14-15.
- ICMSF, (2001). Ecología microbiana de los Productos Alimentarios. Microorganismos de los Alimentos. Ed. Acribia SA. Zaragoza.

- ICSMF (2000) Microorganismos de los Alimentos. Su significado y Métodos de enumeración. Ed. Ed. Acribia, Zaragoza, España
- Iurlina, M. y Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. En: *Int. J. Food Microbiol.* 105,p. 297-304.
- Jay, J. (1992). *Modern Food Microbiology*, 4th edn. Van Nonstrand Reinhold. New York, New York.
- Karabournioti, S. y Zervalaki, P. (2001). Efecto del calentamiento en el HMF y la invertasa de la miel. En: *Apiacta.* 36 (4),p. 177-181.
- Kerr, W.; Carvalho, G.; Nascimento, V. (1996). *Abelha Urucu- biología, manejo e conservacao.* Belo Horizonte. Fundacao Acangau, (MG). p.143.
- Kerr, W. E. 1951 Estudos sobre a genética de populações de Himenopteros em geral e dos Apíneos sociais em particular. Tese para livre docência. En: *Anais Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.* 8, p.219-354.
- Kokubo, Y.; Jinbo, K.; Kaneko, S.; Matsumoto, M. (1984).” Prevalence of spore-forming bacteria in comercial honey. En: *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res Lab. Pub. Health.* 35, p. 192-196.
- Krause, A. y Krause, J. (1991). Changes in Chemicals composition of stored honeydew honey. En: *Acta Alimentaria Polinica.* Vol XVII, XLI, Nro. 2, p. 119-125.
- Manrique, A. y Santana, W. (2008). Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propoleos de abejas sin aguijon, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. De Brazil y Venezuela. En: *Zootecnia Tropical.* 26, p. 157-166.
- Michener, C. (2000). *The Bees of the World.* The Johns Hopkins University Press. Baltimore. Maryland. USA .p. 913.
- Midura, T.; Snowden, S.; Wood, R.; Arnon, S. (1979). Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. En: *Journal of Clinical Microbiology,* 9, p. 282-283.
- Miorin, P.; Levy Junior, N.; Custodio, A.; Bretz, W.; Marcucci, M. (2003).Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. En: *Journal of Applied Microbiology.* 95, p. 913-920.

- Molan, P. (1992). The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity. En: Bee World. 73, p. 5-28.
- Montes, A. (1966). Bromatologia. TOMO II. Editorial Universitaria. Buenos Aires. p. 250-258.
- Moraes, R.; Benevides, L.; Menezes, A. (1989). A desumidificação no mel no Brasil. En: Apicultura & Polinização. 13, p. 27-29.
- Moreira, R.; De Maria, C.; Pietrolungo, M.; Trugo, L. (2007). Chemical changes in the non- volatile fraction of Brailian honeys during storage under tropical conditions. En: Food Chemistry. 104, p. 1236-1241.
- Morse, R. y Hooper, T. (1992). Enciclopedia ilustrada de Apicultura. Editorial El Ateneo, p. 386.
- Moure, J. (1951) Notas sobre Meliponinae. Dusenya v.2 n.1 p.25-70.
- Nakano, H.; Okabe, T.; Hashimoto, H.; Sakaguchi, G. (1989). Incidence of clostridium botulinum in honey of various origins. En: J. Med. Sci. Biol. 43, p. 183-195.
- Nogueira Neto, P. (1997). Vida e Criacao de Abelhas Indigenas sem Ferrao. Editora Nogueirapis, p. 32-38.
- Nogueira-Neto, P. (1970). A Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão. Editora Tecnapis, São Paulo, p. 365.
- Novak, P. (2008). Propiedades Animicrobianas De Miel De Yateí (Tetragonisca Angustula Fiebrigi).Informe final, Posadas, Misiones CEDIT.
- Ojeda De Rodriguez, G.; Sulbaran de Ferrer, B.; Ferrer, A.; Rodriguez, B. (2004) .Characterization of honey produced in Venezuela. En: Food Chemistry. 84, p. 499 – 502 .
- Oliveira, E. (2005). Qualidade microbiológica do mel de tiuba (Melipona compressipes fasciculata) produzido no Estado do Maranhao. En: Higiene Alimentar. v. 19, n 133, p. 92-99.
- Perez-Perez, ;Rodriguez, M.; Vit, P. (2007). Efecto de la fermentación postcosecha en la capacidad antioxidante de miel de Tetragonisca angustula Latreille, 1811. En: Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Vol 11, N° 1,p. 14-20.

- Piana, M.; Poda, G.; Cesaroni, D.; Cuetti, L.; Bucci, M.; Gotti, P. (1991). Research on microbial characteristics of honey samples of Udine province. En: Riv. Soc. Ital. Sci Aliment. 20, p. 293-301.
- Pucciarelli, A.; Schapovaloff, M.; Kumritz, M.; Seňuk, A.; García, M.; Brumovsky, L. (2009). Caracterización Microbiológica y Fisicoquímica de miel de Yateí en la provincia de Misiones, En: III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina.
- Ramirez Cervantes, M.; Gonzalez Novelo, S.; Sauri Duch, E. (2000). Efecto del tratamiento térmico temporal de la miel sobre la variación de su calidad durante el almacenamiento. En: Apiacta. 35 (4), p. 162- 170.
- Roderick, W. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review". En: Food Chemistry. 71, p. 235-239.
- Root, A. (1983). ABC y XYZ of bee culture. A.I. Root Co. Medina.39, p. 712 .
- Rosa Carlos, A.; Marc, A.; Lachance, B.; Jana, O.; Silva, A.; Teixeira, A.; Marjorie, M.; Marini, A.; Yasmine, A.; Rogerio, P. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. En: FEMS Yeast Research. 4, p. 271-275.
- Saint- Eve, A. ; Levy, C. ; Le Moigne, M. ; Ducruet, V. ; Souchon, I. (2008). Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. En: Food Chemistry. 110, P. 285-293.
- Salamanca Grosso, G.; Henaó Rojas, C.; Moreno, G.; Luna, A. (2001). Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. Disponible en <http://www.cuencarural.com/granja/apicultura/79053>. Capturado en 06/2010.
- Sanz, S. y Gradillas, G. (1995). Fermentation, problem in Spanish North Coast Honey. En: Journal of food protection. (58),5,p. 515-518.
- Sanz, B. y Triguero, A. (1970) Composición química y espectro polínico de las mieles españolas. En: Anales de Bromatología XXII, p. 377-406.
- Schapovaloff, M. (2009). Calidad microbiológica de la miel de Yateí para su comercialización. Informe final. Posadas. Misiones. CEDIT.

- Serrano, B.; Villanueva, M.; Marquina, A. (1994a). La miel. Edulcorante natural I. Origen, clasificación y propiedades. En: Alimentaria. Junio, p. 25-28.
- Serrano, B.; Villanueva, M.; Marquina, A. (1994b). La miel. Edulcorante natural II. Composición, producción y legislación. En: Alimentaria. Junio, p. 29-35.
- Shafiur Rahman, M. (2003) Manual de Conservación de los Alimentos. Editorial Acribia. p. 727-779.
- Schepartz, A. y Subers, M. (1966). Catalase in honey. En: Journal of Apicultural Research. 5 (1), p. 37-43.
- Silveira, F.; Melo, R.; Almeida, B. (2002). Abelhas Brasileiras. En: Sistemática e Identificação, Belo Horizonte.p. 253 .
- Snowdon, J. y Cliver, D. (1996). Microorganisms in honey. En: International Journal of Food Microbiology. 31, p. 1-26.
- Souza, B., Roubik, D.; Barth, O.; Heard, T.; Enriquez, E.; Carvalho, C.; Villas Boas, J.; Marchini, L.; Locatelli, J.; Persano Odo, L.; Almeida Muradian, L.; Bogdanov, S.; Vit, P. ( 2006).Composition of stingless bee Honey : setting quality standards. En: Interciencia. Vol 31 N° 12, p. 867-875.
- Souza, B. (2006). Influencia do método de coleta sobre a qualidade microbiológica do mel da abelha urucú (*Melipona scutellaris*). En: Congreso Brasileiro de Apicultura, 16, Congreso Brasileiro de Meliponicultura, 2, Aracaju. Anais... Aracaju.
- Sugiyama, H.; Mills, D.; Kuo, L. (1978).Number of *Clostridium botulinum* spores in honey. En: Journal of Food Protect. 41, p. 848-850.
- Takenaka, L. y Echigo, T. (1974) .Changes in enzyme activity during storage of Honey. En: Bolletin of the Faculty of Agriculture. Tamogawa University, 14, p. 19-25.
- Teixeira, A.; Mariani, M.; Nicoli, J.; Antonini, Y.; Martins, R.; Lachance, M.; Rosa, C. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel Ascomycetous yeast species associated wiht stingless bees. En: International Journal Systematic and Evolution Microbiology. vol. 53, p. 339-343.
- Temaru, E.; Satoshi, S.; Kasuhiro, A.; Karasawa, T. (2007). Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). En: Polish Journal of Microbiology .Vol 56. N° 4, p. 281-285.

- Tisset, C. y Durand, D. (1973). On the survival of some gram negative, non-sporulated bacteria in commercial honey. En: Bull. Acad. Vet. Fr.46, p. 191 -196
- Tysset, C. y Rautlin de la Roy, Y. (1974) Assays on the study of osmophilic yeasts, organisms causing fermentation of honey collected in France. En: Ass. Diplom. Microbiol, Fac. Pharm. Univ. Nancy Bull. 134, p.1 – 26.
- Vit, P.; Bogdanov, S.; Kilchenman, V. (1994). Composition of Venezuelan honey from stingless bees (Apidae, Meliponinae) and *Apis mellifera*. En: Apidologie. 25, p. 278-288.
- Vit, P.; Medina, M.; Enríquez, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. En: Bee World 85(1), p. 2-5.
- Vit, P.; Persano, L.; Marano, M.; Salas de Mejias, E. (1998). Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. En: Apidologie. 29, p. 377-389.
- White, J. (1975). Composition of honey. En: *Crane, E (ed.) Honey A Comprehensive survey*, Heinemann Edition; London, p 157-239.
- White, J. (1978).En: *Advances in Food Research*. 24, p.287-374.
- White, J.; Riethof, M.; Subers, M.; Kushnir, H. (1962). Composition of American honeys. En: Techn. Bull. U.S. Dept. Agric. 1261.I
- White, J.; Kushnir, I.; Subors, M. (1964). En: *Food Technol*, 18, p.555.
- Ximénez, F. (1967). Historia Natural del Reino de Guatemala. Editorial "José de Pineda Ibarra". Guatemala. p.351 .

## ***CAPITULO IV***

#### IV- Trabajos Futuros

- En base a los resultados hallados es importante continuar con la evaluación de las variaciones de las propiedades de la miel de Yateí durante el almacenamiento, fundamentalmente en las primeras etapas del proceso donde se han evidenciado los cambios más significativos
- Es elemental evaluar la aplicabilidad de procesos tecnológicos como la pasteurización y la deshumidificación, y estandarizar los mismos, para lograr la estabilidad del producto a temperatura ambiente y permitir su comercialización de manera similar a la miel de *Apis*.
- Para optimizar las propiedades antimicrobianas es necesario estudiar su acción frente a microorganismos puntuales y con un objetivo claro de aplicabilidad del producto, ya que esta propiedad presenta amplia variabilidad según la cepa y la miel ensayadas.
- Es necesario estudiar diferentes modelos de colmenas y técnicas de melado a fin de relacionar la aplicabilidad de buenas prácticas de manufactura para obtener un producto en mejores condiciones sanitarias.

## ANEXO Nro 1. TABLAS DE ANOVA

### Tabla de Anova para aerobios mesófilos

Análisis de la Varianza para log UFC - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:envase	1,18734	1	1,18734	8,37	0,0080
B:temperatura	0,674141	1	0,674141	4,75	0,0393
C:tiempo	25,3123	4	6,32808	44,59	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0983181	1	0,0983181	0,69	0,4134
AC	1,05035	4	0,262587	1,85	0,1521
BC	0,323197	4	0,0807992	0,57	0,6873
RESIDUOS	3,40588	24	0,141912		
TOTAL (CORREGIDO)	32,0515	39			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Tabla de Anova para recuento de mohos

Análisis de la Varianza para UFC hongos - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:envase	368832,0	1	368832,0	0,21	0,6501
B:temperatura	541260,0	1	541260,0	0,31	0,5830
C:tiempo	8,06977E8	4	2,01744E8	115,44	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2,05617E6	1	2,05617E6	1,18	0,2888
AC	278753,0	4	69688,3	0,04	0,9968
BC	2,1473E6	4	536825,0	0,31	0,8703
RESIDUOS	4,19415E7	24	1,74756E6		
TOTAL (CORREGIDO)	8,5431E8	39			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Tabla de Anova para acidez

Análisis de la Varianza para acidez - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:envase	68,45	1	68,45	1,03	0,3139
B:temperatura	154089,0	1	154089,0	2318,99	0,0000
C:tiempo	102913,0	4	25728,3	387,20	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	610,512	1	610,512	9,19	0,0035
AC	134,519	4	33,6297	0,51	0,7314
BC	50054,0	4	12513,5	188,32	0,0000
RESIDUOS	4252,58	64	66,4466		
TOTAL (CORREGIDO)	312122,0	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## Tabla de Anova para HMF

Análisis de la Varianza paraHMF - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Envase	1,0534	1	1,0534	0,10	0,7578
B:Temperatura	186,111	1	186,111	16,95	0,0001
C:Tiempo	1615,52	4	403,881	36,78	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,09952	1	2,09952	0,19	0,6634
AC	144,495	4	36,1239	3,29	0,0163
BC	353,175	4	88,2936	8,04	0,0000
RESIDUOS	702,7	64	10,9797		
TOTAL (CORREGIDO)	3005,16	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## Tabla de Anova para humedad

Análisis de la Varianza parahumedad - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:envase	0,0588613	1	0,0588613	1,05	0,3096
B:temperatura	1,82106	1	1,82106	32,45	0,0000
C:tiempo	1,74451	4	0,436127	7,77	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0234612	1	0,0234612	0,42	0,5202
AC	0,0656575	4	0,0164144	0,29	0,8818
BC	1,57691	4	0,394227	7,02	0,0001
RESIDUOS	3,59183	64	0,0561224		
TOTAL (CORREGIDO)	8,88229	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## Tabla de Anova para pH

Análisis de la Varianza parapH - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:envase	0,0535613	1	0,0535613	2,64	0,1092
B:temperatura	1,64451	1	1,64451	81,04	0,0000
C:tiempo	3,42103	4	0,855258	42,15	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00010125	1	0,00010125	0,00	0,9439
AC	0,121933	4	0,0304831	1,50	0,2121
BC	0,492507	4	0,123127	6,07	0,0003
RESIDUOS	1,29874	64	0,0202929		
TOTAL (CORREGIDO)	7,03239	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## Tabla de Anova para diastasa

Análisis de la Varianza paradiastasa - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:envase	25,6625	1	25,6625	3,30	0,0739
B:temperatura	9645,05	1	9645,05	1241,17	0,0000
C:tiempo	10885,1	4	2721,29	350,19	0,0000
INTERACCIONES					
AB	6,25521	1	6,25521	0,80	0,3730
AC	25,7091	4	6,42727	0,83	0,5128
BC	6550,58	4	1637,65	210,74	0,0000
RESIDUOS	497,339	64	7,77092		
TOTAL (CORREGIDO)	27635,7	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## Tabla de Anova para poder antimicrobiano ante Cepa 2

Análisis de la Varianza parahalo muestra pura - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:temperatura	63,0125	1	63,0125	560,11	0,0000
B:tiempo	1629,45	4	407,363	3621,00	0,0000
C:envase	0,0125	1	0,0125	0,11	0,7556
INTERACCIONES					
AB	104,55	4	26,1375	232,33	0,0001
AC	0,1125	1	0,1125	1,00	0,3739
BC	0,55	4	0,1375	1,22	0,4252
RESIDUOS	0,45	4	0,1125		
TOTAL (CORREGIDO)	1798,14	19			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## Tabla de Anova para poder antimicrobiano ante Cepa 3

Análisis de la Varianza parahalo muestra pura - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:envase	11,1751	1	11,1751	3,10	0,1531
B:temperatura	16,1101	1	16,1101	4,47	0,1020
C:tiempo	1378,05	4	344,512	95,59	0,0003
INTERACCIONES					
AB	12,8801	1	12,8801	3,57	0,1317
AC	59,5955	4	14,8989	4,13	0,0990
BC	21,9355	4	5,48387	1,52	0,3471
RESIDUOS	14,4155	4	3,60388		
TOTAL (CORREGIDO)	1514,16	19			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

## ANEXO Nro 2. DATOS DE MEDICIONES DE VARIABLES

### 2.a. Datos para acidez

tiempo	temperatura	envase	acidez
0	Ambiente	Vidrio	42,5
0	Ambiente	Vidrio	42,5
0	Ambiente	Vidrio	42,5
0	Ambiente	Vidrio	42,5
0	Ambiente	Plastico	42,5
0	Ambiente	Plastico	42,5
0	Ambiente	Plastico	42,5
0	Ambiente	Plastico	42,5
0	Refrigeracion	Vidrio	42,5
0	Refrigeracion	Vidrio	42,5
0	Refrigeracion	Vidrio	42,5
0	Refrigeracion	Vidrio	42,5
0	Refrigeracion	Plastico	42,5
0	Refrigeracion	Plastico	42,5
0	Refrigeracion	Plastico	42,5
0	Refrigeracion	Plastico	42,5
15	Ambiente	Vidrio	122,5
15	Ambiente	Vidrio	115
15	Ambiente	Vidrio	120
15	Ambiente	Vidrio	122,5
15	Ambiente	Plastico	127,5
15	Ambiente	Plastico	120
15	Ambiente	Plastico	115
15	Ambiente	Plastico	120
15	Refrigeracion	Vidrio	55
15	Refrigeracion	Vidrio	55
15	Refrigeracion	Vidrio	57,5
15	Refrigeracion	Vidrio	55
15	Refrigeracion	Plastico	60
15	Refrigeracion	Plastico	55
15	Refrigeracion	Plastico	57,5
15	Refrigeracion	Plastico	60
90	Ambiente	Vidrio	180
90	Ambiente	Vidrio	185
90	Ambiente	Vidrio	190
90	Ambiente	Vidrio	200
90	Ambiente	Plastico	185
90	Ambiente	Plastico	185
90	Ambiente	Plastico	190
90	Ambiente	Plastico	185

90	RefrigeracionVidrio	75
90	RefrigeracionVidrio	75
90	RefrigeracionVidrio	55
90	RefrigeracionVidrio	60
90	RefrigeracionPlastico	62,5
90	RefrigeracionPlastico	57,5
90	RefrigeracionPlastico	60
90	RefrigeracionPlastico	65
120	Ambiente Vidrio	190
120	Ambiente Vidrio	190
120	Ambiente Vidrio	200
120	Ambiente Vidrio	200
120	Ambiente Plastico	200
120	Ambiente Plastico	210
120	Ambiente Plastico	160
120	Ambiente Plastico	165
120	RefrigeracionVidrio	65,5
120	RefrigeracionVidrio	60
120	RefrigeracionVidrio	60
120	RefrigeracionVidrio	65,5
120	RefrigeracionPlastico	70
120	RefrigeracionPlastico	70
120	RefrigeracionPlastico	70
120	RefrigeracionPlastico	75
180	Ambiente Vidrio	210
180	Ambiente Vidrio	210
180	Ambiente Vidrio	225
180	Ambiente Vidrio	225
180	Ambiente Plastico	195
180	Ambiente Plastico	185
180	Ambiente Plastico	195
180	Ambiente Plastico	200
180	RefrigeracionVidrio	75
180	RefrigeracionVidrio	70
180	RefrigeracionVidrio	70
180	RefrigeracionVidrio	65,5
180	RefrigeracionPlastico	85
180	RefrigeracionPlastico	80
180	RefrigeracionPlastico	80
180	RefrigeracionPlastico	85

## 2.b. Datos para HMF

Tiempo	Temperatura	Envase	HMF
0	Ambiente	Vidrio	3,7
0	Ambiente	Vidrio	3,7
0	Ambiente	Vidrio	3,7
0	Ambiente	Vidrio	3,7
0	Ambiente	Plastico	3,7
0	Ambiente	Plastico	3,7
0	Ambiente	Plastico	3,7
0	Ambiente	Plastico	3,7
0	Refrigeracion	Vidrio	3,7
0	Refrigeracion	Vidrio	3,7
0	Refrigeracion	Vidrio	3,7
0	Refrigeracion	Vidrio	3,7
0	Refrigeracion	Plastico	3,7
0	Refrigeracion	Plastico	3,7
0	Refrigeracion	Plastico	3,7
0	Refrigeracion	Plastico	3,7
15	Ambiente	Vidrio	5,9
15	Ambiente	Vidrio	13,4
15	Ambiente	Vidrio	5,7
15	Ambiente	Vidrio	13,7
15	Ambiente	Plastico	11,3
15	Ambiente	Plastico	5,6
15	Ambiente	Plastico	2,2
15	Ambiente	Plastico	5,2
15	Refrigeracion	Vidrio	0,7
15	Refrigeracion	Vidrio	2,9
15	Refrigeracion	Vidrio	14,3
15	Refrigeracion	Vidrio	9,7
15	Refrigeracion	Plastico	3,7
15	Refrigeracion	Plastico	1,5
15	Refrigeracion	Plastico	5,2
15	Refrigeracion	Plastico	9,4
90	Ambiente	Vidrio	5,4
90	Ambiente	Vidrio	13,47
90	Ambiente	Vidrio	13,4
90	Ambiente	Vidrio	13,6
90	Ambiente	Plastico	10,8
90	Ambiente	Plastico	6,3
90	Ambiente	Plastico	6,7
90	Ambiente	Plastico	0,7
90	Refrigeracion	Vidrio	2,3

90	RefrigeracionVidrio	6,4
90	RefrigeracionVidrio	15,8
90	RefrigeracionVidrio	8,1
90	RefrigeracionPlastico	3,8
90	RefrigeracionPlastico	5,9
90	RefrigeracionPlastico	5,9
90	RefrigeracionPlastico	8,6
120	Ambiente Vidrio	5,67
120	Ambiente Vidrio	9,88
120	Ambiente Vidrio	8,36
120	Ambiente Vidrio	12,4
120	Ambiente Plastico	13,2
120	Ambiente Plastico	11,3
120	Ambiente Plastico	6,87
120	Ambiente Plastico	9,64
120	RefrigeracionVidrio	7,5
120	RefrigeracionVidrio	11,3
120	RefrigeracionVidrio	5,12
120	RefrigeracionVidrio	7,3
120	RefrigeracionPlastico	7,88
120	RefrigeracionPlastico	12,3
120	RefrigeracionPlastico	10,4
120	RefrigeracionPlastico	13,2
180	Ambiente Vidrio	24,2
180	Ambiente Vidrio	19,8
180	Ambiente Vidrio	15,3
180	Ambiente Vidrio	22,1
180	Ambiente Plastico	23,8
180	Ambiente Plastico	31,2
180	Ambiente Plastico	19,3
180	Ambiente Plastico	27,1
180	RefrigeracionVidrio	10,1
180	RefrigeracionVidrio	12,2
180	RefrigeracionVidrio	9,77
180	RefrigeracionVidrio	11,3
180	RefrigeracionPlastico	12,1
180	RefrigeracionPlastico	13,5
180	RefrigeracionPlastico	10,1
180	RefrigeracionPlastico	13,2

## 2.c. Datos para humedad

tiempo	temperatura	envase	humedad
0	Ambiente	Vidrio	26,03
0	Ambiente	Vidrio	26,03
0	Ambiente	Vidrio	26,03
0	Ambiente	Vidrio	26,03
0	Ambiente	Plastico	26,03
0	Ambiente	Plastico	26,03
0	Ambiente	Plastico	26,03
0	Ambiente	Plastico	26,03
0	Refrigeracion	Vidrio	26,03
0	Refrigeracion	Vidrio	26,03
0	Refrigeracion	Vidrio	26,03
0	Refrigeracion	Vidrio	26,03
0	Refrigeracion	Plastico	26,03
0	Refrigeracion	Plastico	26,03
0	Refrigeracion	Plastico	26,03
0	Refrigeracion	Plastico	26,03
15	Ambiente	Vidrio	25,93
15	Ambiente	Vidrio	26,13
15	Ambiente	Vidrio	26,13
15	Ambiente	Vidrio	26,33
15	Ambiente	Plastico	25,73
15	Ambiente	Plastico	25,93
15	Ambiente	Plastico	26,13
15	Ambiente	Plastico	26,13
15	Refrigeracion	Vidrio	25,93
15	Refrigeracion	Vidrio	25,73
15	Refrigeracion	Vidrio	25,93
15	Refrigeracion	Vidrio	25,93
15	Refrigeracion	Plastico	25,73
15	Refrigeracion	Plastico	26,13
15	Refrigeracion	Plastico	26,13
15	Refrigeracion	Plastico	25,93
90	Ambiente	Vidrio	26,33
90	Ambiente	Vidrio	26,52
90	Ambiente	Vidrio	26,52
90	Ambiente	Vidrio	26,72
90	Ambiente	Plastico	26,52
90	Ambiente	Plastico	26,72
90	Ambiente	Plastico	27,71
90	Ambiente	Plastico	26,33

90	RefrigeracionVidrio	25,73
90	RefrigeracionVidrio	25,93
90	RefrigeracionVidrio	26,13
90	RefrigeracionVidrio	26,13
90	RefrigeracionPlastico	25,73
90	RefrigeracionPlastico	25,73
90	RefrigeracionPlastico	26,13
90	RefrigeracionPlastico	25,93
120	Ambiente Vidrio	26,52
120	Ambiente Vidrio	26,72
120	Ambiente Vidrio	26,33
120	Ambiente Vidrio	26,33
120	Ambiente Plastico	26,72
120	Ambiente Plastico	26,72
120	Ambiente Plastico	26,33
120	Ambiente Plastico	26,72
120	RefrigeracionVidrio	25,93
120	RefrigeracionVidrio	26,13
120	RefrigeracionVidrio	25,73
120	RefrigeracionVidrio	26,13
120	RefrigeracionPlastico	25,93
180	Ambiente Vidrio	26,72
180	Ambiente Vidrio	26,33
180	Ambiente Vidrio	25,93
180	Ambiente Vidrio	26,33
180	Ambiente Plastico	26,13
180	Ambiente Plastico	26,72
180	Ambiente Plastico	26,72
180	Ambiente Plastico	26,33
180	RefrigeracionVidrio	25,93
180	RefrigeracionVidrio	26,13
180	RefrigeracionVidrio	26,72
180	RefrigeracionVidrio	26,33
180	RefrigeracionPlastico	25,93
180	RefrigeracionPlastico	26,33
180	RefrigeracionPlastico	26,13
180	RefrigeracionPlastico	26,72

## 2.d. Datos para actividad diastásica

tiempo	temperatura	envase	diastasa
0	Ambiente	Vidrio	42,7
0	Ambiente	Vidrio	42,7
0	Ambiente	Vidrio	42,7
0	Ambiente	Vidrio	42,7
0	Ambiente	Plastico	42,7
0	Ambiente	Plastico	42,7
0	Ambiente	Plastico	42,7
0	Ambiente	Plastico	42,7
0	Refrigeracion	Vidrio	42,7
0	Refrigeracion	Vidrio	42,7
0	Refrigeracion	Vidrio	42,7
0	Refrigeracion	Vidrio	42,7
0	Refrigeracion	Plastico	42,7
0	Refrigeracion	Plastico	42,7
0	Refrigeracion	Plastico	42,7
0	Refrigeracion	Plastico	42,7
15	Ambiente	Vidrio	41,1
15	Ambiente	Vidrio	35,69
15	Ambiente	Vidrio	30,75
15	Ambiente	Vidrio	33,4
15	Ambiente	Plastico	36,48
15	Ambiente	Plastico	28,4
15	Ambiente	Plastico	29,63
15	Ambiente	Plastico	34,96
15	Refrigeracion	Vidrio	39,09
15	Refrigeracion	Vidrio	43,85
15	Refrigeracion	Vidrio	42,46
15	Refrigeracion	Vidrio	33,64
15	Refrigeracion	Plastico	41,51
15	Refrigeracion	Plastico	38,56
15	Refrigeracion	Plastico	36,79
15	Refrigeracion	Plastico	31,33
90	Ambiente	Vidrio	0
90	Ambiente	Vidrio	0
90	Ambiente	Vidrio	0
90	Ambiente	Vidrio	0
90	Ambiente	Plastico	0
90	Ambiente	Plastico	0
90	Ambiente	Plastico	0
90	Ambiente	Plastico	0
90	Refrigeracion	Vidrio	41,39

90	RefrigeracionVidrio	44,78
90	RefrigeracionVidrio	39,17
90	RefrigeracionVidrio	46
90	RefrigeracionPlastico	44
90	RefrigeracionPlastico	39,71
90	RefrigeracionPlastico	42,59
90	RefrigeracionPlastico	43,4
120	Ambiente Vidrio	0
120	Ambiente Plastico	0
120	RefrigeracionVidrio	45
120	RefrigeracionVidrio	48
120	RefrigeracionVidrio	38,05
120	RefrigeracionVidrio	41
120	RefrigeracionPlastico	42,3
120	RefrigeracionPlastico	45
120	RefrigeracionPlastico	39,9
120	RefrigeracionPlastico	41
180	Ambiente Vidrio	0
180	Ambiente Plastico	0
180	RefrigeracionVidrio	25,3
180	RefrigeracionVidrio	22,1
180	RefrigeracionVidrio	16,2
180	RefrigeracionVidrio	25,3
180	RefrigeracionPlastico	12,9
180	RefrigeracionPlastico	22,6
180	RefrigeracionPlastico	22,8
180	RefrigeracionPlastico	13,1

## 2.e. Datos de pH

tiempo	temperatura	envase	pH
0	Ambiente	Vidrio	4,02
0	Ambiente	Vidrio	4,02
0	Ambiente	Vidrio	4,02
0	Ambiente	Vidrio	4,02
0	Ambiente	Plastico	4,02
0	Ambiente	Plastico	4,02
0	Ambiente	Plastico	4,02
0	Ambiente	Plastico	4,02
0	Refrigeracion	Vidrio	4,02
0	Refrigeracion	Vidrio	4,02
0	Refrigeracion	Vidrio	4,02
0	Refrigeracion	Vidrio	4,02
0	Refrigeracion	Plastico	4,02
0	Refrigeracion	Plastico	4,02
0	Refrigeracion	Plastico	4,02
0	Refrigeracion	Plastico	4,02
15	Ambiente	Vidrio	3,51
15	Ambiente	Vidrio	3,3
15	Ambiente	Vidrio	3,33
15	Ambiente	Vidrio	3,31
15	Ambiente	Plastico	3,25
15	Ambiente	Plastico	3,35
15	Ambiente	Plastico	3,28
15	Ambiente	Plastico	3,32
15	Refrigeracion	Vidrio	3,66
15	Refrigeracion	Vidrio	3,62
15	Refrigeracion	Vidrio	3,64
15	Refrigeracion	Vidrio	3,7
15	Refrigeracion	Plastico	3,59
15	Refrigeracion	Plastico	3,61
15	Refrigeracion	Plastico	3,48
15	Refrigeracion	Plastico	3,58
90	Ambiente	Vidrio	3,27
90	Ambiente	Vidrio	3,26
90	Ambiente	Vidrio	3,34
90	Ambiente	Vidrio	3,28
90	Ambiente	Plastico	3,29
90	Ambiente	Plastico	3,71
90	Ambiente	Plastico	3,29
90	Ambiente	Plastico	3,35
90	Refrigeracion	Vidrio	3,7

90	RefrigeracionVidrio	3,98
90	RefrigeracionVidrio	3,72
90	RefrigeracionVidrio	4,01
90	RefrigeracionPlastico	3,54
90	RefrigeracionPlastico	4,11
90	RefrigeracionPlastico	3,55
90	RefrigeracionPlastico	3,97
120	Ambiente Vidrio	3,28
120	Ambiente Vidrio	3,56
120	Ambiente Vidrio	3,98
120	Ambiente Vidrio	3,75
120	Ambiente Plastico	3,21
120	Ambiente Plastico	3,42
120	Ambiente Plastico	3,65
120	Ambiente Plastico	3,9
120	RefrigeracionVidrio	3,8
120	RefrigeracionVidrio	4,08
120	RefrigeracionVidrio	3,75
120	RefrigeracionVidrio	3,98
120	RefrigeracionPlastico	4,01
120	RefrigeracionPlastico	4,12
120	RefrigeracionPlastico	3,68
120	RefrigeracionPlastico	4,01
180	Ambiente Vidrio	3,48
180	Ambiente Vidrio	3,38
180	Ambiente Vidrio	3,46
180	Ambiente Vidrio	3,37
180	Ambiente Plastico	3,19
180	Ambiente Plastico	3,21
180	Ambiente Plastico	3,17
180	Ambiente Plastico	3,19
180	RefrigeracionVidrio	3,69
180	RefrigeracionVidrio	3,7
180	RefrigeracionVidrio	3,75
180	RefrigeracionVidrio	3,77
180	RefrigeracionPlastico	3,58
180	RefrigeracionPlastico	3,57
180	RefrigeracionPlastico	3,57
180	RefrigeracionPlastico	3,59

## 2.f. Datos para recuento de mesófilos aerobios

tiempo	temperatura	envase	log UFC
0	Ambiente	Vidrio	3,556302501
0	Ambiente	Vidrio	3,556302501
0	Ambiente	Plastico	3,556302501
0	Ambiente	Plastico	3,556302501
0	Refrigeracion	Vidrio	3,556302501
0	Refrigeracion	Vidrio	3,556302501
0	Refrigeracion	Plastico	3,556302501
0	Refrigeracion	Plastico	3,556302501
15	Ambiente	Vidrio	3
15	Ambiente	Vidrio	4,522078907
15	Ambiente	Plastico	2,653212514
15	Ambiente	Plastico	2,861534411
15	Refrigeracion	Vidrio	3,213783299
15	Refrigeracion	Vidrio	4,339709755
15	Refrigeracion	Plastico	2,912753304
15	Refrigeracion	Plastico	2,979548375
90	Ambiente	Vidrio	4,122936373
90	Ambiente	Vidrio	3,01911629
90	Ambiente	Plastico	3,329601248
90	Ambiente	Plastico	2,912753304
90	Refrigeracion	Vidrio	4,084075568
90	Refrigeracion	Vidrio	3,657533888
90	Refrigeracion	Plastico	3,931712067
90	Refrigeracion	Plastico	3,544068044
120	Ambiente	Vidrio	1,954242509
120	Ambiente	Vidrio	2,247973266
120	Ambiente	Plastico	1,255272505
120	Ambiente	Plastico	1,556302501
120	Refrigeracion	Vidrio	2,053078443
120	Refrigeracion	Vidrio	2,247973266
120	Refrigeracion	Plastico	2,103803721
120	Refrigeracion	Plastico	1,86332286
180	Ambiente	Vidrio	1,204119983
180	Ambiente	Vidrio	2,096910013
180	Ambiente	Plastico	1,397940009
180	Ambiente	Plastico	1,763427994
180	Refrigeracion	Vidrio	2
180	Refrigeracion	Vidrio	2,176091259
180	Refrigeracion	Plastico	2,033423755
180	Refrigeracion	Plastico	1,949390007

## 2.g. Datos para recuento de mohos y levaduras

tiempo	temperatura	envase	log UFC
0	Ambiente	Vidrio	4,079181246
0	Ambiente	Vidrio	4,079181246
0	Ambiente	Plastico	4,079181246
0	Ambiente	Plastico	4,079181246
0	Refrigeracion	Vidrio	4,079181246
0	Refrigeracion	Vidrio	4,079181246
0	Refrigeracion	Plastico	4,079181246
0	Refrigeracion	Plastico	4,079181246
15	Ambiente	Vidrio	3,838849091
15	Ambiente	Vidrio	3,176091259
15	Ambiente	Plastico	3,787885351
15	Ambiente	Plastico	3
15	Refrigeracion	Vidrio	3,151063253
15	Refrigeracion	Vidrio	3,581835924
15	Refrigeracion	Plastico	3,496376054
15	Refrigeracion	Plastico	3,413299764
90	Ambiente	Vidrio	3,560623875
90	Ambiente	Vidrio	0
90	Ambiente	Plastico	0
90	Ambiente	Plastico	0
90	Refrigeracion	Vidrio	0
90	Refrigeracion	Vidrio	3,06669855
90	Refrigeracion	Plastico	3,282395505
90	Refrigeracion	Plastico	3,034628457
120	Ambiente	Vidrio	3,151063253
120	Ambiente	Vidrio	0
120	Ambiente	Plastico	0
120	Ambiente	Plastico	0
120	Refrigeracion	Vidrio	0
120	Refrigeracion	Vidrio	2,488550717
120	Refrigeracion	Plastico	2,602059991
120	Refrigeracion	Plastico	2,243038049
180	Ambiente	Vidrio	2,152288344
180	Ambiente	Vidrio	0
180	Ambiente	Plastico	0
180	Ambiente	Plastico	0
180	Refrigeracion	Vidrio	0
180	Refrigeracion	Vidrio	1,397940009
180	Refrigeracion	Plastico	1,62324929
180	Refrigeracion	Plastico	0,903089987

## 2.h. Datos para poder antimicrobiano frente a Cepa 2

tiempo	temperatura	envase	halo muestra pura
0	Ambiente	Vidrio	14
0	Ambiente	Plastico	14
0	Refrigeracion	Vidrio	14
0	Refrigeracion	Plastico	14
15	Ambiente	Vidrio	25
15	Ambiente	Plastico	25
15	Refrigeracion	Vidrio	26
15	Refrigeracion	Plastico	25
90	Ambiente	Vidrio	10
90	Ambiente	Plastico	9,5
90	Refrigeracion	Vidrio	0
90	Refrigeracion	Plastico	0
120	Ambiente	Vidrio	8
120	Ambiente	Plastico	9
120	Refrigeracion	Vidrio	0
120	Refrigeracion	Plastico	0
180	Ambiente	Vidrio	0
180	Ambiente	Plastico	0
180	Refrigeracion	Vidrio	0
180	Refrigeracion	Plastico	0

## 2.h.Datos para poder antimicrobiano frente a Cepa 3

tiempo	temperatura	envase	halo muestra pura
0	Ambiente	Vidrio	13
0	Ambiente	Plastico	13
0	Refrigeracion	Vidrio	13
0	Refrigeracion	Plastico	13
15	Ambiente	Vidrio	22,75
15	Ambiente	Plastico	26,7
15	Refrigeracion	Vidrio	23,2
15	Refrigeracion	Plastico	25,7
90	Ambiente	Vidrio	11,2
90	Ambiente	Plastico	8
90	Refrigeracion	Vidrio	10
90	Refrigeracion	Plastico	0
120	Ambiente	Vidrio	8,2
120	Ambiente	Plastico	8
120	Refrigeracion	Vidrio	8
120	Refrigeracion	Plastico	0
180	Ambiente	Vidrio	0
180	Ambiente	Plastico	0
180	Refrigeracion	Vidrio	0
180	Refrigeracion	Plastico	0