



Facultad de Ciencias Veterinarias

-UNCPBA-

**Desarrollo de un producto a base de miel con
agregado de propóleos.**

Álvarez Barragán Yamila; Trama Andrea; Tabera Anahí.

Octubre, 2017

Tandil

Desarrollo de un producto a base de miel con agregado de propóleos.

Tesis de la Carrera de Licenciatura en Tecnología de los Alimentos, presentada como parte de los requisitos para optar al título de grado de Licenciado del estudiante Álvarez Barragán Yamila Soledad.

Director: **Medica Veterinaria Tabera Anahí.**

Codirector: **Licenciada en Tecnología de los Alimentos, Trama Andrea.**

Evaluador: **Médica Veterinaria, Libonatti Carina.**

AGRADECIMIENTOS:

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por formarme como profesional.

A mi directora de tesis Anahí Tabera por la paciencia, dedicación, apoyo, colaboración y generosidad.

A La empresa que me permitió realizar la residencia en su establecimiento y me recibió con gran amabilidad, brindándome las herramientas para llevar a cabo este trabajo; en especial a mi codirectora Andrea Trama por su confianza y compromiso con el mismo.

A Josefina Blanco por el apoyo brindado dentro de la fábrica.

A mi familia y amigos que fueron un pilar importante a lo largo de mi carrera acompañándome en todo momento para que pueda finalizar mis estudios.

A mi hijo Joaquín por ser el motor que día a día me permitió crecer y me motivó a concluir esta etapa.

RESUMEN:

A nivel mundial se ha producido un cambio importante en los hábitos de alimentación, orientándose hacia el consumo de alimentos sanos y apuntando a comercializar productos elaborados, con un mayor valor agregado y diferenciación. Los productos apícolas entran dentro de esta tendencia, por este motivo el presente trabajo busca darle un valor agregado a la miel con la adición del propóleo en forma de extracto y obtener un producto nutracéutico acentuándose en las propiedades nutricionales y terapéuticas tanto de la miel como del propóleo. Para ello se tomaron 7 muestras de miel cruda de una planta fraccionadora de miel y se evaluó su calidad físico-química, microbiológica y capacidad antimicrobiana. De estas muestras solo dos se usaron para formular el producto ya que cumplían con lo requerido por el CAA y presentaron halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*. El extracto de propóleo evidenció una buena calidad microbiológica, físico-química y presentó capacidad antimicrobiana. Para formular el producto se calentó la miel a una temperatura de 78°C durante unos segundos logrando así retrasar su cristalización y haciendo posible la combinación con el extracto de propóleo, luego se probaron dos concentraciones diferentes de este extracto (2% y 10%) para finalmente ser elegida a partir de las características sensoriales la concentración con el 2% de extracto. Esta etapa de elección fue realizada en la fábrica, con los profesionales a cargo del desarrollo de productos nuevos.

Palabras claves: Miel, extracto de propóleo, características físico-químicas y microbiológicas, capacidad antimicrobiana, producto nutracéutico.

Indice:

	<i>Pagina</i>
1) Introducción	1
2) Objetivo Principal	2
2.1- Objetivos específicos	2
3) Marco legal	3
3.1- Miel	3
3.2- Propóleos	4
3.3- Productos con agregados de propóleos	6
4) Marco teórico.....	8
4.1- Miel.....	8
4.1.1- Definición y composición.....	8
4.1.2- Características físico-químicas.....	11
4.1.3- Características microbiológicas.....	13
4.1.4- Propiedades y beneficios para la salud	16
4.1.5- Capacidad antimicrobiana de la miel.....	17
4.2- Propóleos.....	20
4.2.1- Definición y composición.....	20
4.2.2- Propiedades y beneficios para la salud.....	22

5) Materiales y métodos.....	25
6) Resultado y discusión.....	29
6.1- Muestra de miel cruda.....	29
6.1.1- Análisis fisicoquímico.....	29
6.1.2- Análisis microbiológicos.....	32
6.2- Extracto de propóleos.....	34
6.2.1- Análisis físico-químico.....	34
6.2.2- Análisis microbiológico.....	36
6.2.3- capacidad antimicrobiana.....	36
6.3- Elección del producto.....	39
7) Conclusiones.....	40
8) Bibliografía.....	41
9) Anexos.....	47
9.1- Anexo 1.....	47
9.2- Anexo 2.....	48
9.3- Anexo 3.....	50
9.4- Anexo 4.....	51

1) INTRODUCCIÓN:

En los últimos años, se ha producido un cambio importante en los hábitos de alimentación a nivel mundial, orientando el consumo hacia todo aquello relacionado con los alimentos sanos. Dentro de esta tendencia de alimentos con propiedades terapéuticas y nutricionales, se pueden destacar los derivados del sector apícola.

El sector apícola es muy dinámico, pues se encuentran sujeto a los vaivenes de la demanda mundial y a los rendimientos en las diferentes regiones. Actualmente existe una creciente demanda por las manufacturas apícolas (propóleos, polen, jalea real, cera de abejas, apitoxina y material vivo) entre los cuales la miel resulta el alimento más solicitado (Subsecretaría de Producción, Economía y Desarrollo Rural, 2014).

Hasta el momento la producción nacional de miel se destina en un 95% del total a la exportación. Del total de miel exportada el 99,5% es a granel, es decir sin diferenciación, y solo el 0.5% se exporta fraccionado.

La Argentina se posiciona como un productor mundialmente reconocido por la calidad de sus mieles y con una representación importante entre los países exportadores de miel (Subsecretaría de Producción, Economía y Desarrollo Rural, 2014).

El Gobierno Nacional y los Gobiernos Provinciales en forma conjunta con los productores encuentran necesario y oportuno, incentivar y desarrollar el mercado interno, mejorando la producción, calidad y comercialización, como así también aprovechando esas mejoras para fomentar las exportaciones, apuntando a vender productos elaborados, con un mayor valor agregado y diferenciación (Subsecretaría de Producción, Economía y Desarrollo Rural, 2014).

Teniendo en cuenta los hábitos de alimentación como un “alimento sano y natural” además de la miel el propóleos ha incrementado la demanda en el mercado debido a sus propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales, anestésicas, antiulcerosas, inmunoestimulantes, hipotensiva, citostática, antioxidantes,

fitoinhibidoras y anticariogénica (Chaillou, 2004). Es por lo tanto una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos.

En muchos países, se lo utiliza como aditivo por sus propiedades antioxidantes y antisépticas. Unas gotas de solución de propóleos incluidas en productos envasados o en alimentos frescos, pueden prolongar entre dos y tres veces su vida útil (Chavarrías, 2014).

Las principales formas de comercialización son: propóleos en bruto y productos con agregados de propóleos (caramelos y miel con propóleos, tintura de propóleos, como los más relevantes). Haciendo una estimación, Argentina podría disponer de 450 toneladas de propóleos anuales para su venta, tanto en el mercado interno como para la exportación ya que es un producto que está incrementando su demanda externa (Alimentos Argentinos, 2015).

Por estas razones el presente trabajo busca otorgarle un valor agregado a la miel e incrementar las propiedades de la misma con el agregado de propóleos y de esta forma, obtener un alimento que proporcione beneficios para la salud, incluyendo la prevención de enfermedades.

2) OBJETIVO PRINCIPAL:

- Desarrollar un producto a base de miel con agregado de propóleos.

2.1-OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Analizar las características físico-químicas, microbiológicas y capacidad antimicrobiana.
- Evaluar distintas fórmulas en base a una miel de calidad probada, con distintas concentraciones de propóleos, según las características sensoriales.

3) MARCO LEGAL:

La legislación vigente en el territorio argentino en la que nos basaremos es el Código Alimentario Argentino (C.A. A.).

3.1) MIEL:

-Capitulo X, Artículo 782 - (Res 2256, 16.12.85):

"Con la denominación de Miel o Miel de Abeja, se entiende el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenándolo en panales, donde madura hasta completar su formación."

-Artículo 783 - (Res 2256, 16.12.85):

"La miel deberá responder a las siguientes características:

a) Consistencia fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente; color variable desde casi incolora hasta pardo oscuro; sabor y aroma propio.

b) Agua, por refractometría, Máx: 18,0%.

c) Cenizas a 550-600°C: Miel de flores, Máx: 0,6%. Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores, Máx: 1,0%.

d) Azúcares reductores (calculados como Azúcar invertido): Miel de flores: Mín: 65%. Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores, Mín: 60%

e) Sacarosa aparente: Miel de flores, Máx: 8% Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores, Máx: 10%

f) Sólidos insolubles en agua, excepto en miel prensada, Máx: 0,1%. Sólidos insolubles de agua de miel prensada, Máx: 0,5%

g) Acidez, Máx: 40 miliequivalentes/kg.

h) Índice de diastasa (Escala de Gothe), Mín: 8.

i) Hidroximetilfurfural, Máx: 40 mg/kg.

j) Dextrinas totales: Miel de flores, Máx: 3%.

En mieles con contenido natural bajo de enzimas, como mieles de cítricos, se admite: Índice de diastasa (Escala de Gothe): Mín: 3, siempre que el contenido de hidroximetilfurfural no sea mayor de 15 mg/kg.

k) no deberá contener mohos, insectos, restos de insectos, larvas, huevos, así como sustancias extrañas a su composición.

l) no presentará signos de fermentación ni ser efervescente.

m) La acidez de la miel no deberá ser modificada artificialmente.

n) no deberá contener ningún aditivo.

-RESOLUCIÓN GMC N° 015/94, Incorporada por Resolución MSyAS N° 003, 11.01.95

Criterios Microbiológicos:

La miel deberá cumplir con las siguientes características microbiológicas:

-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

3.2) PROPÓLEOS:

-Capítulo XVI Artículo 1308 bis - (Resolución Conjunta SPReI y SAGPyA N° 94/2008 y N° 357/2008)

Se entiende por propóleos el producto compuesto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, ceras, aceites esenciales y polen, de consistencia viscosa, elaborado por las abejas a partir de ciertas especies vegetales, que son

transportadas al interior de la colmena y modificadas parcialmente con sus secreciones salivares. La composición de los propóleos varía dependiendo de las especies vegetales de origen y de la función de los propóleos dentro de la colmena.

Se entiende por “**Extracto Blando de Propóleos**” el producto semielaborado, que se obtiene procesando el propóleos en bruto con alcohol etílico de calidad definida en el artículo 1109 del presente Código, de manera de extraer los componentes biológicamente activos, filtrando las impurezas y las ceras. El alcohol debe evaporarse trabajando a temperatura controlada, de manera de no afectar los compuestos bioactivos, a fin de obtener una sustancia purificada de consistencia pastosa. Para la producción deben aplicarse las Buenas Prácticas Apícolas. El extracto de propóleos debe ser embalado en envases de material bromatológicamente apto, almacenados en un sitio oscuro y fresco. El envase debe ser tal que le confiera al producto una protección adecuada respecto de la humedad, la luz y la temperatura excesiva.

Características organolépticas:

-Aroma: Característico de este producto: resinoso o balsámico, según su origen botánico y/o geográfico.

-Color: Variable, según su origen botánico y/o geográfico y su concentración.

-Sabor: Variable, de suave a fuerte, amargo y picante.

El extracto de propóleos debe cumplir los siguientes requisitos físicos y químicos:

-Extracto seco (materia seca): Mínimo 10%

-Sustancias extraíbles en n-hexano (ceras): -

-Índice de oxidación: Máximo 22 seg.

-Compuestos fenólicos, expresados como ácido gálico: Mínimo 0,25%

-Flavonoides: Mínimo 0,25%

-Espectrograma UV-VIS: Debe presentar un máximo de absorción entre 270 y 315 nm.

-Plomo, expresado como Pb (sobre sustancia seca): Máximo 0,2 mg/kg

-Arsénico, expresado como As (sobre sustancia seca): Máximo 0,1 mg/kg

-Residuos de plaguicidas y antibióticos: Ausencia

-Los métodos de ensayo a aplicar serán los determinados en la Norma IRAM 15935-2- EXTRACTO DE PROPOLEOS.

Criterios Microbiológicos:

-Coliformes totales/g: n = 5 c = 0 m = 0

-*Salmonella spp* - *Shigella spp* /25 g: n = 10 c = 0 m = 0

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

La metodología de referencia para la preparación del extracto blando será la de IRAM-INTA 15935-2.

3.3) Para la aprobación del PRODUCTO se tendrá en cuenta el capítulo XVII del CAA:

- Artículo 1384 - (Resolución Conjunta SPReI N°94/2008 y SAGPyA N° 357/2008)

“Se autorizarán los propóleos definidos en el Artículo 1308 bis como ingrediente únicamente de los siguientes productos:

1. Caramelos con propóleos.
2. Miel con propóleos, las que podrán contener además polen y/o jalea real.
3. Propóleos en solución hidroalcohólica de etanol o propilenglicol.
4. Suplementos dietarios.

A los efectos de la aprobación deberá presentarse el análisis del producto final, que avale la cantidad de propóleos presente en el mismo, mediante una titulación de flavonoides según Normas IRAM 15935-1- PROPOLEOS BRUTO y 15935-2- EXTRACTO DE PROPOLEOS.

El consumo diario de propóleos de acuerdo al modo de uso no podrá superar 300 mg/día para adultos y 150 mg/día para niños menores de 12 años.

En el rótulo de estos productos alimenticios se deberá consignar, además de las exigencias generales de rotulado y la denominación asignada por la Autoridad Sanitaria, lo siguiente:

- a) El contenido porcentual de propóleos que aporta el producto.
- b) La leyenda: 'MANTENER EN LUGAR FRESCO, SECO Y PROTEGIDO DE LA LUZ'.
- c) La ingesta diaria máxima de propóleos para adultos: 300 mg.
- d) La ingesta diaria máxima de propóleos para niños menores de 12 años: 150 mg.
- e) El modo de uso en el que se deberá indicar en forma clara que la porción consumida por día no debe superar lo establecido en c) y d).
- f) Las leyendas: 'CONTIENE PROPOLEOS. PERSONAS ALERGICAS O SENSIBLES. NIÑOS MENORES DE 4 AÑOS, MUJERES EMBARAZADAS O EN PERIODO DE LACTANCIA: NO CONSUMIRLO'.

No se podrán mencionar propiedades de prevención ni tratamiento de enfermedades en el rótulo ni en la publicidad de los productos que contienen propóleos.

Este producto se denominará:

'Miel con... % propóleos', llenando el espacio con el dato de acuerdo al contenido de propóleos y/o 'Miel con... % propóleos, polen y/o jalea real'.

4) MARCO TEORICO:

4.1) MIEL:

4.1.1-Definición y composición:

La miel es un producto alimenticio líquido, espeso o cristalino, azucarado, producido por las abejas melíferas mediante la recolección del néctar de las flores, de las secreciones procedentes de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos sobre ellas. Luego, la miel es enriquecida con secreciones propias de la abeja, transformada, almacenada y madurada en los panales de la colmena (Figuerola, 2003).

La miel es un producto natural que no posee el agregado de conservantes ni aditivo y es utilizada para el consumo en forma directa. La composición de la miel depende en su mayor parte del origen botánico, clima y condiciones ambientales y del tratamiento que se le haya dado (Tabera et al., 2011)

Está compuesta principalmente por azúcares y agua. Además, contiene varias vitaminas y minerales, enzimas, aminoácidos, proteínas, antioxidantes fenólicos, y micronutrientes (Abdulwahid Ajibola et al., 2012).

Los carbohidratos representan la mayor proporción, dentro de los que destacan la fructosa y glucosa. Estos azúcares simples representan el 85% de sus sólidos, ya que la miel es esencialmente una solución altamente concentrada de azúcares en agua (Ulloa et al., 2010). También se pueden encontrar otros tipos de azúcares como la sacarosa, maltosa y melicitosa (Subovsky et al., 2002).

Algunas de las vitaminas que se encuentran en la miel incluyen ácido ascórbico, ácido pantoténico, niacina y riboflavina junto con minerales tales como calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fosforo, potasio y zinc (Abdulwahid Ajibola et al., 2012).

La miel contiene aproximadamente 0.5% de proteínas, principalmente como enzimas y aminoácidos. La cantidad de aminoácidos libres en la miel es pequeña, de los cuales se encuentra la prolina, el ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina. Las enzimas son añadidas principalmente por las abejas, aunque algunas pocas proceden de las plantas. Las abejas añaden enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel. La enzima más importante de la miel es la α -glucosidasa, ya que es la responsable de muchos de los cambios que ocurren durante la miel; también se conoce como invertasa o sucrasa y convierte el disacárido sacarosa de la miel en sus constituyentes monosacáridos fructosa y glucosa. Otras enzimas presentes en la miel son la glucosa oxidasa, responsable en gran parte de la propiedad antibacteriana de la miel; la catalasa, responsable de convertir el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua; la ácido fosfatasa, que degrada el almidón; la diastasa que se usa como indicador de aplicación de calor a la miel (Ulloa et al., 2010).

Los ácidos orgánicos contribuyen en el sabor de la miel y a su estabilidad frente al desarrollo de microorganismos y son los responsables del bajo pH (3.5 a 5.5) de la miel (Figueroa, 2003).

El que predomina es el ácido glucónico que se origina de la glucosa a través de la acción de la enzima glucosa oxidasa añadida por las abejas. Otros ácidos orgánicos contenidos en menor proporción son el fórmico, acético, butírico, láctico, oxálico, succínico, tartárico, maleico, pirúvico, piroglutámico, α -cetoglutámico, glicólico, cítrico, málico (Ulloa et al., 2010).

En la **tabla 1** se puede observar los principales constituyentes de la miel (INFOAGRO, 2002).

COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE LA MIEL		
Constituyentes	Valor medio (%)	Rango (%)
Principales constituyentes (99 % de la miel)		
AGUA	17.0	13.4 - 26.6
FRUCTOSA	39.3	21.7 - 53.9
GLUCOSA	32.2	20.4 - 44.4
SACAROSA	2.3	0 - 5.6
OTROS AZÚCARES	8.8	-
Constituyentes secundarios.		
Total ácidos (glucónico)	0.57	0.17 - 1.17
Minerales	0.17	0.02 - 1.03
Aminoácidos y proteínas	0.04	0.00 - 0.13
Enzimas	Traza	-
Aromas	Traza	-

Tabla 1: composición porcentual de la miel.

4.1.2-Características físico químicas:

Las características fisicoquímicas de las mieles están directamente relacionados con las especies vegetales de las que proceden y de las condiciones climática del lugar de donde se recolectan, así como las prácticas de manipulación llevadas a cabo por el apicultor durante su extracción y almacenamiento y del tratamiento a las que se hayan expuestas.

-Acidez:

Se mide en función de los ácidos orgánicos que naturalmente contiene la miel (Etcheverry et al., 1998).

Varía en función de la temperatura de conservación y del año de recolección de la miel (Subovsky, 2003). Los valores normales de acidez se incrementan si la miel ha fermentado y esto sucede en mieles con elevados porcentajes de humedad donde se han desarrollado mohos y levaduras (Etcheverry et al., 1998).

El Código Alimentario Argentino establece como límite máximo: 40 miliequivalentes/kg.

-Humedad:

El máximo de humedad permitido es de 18-20%, este valor puede ser superior si la miel se cosecha antes que las abejas retiren en exceso de humedad en los panales. Cuando la miel tiene menos del 20% la abeja opercula los panales y la almacena para su uso posterior. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de celdas con miel operculadas (75%), más seguros estaremos de cosechar una miel con reducido % de humedad. Si las condiciones de almacenamiento post-cosecha son inadecuadas, también podría incrementarse el porcentaje de humedad de la miel (Etcheverry et al., 1998).

El porcentaje de humedad superior a 20%, favorece el desarrollo de mohos y levaduras que desencadenan el proceso de fermentación. La miel tiene olor y sabor a vinagre y no puede ser comercializada (Etcheverry et al., 1998).

La miel puede fermentar porque la concentración de azúcares ya no es suficiente para impedir la multiplicación de levaduras (Maidana, 2008).

-Color:

El color es una propiedad óptica de la miel, resultado de los diferentes grados de absorción de la luz de diferentes longitudes de onda por parte de los constituyentes de la miel, para determinar el color se utiliza miel líquida sin cristales, debido a que la cristalización trae como consecuencia un aclarado de la matriz. El color se mide técnicamente en mm de la escala de Pfund (Pérez, 2004).

Los pigmentos naturales presentes en la miel que aportan color son fundamentalmente carotenos y flavonoides (Ciappin et al., 2013).

El color depende de varios factores, fundamentalmente está relacionado con el origen botánico y la composición del néctar, con el proceso de obtención y con la temperatura y tiempo de almacenamiento. Tiene extrema importancia desde el punto de vista comercial, ya que determina su precio (Delmoro et al., 2010).

Cuanto más oscura es la miel, mayor es el porcentaje de sales minerales y por ende mayor es el valor nutritivo de la miel. (Maidana, 2008).

El fenómeno de la melenización de los azúcares durante el envejecimiento o el calentamiento provoca una intensificación del color de la miel (Tabera et al., 2001)

-HMF (Hidroximetilfurfural):

Cuando una solución de sacarosa, glucosa o fructosa en el agua es calentada, se puede formar HMF. La Fructosa es, sin embargo, mucho más sensible que la glucosa a esta reacción. Se esperaría, por lo tanto, que altos valores de HMF serían encontrados más a menudo en las mieles procesadas que tienen un alto contenido de fructosa (Crane, 1982).

El HMF es un aldehído cíclico que se origina espontáneamente a partir de la fructosa en un medio ácido y es un proceso lento. Se calcula que el aumento de HMF en mieles es de 1 mg/kg por mes en climas suaves con temperaturas máximas de 30°C. Algunas comisiones internacionales establecieron que el contenido máximo de HMF debería ser 40 mg/ kg, con excepciones para mieles de origen tropical, en cuyo caso se admiten 80 mg/kg como máximo (Ulloa et al., 2010). El Código Alimentario Argentino establece como límite máximo 40 mg/kg de HMF.

El HMF es un factor importante ya que indica la frescura del producto y determina si ha sido expuesto a excesivo calor durante su procesamiento, lo cual causa la pérdida de elementos nutritivos y afecta la calidad de la miel (Subovsky, 2003)

La miel recién extraída con buenas prácticas de manipulación contiene un pequeño porcentaje de HMF (5 a 7 mg), que se incrementan con el envejecimiento de la miel y es más pronunciado si la miel es muy ácida (Etcheverry et al., 1998).

4.1.3-Características microbiológicas

La miel presenta una carga microbiana muy baja, debido a la alta presión osmótica por el alto contenido en azúcares, la baja actividad de agua, bajo pH y potencial de óxido reducción, que con la producción de peróxido de hidrogeno contribuyen a su actividad contra el crecimiento de microorganismos indeseables (Tabera et al., 2011).

La miel, como todo producto de origen animal, tiene una flora microbiana original que le es propia. Esta carga microbiana introducida por las abejas está constituida por:

- Esporas de diversas especies de *Bacillus* se presentan en estado esporulado, aunque en mieles recientes se pueden encontrar formas vegetativas. Se trata de microorganismos que no tienen acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana (Coll Cárdenas et al., 2008).

- Mohos Los mohos que se encuentran en algunas mieles, pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Mucor* (Coll Cárdenas et al., 2008).

- Levaduras banales u osmófilas: En cuanto a las levaduras, éstas por presentar capacidad de evolucionar en un ambiente tan concentrado como los azúcares presentes en la miel, se conocen como osmófilos o sacarófilos, provienen de las flores del medio ambiente de donde se originan o manipulan las mieles, del equipo utilizado en las operaciones de extracción y sobre todo de las condiciones de envasado. Las flores se enriquecen de levaduras durante la polinización y cuando están en zonas donde existen frutos en descomposición. Estas levaduras, pertenecen al género *Saccharomyces*, y son las principales responsables de la fermentación de la miel, cuando las condiciones de humedad así, lo permiten (porcentaje de humedad cercano a 21%). Dentro de este género, las especies más frecuentes son *Saccharomycesbisporus* variedad *mellis*, *Saccharomycesrouxii*, *Saccharomycesbailii* variedad *osmophilus*. También se pueden encontrar levaduras banales; esta flora propia de la miel es introducida por la abeja en la colmena, con el néctar, polen o mielato, o por las mismas abejas durante las operaciones de limpieza, al vehicularlos sobre o dentro de su organismo (Coll Cárdenas et al., 2008)

Las levaduras actúan cuando la temperatura de almacenamiento de la miel es superior a 15°C y existe un alto grado de humedad. También existe una correlación con el fenómeno de cristalización. Cuando la miel cristaliza, la glucosa retiene menor cantidad de agua que en condiciones normales, lo que hace que quede mayor cantidad de agua libre, favoreciéndose el desarrollo de las levaduras (Pérez et al., 1985)

Los agentes de contaminación primaria son de muy difícil control, en tanto los de contaminación secundaria pueden ser controlados mediante el empleo de buenas prácticas de manufactura (Coll Cárdenas et al., 2008).

A esta microflora original, se puede añadir una contaminación accidental o secundaria, que depende de:

- El propio hombre
- Las manipulaciones
- Los locales
- Los aparatos
- Los recipientes
- Los insectos predadores
- Roedores
- Animales de compañía.

En esta contaminación secundaria es muy importante tener en cuenta la presencia de gérmenes patógenos como, por ejemplo, *Salmonella*. Estos gérmenes son muy resistentes y sobreviven en la miel durante mucho tiempo. El problema se agrava cuando la miel se incorpora a otro alimento, dando un producto final que puede provocar enfermedades en el hombre. La presencia en la miel de *Escherichia coli* indica una contaminación de origen fecal debido a una falta de higiene en la extracción de la miel. Sin embargo, se ha comprobado que la supervivencia del germen contaminante dura escasamente unos días (Pérez et al., 1985).

La presencia de bacterias Coliformes (origen fecal) y/o abundancia de hongos y levaduras en la miel sugiere una falta general de higiene y saneamiento en la manipulación del alimento, en el proceso de extracción, envasado y/o almacenamiento (Etcheverry et al., 1998).

La presencia de clostridios sulfito-reductores es también indicador de contaminación del producto. La presencia de esporos de clostridios es en especial peligrosa para bebés y niños de corta edad, siendo causante del Botulismo infantil. En este sentido, la miel al presentar un alto contenido de azúcares (70±80%) y un pH entre 3.5 a 4.5, permite que estos microorganismos sobrevivan y una vez ingeridos por el niño, pueden pasar a forma vegetativa, multiplicándose y

colonizando el colon, produciendo luego, la neurotoxina, causante de la enfermedad. Debido a esta contaminación se aconseja evitar la ingesta de mieles en niños menores de un año (Coll Cárdenas et al., 2008).

La orden ministerial del 5 de agosto de 1983, publicada en el B.O.E. de 13 de agosto del mismo año, «Norma de calidad para la miel destinada al mercado interior», en su apartado 8.1. «Normas microbiológicas aplicables a la miel», indica los parámetros que deberá cumplir la miel en lo que concierne a este aspecto. Ellos son:

- Gérmenes patógenos o toxinas patógenas: Ausencia.
- Recuento de colonias aerobias mesófilas ($31 \pm 1^\circ\text{C}$): Máximo 1×10^4 col/g.
- Enterobacterias totales: Ausencia/g.
- *E. coli*: Ausencia/g.
- *Salmonella-Shigella*: Ausencia/25 g.
- Mohos y levaduras: Máximo 1×10^2 col/g.

(Pérez et al., 1985).

4.1.4-Propiedades y beneficios para la salud:

-NUTRICIONALES:

- Es un edulcorante natural.
- Es un alimento de alto poder energético que proporciona más de 3000 cal/gr.
- Es de fácil asimilación debido a que posee hidratos de carbono de cadenas cortas. Es una fuente de energía rápida.
- Mejora el rendimiento físico, especialmente, en los deportistas.
- Facilita la digestión y metabolización de otros alimentos: en el caso de los niños facilita la metabolización de calcio y magnesio. (INTI, 2011)

-TERAPEUTICAS:

- Es suavemente laxante (regulariza el funcionamiento intestinal).
- Es antiséptica. No es propicia para las bacterias. La propiedad bactericida de la miel se llama «efecto inhibidor».
- Es antihemorrágica y cicatrizante.
- Estimula la formación de glóbulos rojos debido a la presencia de ácido fólico.
- Estimula la formación de anticuerpos debido al ácido ascórbico, magnesio, cobre y zinc.
- Algunas mieles se les atribuye poder analgésico y antiséptico pulmonar, expectorante.
- Función antioxidante: Se debe al aporte de Flavonoides, ácidos fenólicos y algunas enzimas (p.ej., la glucosa oxidasa, catalasa), junto con el ácido ascórbico, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas, previenen el envejecimiento celular de los tejidos.
- Es Antimutágeno, antitumoral y tiene actividad antiinflamatoria.
- Es un inhibidor potente del agente que causa úlceras y gastritis; *Helicobacter pylori*.
- Mejora factores de riesgo cardiovasculares en individuos sanos y en pacientes con factores de riesgo elevados, como el colesterol y triglicéridos.

(Álvarez -Suarez, 2009; INTI, 2011)

4.1.5-Capacidad Antimicrobiana de la miel:

La actividad antimicrobiana ha sido atribuida a compuestos específicos presentes en la miel (Fangió et al., 2007). Estos compuestos antimicrobianos naturales podrían aplicarse como conservantes de alimentos para proteger su calidad,

extender su vida útil e inactivar la capacidad alterante de ciertos microorganismos patógenos (Chavarrías, 2014).

Se ha demostrado que la miel inhibe la formación de biofilms (comunidades de bacterias). La miel altera la forma en la que las bacterias se comunican unas con otras y debilita la virulencia bacteriana, lo que hace que ciertos patógenos sean más susceptibles a los antibióticos convencionales (Chavarrías, 2014). El efecto antibacteriano de la miel está relacionado con los siguientes factores:

-Acidez (pH bajo): La miel presenta un pH que varía en la escala de 3.2 a 4.5. La acidez, beneficia la acción antibacteriana de los macrófagos, ya que un pH ácido dentro de la vacuola se relaciona con lisis bacteriana. La mayoría de las sustancias antimicrobianas de la miel se forman en el organismo de las abejas.

-Osmolaridad: La miel por su concentración de glucosa es una sustancia hiperosmolar, con alta presión osmótica y baja actividad de agua "Aw"0.5 (16% agua) en un rango de temperatura de 4° a 37° C. El azúcar crea un medio con bajo contenido de agua (alta osmolaridad), el cual hace que ninguna bacteria u hongo pueda desarrollarse.

(Manrique, 2011)

-Peróxido de hidrógeno: se produce de la hidrólisis de la glucosa por la acción de la enzima glucosa oxidasa, producida en las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Vega, 2014).

.Es uno de los principales factores responsables de la actividad antibacterial, por ello cuando el contenido de peróxido de miel es alto, su efecto bactericida es muy grande. Al contrario, cuando el contenido de peróxido es bajo, el efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano es leve o ausente (Dustmann, 1978).

En la miel los niveles de peróxido de hidrógeno son bajos, aproximadamente 1000 veces menos que las soluciones usadas como antisépticos, de manera que no causa daño tisular; sin embargo, sigue siendo efectivo como antimicrobiano. Parte de la efectividad como antimicrobiano del peróxido de hidrógeno se debe a la

liberación lenta de éste y a la producción continua por parte de la glucosa-oxidasa (Estrada et al., 2005). Existen determinados factores naturales que pueden inhibir, la actividad del peróxido, tal es el caso de:

- Niveles de catalasa: enzima presente en el polen que llega a la miel por contacto durante el pecoreo y que disminuye la concentración del peróxido de hidrógeno (Vega et al., 2014). Esta rompe el peróxido producido por la glucosa oxidasa, con el agua y oxígeno. En general, con la gran actividad catalasa el valor de inhibición es relativamente bajo, mientras en mieles desprovistas de actividad catalasa los valores de inhibición son más elevados (Dustmann, 1978).
- La Vitamina C (el ácido ascórbico) u otras sustancias que se reducen fácilmente puede destruir el peróxido (H_2O_2) producido (Dustmann, 1978).
- Exposición a la luz: La luz solar directa y la luz fluorescente pueden tener un efecto sobre la actividad de la glucosa oxidasa durante su extracción, tratamiento, y almacenaje. Ciertas sustancias que existen en algunas mieles aumentan su sensibilidad a la luz. El efecto de luz puede ser tan fuerte que destruye la enzima que produce el peróxido (Dustmann, 1978).

-Sustancias propias de la composición de la miel tales como ácidos, flavonoides, y otros derivados fotoquímicos (Maidana, 2008).

Los fitoquímicos son sustancias que provienen de la floración visitada por la abeja para la colecta del néctar. Dentro de éste grupo están los flavonoides, que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas. Las mieles oscuras se destacan por su actividad antibacteriana atribuida al peróxido de hidrógeno y al poder antioxidante de los ácidos fenólicos. Su contenido en antioxidantes es incrementado por poseer mayor cantidad de pigmentos vegetales, como carotenoides y, fundamentalmente, flavonoides (Manrique, 2011).

4.2) PROPÓLEOS:

4.2.1-Definición y composición:

El propóleo es una sustancia resinosa, balsámica y gomosa. A temperaturas elevadas es suave, flexible, y muy pegajosa, pero cuando se enfría se vuelve dura y quebradiza. Su color varía de verde a marrón rojizo, dependiendo de su fuente botánica. Es de sabor acre o amargo, olor agradable, dulce y cuando se quema exhala una fragancia de resina (Rodríguez Pérez, 2013).

Las abejas elaboran el propóleo mezclando sustancias activamente secretadas o exudadas por heridas de ciertos vegetales, con ceras, sus secreciones salivares y otras sustancias en proporciones variables. Lo utilizan para barnizar el interior de la colmena (incluyendo los panales) con fines desinfectantes, para cerrar grietas, reducir vías de accesos y para consolidar los componentes estructurales. También lo emplean para recubrir los cadáveres de animales que se pueden haber introducido en la colmena y son muertos por las abejas quedando embalsamados y evitando su descomposición (Bedascarrasbure et al., 2006).

Se han identificado más de 300 componentes de los cuales un 50% son compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye acción farmacológica (Rodríguez, 2013).

Desde el punto de vista macroscópico el propóleo está constituido por:

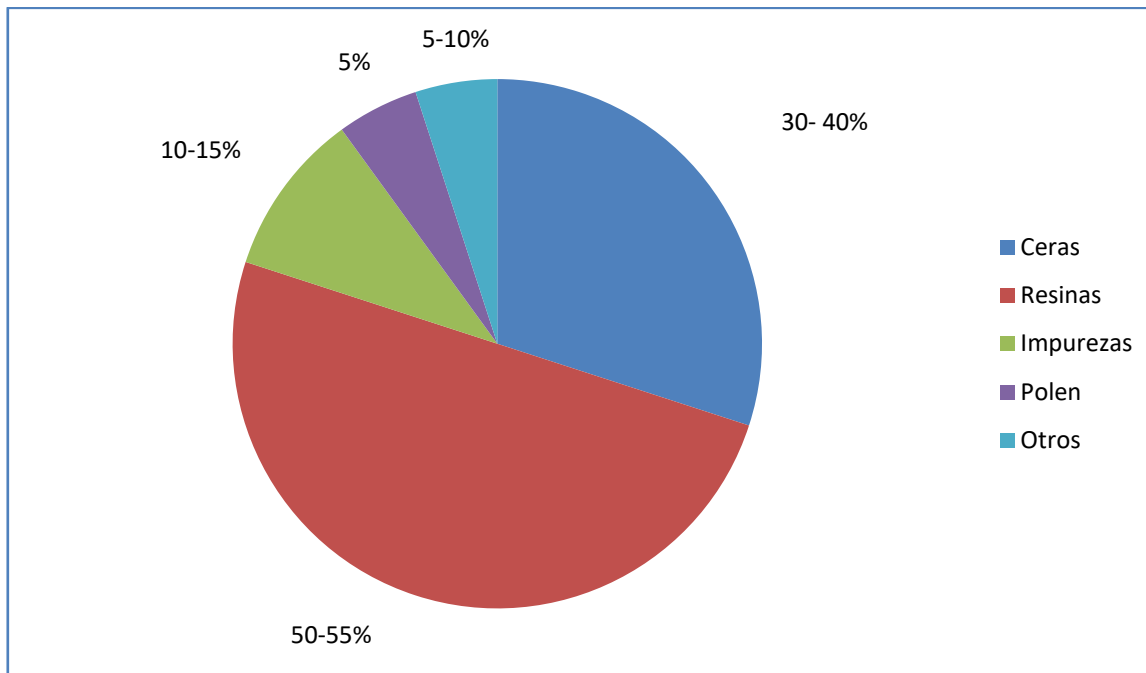


Gráfico 1: Composición genérica del propóleo (Bedascarrasbure et al., 2006).

Estos parámetros están influenciados por varios factores como: el medio ambiente, la época del año, el método de recolección (ver anexo 1), zona de la colmena de donde se extrajo y el tipo de abeja.

Las resinas son altamente solubles en etanol, metanol, cloroformo y prácticamente insoluble en agua, dependiendo del origen botánico del propóleo. Dentro de esta fracción se encuentran compuestos de tipo fenólicos, con intensa actividad biológica. Esta fracción está muy relacionada con las de las plantas que lo originaron. Se puede encontrar también otros compuestos con actividad biológica como los aceites esenciales (compuestos volátiles), que se pueden degradar, principalmente por oxidación ya sea por acción del tiempo o temperaturas altas (Bedascarrasbure et al., 2006).

La fracción denominada “Cera” (cera de abeja) es insoluble en agua y alcohol en frío, pero muy soluble en n-hexano o éter de petróleo y normalmente es considerada como inerte (Bedascarrasbure et al., 2006).

Las “impurezas” (o impurezas mecánicas) están constituidas por restos vegetales y minerales adicionados por las abejas con el objeto de otorgarle consistencia necesaria de acuerdo a la función que tendrá en la colmena (Bedascarrasbure et al.,2006). No presenta compuestos activos y su elevada presencia disminuye la pureza de este producto (Noriega, 2014)

El Polen proporciona proteínas y aminoácidos libres, tales como la arginina y la prolina (Noriega, 2014).

Entre los compuestos que se encuentran en un 5-10% se destacan :minerales, como el hierro y el cinc son los más abundantes, vitaminas (provitamina A, tiamina, riboflavina, niacina y ácido pantoténico, a nivel de trazas), pequeñas cantidades de terpenos, aldehídos aromáticos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivares de las abejas, etc. Sus principales componentes son los flavonoides (que incluyen a flavonas, flavonoles, y flavononas), los ácidos fenólicos y sus ésteres. Ellos son los responsables de la mayoría de sus acciones terapéuticas (Bedascarrasbure et al., 2006).

4.2.2-Propiedades y beneficios para la salud:

Los principales usos se vinculan con su capacidad:

-Cicatrizante: Esta directamente relacionada a la presencia de Cobre. Presenta excelente cualidades como antiséptico, astringente y reestructurante tisular (Sosa, 2000)

-Antioxidante: Es una excelente fuente natural de antioxidantes, por su alto contenido en flavonoides (Maidana, 2008).Los flavonoides absorben radiación electromagnética en la zona del ultravioleta-visible (UV-Vis) y de esta forma representan una protección natural para las plantas contra la radiación UV, al contener en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y otros metales de transición, lo que les confiere una capacidad antioxidante (Rodríguez, 2013). Los antioxidantes impiden la oxidación lipídica,

reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y además, neutralizan los radicales libres, que son los responsables del envejecimiento celular (Alzaga, 2011).

-Acción inmunomoduladora y antitumoral: Los flavonoides contenidos en el propóleo participan indirectamente en el mecanismo de inmunidad celular, debido a que estimulan los linfocitos T, estos reciben el mensaje proveniente de los macrófagos, que informan sobre la presencia de antígenos en el cuerpo, los linfocitos T actúan como segunda línea de defensa del sistema inmune, actuando contra células invasoras, como las cancerígenas, los virus y las células bacterianas. En el mismo sentido, se considera que la actividad antitumoral del propóleo y de algunos de sus componentes, está asociada a su acción inmunomoduladora, principalmente, debido al aumento de la inmunidad antitumoral innata, activando los macrófagos, los cuales pueden producir factores solubles que interfieren sobre la célula tumoral o sobre las funciones de otras células inmunes (Muñoz et al., 2011).

-Antiinflamatoria: La inflamación es la respuesta biológica de los tejidos vasculares a los estímulos nocivos, tales como agentes patógenos, células dañadas, irritantes y radicales libres (Noriega, 2014). Su actividad antiinflamatoria está estrechamente relacionada con la inhibición de enzimas involucradas en la degradación de los tejidos (Alzaga, 2011). Esta acción es atribuida al ácido cafeico y a la quercetina. Actuando a nivel de los macrófagos suprime la producción de prostaglandina y leucotrienos (Noriega, 2014).

-Anestésico: Algunos de los flavonoides del propóleo como la pinocembrina, pinostrobrina y ésteres del ácido cafeico, producen efectos anestésicos (Noriega, 2014). Este efecto es 3,9 veces mayor que la cocaína y 52 veces mayor que la novocaína (Alzaga, 2011).

-Antimicrobiana: La propiedad antimicrobiana del propóleo puede estar relacionada a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo. El mecanismo de la actividad antimicrobiana del propóleo es complejo y puede ser

atribuido al sinergismo entre algunos de sus componentes, tales como flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos y otros compuestos fenólicos presentes en su composición. La ventaja de su acción se debe a la capacidad de llegar por vía sanguínea o linfática hacia todo el organismo, independientemente del pH que se encuentre, manteniéndose su acción de igual forma (El Apicultor, 2009).

- Capacidad Antibacteriana: Se encuentran como principales responsables de la capacidad antibacteriana, los Flavonoides galangina y pinocembrina y derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y cafeico. El propóleo desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular causando bacteriolisis parcial e inhibiendo la síntesis proteica (Bedascarrasbure et al., 2006). El efecto antibacteriano actúa sobre los gérmenes gram positivos como el estafilococo dorado y estreptococo beta hemolítico, y algunos gram negativos como los prociánicos y proteus (Noriega, 2014).
- Capacidad Antiviral: El propóleo se comporta como un antiviral de amplio espectro y presenta una buena actividad frente a Herpesvirus y Poliovirus. Los responsables de esta acción son algunos Flavonoides, un éster del ácido cafeico y el ácido ferúlico (Bedascarrasbure et al., 2006).
- Capacidad Antimicótica: Está determinada por la presencia de la sacranetina, perostibeno y los estalibenos que son probados agentes antifúngicos, acción que también está probada para el ácido benzoico (Noriega, 2014).

5) Materiales y Métodos:

Se tomaron 7 muestras de miel cruda contenida en tambores pertenecientes a diferentes apicultores de la provincia de Buenos Aires. Estas muestras fueron tomadas de una planta fraccionadora de miel la ciudad de Tandil, las cuales tienen como fecha de cosecha 2015/2016. Las muestras se tomaron en potes de plástico de 500 g de capacidad.

El propóleo se utilizó en forma de extracto de propóleos al 10% (10gr de extracto seco de propóleos cada 100gr de solución), este es producido en INTA Famaillá y tiene su origen como propóleos en bruto en la llanura chaqueña. Esta zona nos garantiza la producción de propóleos naturales.

Para la formulación del producto la miel fue calentada a 78°C y homogeneizada para obtener una miel líquida, luego se probaron dos concentraciones diferentes del extracto de propóleos (2% y 10%) el cual se agregó a ésta miel y se homogeneizó para obtener el producto final.

El análisis de las muestras de miel, el extracto de propóleos y la formulación del producto se realizó en el laboratorio de Calidad de Miel del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, exceptuando las pruebas físico químicas de las muestras de miel que fueron analizadas en el laboratorio de Calidad de Miel de la planta, como así también la elección del producto a partir de sus características sensoriales.

Para las muestras de miel se realizaron las siguientes determinaciones:

Análisis físico-químico (anexo 2):

-Acidez libre: Se determinó por titulación (A.O.A.C. 15th. Ed., 1990, 962.19).

-Humedad: Se determinó por refractometría (A.O.A.C. 15th. Ed., 1990, 969.38 B).

-Color: Para la determinación se utilizó un Colorímetro de Pfund (IRAM 15941-2/97).

-HMF: Se efectuó por el método colorimétrico de Winkler (IRAM 15937-1/95).

Análisis microbiológico (anexo 3):

-Recuento de Mesófilos totales (ICSMF., 2000)

-Recuento de Mohos y levaduras (A.P.H.A., 1984).

-Recuento de Coliformes totales (I.C.M.S.F., 1978).

-Investigación de *Salmonella spp* - *Shigella spp* (A.P.H.A., 1984).

-Clostridios sulfito reductores (ICMSF., 2000)

Se determinó la capacidad antimicrobiana de cada muestra a partir del método por difusión en paca por pocillo frente a *Staphylococcus aureus* (Halawani y Mohamed, 2011)

Se evaluó la calidad del extracto de propóleos para ello se hicieron los siguientes análisis:

Análisis físico-químicos:

Poder antioxidante:

- Índice de oxidación:

Procedimiento: Tomar 1ml de tintura y agregarle 50ml de agua destilada y luego mezclar. De esta mezcla tomar 2ml y colocarla dentro de un vaso de precipitado, a esto se le añade 1ml de ácido sulfúrico al 20% y se mezcla durante 1 minuto. Trascorrido este tiempo se le adiciona una gota de Permanganato de Potasio 0,1N y con cronometro se mide el tiempo que tarda en desaparecer la coloración rosada, este no debe superar los 20 segundos.

(Normas IRAM-INTA 15935-2, 2008)

Principios Activos: (Técnicas cualitativas)

-Polifenoles:

Procedimiento: Se prepara una solución a partir de 1ml de tintura de propóleos y 9ml de alcohol etílico. En tres tubos se colocan 1ml de esta solución y se le agregan a cada uno de estos lo siguiente:

Tubo 1: se adiciona cloruro férrico 5 %. Observar si el tubo naranja verdoso oscurece y cambia a pardo oscuro.

Tubo 2: se adiciona Hidróxido de Sodio al 20%. Observar si el tubo color amarillo anaranjado se oscurece rápidamente.

Tubo 3: se adiciona 0,5ml de acetato de plomo al 1%. Observar si el tubo color amarillo verdoso precipita.

-Flavonoides: (test de Shinoda).

Procedimiento: Se parte de una solución de 1ml de tintura de propóleos y 9ml de alcohol etílico.

Tubo 1: se adiciona 0,02g de magnesio metálico y 0,3ml de ácido clorhídrico. Observar si el tubo cambia la coloración a rojo- violeta o rojo cereza.

Tubo 2: se le adiciona zinc y se observa el cambio de color a rosado o amarillo limón.

(Maidana, 2012)

Análisis microbiológico:

-Recuento de Mohos y levaduras (A.P.H.A., 1984).

-Recuento de Coliformes totales (I.C.M.S.F., 1978).

-Investigación de *Salmonella spp* - *Shigella spp* (A.P.H.A., 1984).

Se determinó la capacidad antimicrobiana del extracto de propóleos partir del método por difusión en paca por pocillo frente a *Staphylococcus aureus* (Halawani y Mohamed, 2011).

Para el producto formulado se realizaron los siguientes análisis microbiológicos:

- Recuento de Mesófilos totales (ICSMF., 2000)
- Recuento de Mohos y levaduras (A.P.H.A., 1984).
- Recuento de Coliformes totales (I.C.M.S.F., 1978).

Se determinó la capacidad antimicrobiana del producto con las diferentes concentraciones del extracto de propóleos a partir del método por difusión en paca por pocillo frente a *Staphylococcus aureus* (Halawani y Mohamed, 2011).

6) RESULTADOS Y DISCUSION:

6.1-MUESTRAS DE MIEL CRUDA:

6.1.1- Análisis físico-químicos:

-Acidez libre:

MUESTRA	ACIDEZ
A	15meq/kg
B	9meq/kg
C	10meq/kg
D	8meq/kg
E	13meq/kg
F	7meq/kg
G	7meq/kg

Tabla 2: Valores de Acidez.

El análisis realizado para determinar la acidez de las muestras arrojó como resultado valores entre 8meq/kg y 15meq/kg, por lo que se encuentran debajo de lo permitido por el CAA.

En investigaciones realizadas para mieles de la misma zona (Tabera et al., 2001), se obtuvieron resultados similares, sin embargo, el rango en que se encuentra estos valores son inferiores a los estudios realizados por Iurlina y Fritz (2005).

-Humedad:

MUESTRA	HUMEDAD
A	16,5%
B	15,6%
C	14,8%
D	13,6%
E	16%
F	16,4%
G	16,2%

Tabla 3: Valores de Humedad.

Los valores de humedad que se encontraron están por debajo del límite permitido por el CAA que establece como límite máximo 18-20%. Las muestras se encontraron en un rango de 13,6% a 16,5%. Estos valores concuerdan con estudios realizados por otros autores (Tabera et al., 2001) para la misma zona de producción.

-Color:

MUESTRA	COLOR
A	38 mm
B	46 mm
C	42 mm
D	26 mm
E	39 mm
F	51 mm
G	40 mm

Tabla 4: Determinación de color.

El color que predominó en las muestras de mieles corresponde a un Ámbar Extra Claro, exceptuando la muestra D que dio como resultado un color Blanco y la muestra F un Ámbar Claro.

En estudios realizados para la misma zona de producción (Tabera et al., 2001) se evidencia que la mieles que predominan son las que pertenecen a un ámbar claro, mientras que en este estudio predominan mieles ámbar extra claro.

-HMF:

MUESTRA	HMF
A	< 15mg/kg
B	< 15mg/kg
C	< 15mg/kg
D	< 15mg/kg
E	< 15mg/kg
F	< 15mg/kg
G	< 15mg/kg

Tabla 5: Valores de HMF.

Si bien con este método no se determinó el valor específico de cada muestra, todos los valores de HMF se encontraron por debajo de 15mg/kg, este valor corresponde a una miel utilizada como testigo.

Teniendo en cuenta que el Código Alimentario Argentino establece como límite máximo 40 mg/kg de HMF cualquiera de estas mieles podrían ser utilizadas para la elaboración del producto ya que parten de un valor de HMF muy bajo.

Estos valores concuerdan con estudios realizados por el mismo método (Subovsky, 2002). En investigaciones realizadas en la misma zona de producción (Valle et al., 2001), también se obtuvieron resultados por debajo de 15mg/kg de HMF.

6.1.2- Análisis microbiológicos:

Los análisis microbiológicos de la miel permiten determinar falencias en los procesos de extracción, envasado, transporte y almacenamiento. Este estudio se realiza en mieles que no han sufrido ningún tratamiento post-cosecha, para poder determinar la carga microbiana presente y cuál es su impacto en la calidad del producto.

MUESTRA	Recuento de Mesófilos.	Recuento de Mohos y Levaduras.	Recuento de Coliformes.	Salmonella spp	Clostridium Sulfito-Reductores
A	860 UFC/g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Negativo
B	155 UFC/g	1 UFC/g.	Ausencia	Ausencia	Negativo
C	242 UFC/g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Negativo
D	136 UFC/g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Negativo
E	204 UFC/g	2 UFC/g.	Ausencia	Ausencia	Negativo
F	380 UFC/g	4 UFC/g.	Ausencia	Ausencia	Positivo
G	276 UFC/g	2 UFC/g.	Ausencia	Ausencia	Positivo

Tabla 6: Caracterización microbiológica de las muestras de miel.

- ✓ Los parámetros establecidos para el Recuento de colonias aerobias mesófilas presenta un máximo de 1×10^4 UFC/g. Teniendo en cuenta este valor las muestras se encuentran dentro de este límite permitido. Los Mesófilos hacen referencia a la contaminación durante la extracción de la miel y al mal manejo de tiempo-temperatura en el almacenamiento. Estos valores concuerdan con los estudios realizados por Iurlina y Fritz (2005)
- ✓ El recuento de Moho y Levaduras se encuentran dentro del límite permitido por el CAA (<10 UFC/g). Si bien cuatro de las muestras presentan el crecimiento de al menos 1 UFC/g se evidencia que las condiciones generales de higiene fueron buenas, la temperatura de almacenamiento fue apta y no presentan grados de humedad elevados. Estos valores son similares a los estudios realizados por Iurlina y Fritz (2005), pero no

concuerdan con lo los valores obtenidos por Tabera et al., (2001) ya que se observan muestras con niveles de Mohos y Levaduras superiores a lo permitido por CAA.

- ✓ La legislación exige la ausencia total de microorganismos Coliformes y patógenos como *Salmonella*. En las muestras estudiadas no se evidencia el desarrollo de estos microorganismos por lo que se encuentran dentro de lo exigido por el CAA. Estos valores concuerdan con estudios realizados por diferentes autores (Tabera et al., 2001; Iurlina y Fritz, 2005).

- ✓ Dos de las siete muestras analizadas presentaron crecimiento de Clostridios sulfito-reductores. Este crecimiento de Clostridios puede deberse a la falta de buenas prácticas de manufacturas tanto en el campo como dentro de la sala de extracción. Estas muestras fueron sometida a un shock térmico (78°C aproximadamente) e incubadas nuevamente, donde se pudo observar que hubo crecimiento, lo que genera grandes cuestionamientos sobre su calidad microbiológica ya que este grupo bacteriano es capaz de formar esporas de anaerobios sulfito reductores y sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el producto que representan alto riesgo para la salud del consumidor. Por este motivo las muestras F y G fueron descartadas. Estos resultados no concuerdan con estudios realizados por varios autores (Tabera et al., 2001; Iurlina y Fritz, 2005).

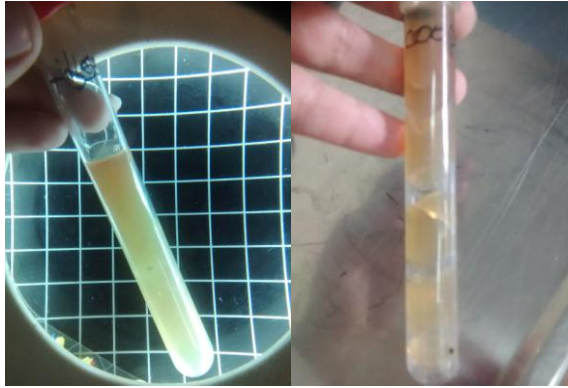


Figura 1.

Figura 2.

Figura 1: muestra F de miel cruda. Figura 2: muestra G de miel cruda (formación de gas).



Figura 3.

Figura 4.

Figura 3: muestra F después del tratamiento térmico. Figura 4: muestra G después del tratamiento térmico (formación de gas).

6.2- EXTRACTO DE PROPÓLEOS:

6.2.1- Análisis físico-químicos:

-Índice de oxidación:

El extracto de propóleos presentó un alto poder antioxidante ya que el tiempo que tardo la solución en decolorarse fue 5 segundos 20 milésimas. Este valor se encuentra dentro de lo exigido por el CAA.

Este parámetros nos proporciona una idea de la cantidad de compuestos oxidantes presentes en la muestra, a mayor concentración menor tiempo de

decoloración y, por lo tanto, mejor calidad del producto (Noriega, 2014). La actividad antioxidante de algunos propóleos indica su potencial como producto nutracéutico (Palomino et al., 2009).

Este valor es similar a propóleos de la misma zona estudiados por Chaillou et al., (2000).

-Principios activos:

Los polifenoles y los flavonoides son considerados los principales compuestos bioactivos del propóleos, El contenido de fenoles y flavonoides en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante (Palomino et al., 2009).

-Polifenoles:

1. En el tubo 1 se pudo observar un cambio de coloración a pardo oscuro.
2. En el tubo 2 se observó un cambio de coloración a pardo.
3. En el tubo 3 se pudo observar un cambio de color a amarillo opaco y turbidez.

Se puede observar que este extracto presenta los tres principios activos ya que todos presentaron el cambio esperado para esta técnica.

-Flavonoides:

1. En el tubo 1 se observó un cambio de color siendo este rojo cereza.
2. En el tubo 2 no se pudo observar ningún cambio por este motivo no presenta todos los principios activos.

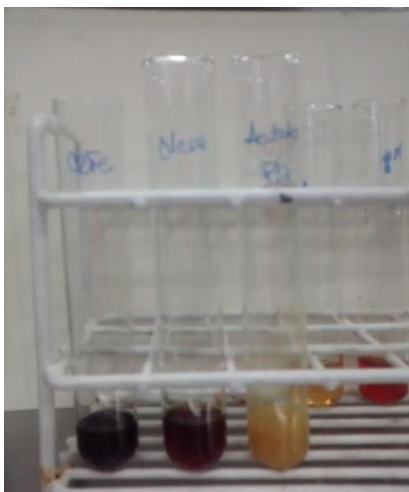


Figura 5.



Figura 6.

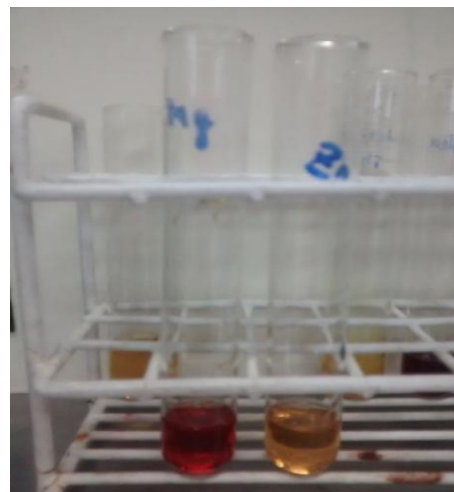


Figura 7.

Figura 5: Análisis de Polifenoles. Figura 6: solución de extracto de propóleo y Alcohol etílico. Figura 7: Análisis de Flavonoides.

Si bien esta es una Técnica cualitativa para detectar los principios activos del propóleos en investigaciones realizadas en la misma zona por diferentes autores (Chaillou et al., 2000; Bedascarrasbure et al., 2004; Chaillou y Nazareno, 2009) el propóleos tiene la presencia de estos principios.

6.2.2- Análisis microbiológico:

	Recuento de Coliformes.	Salmonella spp	Recuentos de Mohos y Levaduras
Extracto de Propóleos.	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Tabla 7: Análisis microbiológico de extracto de propóleos.

Se puede observar que el extracto de propóleos no presenta crecimiento de ninguno de los microorganismos estudiados por tal motivo se encuentra dentro de lo permitido por el CAA.

6.2.3- Capacidad Antimicrobiana:

Muestra	Mc	MT	(M+P) _{2%}	(M+P) _{10%}
A	Presencia de halo de inhibición.	Presencia de halo de inhibición.	Presencia de halo de inhibición.	Presencia de halo de inhibición.
B	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.
C	Presencia de halo de inhibición.	Presencia de halo de inhibición.	Presencia de halo de inhibición.	Presencia de halo de inhibición.
D	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.
E	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.	Ausencia de halo.

Tabla 8: Presencia o ausencia de capacidad antibacteriana.

El extracto etanolito de propóleos al 100% presento halo de inhibición al *Staphylococcus aureus*. Este resultado concuerda con los estudios realizados por Maldonado, (1999) y Tabera et al., (2011).

Mc: Miel cruda.

MT: Miel sometida a un tratamiento térmico de 78° C aproximadamente.

(M+P)_{2%} : Miel con tratamiento térmico y el agregado de extracto de propóleo al 2%

(M+P)_{10%} :: Miel con tratamiento térmico y el agregado de extracto de propóleo al 10%.

De las cinco muestras analizadas solo la muestra A y C presentaron halos de inhibición frente al *Staphylococcus aureus*. Por este motivo se descartan las muestras B, D y E ya que, lo que se busca para este producto es que presenten capacidad antimicrobiana. Estos datos son similares a los resultados expuestos por Tabera et al., (2011).

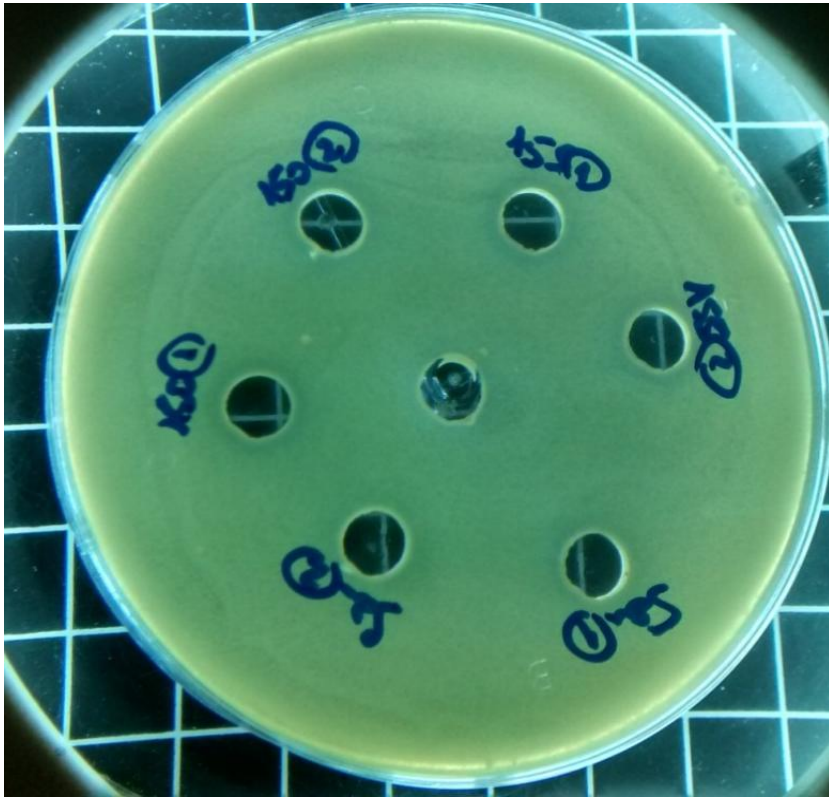


Figura 8: Muestras sin presencia de halos.

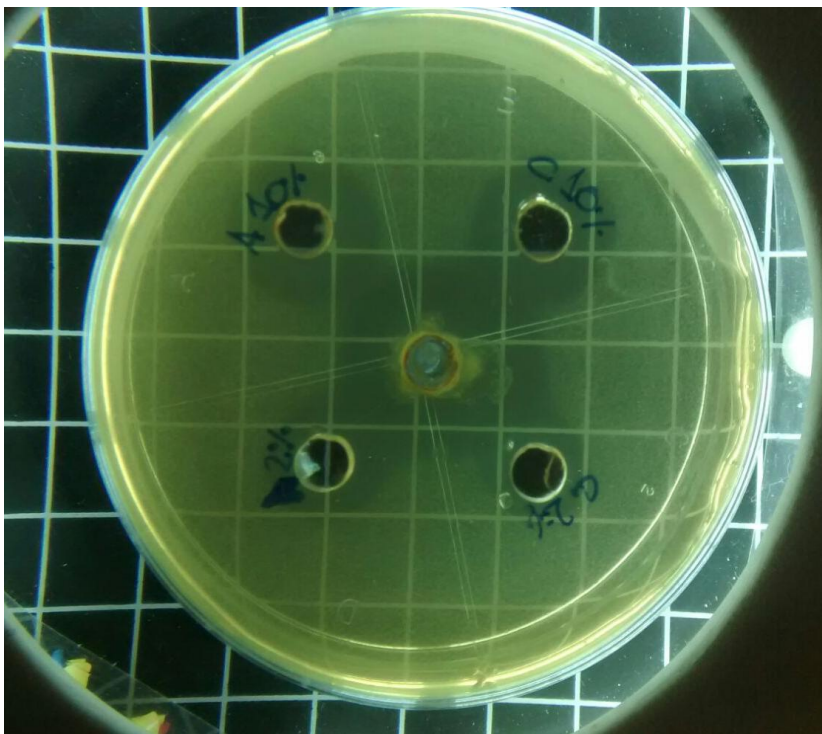


Figura 9: Muestras A y C, con presencias de halos.

El producto se formulará con las muestras de mieles A o C, para ello antes de realizar la cata del producto que dará como resultado la elección del mismo se debe hacer un análisis microbiológico en respeto al consumidor ya que estas formulaciones van a ser consumidas por catadores.

Las pruebas microbiológicas se realizaron a la miel con tratamiento térmico y el agregado de propóleo al 10%.

MUESTRA	Recuento de Coliformes.	Recuento de Mesófilos	Recuentos de Mohos y levaduras
A	Ausencia	28 UFC/g	Ausencia
C	Ausencia	31 UFC/g	1 UFC/g

Tabla 9: Análisis microbiológico del producto.

Se puede observar que el recuento de Mesófilos disminuyó considerablemente con la temperatura a la cual fue sometida la miel y con el agregado del extracto de propóleos.

6.3- Elección del producto

De acuerdo a los resultados obtenidos por calidad y características antimicrobianas se eligió las muestras A y C para desarrollar de producto.

Se agregó en distintas proporciones el propóleos, para realizar las pruebas sensoriales. La elección fue las formulaciones al 2%. Esta etapa de elección fue realizada en la fábrica, con los profesionales a cargo del desarrollo de productos nuevos.

7) **CONCLUSIONES:**

- Se utilizaron dos muestras de miel para la elaboración de producto ya que, si bien los parámetros físico-químicos se encontraron dentro de lo permitido por el Código Alimentario Argentino hubo muestras que presentaron desarrollo de clostridios sulfito-reductores y no presentaron actividad antibacteriana frente al *Staphylococcus aureus*.
- Se evidenció que el extracto de propóleos utilizado fue de buena calidad y presentó una alta capacidad antimicrobiana.
- Para el desarrollo del producto se eligió la concentración de extracto de propóleos al 2%, la cual no evidenció un cambio de color en la miel ni alteró el sabor de la misma.
- Se logró desarrollar un producto a base de miel con el agregado de propóleos, el mismo se encuentra en una etapa de prueba dentro de la empresa tomando como base experimental los resultados presentados en esta tesis.

8) BIBLOGRAFIA:

-Abdulwahid Ajibola; Chamunorwa J. P.; Erlwanger, K. J. (2012). Los valores nutracéuticos de miel natural y su contribución a la salud humana y la riqueza. Nutr Metab (Lond). 2012; V 9, 61.

-Alimentos Argentinos. (2015). Disponible en el URL: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/html/15/15_02_propo.htm.

(Fecha de consulta: 20/09/2016).

-Alzaga Ruiz, N. (2011). El Propóleo. Su aplicación en la medicina humana. Disponible en el URL: <https://es.slideshare.net/aloeverasantander/el-propoleo>.

(Fecha de consulta: 5/05/2017).

-A.O.A.C 969.38.B.1990. Determinación de humedad.

-A.O.A.C. 15th. Ed., 1990, 962.19. Determinación de acidez.

-A.P.A.A, 1984. Investigación de *Salmonella spp*.

-A. P. A.A., 1984. Recuento de Mesófilos aerobios.

- Alvarez-Suarez, J. M.; Tulipani, S.; Romandini, S.; Bertoli, E.; Battino, M. 2011. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. Revista Mediterránea de Nutrición y Metabolismo. 3 (1), 15-23.

-Bedascarrasbure, E.; Maldonado L.; Morales W.; Álvarez A. (2006). Propóleos: Caracterización y normalización de propóleos Argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades. Tucumán, Argentino.

-Bedascarrasbure, E.; Maldonado L.; Álvarez, A.; Rodríguez, E. (2004). Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. INTA Famaillá. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires y Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán. Argentina.

- Ciappini, M. C.; Gatti, M.B.; Di Vi, M.V. (2013). El Color como indicador del contenido de flavonoides en miel. Rev. Cienc. Tecnol. Año 15, Nº 19, pp. 59-63.
- Chaillou, L. L; Herrera, H. A.; Maidana, J. F. (2004). Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. Ciencia Tecnología Alimentos vol.24 no.1
- Chaillou, L. L; Nazareno, M. A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. Instituto de Ciencias Químicas. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Chavarrías, M. (2014). Miel contra patógenos. Disponible en el URL: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-Tecnologia/2014/04/09/219689.php>. (Fecha de consulta 13/03/2017).
- Código Alimentario Argentino. Disponible en el URL: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. (Fecha de consulta: 25/6/2016).
- Coll Cárdenas, F.; Villat, C.; Laporte, G.; Noia, M.; Mestorino. N. (2008). Características microbiológicas de la miel. Revision bibliográfica. , Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.
- Delmoro, J.; Muñoz, D.; Nadal, V.; Clementz, A.; Pranzetti, V. (2010). El color en los alimentos: Determinación de color en mieles. Invenio, vol. 13, núm. 25, pp. 145-152 Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario, Argentina.
- Dustmann, J.H. (1979). Antibacterial effect of honey. *Apiacta* 1.
- El Apicultor. (2009). Propóleos como antiviral. Edición Nº 62. pp. 10.
- Estrada, H.; Gamboa, M.; Chaves C.; Arias M. L. (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

-Etcheverry, M. L.; Nimo, M.; Janin, A.; Fattori, S.; Marconi, C.; Tiscornia, I.; Malacalza, N.; Rabinovich, M.; Di Giovanni, J.; Tapia, C.; Feldman, P. (1998). Guía de buenas prácticas apícolas y de manufacturas. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos.

-Fangió, M. F.; Iurlina M. O; Fritz R. (2007). Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Revista. Argentina microbiología. v.39 n.2

-Figueroa A. P.V. (2003). Análisis de residuos de aceite esencial mentol en miel de abejas, *Apis mellifera* L. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.

-Halawani, E.; Mohamed, S. (2011). Survey of the antibacterial activity of Saudi and some international honeys. Journal of Microbiology and Antimicrobials Vol. 3(4), pp. 94-10.

-ICSMF. 2000. Recuento de Mesófilos aerobios. Determinación de Clostridios sulfito reductores.

-INFOAGRO. (2002). Disponible en el URL: http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/apicultura2.htm. (Fecha de consulta: 15/10/2016).

-INTI 2011 ¿Por qué consumir miel?. Disponible en el URL: https://www.inti.gob.ar/entrerios/pdf/Porque_consumir_miel.pdf. (Fecha de consulta: 20/9/2016).

-Iurlina, M. O.; Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. International Journal of Food Microbiology. 105, 297-304.

-Maidana, J. F. (2008). Propóleos, caracterización y propiedades. Revista Espacio Apícola. N° 70, pp. 9-15.

-Maidana, J.F. (2012).Control de calidad de miel y propóleos, CEDIA. Universidad Nacional de Santiago del Estero.

-Maldonado, L. (1999). Perfil de los propóleos Argentinos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Famaillá – Argentina.

-Manrique R. B. (2011) Efecto antimicrobiano de la miel de abeja en diferentes concentraciones sobre el Estreptococo Mutans. Facultad de odontología. Lima-Perú.

-Ministerio de Asuntos Agrarios- Subsecretaría de Producción, Economía y Desarrollo Rural. Características del sector apícola. 2014. Disponible en el URL: <http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/DesarrolloRural/publicaciones.php>. (Fecha de consulta: 15/10/2016).

-Muñoz Rodríguez, L. C.; Linares Villalba, S. E.; Solarte, W. N. (2011). Propiedades del propóleos como aditivo natural funcional en la nutrición Animal. Biosalud vol.10 no.2.

-Noriega Salomón, V. (2014). El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. Universidad de Cantabria. Disponible en el URL: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.pdf?sequence=1>. (Fecha de consulta: 10/03/2017).

-Norma IRAM 15935-2. Disponible en URL www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1197&io=7859. (Fecha de consulta: 10/04/2017).

-Norma IRAM 15937-1/95. Determinación de HMF. Disponible en el URL: <http://www-biblio.inti.gov.ar>. (Fecha de consulta: 15/04/2017).

-Norma IRAM 15941-2/97. Determinación de color. Disponible en el URL: <http://www.construsur.com.ar/IRAM-794>. (Fecha de consulta: 15/04/2017)

- Normas IRAM-INTA 15935-2. 2008. Determinación del Índice de oxidación.

- Pérez, A. O. H. (2004). Elaboración de una mezcla de miel rema de abejas (*Apis melífera* L.) con harina de piñones de *Araucaria araucana* ((Mol) k, koch). Facultad de Ciencias Agrarias.
- Perez Aroullue, C; Fuencisla, J. B. (1985). Manejo y alteraciones de la miel. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras. Núm. 13/85.
- Rodríguez Pérez, Q.F. B.B. (2013). Uso terapéutico del propóleos de acuerdo a su composición química. Disponible en el URL: <https://anamorin.wordpress.com/2013/06/26/usos-terapeuticos-del-propoleo-de-acuerdo-con-su-composicion-quimica/>. (Fecha de consulta: 20/04/2017).
- Subovsky, M. J.; Sosa López, A.; - Castillo, A.; Cano, N. (2002). Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles del NEA. Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE.
- Subovsky, M J.; Sosa López, A.; Castillo, A. (2003). Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos en la miel de abeja de la provincia de corrientes, Argentina y su relación con la cosecha y procesamiento. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Revista Científica Agropecuaria 7(2): 61-64.
- Sosa, A. (2000). Los minerales presentes en el propóleos potencian sus cualidades antisépticas. Revista Espacio Apícola. N° 44. Pp. 4-8.
- Tabera, A. E.; Libonatti, C.C.; Díaz, M. D. (2001). Relevamiento de muestras de mieles procedentes de la zona de Tandil. Laboratorio de Calidad de Miel. Departamento de Tecnología de los Alimentos Fac. Cs Veterinarias- U.N.C.P.B.A. Tandil - Pcia. Buenos Aires.
- . -Tabera, A., Libonatti C., Soria N. (2011).Capacidad antimicrobiana de productos de la colmena. XIII Congreso CYTAL - AATA
- Ulloa, J. A.; Mondragón, P. M.; Rodríguez, R.; Reséndiz, J. A.; Ulloa, P. R. (2010). La miel de abeja y su importancia. Revista Fuente Año 2, No. 4.

- Valle, A.; Andrada, A.; Aramayo, E; Gallez, L; Lamberto, S. (2001). Mieles de la región periserrana del Sistema de Ventania, Argentina. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

-Vega-Olivera, C.; Gutiérrez-Cortes, C.; Díaz-Moreno, C. (2014).Actividad Antimicrobiana de Mieles de Apis melífera de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia, Il Congreso Internacional de Investigación e Innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos,

9) ANEXOS:

9.1-**Anexo 1**-Los métodos más difundidos de producción y cosecha en nuestro país son:

Método artesanal o de raspado:

En forma natural las abejas elaboran propóleos para utilizarlos en las colmenas y para recolectarlo el apicultor debe raspar las partes donde fue depositado. Para obtener una mayor cantidad se recurre a la incentivación, que consiste en emplear elementos que se colocan entre las alzas (por ejemplo cuñas de madera), cuando se producen grietas o roturas, las abejas las cierran con propóleos.

Este método presenta una serie de inconvenientes y desventajas relacionados por un lado con aspectos de manejo de apiario (favorece el pillaje) y por otro con la calidad del producto obtenido ya que está más expuesto a contaminaciones. Es recomendable utilizar una espátula de acero inoxidable, sin mucho filo para reducir el riesgo de arrastrar virutas de madera. Cuidar de no arrastrar donde haya pintura, pues esta es uno de los mayores responsables de la contaminación del propóleos y es fácilmente detectable. Se debe realizar el raspado del propóleos que se encuentra en las superficies interiores de la colmena: tapa, cuadro y cajas, desechando el que se encuentra en el piso y piqueta, pues generalmente esta muy contaminado. La recolección se debe realizar con las manos y espátula libres de miel, tierra o cualquier otra sustancia que pueda contaminarlo. Durante la cosecha se debe tratar de no exponer el propóleos a la incidencia directa de los rayos solares, evitándose su almacenamiento cerca de fuentes de calor como el ahumador. No debe mezclarse con la cera que se encuentra en la tapa o entre y sobre los marcos.

Métodos de mallas:

Con este método se producen propóleos de mejor calidad.

-Mallas matrizadas: son placas de material plástico de diferentes procedencias y dimensiones en las cuales se encuentran estampadas las ranuras donde se depositará el propóleos. Una vez q las abejas hicieron el trabajo, se procede a retirar las mallas y cosechar el propóleos.

-mallas de tejido mosquitero plástico: Consiste en la utilización de un tejido de hilos plásticos que se termosellan en los bordes antes de comenzar a usar.

Cualquiera de las mallas que se vayan a utilizar pueden ser colocadas y retiradas en cualquier época del año, en función a la zona de recolección.

Para retirar el propóleos se puede congelar entre -10° y -20° C durante por lo menos una hora lo que torna a la resina rígida y frágil, fácil de separar de la malla mediante manipuleo.

En general, se debe evitar que el propóleos se compacte y para lograrlo no se debe comprimir con las manos para formar pelotas, por el contrario se debe mantener granulado, en forma de escamas y/o trozos sueltos.

9.2- **Anexo 2-** Análisis físico-químico de mieles:

-Acidez:

Se pesaron 10g de miel y se agregó 75ml de agua destilada, luego se agito con varilla de vidrio para disolver la muestra y se añadió 3 gotas del indicador fenolftaleína.

Una vez preparada la solución se titula desde bureta con NaOH 0,1N hasta que aparezca una coloración rosada que perdure por unos segundos.

Finalmente se miden los ml gastados de NaOH 0,1N y el resultado se expresa en miliequivalentes de ácido/kg de miel.

-Humedad:

Para realizar está medición se utiliza un refractómetro de Abbe que mide el contenido de humedad de las muestras de miel en relación al índice de refracción,

Para ello se coloca una fina capa de miel sobre el prisma del refractómetro y se procede a realizar la lectura.

Las muestras de miel no deben contener cristales y deben tener una temperatura cercana a los 20°C ya que de ser superior a esta puede interferir en la medición.

-Color:

Para esta determinación se utiliza la miel líquida, ya que la presencia de cristales trae como consecuencia un aclarado del matiz, para ello se calienta la muestra de miel a baño maría a una temperatura de 40°C.

La muestra es introducida en cubetas que se colocan en el equipo que realiza la lectura y se la compara con una escala patrón. El equipo debe ser calibrado con glicerina antes de la lectura.

Para designar los colores se utilizan las siguientes denominaciones:

Blanco Agua	0 - 7,9 mm
Extra Blanco	8 - 16,4 mm
Blanco	16,5 - 33,9 mm
Ámbar Extra Claro	34 - 49,9 mm
Ámbar Claro	50 - 84,9 mm
Ámbar	85 - 113,9 mm
Oscuro	114 - 140 mm

-HMF

1) Preparación del reactivo: Se prepara a partir de 1g de Paratoludina, 5ml de alcohol isopropílico y 1ml de ácido acético. Se deja reposar hasta que se disuelva por completo los granos de Paratoludina para luego medir con pipeta cuanto quedo de reactivo y llevar a 10ml con alcohol isopropílico.

2) Preparación del ácido barbitúrico: Se utiliza al 5% con agua destilada. Se almacena en Heladera y para su uso es necesario que no presente cristales, de ser así se coloca el matraz en un recipiente con agua caliente hasta que se disuelvan los cristales.

3) Preparación de la muestra: Se pesan 2g de miel y se adiciona 5ml de agua destilada luego se disuelve con varilla de vidrio. Una vez disuelta, con pipeta de 10ml se toma el volumen que mide la muestra para luego completar con agua destilada el volumen que falta para llegar a 10ml.

4) Colocar en un tubo: 0,5 ml de solución de la muestra, 1,25 ml de reactivo junto con 0,25 ml de ácido barbitúrico, agitar con un agitador y después de 3 minutos comparar el color con el testigo (color oscuro).

En este caso el testigo es una miel que tiene 15 mg/kg de HMF y se la prepara igual que a las muestras de miel.

9.3- **Anexo 3-** Análisis microbiológicos:

Todas las muestras que van a ser examinadas se deben tratar en todo momento de forma aséptica empleando técnicas que lo permitan.

Preparación de la muestra: Se pesan 10 g de miel y se agregan 90ml de agua peptonada al 0,1%. Se homogeneiza la muestra en Stomacher. En el caso del propóleo se utiliza 0,5ml de extracto con 4,5ml de agua peptonada.

-Recuento de Mesófilos totales: Se toman 1ml de la dilución 1/10 de la muestra y se la coloca en una placa de Petri, luego se agrega el medio fundido y atemperado, agar Plate Count (PCA) y se homogeneiza. Se incuba a 35°C durante 24-18 hs.

-Recuento de Moho y Levaduras: Se toman 1ml de la dilución 1/10 de la muestra y se la coloca en una placa de Petri, se agrega el medio fundido y atemperado YGC (extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol), se homogeneiza y se incuba a 30°C durante 3 días.

-Recuento de Coliformes totales: Se toman 1ml de la dilución 1/10 de la muestra y se la coloca en una placa de Petri, se agrega el medio fundido y atemperado VRB (Violeta Rojo Bilis), se homogeneiza e incuba a 35°C durante 24 hs.

- Investigación de *Salmonella spp*: Se toman 25 g. de muestra dado que estas bacterias no se hallan distribuidas en forma uniforme dentro del alimento. Se trabaja realizando un enriquecimiento previo a partir de 25 g de muestra en 225 ml de caldo lactosado (dilución 1/10), se agita y se incuba a 35°C de 18-24 hs. Luego se realiza un enriquecimiento selectivo, para lo cual se tomó 1 ml del preenriquecimiento y se coloca en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Rapaport Vasiladis. Agitar e incubar a 42-43°C durante 24 hs. El enriquecimiento selectivo en placas consiste en la siembra en estrías en medio agar *Salmonella-Shigella* a partir del tubo anterior. Se incubaron a 35-37 °C durante 24-48 hs. La identificación de colonias sospechosas se realiza mediante pruebas bioquímicas: TSI, LIA, IMVIC, UREA, FERMENTACIÓN DE AZÚCARES, LISINA, ARGININA, ORNITINA, MALONATO

-Recuento de Clostridios Sulfito Reductores: En un tubo de ensayo se coloca un medio diferencial para clostridios y se deja solidificar para luego agregar 1 ml de muestra desde el interior del medio hasta la superficie. Por último se sella con parafina

9.4- **Anexo 4-** Método de difusión en placa por pocillos.

-Se preparan los inóculos a partir de cepas de: *Staphylococcus aureus*

Preparación de inóculo:

- 1) Se parte de cultivos puros y frescos, sembrados en overnight, en agar nutritivo.
- 2) Se arrastra la biomasa con solución Fisiológica.
- 3) Esta suspensión se compara con Escala de Mc Farland hasta alcanzar la turbidez del tubo 0,5.

-Técnica de pocillos en placa:

- 1) Se prepara el medio: Agar Muller Hinton
- 2) Agregar al medio fundido el inóculo.
- 3) Se realizan los pocillos con sacabocados estéril
- 4) Se cargan los pocillos con las muestras a distintas concentraciones.

En cada placa va un pocillo central con un control que en este caso se utilizó extracto de propóleos.

- 5) Se cubren las placas con papel de filtro
- 6) Se incuban a 35-37°C durante 18-24 hs y se procede a realizar la lectura.