

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

DETERMINACION DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA MIEL

por

**Paula FERRER VERA
Macarena MORALES PETERSEN**



TRABAJO FINAL presentado como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
(Orientación Tecnología de los Alimentos)

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

019 TG
Determinación d
Ferrer Vera, Paula



FV/26472

TUTOR de Trabajo Final

Dra. Cristina López

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Nombre completo y Firma

Segundo Miembro (Tutor):

Nombre completo y Firma

Tercer Miembro:

Nombre completo y Firma

Fecha:

Autores:



Macarena Morales
Nombre completo y Firma



PAULA FERRER
Nombre completo y Firma

Agradecimientos

A nuestra tutora Dra. Cristina López por su dedicación y apoyo para poder llevar a cabo nuestro trabajo final.

Al Profesor. Arnaldo Maggi por compartir sus conocimientos y brindar material indispensable para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. José Piaggio por guiarnos, brindarnos todo su apoyo y por el tiempo dedicado.

A todos los productores que nos proporcionaron las muestras.

A la Cátedra de Microbiología de los Alimentos, por permitir la utilización del Laboratorio de Análisis, así como de los instrumentos y aparatos, gracias a los cuales logramos cumplir con la metodología planteada.

A nuestras familias por su incondicional apoyo a lo largo de todos estos años y por no permitir que bajáramos los brazos nunca confiando siempre en nosotras.

A nuestros amigos por acompañarnos en el camino recorrido.

INDICE DE CUADROS

Cuadro I. Límites Microbiológicos.....	23
Cuadro II. Resultado del Recuento de Aerobios Mesófilos en Mieles Alteradas.....	23
Cuadro III. Resultado del Recuento de Aerobios Mesófilos en Mieles Normales.....	25
Cuadro IV. Resultado de la Determinación de Coliformes en Mieles Alteradas.....	26
Cuadro V. Resultado de la Determinación de Coliformes en Mieles Normales.....	27
Cuadro VI. Resultado del Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Alteradas.....	28
Cuadro VII. Resultado del Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Normales.....	29

INDICE DE FIGURAS

Figura I. Recuento de Aerobios Mesófilos en mieles Alteradas. Dilución 1/10.....	24
Figura II. Recuento de Aerobios Mesófilos en mieles Alteradas. Dilución 1/100.....	24
Figura III. Recuento de Aerobios Mesófilos en Mieles Normales. Dilución 1/10.....	25
Figura IV. Recuento de Aerobios Mesófilos en Mieles Normales. Dilución 1/100.....	26
Figura V. Determinación de presencia de Coliformes en Mieles Alteradas.....	27
Figura VI. Determinación de la presencia de Coliformes en Mieles Normales.....	28
Figura VII. Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Alteradas.....	29
Figura VIII. Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Normales.....	30

TABLA DE CONTENIDOS

PAGINA DE APROBACION.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDOS.....	IV
INDICE DE CUADROS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	2
3. <u>ANTECEDENTES</u>	3
3.1 <u>ORIGEN</u>	3
3.2 <u>CLASIFICACION</u>	4
3.2.1 <u>Por su origen botánico</u>	4
3.2.1.1 Miel de flores.....	4
3.2.1.2 Miel de mielada.....	4
3.2.2 <u>Según el procedimiento de obtención</u>	4
3.2.2.1 Miel escurrida.....	4
3.2.2.2 Miel prensada.....	4
3.2.2.3 Miel centrifugada.....	4
3.2.2.4 Miel filtrada.....	5
3.2.3 <u>Según su presentación</u>	5
3.2.3.1 Miel.....	5
3.2.3.2 Miel en panales o miel en secciones.....	5
3.2.3.3 Miel con trozos de panal.....	5
3.2.3.4 Miel cristalizada o granulada.....	5
3.2.3.5 Miel cremosa.....	5
3.3 <u>COMPOSICION</u>	5
3.3.1 <u>Macroelementos</u>	5
3.3.1.1 Contenido de agua.....	5
3.3.1.2 Azúcares.....	6
3.3.2 <u>Elementos trazas</u>	6
3.3.2.1 Enzimas.....	6
3.3.2.2 Acidos orgánicos.....	7
3.3.2.3 Proteínas y aminoácidos.....	7
3.3.2.4 Minerales.....	7
3.3.2.5 Vitaminas.....	7
3.3.2.6 Otros componentes.....	8
3.4 <u>PROPIEDADES DE LA MIEL</u>	8
3.4.1 <u>Características sensoriales</u>	8
3.4.1.1 Color.....	8
3.4.1.2 Sabor y aroma.....	8
3.4.2 <u>Propiedades físico-químicas</u>	9
3.4.2.1 Higroscopicidad.....	9
3.4.2.2 Viscosidad.....	9
3.4.2.3 Tendencia a la cristalización.....	9
3.4.2.4 Densidad.....	10
3.4.2.5 Actividad antibacteriana.....	10
3.5 <u>MICROBIOLOGIA DE LA MIEL</u>	11
3.5.1 <u>Microorganismos propios</u>	11

3.5.2 <u>Microorganismos ocasionales o contaminantes</u>	11
3.6 <u>CONTROL DE CALIDAD DE LA MIEL</u>	13
3.6.1 <u>Consideraciones generales</u>	13
3.6.2 <u>Principios del control microbiológico de los alimentos</u>	14
3.6.2.1 <u>Aerobios mesófilos</u>	14
3.6.2.2 <u>Familia Enterobacteriaceae</u>	15
3.6.2.3 <u>Levaduras</u>	16
4 <u>INTRODUCCION</u>	17
4.2 <u>OBJETIVOS</u>	18
4.2.1 <u>Objetivo particular</u>	18
4.2.2 <u>Objetivo específico</u>	18
5 <u>MATERIALES Y METODOS</u>	19
5.1 <u>MATERIALES</u>	19
5.2 <u>DISEÑO DEL ESTUDIO</u>	19
5.3 <u>ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS</u>	20
5.3.1 <u>Recuento de microorganismos viables totales</u>	20
5.3.1.1 <u>PCA 1/10</u>	20
5.3.1.2 <u>PCA 1/100</u>	20
5.3.2 <u>Detección de coliformes</u>	20
5.3.3 <u>Recuento de hongos y levaduras</u>	21
5.4 <u>ANALISIS ESTADÍSTICO</u>	21
6 <u>RESULTADOS</u>	23
6.1 <u>RECuento DE AEROBIOS MESOFILOS</u>	23
6.2 <u>DETERMINACION DE COLIFORMES</u>	27
6.3 <u>RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS</u>	29
7 <u>DISCUSION</u>	32
8 <u>CONCLUSIONES</u>	33
10 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	34

1. RESUMEN

Como cualquier producto de origen natural, la miel de abejas presenta una flora microbiana propia con un comportamiento microbiológico característico. Es un alimento cuya principal ventaja competitiva en el mercado, más allá de sus propiedades intrínsecas, radica en la imagen que los consumidores tienen respecto de su pureza. Sin bien la carga microbiana de la miel se considera baja, a pesar de su gran concentración de azúcares y su baja actividad agua, no se puede descartar la presencia y proliferación de ciertos microorganismos que podrían actuar en detrimento de la calidad del producto, o bien podrían causar importantes perjuicios al consumidor. En este estudio se analizaron un total de 31 muestras de miel divididas en dos grupos, 13 muestras de mieles alteradas y 18 muestras de mieles normales, con el objetivo de comprobar si las mismas cumplían con los límites microbiológicos establecidos en reglamento Técnico del MER.CO.SUR. de Identidad y Calidad de la Miel. Cada muestra fue sometida a diferentes análisis microbiológicos, los cuales se realizaron por duplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, observándose que algunas muestras correspondientes al grupo de mieles alteradas sobrepasaron los límites microbiológicos establecidos, mientras que la totalidad de las muestras correspondientes al grupo de mieles normales cumplieron con los mismos.

2. SUMMARY

Honey as any other natural product, has its own microbiological flora, but with a special behavior. Besides its own properties, one of the most important benefits of honey is the image that the consumers have of its purity. Even if the number of microorganisms presents is considered very low, compared with other natural products, fact that occurs not only because it is a low water activity product but also because of its high concentration of sugar; we cannot disregard the presence and proliferation of certain number of microorganisms that could cause not only the spoilage of the product but also serious damage to the consumers.

In this experiment, 31 samples of normal and altered honey were used; they were separated in two groups. Were analyzed in order to comprobe if they fulfilled with the recommendations that are exposed in the Technical Regulations of MERCOSUR –Honey Identity and Quality.

This regulation was used as criteria to establish the microbiological status of the honey that was studied.

Considering the results, which were obtained, it is possible to conclude that certain samples corresponding to the spoiled group exceeded the limits exposed in the regulations. However all the samples which come from the group considered as normal fulfilled with the recommendations established.

3. ANTECEDENTES

Según el Codex Alimentarius (2000) se entiende por miel: "sustancia dulce, natural, no fermentada elaborada por las abejas a partir del néctar de flores, plantas y árboles u otras partes florales productoras de néctar; que las abejas recolectan, transforman y combinan con sus propias secreciones, para almacenarla y dejarla en la colmena hasta que se produzca su maduración (Maidana, 2004).

En nuestro país, la legislación vigente se recoge en la Resolución MERCOSUR 89/99, Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel y cuyo texto es el siguiente: Se entiende por miel el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de 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 dejan madurar en los panales de la colmena (Fierro y col, 2003).

Como todo producto natural es completo y no necesita de ningún tipo de agregado para ser mejorado. Por lo que cualquier agregado de alguna sustancia natural o artificial no sólo será inútil sino contraproducente, pues deteriorara su calidad. Por ello es que la legislación vigente prohíbe expresamente todo agregado a la miel (Massicot, 1990).

3.1. ORIGEN DE LA MIEL

La miel proviene de la savia elaborada, materia prima de la miel, la cual es extraída de los vasos del liber que la contiene de dos maneras: por los nectarios (glándulas secretoras de los vegetales, los cuales pueden ser florales, situados en las distintas partes de la flor, o extraflorales situados en las regiones vegetativas de las plantas) elaboradores de néctar (solución acuosa, azucarada), y por los insectos picadores y chupadores, exudando melaza (Bravo y col, 1994).

Estos productos son recogidos por las abejas, para lo cual utilizan la trompa, órgano equivalente a la lengua, con la cual toman las pequeñas gotas de néctar, almacenándolo en el buche, pequeña bolsa elástica que poseen separada del aparato digestivo, donde se mezclan con enzimas (invertasas) procedentes de las glándulas salivares que inician el proceso de transformación de las sustancias melíferas, en miel. Para llenar el buche es necesario el aporte del néctar de 1.000-1.500 flores. La abeja, si lo necesita, puede tomar algo de néctar del buche para su propio alimento, pero la mayor parte irá a la colmena, donde lo regurgitará pasándolo boca a boca a otras obreras, fenómeno conocido como trafalaxia. Dichas obreras continúan el proceso al enriquecer la bola del néctar con más enzimas, hasta que finalmente la depositan en celdilla (Bravo y col, 1994).

La transformación bioquímica que lleva a la formación de la miel se acompaña de una deshidratación progresiva. El contenido en materia seca pasa de un 30-40 % a un 82-84 %, por evaporación del agua, lo cual consiguen las abejas gracias a una energética ventilación producida con sus alas. De esta manera las abejas han resuelto el difícil problema de la conservación de la miel, concentrando el néctar y disminuyendo así el riesgo de alteración por levaduras (Bravo y col, 1994).

Posteriormente las abejas cierran la celdilla con cera (operculación) Como una forma de protección para su almacenamiento definitivo (Bravo y col, 1994).

La constitución química de los azúcares se irá transformando. En particular la sacarosa dará como resultado una mezcla de glucosa y fructosa bajo la acción de la invertasa (Bravo y col, 1994).

De esta manera, con la deshidratación y la acción de la invertasa, que sigue actuando en el néctar almacenado, es como se consigue la miel (Bravo y col, 1994).

3.2 CLASIFICACION (Maidana, 2004)

La miel se puede clasificar por medio de la utilización de diferentes criterios.

3.2.1 Por su origen botánico

3.2.1.1 Miel de flores

Obtenida principalmente de los néctares de las flores. Se distinguen entre ellas mieles uniflorales o monoflorales, las cuales procederían primordialmente de flores de una misma familia, género o especie y poseerían características fisicoquímicas y microscópicas propias. También se distinguen las mieles multiflorales, poliflorales o milflores

3.2.1.2 Miel de mielada

Obtenida primordialmente a partir de secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que se encuentran sobre ellas.

3.2.2 Según el procedimiento de obtención

3.2.2.1 Miel escurrida

Obtenida por escurrimiento de los panales desoperculados, sin larvas.

3.2.2.2 Miel prensada

Obtenida por prensado de los panales sin larvas.

3.2.2.3 Miel centrifugada

Obtenida por centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.

3.2.2.4 Miel filtrada

Es la que ha sido sometida a un proceso de filtración sin alterar su valor nutritivo.

3.2.3 Según su presentación

3.2.3.1 Miel

En estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas.

3.2.3.2 Miel en panales o miel en secciones

Es aquella almacenada por las abejas en celdas operculadas de panales nuevos construidos por ellas mismas que no contengan larvas y comercializada en panal entero o en secciones de tales panales.

3.2.3.3 Miel con trozos de panal

Es aquella que contiene uno o más trozos de panales con miel, exentos de larvas.

3.2.3.4 Miel cristalizada o granulada

Es la que ha experimentado un proceso natural de solidificación como consecuencia de la cristalización de la glucosa.

3.2.3.5 Miel cremosa.

Es aquella que tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura y que la haga fácil de untar.

3.3 COMPOSICION

Químicamente la miel esta integrada por una serie de componentes de distinto origen (Massicot, 1990).

3.3.1 Macroelementos

3.3.1.1 Contenido de Agua

El contenido de agua varía considerablemente, el mismo puede fluctuar entre un 13 y 25 % (Bravo y col, 1994).

Es un parámetro de clasificación de calidad por cuanto condiciona la cristalización e indirectamente la fermentación, ya que la cristalización aumenta el contenido acuoso lo que la hace susceptible al ataque microbiano (Bravo y col, 1994).

En los panales de cera operculados el contenido de agua oscila entre un 17% y 18%, sin embargo, no es raro encontrar mieles operculadas con un 15% de agua y otras con un 22% a 23%. Esta cifra varía, de hecho, de una región a otra y de un país a otro (Bravo y col, 1994).

Después de la desoperculación realizada por el apicultor para recoger la miel, el contenido en agua puede oscilar entre un 14% y 25% según las condiciones higroscópicas ambientales que favorezcan la evaporación o absorción del agua (Bravo y col, 1994).

Para una buena conservación, el contenido ideal se sitúa entre un 17%-18%. Cuando tienen más de un 20% hay que considerar a estas mieles de calidad inferior, produciéndose cambios notables en la viscosidad y densidad principalmente (Bravo y col, 1994).

3.3.1.2 Azúcares

Constituyen el componente que se encuentra en mayor medida en la miel representan el 95-99% de la materia seca de la misma, contribuyendo al poder antiséptico que obstaculiza cualquier fermentación intestinal. Están representados por monosacáridos, hexosas, disacáridos y otros azúcares superiores. Dentro de los primeros constituyen la glucosa y la fructosa la parte más importante, ya que se encuentran en la proporción de un 80% o un 90% del total. Ambos directamente asimilables por el organismo y transformados en energía (Bravo y col, 1994).

3.3.2 Elementos trazas

3.3.2.1 Enzimas

La existencia de enzimas en la miel es de gran importancia. La presencia o ausencia de éstas ayuda a determinar la calidad de la miel y su estado de envejecimiento, ya que la actividad de las mismas disminuye con la edad (Dustmann, 1993).

Las enzimas de la miel pueden provenir de la propia abeja, del polen, del néctar, o aún de levaduras y microorganismos. Las más importantes son las agregadas por la abeja al convertir el néctar en miel (White, 1967).

La invertasa, también conocida como sucrosa o sacarasa, descompone la sucrosa o sacarosa en los azúcares simples, componentes de la miel, glucosa y fructosa. Otra enzima presente es la diastasa, que desdobra el almidón. Se encuentra en diferentes cantidades y es indicativo del grado de frescura, envejecimiento o sobre calentamiento (Maidana, 2004). Además de la anterior la miel cuenta con una enzima capaz de desdoblar a la glucosa denominada glucooxidasa. Esta convierte la glucosa en una sustancia afín, una glucolactona, que a su vez forma el ácido glucónico, el principal ácido de la miel. Además de glucolactona, esta enzima forma peróxido a partir de la glucosa (White, 1967). Otras enzimas existentes en la miel son la catalasa y la fosfatasa (Pesok, 1987; Maidana, 2004).

Todas estas enzimas pueden ser debilitadas o destruidas por el calor, por ello se suele determinar el nivel de diastasa presente en la miel para indicar un posible calentamiento, así como también es un indicador del grado de

frescura y envejecimiento. Es, por consiguiente un factor de calidad (Maidana, 2004).

3.3.2.2 Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos son sustancias que se forman por la acción de secreciones salivares de la abeja y en los procesos enzimáticos y fermentativos. Actúan como poderosos antisépticos por lo que participan igualmente en la actividad microbiana de la miel (Bravo y col, 1994)

Todas las mieles tienen, por lo tanto, un pH ácido situado entre 3,5 y 5,5 (Maggi y col, 1988; Maidana, 2004). Contienen ácidos orgánicos libres o combinados en forma de lactonas. El principal ácido orgánico es el ácido glucónico, detectándose también la presencia del ácido butírico, acético, málico y fórmico, que en dosis muy débiles son uno de los factores antibióticos. (Bravo col, 1994).

3.3.2.3 Proteínas y aminoácidos

Representan una pequeña proporción (que no reviste importancia desde el punto de vista alimenticio) y se encuentra vinculado a la cantidad de polen existente en la miel (Bravo y col, 1994; White, 1967).

Se han detectado 17 aminoácidos libres, siendo los más importantes: tripsina, leucina, histidina, alanina, glicina, metionina y ácido aspártico (Bravo y col, 1994).

Se sabe que los aminoácidos reaccionan con el calor dando los conocidos compuestos de Maillard los cuales aparecen como sustancias amarillas o pardas. Parte del oscurecimiento de la miel por el paso del tiempo o por calentamiento podría deberse a esto (White, 1967).

3.3.2.4 Minerales

Cuando la miel se seca y se quema invariablemente queda un residuo de cenizas, este es el contenido mineral (White, 1967). Su contenido depende del origen y tiene una marcada relación con el sabor y la acidez. La proporción de sales minerales es aparentemente insignificante, aproximadamente un 0,2%, pero posee gran valor alimenticio. Se han encontrado: calcio, magnesio, potasio, hierro, fósforo y silicio (Bravo y col, 1994).

3.3.2.5 Vitaminas

En general, puede decirse que la miel es pobre en vitaminas, sobretudo en aquellas muestras que están bien procesadas en cuanto a su clarificación y filtrado, pues en dicho proceso se le quitan los granos de polen que son quienes le aportan la riqueza vitamínica. Principalmente poseen vitaminas hidrosolubles del grupo B, vitamina C, ácido fólico y nicotínico. Pero

fundamentalmente posee vitamina A (antixeroftálmica), E y K (antihemorrágica) (Bravo y col, 1994).

3.3.2.6 Otros componentes.

Se destacan hormonas, pigmentos y sustancias aromáticas, que contribuyen al poder antiséptico de la miel. También posee sustancias en estado de solución y junto a los coloides, elementos figurados como granos de polen, levaduras, granos de almidón, esporas y polvo mineral (Bravo y col, 1994).

Otra sustancia que posee es el hidroximetilfulfural que no es un componente normal de la miel, sin embargo, se forma fácilmente a partir de los azúcares dependiendo su concentración final, tiempo, temperatura, pH, humedad y contenido inicial del mismo. Permite tipificar la miel y posibilita el descubrimiento de la adición fraudulenta de azúcar invertida (Maidana, 2004).

3.4 PROPIEDADES DE LA MIEL

Las propiedades de la miel pueden dividirse en aquellas propiedades que le imprimen las características sensoriales al producto, y en aquellas propiedades químicas y físicas que son quienes en gran medida van a dar lugar a las primeras (Maidana, 2004).

3.4.1 Características sensoriales

Las que mejor describen a una miel son el color, el sabor, la fluidez y la granulación (Maidana, 2004)

3.4.1.1 Color

El color es una característica importante en la evaluación de la calidad de los alimentos, siendo el aspecto que más sobresale y el que mayor importancia tiene desde el punto de vista comercial. Es el único parámetro sensorial, dentro de la legislación, que es objeto de una codificación precisa. Se debe a las materias pigmentarias, como el caroteno y las xantófilas, se intensifica durante el envejecimiento o el calentamiento (Lozano y col., 1994)

3.4.2.2 Sabor y aroma

Ambos parámetros varían fundamentalmente en función del tipo de flor, la región geográfica y del clima (Maidana, 2004).

Las sustancias que colaboran a la producción del gusto y del aroma de la miel no son bien conocidas y entre otras aparecen: terpenos, aldehídos, alcoholes, todas ellas en cantidades mínimas y muy volátiles (Bravo y col., 2004).

3.4.2 Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas características de la miel, alta viscosidad, relativamente alta densidad, tendencia a absorber la humedad del aire y a la cristalización así como también la inmunidad a cierto tipo de deterioro (actividad antibacteriana) radica en el hecho de que es naturalmente una solución muy concentrada de azúcares (White, 1967).

3.4.2.1 Higroscopicidad

Es la tendencia que tiene la miel de absorber y retener la humedad. Todos los azúcares poseen esta propiedad en mayor o en menor grado, pero la mayor capacidad le corresponde a la fructosa, que es el más abundante de los azúcares que tiene la miel y a la cual debe su carácter en forma notable. Su higroscopicidad es tal que una miel con un 18% de agua se encuentra en equilibrio en una atmósfera cuya humedad relativa sea del 60% en la cual no se da intercambio (Bravo y col, 1994).

3.4.2.2 Viscosidad

Es la propiedad que tiene la miel para fluir más o menos rápidamente en el recipiente que la contiene. Está influenciada por la temperatura, alcanzando su máxima fluidez alrededor de los 38°C, disminuyendo lentamente hasta llegar aproximadamente entre 48 y 50 °C, a un punto en el que ya no hay variación. También esta controlada por la humedad y cuanto menor sea el contenido de agua mayor será la viscosidad (Bravo y col, 1994).

3.4.2.3 Tendencia a la cristalización

Cuando en un medio líquido, en el caso de la miel es el agua, se va incorporando un sólido (los azúcares), estos se van disolviendo hasta que llega un punto a partir del cual no se verifica más disolución y al seguir agregando soluto se dice que la solución está sobresaturada. En estas condiciones el medio es inestable y va a tender al equilibrio. Dicho equilibrio lo logra liberando el exceso de soluto (Massicot, 1990).

Tales son las condiciones de la miel, por ello es que toda miel espontáneamente tiende a cristalizar, ahora bien, como la glucosa es menos soluble en agua que la fructosa, es a partir de aquella que se origina la cristalización si bien puede realizarse también a partir de granos de polen, partículas de polvo, coloides, etc. El número de cristales iniciales (núcleos de la cristalización) que desencadenan el fenómeno es sumamente importante en el resultado final de la cristalización y harán que esta sea rápida y fina, en

cambio si los núcleos son escasos el fenómeno se verificara en forma lenta y gruesa (Massicot, 1990).

La cristalización es un fenómeno natural y no significa que sea defectuosa. La miel no cristaliza por debajo de 5°C ni por encima de 25°C. La temperatura optima de cristalización es de 14°C, debiéndose evitar el intervalo de 12 a 16°C si se quiere preservarla de este fenómeno (Root y col, 1973).

Es un factor a tener en cuenta debido a que los hábitos de consumo llevan a que los consumidores rechacen aquellas mieles granuladas y opten por las que se presentan en estado líquido (Root y col, 1973).

Para evitar este fenómeno se podría someter el producto a un proceso de pasterización, el cual consiste en someter a la miel a un choque térmico elevado (78-82°C.), de baja duración (2-3 minutos), que destruye la mayor parte de las estructuras cristalinas iniciales que favorecen la total o parcial cristalización de la miel permitiendo que permanezca líquida por mas tiempo. Sin embargo, si consideramos a la miel como un alimento vivo hay que indicar que la pasterización la convierte en un producto en el que se ha reducido su riqueza enzimática que es la verdadera garantía de un correcto procesado y el fundamento de la acción bacteriostática de la misma. La pasterización destruye las levaduras, los cristales, un 80% de la invertasa y el 25% de la amilasa, no modifica los azúcares y provoca la formación de hidroximetilfurfural (Prost, 1995).

3.4.2.4 Densidad

Se encuentra en estrecha relación con la humedad y varía con el porcentaje de ésta y la temperatura, está comprendida entre 1,410 y 1,435 (Bravo y col, 1994).

Una miel recolectada demasiado pronto o bien extraída en un local húmedo, contiene mucho agua, defecto que se descubre mediante la determinación de este parámetro. Las mieles poco densas tienen humedad elevada y son propensas a la fermentación (Bravo y col, 1994).

3.4.2.5 Actividad antibacteriana

La miel no es un medio conveniente para las bacterias por dos razones, fundamentalmente por su acidez y por otro lado porque contiene demasiado azúcar para que puedan desarrollarse las bacterias (White, 1967; Pesok, 1987; Bravo y col, 1994; Smittle y col, 1992, Salamanca y col, 2001).

También se ha detectado un grupo de sustancias conocidas con el nombre genérico de inhibina con poder bactericida. Su modo de acción no ha podido ser descifrado totalmente, pero lo que sí se conoce es que el efecto inhibitor

resulta de la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel diluida. Esta sustancia, es un derivado de la formación de ácido glucónico en la miel producido por un sistema natural de enzimas: glucosa- oxidasas. El peróxido de hidrógeno puede inhibir el desarrollo de ciertas bacterias en la miel líquida (White, 1967; Bravo y col, 1994).

La inhibina es una sustancia termolábil y fotolábil, de modo que una miel expuesta a los rayos solares o una temperatura elevada pierde sus propiedades antisépticas (White, 1967; Pesok, 1987; Bravo y col, 1994; Salamanca y col, 2001).

La cantidad de inhibina (acumulación de peróxidos) depende del tipo floral, edad y calentamiento (White, 1967).

3.5 MICROBIOLOGIA DE LA MIEL

La miel de abejas es un alimento cuya principal ventaja competitiva en el mercado, más allá de sus propiedades intrínsecas, radica en la imagen que los consumidores tienen respecto de su pureza (Fierro y col, 2003), pero de todas formas como cualquier producto de origen natural, presenta una flora microbiana propia, con un comportamiento microbiológico característico (Salamanca y col, 2001).

Además se debe considerar su naturaleza pegajosa y adherente, lo cual asegura que las esporas que puedan provenir del piso o de actividades propias de la abeja permanezcan allí por tiempo indeterminado (Huhtanen, 1991).

La flora microbiana puede dividirse en dos grupos, por un lado los microorganismos propios de la miel y en segunda instancia los microorganismos ocasionales o contaminantes (Salamanca y col, 2001).

3.5.1 Microorganismos propios

Las bacterias presentes en la miel pertenecen fundamentalmente al género *Bacillus* que se presentan en estado esporulado, aunque en mieles recientes también pueden estar en forma vegetativa (Salamanca y col, 2001)

En el caso de los mohos, pertenecen al género *Penicillium* y *Mucor*. Las levaduras, pertenecen al género *Sacharomyces* (Smittle y col, 1992; Salamanca y col, 2003).

3.5.2 Microorganismos ocasionales o contaminantes

Durante la extracción y recolección, las fuentes de contaminación residen en la manipulación incorrecta de la miel, el uso de material con pobre desinfección, etc.

Entre estos microorganismos existen diferentes géneros, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. También se ha podido detectar la presencia de bacterias del género *Salmonella*, las cuales son capaces de resistir 34 días en la miel, cuando está se mantiene a 10 °C (Salamanca y col, 2001). Pero el riesgo fundamental lo reviste la posible presencia de esporas de *Clostridium botulinum*, que serían las causantes de botulismo del lactante. Dichas esporas pueden crecer y producir toxinas en el intestino de los lactantes, pero no se han encontrado toxinas preformadas en la miel (Smittle y col, 1992). El botulismo del lactante a diferencia del botulismo clásico es causado por la ingestión de esporas viables de *Clostridium botulinum* que luego se desarrollan en el intestino de niños menores a un año. Estos niños son especialmente susceptibles debido a que su pH intestinal permite el desarrollo y multiplicación del microorganismo (Huhtanen y col, 1981; Kautter y col, 1982; Guilfoyle y Yager, 1983; Huhtanen, 1991).

Si bien la carga microbiana de la miel, en principio, se puede considerar baja, si se compara con otros alimentos de origen animal; debido fundamentalmente a la gran concentración de azúcar y a la baja actividad agua, no se debe descartar la presencia y proliferación de los microorganismos antes mencionados que podrían actuar en detrimento de la calidad del producto, o bien podrían causar importantes perjuicios al consumidor (Salamanca y col, 2001).

Una alteración importante que puede sufrir la miel debido a la presencia de microorganismos es la fermentación. La misma es originada por la germinación y desarrollo de levaduras que se encuentran normalmente en ella. Estas levaduras, que pueden encontrarse en el suelo de cualquier apiario, en el lugar donde se almacena la miel y en la colmena. Tienen la particularidad de que son capaces de crecer con grandes concentraciones de azúcar, y se le llaman por ello osmofílicas (Root y col, 1973; White, 1967; Bravo y col, 1994).

El contenido de agua en la miel es uno de los factores relacionados con el deterioro por fermentación. Los otros son el grado de contaminación por esporas de levaduras (recuento de levaduras) y la temperatura de almacenamiento (Root y col, 1973; White, 1967; Bravo y col, 1994).

La miel con menos de 17% de agua no fermentará durante un año, independientemente del grado de contaminación con levaduras. Un contenido de agua mayor al 19 % podría provocar la fermentación de la miel aún con un recuento muy bajo de levaduras (White, 1967).

Otro factor a tener en cuenta es el sitio donde la miel va ser almacenada, se ha comprobado que cuando la miel es almacenada en lugares donde el porcentaje de humedad relativa es mayor que un 60%, el contenido inicial de agua aumenta, y las levaduras crecen aeróbicamente en la superficie multiplicándose rápidamente, dejando una capa espumosa. El aumento del contenido de agua en el interior de la miel es más lento así como también el crecimiento de las mismas (White, 1967).

3.6 CONTROL DE CALIDAD DE LA MIEL

3.6.1 Consideraciones generales

En el caso de la miel como de cualquier otro alimento son varios los parámetros que debe cumplir para ser considerada como un alimento de buena calidad.

La miel deberá estar exenta de sustancias inorgánicas u orgánicas extrañas a su composición tales como insectos, larvas, granos de arena y no exceder los máximos niveles tolerables para contaminaciones microbiológicas o residuos tóxicos. Su preparación deberá realizarse de conformidad con los Principios Generales sobre Higiene de Alimentos recomendados por la Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS (Reglamento MER.CO.SUR, 1999).

La miel de acuerdo a la legislación de la mayoría de los países sobre todo europeos; debe ser pura, genuina y no debe estar alterada. Ello quiere decir que no se le puede agregar ni sustraer ningún tipo de sustancia. El apicultor debe asegurarse de que la miel no contenga ningún agregado ni residuos de antibióticos o pesticidas (Dustmann, 1993; Reglamento MERCOSUR, 1999; Fierro y col, 2003; Maidana, 2004).

La miel que se destine a consumo humano debe estar madurada es decir que más de la mitad de las celdillas deberían estar operculadas al momento de la extracción de la misma. Este criterio está estrechamente asociado con el contenido de agua, enzimas y otras sustancias orgánicas. Debe tener como máximo un 20% de humedad (Dustmann, 1993; Reglamento MERCOSUR, 1999; Fierro y col, 2003; Maidana, 2004).

Se le debe suministrar un empaque adecuado con el fin de brindarle una adecuada protección, pero a su vez debe ser atractivo el cual debe ir acompañado de un correcto etiquetado. La información que suministrara la etiqueta debe ir de acuerdo con las exigencias de cada país. De acuerdo con el Standard europeo de mieles y la legislación nacional en la mayoría de los países, en la etiqueta de todas aquellas mieles que vayan a ser presentadas al consumidor debe figurar el *nombre del producto*, en este caso miel, el *peso*, el nombre del *apicultor* o en su defecto del *distribuidor*. En caso de tratarse de mieles monoflorales debe especificarse el nombre botánico de la planta que le da origen (Dustamann, 1993; Maidana, 2004)

El aseguramiento de la calidad de la miel se inicia en la producción, en el apiario, y lo que no se logre en dicha etapa no se podrá mejorar más adelante. Por ello es que se deben aplicar las buenas prácticas de manejo y manufactura en las distintas etapas del proceso productivo y comercial (Fierro y col, 2003). Se denominan Buenas Prácticas de Manejo y Manufactura (BPM; GMP) a todas aquellas acciones tendientes a reducir los riesgos microbiológicos, físicos y químicos durante la producción, cosecha, extracción, transporte, almacenamiento y procesamiento (Fierro y col, 2003).

La producción bajo buenas prácticas, asegura a los consumidores un producto sano y apto (inocuo) para el consumo humano, protegiendo además el medio ambiente y la salud de los trabajadores (Fierro y col, 2003).

La importancia fundamental sobre el cumplimiento de dichas prácticas se basa en el hecho de evitar las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (E.T.A.s) las cuales según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se definen como: “ el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (microorganismos, parásitos) o no biológicos (plaguicidas o metales pesados), en cantidades tales que afecten la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupos de personas. Según Bryan las E.T.A.s (OMS) incluyen *infecciones e intoxicaciones* (Rey y Silvestre, 2002).

Las infecciones alimentarias son las producidas por la ingestión de alimentos y/o agua con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos o parásitos que en la luz intestinal pueden multiplicarse, lisarse, producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas. Mientras que una intoxicación es la causada por la ingestión de toxinas preformadas en los tejidos de plantas o animales o por la ingestión de productos metabólicos de los microorganismos o de sustancias químicas.

Dichas enfermedades constituyen un riesgo muy importante para la población (Rey y Silvestre, 2002).

3.6.2 Principios del control microbiológico de los alimentos

Desde el punto de vista microbiológico los alimentos elaborados y los alimentos de consumo directo no podrán contener:

1. Microorganismos patógenos
2. Toxinas u otro metabolitos microbianos actual o potencialmente peligrosos
3. Agentes microbianos capaces de causar alteración y que la tecnología exigible para su eliminación debió eliminar
4. Cualquier tipo de microorganismo que por su cantidad, o por sus cualidades indique una manipulación defectuosa, malas condiciones higiénicas o haga presumir la presencia de microorganismos patógenos.

(Reglamento Bromatológico Nacional, 1994)

3.6.2.1 Aerobios mesófilos

Se definen como el grupo de bacterias que crecen en placa de agar a 30-37°C (coincidente con la temperatura corporal), pueden ser considerados como indicadores microbiológicos de la calidad de los alimentos. Indican si la limpieza, desinfección y el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado en

forma adecuada. Esta determinación permite también obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos, su probable vida útil. Así mismo resulta adecuada cuando se desea poner de manifiesto el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de los alimentos.

La presencia de un número elevado de estas bacterias, significa que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal (ICMSF, 1982)

3.6.2.2 Familia *Enterobacteriaceae*

El empleo de las enterobacterias como microorganismos indicadores se basa en que estas bacterias son destruidas por los tratamientos de pasteurización, térmicos o clorado de las aguas con gran facilidad. Por esto, la presencia de altos valores de enterobacterias en los alimentos es síntoma de fallos en el proceso de elaboración o de conservación que pueden acarrear riesgos para el consumidor (ICMSF, 1982).

La familia *Enterobacteriaceae* se divide en dos grupos:

- coliformes totales
- no coliformes.

El grupo coliforme incluye aeróbicos y anaeróbicos facultativos, gram negativos, no esporulados, capaces de fermentar a la lactosa, formando ácido y gas a 35°C a las 48 hs (ICMSF, 1982).

La presencia de coliformes en los alimentos es un indicador útil de la contaminación luego de la sanitización y del procesamiento. La presencia de los mismos en el alimento denota una falla en la aplicación de las buenas prácticas de manufactura (Hitchins y col, 1992).

Los coliformes totales a su vez se dividen en:

- fecales o termo resistentes
- no fecales

El grupo de coliformes fecales esta restringido a microorganismos que crecen en el tracto gastrointestinal de los humanos y animales de sangre caliente. Este grupo incluye miembros de al menos tres géneros: *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Muchos trabajos sugieren la enumeración de *Escherichia coli* como un índice de contaminación fecal (Hitchins y col, 1992). La supervivencia de esta bacteria en medios de cultivos específicos es limitada por lo que su presencia indica una contaminación reciente. Por estas razones *E. coli* es el microorganismo indicador ideal (microorganismo indicador es aquel cuya presencia alerta de la posible existencia de un microorganismo patógeno relacionado ecológicamente con él, por ejemplo *E. coli* es índice de *Salmonella typhi*) (ICMSF, 1982).

Otro género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* es el género *Salmonella* el cual es predominantemente de origen fecal pero no se detecta mediante las "pruebas para coliformes" (ICMSF, 1982).

Hasta el momento, existen más de 1600 serotipos y constantemente se están añadiendo a la lista serotipos nuevos (Joint FAO/WHO, 1968). La presencia de uno cualquiera de los serotipos de salmonellas en un alimento deberá ser considerado como un peligro potencial. Los distintos serotipos difieren, sin embargo, en su virulencia para el hombre. La presencia de dicha bacteria cualquiera sea su número en un alimento preparado para el consumo, se considera siempre como un peligro grave para la salud (ICMSF, 1982).

3.6.2.3 Levaduras

Las levaduras y los mohos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad, y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo los alimentos ácidos y en los de baja actividad agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando importantes pérdidas por alteración (I.C.M.S.F, 1982; Mislivec y col, 1992).

Los líquidos azucarados son en general más susceptibles a la acción de las levaduras que de las bacterias. La miel debido a su elevada concentración de azúcar impide el desarrollo de las levaduras comunes, sin embargo existe un grupo de levaduras denominadas osmofílicas, que son capaces de crecer en la miel, y que son las responsables del deterioro de la miel por fermentación (Root y Root, 1945). Los términos osmo - y xero - tolerantes deberían ser usados para definirlos en lugar del término osmofílicas, ya que no presentan un requerimiento absoluto de la presencia de grandes concentraciones de azúcar ni de baja actividad agua, pero son capaces de tolerar mejor que otros microorganismos dichas condiciones. De todas maneras se utiliza el término osmofílicas, para evitar confusiones (Baross y Lenovich, 1992).

Las levaduras crecen más rápidamente que los mohos pero con frecuencia junto a ellos. Mientras que los mohos son casi siempre aerobios estrictos, las levaduras generalmente crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (I.C.M.S.F, 1982).

4 INTRODUCCION

Desde hace varios milenios la miel ha sido utilizada no sólo como un alimento de excelente calidad, sino que también como un destacado rubro comercial derivado de la producción animal (Maggi y col, 1988).

Las condiciones climáticas que posee el Uruguay son muy favorables para el desarrollo de la apicultura en todo su territorio, tanto en lo que se refiere a clima como a flora. Esta última da lugar mayormente a mieles de primera calidad y reconocidas a nivel de distintos mercados internacionales; teniendo mucha aceptación en consumidores tan exigentes como los de la Unión Europea (Junagra, 2003). Nuestro país ha experimentado un gran crecimiento en cuanto a volumen de producción y exportación en la última década, lo que ha llevado a la apicultura a posicionarse como uno de los rubros agropecuarios más importantes y que genera grandes ingresos para el país.

En razón de que el consumo interno no es significativo, el 95-99% de la producción se destina a la exportación; resta un importante saldo exportable, que se vende un 98% a granel y sólo un 2% como miel fraccionada, cuyo principal destino son la Unión Europea y Estados Unidos (Harriet y col, 2005). Las exportaciones de miel uruguaya durante el 2003 alcanzaron un valor cercano a los 25 millones de dólares, con una producción de 11 mil toneladas (Junagra, 2003), en el 2004 se exportaron 12437 toneladas. (Harriet y col, 2005). Estos factores determinan que sea fundamental el logro de una calidad uniforme basada en las exigencias de cada mercado destinatario. Se sabe que los elementos determinantes de la competitividad del sector son los aspectos sanitarios de la colmena, el nivel tecnológico de las instalaciones y el establecimiento de estándares de calidad y diferenciación de productos para su comercialización (Junagra, 2003).

Dado los riesgos que se ciernen sobre nuestra posición de país exportador y en función de los crecientes requisitos de calidad e inocuidad que los clientes y mercados van demandando es que consideramos de suma importancia el estudio de la Calidad Microbiológica de la Miel con el fin de asegurar una mayor y mejor conservación; pero fundamentalmente por el hecho de que dicho producto no constituya una fuente de E.T.A. (Fierro y col, 2003).

En Uruguay no existe aún ninguna clase de reglamentación que establezca los límites microbiológicos para la miel. En el Reglamento Bromatológico Nacional se establecen los parámetros físico químicos que debe cumplir pero no existen especificaciones en cuanto a la calidad microbiológica. Por lo tanto nos basaremos en los criterios microbiológicos que se establecen en el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel. Dicho reglamento establece los requisitos que debe cumplir la miel para consumo humano que se comercialice entre los Estados Partes del MERCOSUR.

A través de este trabajo nos proponemos ampliar la base de información sobre el tema para poder estandarizar la calidad microbiológica de las mieles

uruguayas, basándonos en fundamentos científicos comprobados internacionalmente.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo particular

Determinar y cuantificar la calidad microbiológica de muestras de mieles tanto normales como alteradas.

4.2.2 Objetivo específico

Comparar los resultados obtenidos con los límites establecidos en el Reglamento Técnico del MER.CO.SUR de Calidad e Identidad de la Miel.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 MATERIALES

- Autoclave All American Modelo 25 x
- Balanza analítica Modelo Precisa 3000 C – 6000 D
- Estufa para incubación de hongos Modelo Pablo Ferrando
- Estufa para incubación de bacterias Modelo Electrolux
- Stomacher Modelo 400 Laboratory Blender
- Contador digital Sartorius Modelo SM 17649
- Mechero de Bunsen
- Pipetas graduadas
- Tubos de ensayo
- Extendedores
- Bolsas estériles
- Placas de petri descartables
- Medios de cultivo
- Suero fisiológico

5.2 Diseño del estudio.

El mismo fue llevado a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Departamento de Calidad Agroalimentaria de la Facultad de Veterinaria Universidad de la República.

Para este estudio se utilizaron 31 muestras de miel proporcionadas por productores y adquiridas a nivel comercial (supermercados y ferias municipales) las cuales fueron numeradas. Se realizó una planilla en la cual se incluyeron datos sobre el origen de las muestras, año de cosecha, etc. Posteriormente fueron sometidas a un análisis sensorial lo que permitió la clasificación de las muestras en dos grupos, uno correspondió a mieles normales y el otro a alteradas. El uso de mieles alteradas fue llevado a cabo con el propósito de verificar resultados que excedieran los límites microbiológicos establecidos.

Luego fueron sometidas a los diferentes análisis microbiológicos. Los cuales se realizaron por duplicado para cada muestra.

5.3. ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.

Para la realización de dichos análisis las muestras se prepararon en bolsas plásticas estériles que contenían 90ml. de suero fisiológico estéril (diluyente) y 10 gr. de la muestra. Ambos fueron tomados asépticamente, para luego ser introducidos en un homogenizador (*Stomacher*), que actúa golpeando rítmicamente la mezcla de alimento y diluyente logrando una muestra homogénea, obteniéndose así una dilución 1/10 o solución madre. De la

dilución inicial (1/10) se tomó un ml y se diluyó en 9 ml de suero fisiológico obteniendo de esa forma una segunda dilución 1/100 (I.C.M.S.F., 1982)

5.3.1 Recuento de microorganismos viables totales (Aerobios Mesófilos)

Para ello se utilizó la Técnica de Recuento Estándar en Placa. Esta Técnica se basa en el principio de que cada bacteria viable formará una colonia sobre la placa del medio de cultivo. El método de siembra utilizado fue el de placa vertida y el medio de cultivo el Agar para Recuento en Placa Estándar (PCA). Este un medio de Métodos Estándar usado para la enumeración de microorganismos viables en agua y alimentos. Está preparado con los ingredientes seleccionados en el protocolo de la American Public Health Association (Manual Difco, 1984).

5.3.1.1. PCA 1/10.

Se tomó 1 ml de la dilución 1/10 y se sembró en la placa a la cual posteriormente se le añadió el medio de cultivo.

5.3.1.2 PCA 1/100.

Se tomó 1 ml de la solución 1/100 para luego realizar el mismo procedimiento que el utilizado para la dilución 1/10.

Se añadió el medio de cultivo, se realizaron movimientos circulares y se dejó solidificar la muestra. Luego se llevó a la estufa para su incubación a 37°C durante 48 horas.

El número de colonias (en nuestro caso) se cuantifico empleando el contador digital.

En cada placa se realiza el recuento de las unidades formadoras de colonias (u.f.c). Dicho parámetro surge de multiplicar el número de colonias contadas en la placa por la dilución y por el inóculo (ml) (I.C.M.S.F., 1982).

5.3.2 Detección de Coliformes

La Técnica empleada fue la de Recuento en Placa de Agar y el medio de cultivo utilizado fue el Mc Conckey Agar. Este es un medio diferencial de siembra recomendado para uso en el aislamiento y diferenciación entre organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa, de bacterias entéricas Gram.- negativas. El principio del método se basa en la acción diferencial de Mc Conckey Agar que consiste en la fermentación de lactosa. Las colonias de microorganismos capaces de fermentar lactosa producen un descenso localizado del pH, lo cual, seguido por la absorción del rojo neutro, imparte un color rojo a la colonia. Las colonias de microorganismos que no fermenten la lactosa permanecen incoloras y translúcidas. En placas que no estén sobrecargadas de organismos, la diferenciación es muy buena. La selectividad del medio se debe a la presencia de violeta cristal y sales biliares que inhiben casi o completamente el crecimiento de microorganismos Gram.-positivos. (Manual Difco, 1984)

Para la realización del estudio se tomaron 25 grs. de miel asépticamente y se introdujeron en bolsas plásticas, las cuales contenían 90 ml de suero fisiológico estéril y fueron sometidas a un proceso de homogeneización el cual se llevó a cabo mediante el Stomacher.

Posteriormente para la realización de la siembra se tomaron 0,1 ml de la dilución y se depositaron en las placas de Petri estériles. Se añadió a cada placa de petri que contenía el inóculo, el medio de cultivo. Se mezcló el contenido de las placas con movimientos de rotación y balanceo, se dejó solidificar la mezcla (5 a 10 minutos) y luego se incubó en estufa 35-37°C durante 48 horas.

Se consideraron únicamente como bacterias pertenecientes al grupo de coliformes a las colonias de un color rojo oscuro, cuyo tamaño fue superior a 0,5mm.

5.3. 3 Recuento de Hongos y Levaduras.

El método utilizado fue el de siembra en placa en todo el medio, el medio de cultivo el Potato Dextrosa Agar. Este es un Medio recomendado para detección y numeración de levaduras y hongos, en productos lácteos y alimentos (Manual Oxoid, 1995). Proporciona el más alto y más consistente recuento de levaduras y mohos (Manual Difco, 1984).

El procedimiento consistió en tomar las placas de petri y verter de 10 a 15 ml de agar fundido y templado. Se dejó solidificar para luego agregar 0,1ml de la dilución madre. Luego se extendió el inóculo por toda la superficie del medio. Incubamos en estufa a 22°C durante 72 horas. El recuento se determinó siguiendo el mismo criterio que para el recuento de Aerobios Mesófilos.

5.4. ANALISIS ESTADISTICO.

En este estudio, se trata, para el caso de recuento de aerobios, de hongos y levaduras de variables cuantitativas. Para el caso de la determinación de coliformes, se trata de una variable cualitativa.

Para el análisis estadístico se utilizó el *S.T.A.T.A 8.0 (Stata Corp.2003 Statistical Software)*. Se realizó un análisis descriptivo de los datos y se los representó mediante el uso de gráficos de barras. Se calcularon las medias geométricas, aritméticas y armónica para cada uno de los de los estudios realizados y sus intervalos de confianza.

Para la interpretación de los resultados nos basaremos en los criterios microbiológicos que se establecen en el Reglamento Técnico del MER.CO.SUR de Identidad y Calidad de Miel.

Cuadro I. Límites Microbiológicos.

Grupo de microorganismos	Límites
Aerobios mesófilos	1×10^4 / g.
Enterobacteriaceae	Ausencia/ 25 g.
Hongos Filamentosos y Levaduras	1×10^2 / g.

Dicha norma se debe aplicar a las mieles de consumo y manejo.



6. RESULTADOS.

El planteo de los resultados obtenidos se hará según el estudio realizado y discriminando entre mieles normales y alteradas.

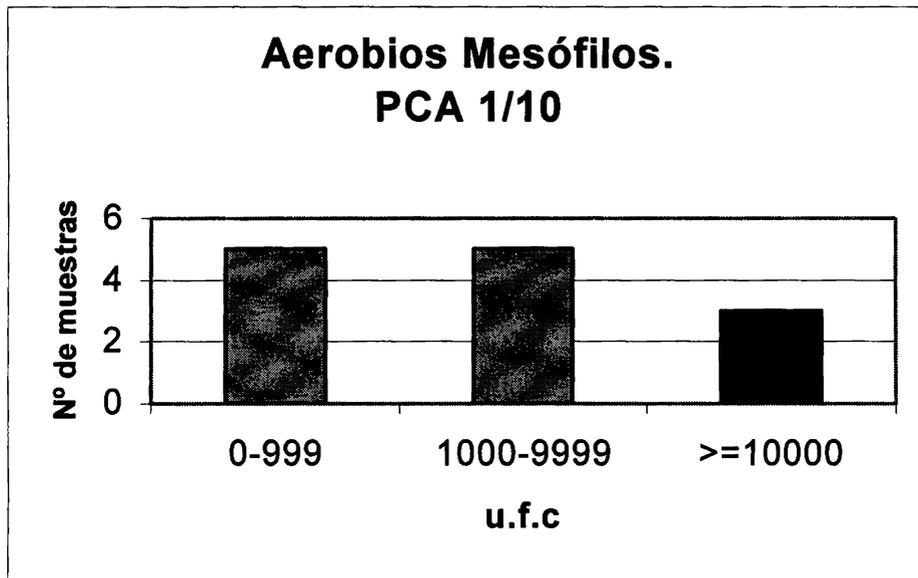
6.1 RECUESTO DE AEROBIOS MESOFILOS.

A continuación se presentará un cuadro con los resultados para el recuento de aerobios mesófilos.

Cuadro II. Resultados del Recuento de Aerobios Mesófilos para Mieles Alteradas.

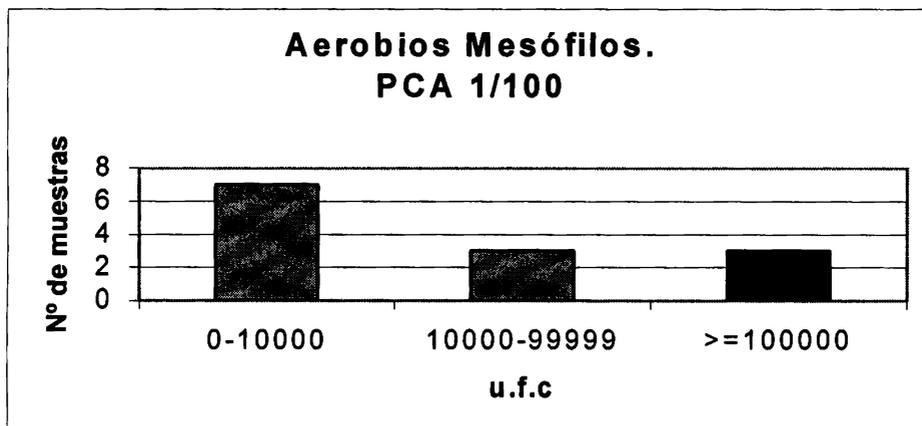
N° de muestra	u.f.c/ ml (PCA 1/10)	u.f.c/ ml (PCA 1/100)
1	10.000	100.000
2	10.000	100.000
3	10.000	100.000
4	40	300
5	3210	27.600
6	>10000	4.00
7	>10000	40.100
8	1150	1300
10	2000	1000
12	210	1900
13	40	100
15	190	400
16	50	100

Figura I. Recuento de Aerobios Mesófilos en mieles Alteradas. Dilución 1/10



- N° de muestras 13
- Media 4376,15

Figura II. Recuento de Aerobios Mesófilos en mieles Alteradas. Dilución 1/100.



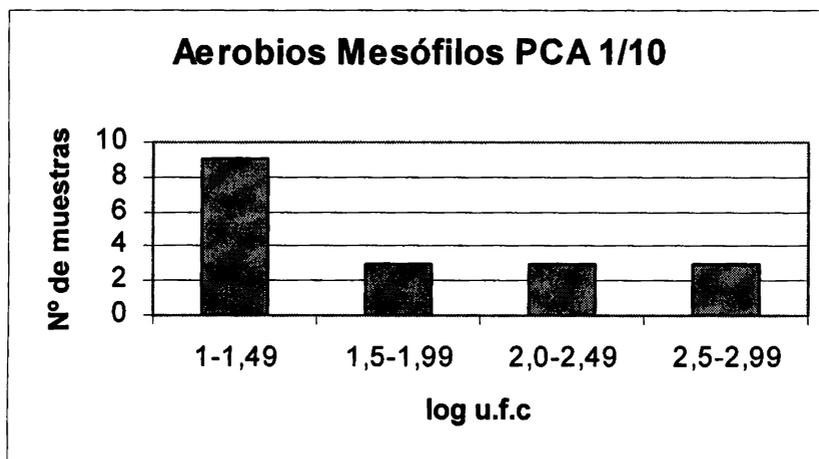
- N° de muestras 13
- Media 18103

En el caso de las mieles normales los resultados para el recuento de mesófilos fueron los siguientes:

Cuadro III. Recuento de Aerobios Mesófilos en Mieles Normales

N° de muestra	u.f.c /ml PCA 1/10	u.f.c /ml PCA 1/100
9	650	7400
11	780	7200
14	110	300
17	20	0
18	400	600
19	20	3300
20	160	500
21	80	100
22	10	0
23	10	100
24	10	200
25	60	200
26	10	100
27	10	0
28	20	100
29	20	100
30	160	200
31	80	400

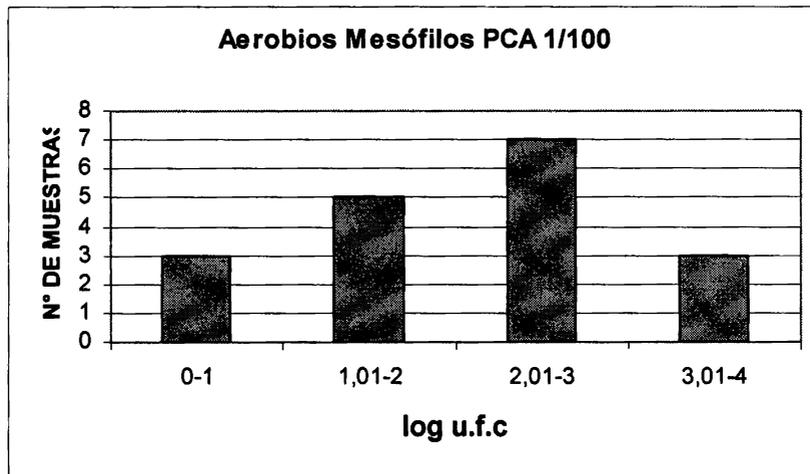
Figura III. Recuento de Aerobios Mesófilos en Mieles Normales. Dilución 1/10.



- Determinación de Medias

Media	N° de muestras	Resultado	95% Intervalo de confianza
Aritmética	18	145	30,9458 - 259,0547
Geométrica	18	49,76831	22,53303 - 105,2514
Armónica	18	23,41987	15,90824 - 44,37137

Figura IV. Recuento de Aerobios Mesófilos en mieles Normales. Dilución 1/100.



- Determinación de medias

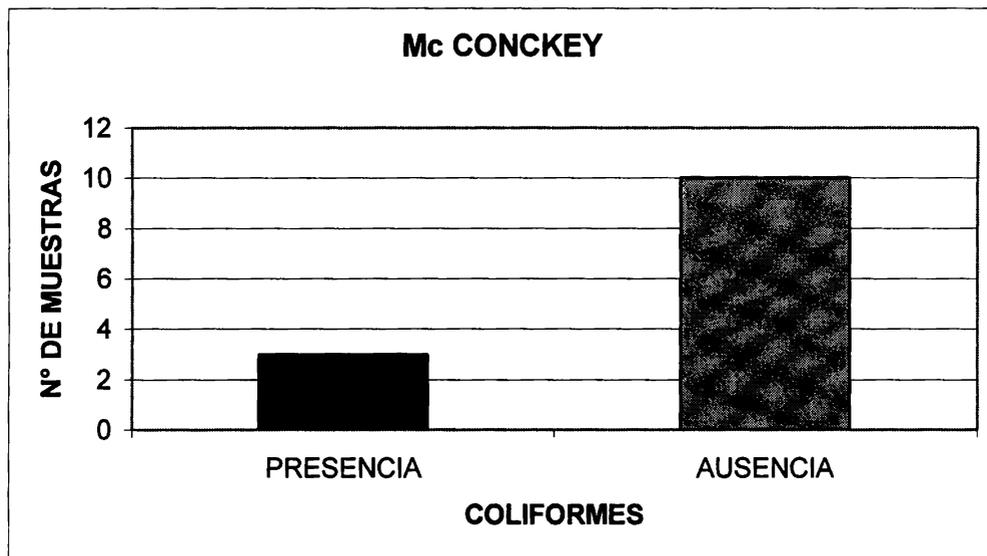
Media	Nº muestras	Resultado	95% Intervalo de confianza
Aritmética	18	1155.556	-16.8124 - 2327.924
Geométrica	15	380.4504	163.3526 - 886.0742
Armónica	15	199.7947	138.5468 - 358.1024

6.2 DETERMINACION DE COLIFORMES.

Cuadro IV. Resultado de la Determinación de Coliformes en Mieles Alteradas.

Nº de muestra	Coliformes
1	Presencia
2	Presencia
3	Presencia
4	Ausencia
5	Ausencia
6	Ausencia
7	Ausencia
8	Ausencia
10	Ausencia
12	Ausencia
13	Ausencia
15	Ausencia
16	Ausencia

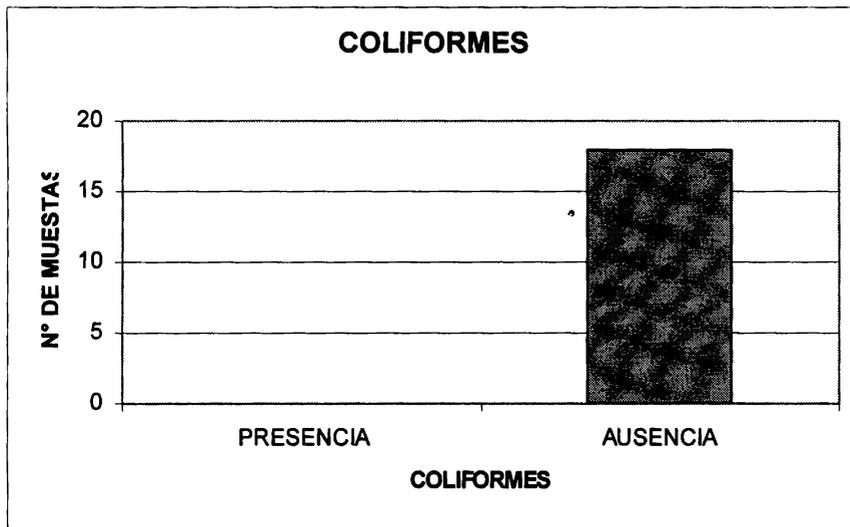
Figura V. Determinación de presencia de Coliformes en Mielles Alteradas



Cuadro V. Resultado de la Determinación de Coliformes en Mielles Normales

Nº de muestra	Coliformes
9	Ausencia
11	Ausencia
14	Ausencia
17	Ausencia
18	Ausencia
19	Ausencia
20	Ausencia
21	Ausencia
22	Ausencia
23	Ausencia
24	Ausencia
25	Ausencia
26	Ausencia
27	Ausencia
28	Ausencia
29	Ausencia
30	Ausencia
31	Ausencia

Figura VI. Determinación de la presencia de Coliformes en Mieles Normales



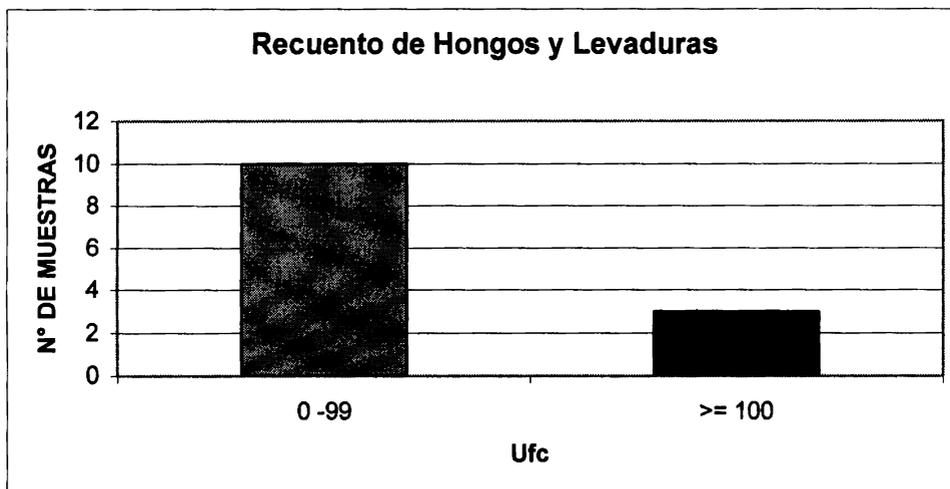
6.3. RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS.

Cuadro VI. Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Alteradas.

N° de muestra	u.f.c/ml
1	122
2	42
3	121
4	0
5	1
6	2
7	2
8	0
10	3
12	5
13	500
15	0
16	6

Ello queda representado a través del siguiente gráfico:

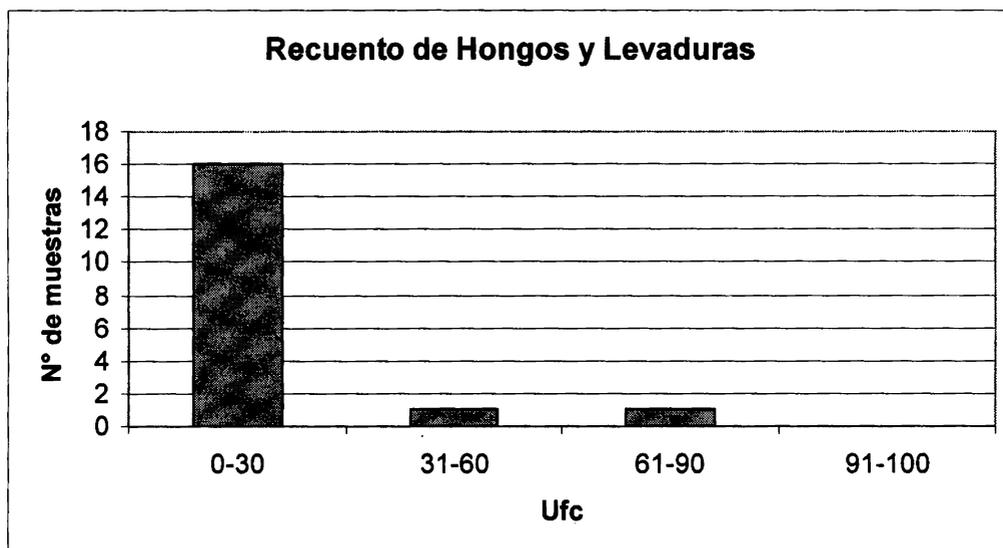
Figura VII. Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Alteradas.



Cuadro VII. Resultado del Recuento de Hongos y Levaduras de Mieles Normales

N° de muestra	u.f.c/ml
9	80
11	2
14	1
17	2
18	2
19	3
20	4
21	1
22	2
23	2
24	2
25	1
26	54
27	2
28	0
29	1
30	2
31	0

Figura VIII. Recuento de Hongos y Levaduras en Mieles Normales



- **Determinación de Medias**

Medias	N° de muestras	95% Intervalo de Confianza
Aritmética	18	- 1.800655 - 19.68954
Geométrica	16	1.395681 - 5.566432
Armónica	16	1.410592 - 2.718339

7. DISCUSIÓN.

El interés fundamental de este trabajo radica en el hecho de que no existen antecedentes de un estudio de este tipo en el Uruguay. Es importante resaltar los riesgos que se ciernen sobre nuestra posición de país exportador en función de los crecientes requisitos de calidad e inocuidad que nuestros clientes y mercados van demandando cada vez con mayor exigencia.

A través de los resultados obtenidos se pudo apreciar que para el caso del grupo de mieles alteradas, 5 muestras de las 13 estudiadas mostraron recuentos de aerobios mesófilos por encima de los establecidos en el límite, para ambas diluciones. La determinación de presencia de coliformes fue positiva en 3 de las 13 mieles analizadas. Para el caso de hongos y levaduras 3 de las 13 muestras estudiadas mostraron recuentos por encima de los límites establecidos en la norma. Dichos resultados concuerdan con lo esperado ya que con el tiempo disminuye la actividad de las enzimas responsables de la actividad antibacteriana de la miel (inhibina).

A su vez en éste estudio se pudo comprobar que de las muestras analizadas todas aquellas mieles destinadas a consumo cumplían con los requisitos microbiológicos establecidos en el reglamento. REGLAMENTO TÉCNICO DEL MERCOSUR de Identidad y Calidad de la Miel.

A pesar de desconocer los pormenores en cuanto a la producción, extracción y envasado de las muestras obtenidas, los resultados del análisis realizado fueron los esperados, ello se podría deber en parte a las características propias del alimento y las condiciones de explotación del Uruguay.

Esperamos haber sido capaces de generar información primaria para técnicos y productores acerca de ésta alternativa agroindustrial, que ocupa un escenario cada vez más importante en nuestro país (Fierro y col, 2003). Para fundamentar que la calidad microbiológica de las mieles uruguayas se encuentra dentro de los límites establecidos en el Reglamento Técnico del MER.CO.SUR, deberíamos realizar un estudio basado en un mayor número de muestras. Además tendríamos que tener en cuenta a toda la cadena productiva verificando el cumplimiento de buenas prácticas de manejo y manufactura, para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos orígenes de las mieles. Es nuestra intención poner ésta información a disposición para que se continúen los estudios y así generar una base de datos de manera de en un futuro poder estandarizar la calidad microbiológica de las mieles uruguayas y brindarle así una herramienta más a la hora de ser comercializada.

8. CONCLUSIONES.

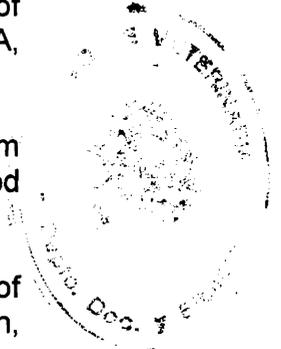
En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la información previamente presentada, podemos establecer las siguientes conclusiones:

- Dentro del grupo de mieles alteradas cierto número de muestras sobrepasaron los límites microbiológicos establecidos, coincidiendo con lo esperado.
- Dentro del grupo de mieles consideradas normales los resultados obtenidos cumplen con los requisitos microbiológicos establecidos en el Reglamento Técnico del MER.CO.SUR.

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Arrabal, M.V.; Ciappini, M.C (2001) Aceptabilidad de miel y su correlación con análisis físico-químicos.
www.beekeeping.com/articulos/aceptabilidad/_miel.htm
- 2) Baross, J.; Lenovich, L.M. (1992) Halophilic and Osmophilic Microorganism. En: En: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. Tercera Ed., U.S.A, Ed. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. , pp.199-212.
- 3) Belitz, H.D.; Grosch, W.(1988) Química de los Alimentos. España, Ed. Acribia, 813p.
- 4) Bravo, R.; Orzaez, M.T.; Díaz, A. (1994) La miel. Edulcorante natural por excelencia. Alimentaria, 94:25-35.
- 5) Cheftel, J.C.; Cheftel, H.; Besancon, P. (1988) Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos, Vol.1. España, Ed. Acribia, 331p.
- 6) Cheftel, J.C.; Cheftel, H. (1989) Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos, Vol.2. España, Ed. Acribia, 404p.
- 7) De Centorbi, O.N.; Alcaraz, L.E.; Centorbi, H.J.; Molins, M.B.; Uñates, M.A.; Mohamed, F. (1992) Investigación de Clostridium botulinum y estudios de calidad de mieles de la Provincia de San Luis. Argentina. Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. III Montevideo, Uruguay, 52p.
- 8) Difco, Laboratories (1984) Manual Difco. Medios de Cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. Décima ed., España, Ed. Gráficas Letra S.A., 1166p.
- 9) Dustmann, J.H. (1993) Honey, Quality and Its Control. American Bee Journal, pp.648-651.
- 10) Earle, R.L. (1987) Ingeniería de los alimentos. Las operaciones básicas del procesado de los alimentos. España, Ed. Acribia
- 11) Fierro, W.; Ferenczi, R.; Mastandrea, R.; Diaz, R.; Toscano, H.; Bedascarrasbure, E.; Maldonado, L.; Caporgno, J.; Alvarez, A. (2003) Guía de Buenas Prácticas de Manejo de Miel. Uruguay, Ed. PREDEG, 28p.

- 12) Guilfoyle, D.E.; Yager, J.F. (1983) Survey of Infants Foods for Clostridium botulinum spores. Technical Communications. J. ASSOC .OFF. ANAL. CHEM. 66:1302-1304.
- 13) Harriet, J.; Oficialdegui, G.; Heinzen, T.; González, D. (2005). Evaluación de los Residuos de Medicamentos Veterinarios y Contaminantes. Jornadas Técnicas de Ciencia y Tecnología de Carnes y Alimentos, IV, Montevideo, Uruguay.
- 14) Hitchins, A.D.; Hartman, P.A.; Todd, C.D. (1992) Coliform-Escherichia coli and its toxins. En: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. Tercera Ed., U.S.A, Ed. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F.; A.P.H.A. , pp.325-369.
- 15) Huhtanen, C.N. (1991) Gama Radiation Resistance of Clostridium botulinum 62 A and Bacillus subtilis Spores in honey. Journal of Food Protection, 54:894-896.
- 16) Huhtanen, C.N.; Knox, D.; Shimanuki, H. (1981) Incidence and Origin of Clostridium botulinum Spores in Honey. Journal of Food Protection, 44:812-814.
- 17) I.C.M.S.F (1980) Ecología Microbiana de los Alimentos. Productos Alimenticios Vol.3. España, Ed. Acribia S.A., 331p.
- 18) I.C.M.S.F (1982) Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Vol.1. 2ª ed., España, Ed. Acribia, 431p.
- 19) Joint FAO/WHO Expert Committee on Microbiological Aspects of Food Hygiene. (1968). World Health Organization. Technical Report Series, Nº 399.
- 20) Junagra (2003) Apicultura. www.mgap.gub.uy/junagra/sectorapicola/produccionapicola
- 21) Kautter, D.A.; Lilly, T.; Solomon, H; Klynt, R. (1982) Clostridium botulinum spores in infant foods: a survey. Journal of Food Protection, 45:1028 – 1029.
- 22) Lozano, M.; Montero, V.; Osorio, E.; Sabio, E.; Sánchez, J. (1994) Características del color de algunas mieles de Extremadura. Alimentaria, 94:39-41.
- 23) Maggi, A; Barreiro, D.; Mario, R.; Mayor, B.; Urbeltz, G. (1988) La calidad de la miel. Jornadas Científico Técnicas de Producción Animal, Montevideo, Uruguay.
- 24) Maidana, J.F. (2004) La miel. Características y composición. Análisis y adulteración. Argentina, Ed. Universidad Nacional de Santiago del Estero; Facultad de Agronomía y Agroindustrias; Centro de Investigaciones Apícolas, 117p.



- 25) Massicot, A. (1990) Algunas causas que desencadenan la cristalización de la miel. *Revista Ciencias y abejas*, 23:39-40.
- 26) MERCOSUR/GMC/RES N°89/99, Reglamento Técnico del MER.CO.SUR de Identidad y Calidad de Miel. Presidencia de la República Oriental del Uruguay Secretaria de prensa y Difusión, www.presidencia.gub.uy/noticias/archivo/2001/marzo/2001032711.htm
- 27) Mislivec, P.B; Beuchat, L.R.; Cousin, M.A. (1992) Yeast and Molds. En: Vderzant, C.; Splittstoesser, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Tercera Ed., U.S.A, Ed. Vderzant, C.; Splittstoesser, D.F.; A.P.H.A. , pp.239-249.
- 28) Ordenanza Bromatológica Municipal Decreto N° 27.235 del 12/09/1996 actualizado el 30/09/2000. Uruguay, 157p.
- 29) Ordoñez, J. A. y col. (1998) *Tecnología de los Alimentos*. Vol. I. Componentes de los Alimentos y Procesos. España, Ed. Síntesis.
- 30) Ordoñez, J. A. y col. (1998) *Tecnología de los Alimentos*. Vol I. Alimentos de origen animal. España, Ed. Síntesis.
- 31) Oxoid, Laboratorios (1995) *Manual Oxoid*. Sexta ed., España, Ed. Unipath España S.A., 394p.
- 32) Pesok, J.C (1987) *La Miel: Origen, propiedades, procesamiento y control*. Aspectos comerciales y económicos.(s.l),(s.d), 152p. En: Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.
- 33) Prost, J.P. (1995) *Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. 3ª ed, España, Ed. Mundiprensa, 741p.
- 34) *Reglamento Bromatológico Nacional*. Decreto N 315/994 de fecha 05/07/1994. Uruguay, 144p.
- 35) Rey, A.M.; Silvestre, A.A. (2002) *Comer sin riesgos 2. Las enfermedades transmitidas por los Alimentos*. Argentina, Ed. Hemisferio Sur, 220p.
- 36) Root, A.I.; Root, E.R. (1973) *A B C y X Y Z de la Apicultura*. Enciclopedia de la cría científica de las abejas. 10ª ed, Argentina, Ed. Librería Hachette S.A., 670p.
- 37) Salamanca, G.; Henao, C.A.; Moreno, G.I.; Luna, A. (2001) *Características microbilógicas de las mieles tropicales de Apis mellífera*. Colombia, Ed. Universidad de Tolima. Facultad de Ciencias, 10p.

- 38) Smittle, R.B.; Krysinski, E.P.; Ritcher, E.R. (1992) Sweeteners and Starches En: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. Tercera Ed., U.S.A, Ed. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F.; A.P.H.A. , pp.985-993.
- 39) White, J.W.Jr. (1967) Honey, its composition and properties.p.56. En: Beekeeping in the United States. Agricultural Handbook N° 335. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.