



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO O DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA
DE MIEL DE LA TRIBU MELIPONINI EN LA PROVINCIA DE
ORELLANA-ECUADOR”**

AUTOR: RUIZ CALDERÓN, PAOLA LIZBETH

DIRECTOR: Dr. RON ROMÁN, JORGE Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización fisicoquímica y microbiológica de miel de la tribu Meliponini en la provincia de Orellana-Ecuador**” realizado por la señorita **RUIZ CALDERÓN, PAOLA LIZBETH**, ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto, me permito acreditarlo y autorizar para sustentar públicamente.

Sangolquí, 24 de junio del 2019.

Dr. RON ROMÁN, JORGE Ph.D.

DIRECTOR

C.C. 1709505125



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **RUIZ CALDERÓN, PAOLA LIZBETH**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Caracterización fisicoquímica y microbiológica de miel de la tribu Meliponini en la provincia de Orellana-Ecuador**” es de un autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 24 de junio del 2019

PAOLA LIZBETH RUIZ CALDERÓN

C.I: 1718479833



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **PAOLA LIZBETH RUIZ CALDERÓN**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación “**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE MIEL DE LA TRIBU MELIPONINI EN LA PROVINCIA DE ORELLANA-ECUADOR**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 24 de junio del 2019

PAOLA LIZBETH RUIZ CALDERÓN

C.I: 1718479833

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Luz y César, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida, y quienes me han dado su apoyo incondicional para poder tener una carrera profesional, apoyarme y creer en mi a pesar de los obstáculos que se han presentado.

A mis hermanos Fernando y David, quienes siempre me han apoyado y con sus ocurrencias alegran mis días.

A mis hermanas Lorena, y Camila, quienes siempre me han sabido aconsejar en mis momentos más difíciles y apoyar para que siga cumpliendo mis metas.

Y sobre todo a mi hermana Joselyn quien desde niña me ayudo a ser una mejor persona, con la que compartía este sueño por los seres vivos en especial por lo animales, y aunque ella no esté presente cada pequeño esfuerzo que hago es gracias a su amor.

A Edison y Andrés, mis grandes amigos que me ayudaron a ser mejor persona y juntos perseguíamos este sueño de ser mejor personas cada día y mejores profesionales.

AGRADECIMIENTO

Dr. Jorge Ron Román por darme una oportunidad y confianza para realizar este proyecto, así como su guía para realizarlo.

Mgs. Alma Koch por ser una mi guía no solo al compartir sus conocimientos sino su apoyo moral, además por la dedicación, y compromiso que ha ayudado a mi crecimiento profesional.

Dra. Sarah Martin por su colaboración, sus enseñanzas, y por permitirme ocupar el laboratorio de Biotecnología Animal.

Dr. Iván Samaniego por ayudarme con el equipo, reactivos, y el laboratorio de nutrición y calidad, donde pude concluir esta investigación realizando el análisis de azúcares.

Dr. Meitner Cadena por la colaboración brindada en la parte estadística de esta investigación.

Al laboratorio de Nanociencias y Nanotecnología (CENCINAT), por la ayuda brindada para medir parámetros fisicoquímicos de la miel.

Las laboratoristas (Cristina, Isabel, Patricia y Silvana) de los diferentes departamentos de la Universidad, que me apoyaron al realizar las diferentes técnicas en esta investigación.

A los chicos y chicas del Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, con los cuales compartí experiencias para poder realizar esta investigación.

A mis amigos que conocí durante la carrera, y quienes han sido un apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	1
6.1 Planteamiento de problema	1
6.2 Justificación	2
6.3 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo General	4
1.1.2 Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II	
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Generalidades de Meliponini	5
2.2 Productos que generan las abejas sin aguijón	6
2.2.1 Miel	6
2.2.2 Cerumen	7
2.2.3 Polen	8
2.3 Características de la miel según la INEN.	8
2.4 Características físico y químicas de la miel	10
2.4.1 Acidez total.	10

2.4.2	Humedad	10
2.4.3	Sólidos insolubles.....	11
2.4.4	Cenizas	11
2.4.5	Azúcares	11
2.5	Medición de azúcares.....	14
2.5.1	Colorimetría	14
2.6	Fuentes de contaminación de la miel.....	17
2.7	Métodos de identificación microbiológica.	20
2.8	Sistema de Hipótesis.....	21
CAPÍTULO III		
MATERIALES Y MÉTODOS.....		22
3.1	Ubicación geográfica de las zonas de estudio.	22
3.2	Tamaño Muestral.....	23
3.2.1	Cálculos de obtención del número de muestras	24
3.3	Fase de campo	26
3.4	Fase de laboratorio.....	26
3.4.1	Procesamiento de muestras.	26
3.4.2	Metodología para la caracterización fisicoquímica de la miel.....	27
3.5	Análisis microbiológico de la miel	33
3.6	Análisis estadístico	36
CAPITULO IV		
RESULTADOS.....		37
4.1	Agrupación de miel según su género.....	37
4.2	Estandarización de los análisis fisicoquímicos.....	38
4.3	Resultados del análisis fisicoquímico de la miel.	41
4.3.1	Humedad	43
4.1.2	Sólidos insolubles.....	43
4.1.3	Cenizas	44
4.1.4	pH, Acidez libre, lactónica, y total.....	45
4.1.5	Azúcares totales, reductores y no reductores en la miel.	47
4.4	Resultados del análisis microbiológico de la miel.....	48
4.4.1	Resultados de microorganismos indicadores de contaminación en la miel.	48

4.4.2	Descripción morfológica celular	49
4.4.3	Análisis Bioquímico	49
4.4.4	Cuantificación de microorganismos presentes en miel	51
CAPITULO V		
DISCUSIÓN.....		53
5.1	Análisis fisicoquímicos de la miel de abejas sin aguijón	53
5.2	Microbiología de la miel de abejas sin aguijón.	56
5.3	Comparación general de los resultados.	57
CAPITULO VI		
CONCLUSIONES. Y RECOMENDACIONES		59
6.1	Conclusiones.....	59
6.2	Recomendaciones.	59
CAPITULO VII		
BIBLIOGRAFÍA.....		60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Parámetros de calidad de la miel según Codex Alimentarius (2001)</i>	9
Tabla 2 <i>Composición de la miel de Apis mellifera</i>	12
Tabla 3 <i>Coordenadas geográficas de parroquias muestreadas en Orellana-Ecuador</i>	22
Tabla 4 <i>Distribución de las muestras en la provincia de Orellana</i>	23
Tabla 5 <i>Concentración de glucosa para curva de calibración</i>	30
Tabla 6 <i>Concentración de glucosa para curva de calibración</i>	32
Tabla 7 <i>Frecuencia según género</i>	37
Tabla 8 <i>Estandarización del análisis de sólidos insolubles</i>	38
Tabla 9 <i>Estandarización para el análisis de cenizas</i>	38
Tabla 10 <i>Estandarización para el análisis de acidez libre, láctica y total</i>	40
Tabla 11 <i>Tabla de parámetros fisicoquímicos general</i>	42
Tabla 12 <i>Cuantificación microbiológica de miel según el género</i>	51
Tabla 13 <i>Frecuencia de muestras positivas para Bacillus</i>	52
Tabla 14 <i>Comparación de resultados del estudio con sugerencias de estándares para parámetros fisicoquímicos</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama modificado de un nido de abejas sin aguijón en un tronco de árbol.	6
Figura 2	Determinación de azúcares totales por el método de antrona.....	14
Figura 3	Diagrama modificado de reacciones en el método de Nelson-Somogyi para determinar azúcares reductores.....	15
Figura 4	Diagrama modificado de la reacción del método dinitrosalicílico para determinar azúcares reductores.	16
Figura 5	Ubicación geográfica de las parroquias visitadas en el catón Francisco de Orellana, provincia de Orellana-Ecuador.	22
Figura 6	Contenido de humedad (%) de miel según género.	43
Figura 7	Contenido de sólidos insolubles en miel según el género	44
Figura 8	Porcentaje de cenizas encontradas en la miel, clasificadas según género.	45
Figura 9	Determinación de acidez libre, lactónica y total (meq/Kg), para cada tipo de miel	46
Figura 10	Porcentaje de azúcares totales, reductores y no reductores clasificados según el género.	47
Figura 11	Porcentaje de microorganismos presentes en las 15 muestras de miel.....	48
Figura 12	Tinción presuntiva de Bacillus: a) tinción Gram positiva, y b) tinción de Wirtz, donde se observa las esporas (100x).....	49
Figura 13	Pruebas bioquímicas aplicadas para la diferenciación de Bacillus. y Clostridium...	50

RESUMEN

La miel de pote, de las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini), en los últimos años se ha incrementado la comercialización en la provincia de Orellana en el Ecuador, pero se desconocen las características fisicoquímicas y microbiológicas. Esta investigación identifica propiedades fisicoquímicas y microbiológicas con el fin de documentar el perfil informativo para promover el control de calidad. El estudio se realizó en fincas (n=4) de la provincia de Orellana, en la región amazónica de Ecuador. Las muestras de miel (n=15) de diferentes especies de abejas fueron tomadas asépticamente y analizadas según la norma INEN-1572 basada en el Codex Alimentarius, para miel de *Apis mellifera*, con modificaciones. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración hasta su posterior análisis. Se observaron valores de pH entre 2.92 y 4.64, acidez total: 23.53 y 101.88 meq/kg, humedad: 25.35 y 36.85%, cenizas: 0,006 y 1,61 %, sólidos insolubles: 0.02 y 1.7 %. El análisis microbiológico determinó la presencia de hongos y levaduras en el 80% de las muestras, coliformes totales y *Bacillus* en el 33% de las muestras, aerobias mesófilas en 93.33 %, presencia de *E. coli* en el 26,67% de las muestras. Ninguna muestra presentó *Salmonella*, *Clostridium* y *Staphylococcus aureus*. Muchos de los contaminantes encontrados, se debería al acopio de agua de fuentes contaminadas por parte de las abejas, por la ubicación de nidos junto a corrales de animales. Se determina la necesidad de establecer Normas de calidad para miel de abejas nativas, y capacitar a los meliponicultores sobre buenas prácticas de manejo de nidos y correcto aprovechamiento de sus productos.

PALABRAS CLAVE:

- **CONTAMINANTES**
- **MIEL DE POTE**
- **CODEX ALIMENTARIUS**

ABSTRACT

Pot honey, from stingless bees (Hymenoptera: Meliponini), marketing has increased in the province of Orellana in Ecuador in recent years, but the physicochemical and microbiological characteristics are unknown. This research identifies physicochemical and microbiological properties in order to document the information profile to promote quality control. The study was conducted on farms (n = 4) in the province of Orellana, in the Amazon region of Ecuador. The honey samples (n = 15) of different bee species were taken aseptically and analyzed according to the INEN-1572 standard based on the Codex Alimentarius, for honey of *Apis mellifera*, with modifications. The samples were stored under refrigeration until further analysis. pH values between 2.92 and 4.64 were observed, total acidity: 23.53 and 101.88 meq / kg, moisture: 25.35 and 36.85%, ash: 0.006 and 1.61%, insoluble solids: 0.02 and 1.7%. The microbiological analysis determined the presence of moulds and yeasts in 80% of the samples, total coliforms and *Bacillus* in 33% of the samples, *Mesophilic aerobes* in 93.33%, presence of *E. coli* in 26.67% of the samples. No sample presented Salmonella, Clostridium and Staphylococcus aureus. Many of the pollutants found, it would be due to the collection of water from contaminated sources by bees, by the location of nests next to animal pens. It is determined the need to establish quality standards for native honey, and train the meliponicultores on good nest management practices and correct use of their products.

KEY WORDS:

- CONTAMINANTS
- POT HONEY
- CODEX ALIMENTARIUS.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

6.1 Planteamiento de problema

Las abejas sin aguijón de la tribu Meliponini se encuentran en áreas tropicales y subtropicales, son abejas sociables (Michener, 2000). Las diferencias respecto a *Apis mellifera* son morfológicas como, por ejemplo: su aguijón atrofiado, así como su comportamiento, ya que poseen varias reinas. Son considerados los mayores polinizadores de plantas nativas, y se ha reportado una gran variedad de especies en Sur América (Michener, 2000).

Desde la época precolombina se ha practicado la meliponicultura, como se ha visto en la cultura indígena de México donde criaron abejas sin aguijón para la producción de miel y cera. Las abejas sin aguijón hacen sus nidos en cualquier tipo de nido abandonado o árboles huecos, se adaptan a diferentes condiciones geográficas (Rodríguez-Suazo, 2014).

Las abejas producen miel a partir de néctares de varias plantas y combinando enzimas segregadas y depositados en potes o celdas (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz, & Rosas-Ulloa, 2010).

En la actualidad la miel de abejas sin aguijón tiene algunas propiedades curativas. Es utilizada en tratamientos como cataratas oculares, carnosidad, problemas hepáticos, conjuntivitis, heridas, úlceras oculares, manchas en cutis a causa de gestación, infecciones respiratorias y asma (Huicochea, 2011).

Las abejas *A. mellifera*, al ser reconocidas a nivel mundial cuentan con protocolos técnicos de producción, extracción y envasado. Han sido muy estudiadas en varios países, incluyendo a

Ecuador, cuenta con un reglamento sobre normas de calidad en la Norma Técnica Ecuatoriana (INEN). Por lo contrario, para la miel de abejas sin aguijón no hay información, a pesar de que en otros países se han reportado estudios referentes a sus características. Varían por ejemplo en su cantidad de humedad superando el 20%, condición que favorecer el crecimiento de microorganismos y por ende el deterioro de la misma (Correa, 2015).

Aunque la miel tiene propiedades especiales, por su alta osmolaridad y poca humedad, también contener microorganismos presentes en polen, polvo, aire, suelo y néctar son difíciles de controlar. Otra posibilidad de la contaminación microbiana es una contaminación cruzada por mala manipulación de los meliponarios (Pucciarelli et al., 2014).

Según Contreras (2014), la miel es un producto alimenticio con cualidades reconocidas y utilizadas por los seres humano, gracias a propiedad endulzante natural, además de ser un alimento de alto valor calórico fácilmente asimilable.

6.2 Justificación

Según Ramírez Viteri (2016), la industria alimenticia, en la cual está inmersa la miel representó en el 2015 más del 13% del PIB en el Ecuador, y ha tenido un crecimiento de aproximadamente 4% cada año. Este es uno de los rubros con mayor crecimiento y estabilidad dentro del PIB en los últimos años en el Ecuador (Ramírez Viteri, 2016).

Según un estudio realizado por Arana & Beltrán (2012), la comercialización de un frasco de 250 g de miel de *Scaptotrigona postica*, una especie perteneciente al género *Melipona* puede alcanzar el valor de \$12.50 en Ecuador, mayor a comparación de la miel de *Apis mellifera* que es de entre \$5

a \$10 dólares, debido a que existe una creencia ancestral de que la miel de abejas sin aguijón posee propiedades curativas (Arana & Beltrán, 2012).

La calidad de la miel está determinada por sus características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas (Norma INEN 1572, 2016). Internacionalmente los criterios de calidad de miel son especificados mediante Regulaciones Standard, compiladas en el Codex Alimentarius (Bogdanov, Vit, & Kilchenmann, 1996). En el Ecuador, están regulados por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), el cual evalúa si los productos son aptos para el consumo humano dando una garantía sanitaria (Norma INEN 1572, 2016).

Esta será la primera evaluación en la miel de abejas sin aguijón del país, y se podrá brindar a los productores una directriz del tipo de miel y de calidad que están produciendo, así como recomendaciones para cosecha y almacenamiento.

Este proyecto busca caracterizar, mediante técnicas fisicoquímicas y microbiológicas de la miel obtenida de diferentes abejas sin aguijón. El área de influencia son las diferentes haciendas productoras, ubicadas en la provincia de Orellana en Ecuador.

Finalmente, este estudio proporcionará un perfil informativo de la miel de abeja sin aguijón procedente de la amazonia ecuatoriana, cosechada por nativos de la zona con el objetivo de saber si las mieles son aptas para el consumo humano.

6.3 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente muestras de miel de abejas sin aguijón provenientes de la provincia de Orellana.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar las propiedades fisicoquímicas (humedad, acidez total, sólidos insolubles y cenizas) de muestras de miel provenientes de Orellana, tomando como referencia indirecta los protocolos establecidos en la norma técnica ecuatoriana INEN 1572 para mieles de *Apis mellifera*.
- Analizar el porcentaje de azúcares presentes en la miel mediante la técnica de colorimetría.
- Determinar la presencia de microorganismos indicadores de contaminación en la miel de Meliponini, mediante medios de cultivo selectivos y diferenciales.
- Realizar el recuento de microorganismos presentes en la miel mediante el conteo de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades de Meliponini.

En el orden Himenópteros apócritos se encuentran los géneros *Melipona*, *Trigona*, *Scaptotrigona*, *Tretragonisca*, *Nanotrigona*, *Frisiometita* entre otros constituyentes de la tribu Meliponini. Su distribución abarca regiones tropicales y subtropicales, se han reportado 500 especies y la mayoría se encuentra en Sur América, a comparación de *Apis mellifera* derivada de Europa y Asia (P. Vit, Bogdanov, & Kilchenmann, 1994).

Su casta es diferente a *A. mellifera*, son abejas que tiene varias reinas, sus tamaños varían, algunas son más pequeñas (2 a 8 mm de longitud) (Wille, 1976) hasta otras más grandes (8 a 15 mm de longitud) (Wille, 1976). Sus nidos se caracterizan por tener diferentes tipos de entrada creada según la especie, además está conformado por celdas de cría que se encuentran en forma de discos o peines, estas abejas colocan en potes tanto la miel como el polen, todo rodeado por una capa de cerumen, la Figura 1 (Patricia Vit & Silvia, 2013)

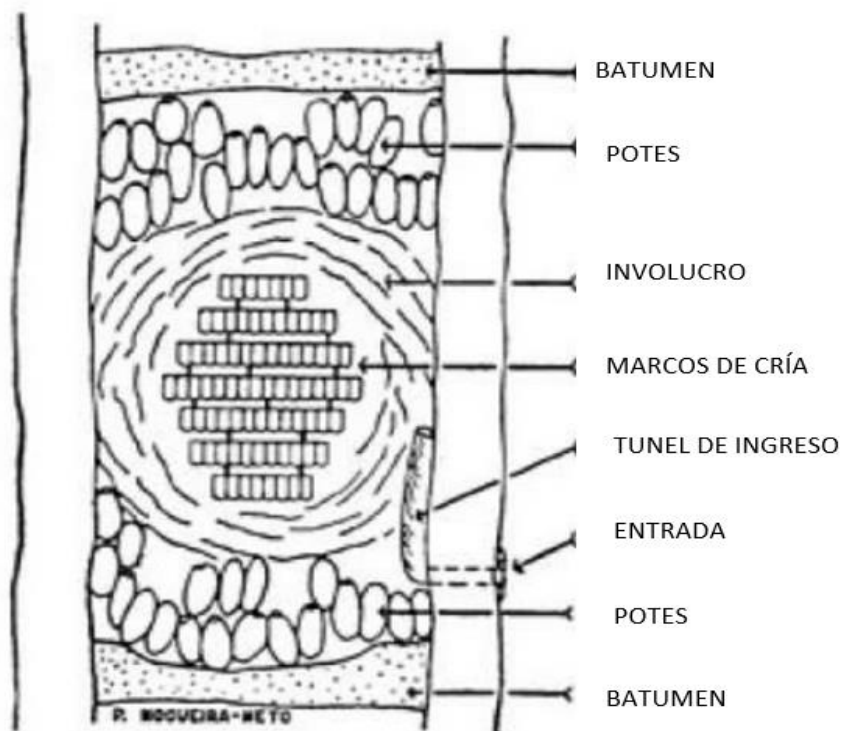


Figura 1. Diagrama modificado de un nido de abejas sin aguijón en un tronco de árbol.

Fuente: Nogueira-Neto, (1997).

2.2 Productos que generan las abejas sin aguijón.

2.2.1 Miel

La miel es un producto natural es producida por insectos de la familia Apidae (Mandal & Mandal, 2011). Se han descrito más de 300 tipos de miel (Mandal & Mandal, 2011). Además se describe que han existido casi desde hace 5500 años (Samarghandian, Farkhondeh, & Samini, 2017). La miel tiene propiedades antibacterianas contra bacterias con una resistencia a antibióticos, debido a su bajo nivel de pH y alto contenido de azúcar (alta osmolaridad) (Mandal & Mandal, 2011). La

miel tiene propiedades no solo antibacterianas, sino también antiinflamatorias, fitoquímicas, y antioxidantes (Mandal & Mandal, 2011; Samarghandian et al., 2017).

La mayoría de compuestos presentes en la miel son carbohidratos, azúcares disueltos en agua (Foitzich Molina, 2013). La fracción de azúcares es más o menos de 95 a 99% de los sólidos totales, los principales son la glucosa y fructosa, componen el 70% de la miel. A ellos se debe su consistencia pegajosa y viscosa: alta densidad (1,3 a 1,4 g/ml) (Foitzich Molina, 2013). Los azúcares, ácidos, compuestos nitrogenados y minerales se forman cuando las abejas almacenan el néctar en las celdas o potes (Foitzich Molina, 2013).

2.2.2 Cerumen

El cerumen, también conocido como propóleo es una mezcla producida por las abejas *A. mellifera* y *Meliponas* spp., a partir de partes de plantas; esta sustancia es pegajosa y su naturaleza es cerosa es usada para la construcción y reparación para sus nidos (Miguel & Antunes, 2011). Además sirve de protección contra invasores (Wagh, 2013). El cerumen tiene propiedades antibacterianas, y a lo largo de la historia ha sido utilizado como: embalsamador de cadáveres en la época de los egipcios, y remedio para tratar enfermedades relacionado al sistema respiratorio en la segunda guerra mundial (Wagh, 2013).

Su composición es de resina (50%), formada por flavonoides y ácidos fenólicos. El otro 50% por ceras, aceites esenciales, polen y otros compuestos orgánicos. (Miguel & Antunes, 2011). El tipo de vegetación de la zona, sustancias exudadas de las plantas y según el metabolismo de las abejas son factores que dan diferentes propiedades al cerumen (Miguel & Antunes, 2011).

2.2.3 Polen

El polen es un producto, al igual que la miel y el cerumen tiene propiedades terapéuticas, dependientes del origen es decir del tipo de planta y su posición geográfica, junto con las condiciones climáticas. El polen recolectado es humedecido con saliva y fragmentado por abejas no voladoras, y se envasa en potes que son una capa delgada de miel y cerumen (Komosinska - Vassev et. al, 2015). El polen entonces es sometido a una fermentación anaeróbica y se conserva gracias al ácido láctico resultante. Su composición química es de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, compuestos fenólicos, enzimas, coenzimas y vitaminas (Komosinska-Vassev et al., 2015).

2.3 Características de la miel según la INEN.

El servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN), según la Norma técnica ecuatoriana (NTE INEN 1572) Miel de abejas, establece los requisitos para la miel producida por abejas de la especie *Apis mellifera*, destinada al consumo humano. Debe evaluarse los siguientes parámetros físicos y químicos: contenido de humedad, azúcares reductores (suma de fructosa más glucosa), sacarosa aparente, sólidos insolubles en agua, acidez total, actividad de la diastasa, hidroximetilfurfural, cenizas y conductividad eléctrica. También los parámetros microbiológicos con recuento total de hongos y levaduras (Norma INEN 1572, 2016).

Cabe recalcar que la regulación en la cual se basa la Norma técnica ecuatoriana es el *Codex Alimentarius* (2001), según Tabla 1.

Tabla 1

Parámetros de calidad de la miel según Codex Alimentarius (2001)

Fuente: Codex Alimentarius, (2001)

Parámetro	Valor
a) Contenido de humedad	
Mieles no indicadas a continuación	no más del 20%
Miel de brechina (Calluna)	no más del 23%
b) Contenido de azúcares /contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas)	
Mieles no indicadas a continuación	no menos que 60 g/100 g
Miel de mielada, mezcla de miel de mielada con miel de flores	no menos que 45 g/100 g
c) Contenido de sacarosa	
Mieles no indicadas a continuación	no más que 5 g/100 g
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), Citrus spp., falsa acacia (<i>Robinia pseudoacacia</i>), madreSelva francesa (<i>Hedysarum spp.</i>), menzies banksia (<i>Banksia menziesii</i>), "Red Gum" (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>), "Leatherwood" (<i>Eucryphia lucida</i>), <i>Eucryphia milligani</i> .	no más que 10 g/ 100 g
Lavanda (<i>Lavandula spp.</i>), borraja (<i>Borago officinalis</i>)	no más que 15 g/ 100 g
d) Contenido de sólidos insolubles en agua	
Mieles distintas de la miel prensada	no más que 0,1 g/ 100 g
Miel prensada	no más que 0,5 g/ 100 g
e) Acidez libre	
	no más que 50 miliequivalentes de ácido por 1000 gramos

2.4 Características físico y químicas de la miel.

2.4.1 Acidez total.

La acidez total es dada por la suma de la acidez libre y las lactonas (Lorenzo, 2002). Su análisis es relacionado a la frescura de la miel, o si ha sido sometida alguna adulteración como sobrecalentamiento o mucho tiempo almacenamiento (Lorenzo, 2002). Las lactonas son ésteres cíclicos internos, hidroxiaácidos principalmente gamma y delta, los cuales dan la característica de olor dulce (Lorenzo, 2002).

La acidez de miel es un factor analizado para saber su calidad, ya que representa el 0,05% de los sólidos, siendo responsable de su estabilidad (Soto, 2008). La miel contiene algunos ácidos volátiles como no volátiles entre ellos están: glucónico, acético, fórmico, valérico, málico, maleico y cítrico (Soto, 2008). La acidez se la determina por los miliequivalentes de ácido glucónico por kilo de miel, el ácido es producido por la transformación de la glucosa por medio de la enzima glucoxidasa (Soto, 2008).

2.4.2 Humedad

La humedad es un factor evaluado al momento de caracterizar la miel ya que, si el contenido de humedad es mayor a 21 g H₂O/ 100 g, la miel podría fermentarse y traer problemas de contaminación microbiológica (Maradiaga, 2005). Usualmente la miel de *A. mellifera* tiene un contenido de humedad entre 14% a 22%, pero depende de las condiciones climáticas, grado de maduración y su origen biogeográfico (Maradiaga, 2005).

2.4.3 Sólidos insolubles

El análisis de sólidos insolubles busca detectar las impurezas presentes en la miel, es una forma de control higiénico. El máximo permitido es de 0,1 g/100 g de miel, según el Codex Alimentarius (2001). Como contaminación es considerado cualquier sustancia ajena al contenido natural de la miel (Maradiaga, 2005).

2.4.4 Cenizas

El parámetro contenido de cenizas permite conocer si los minerales son de origen floral o de mieles de mielada. Las primeras usualmente tienen mayor cantidad de cenizas que las segundas (Rodríguez-Suazo, 2014). También se las puede determinar mediante la conductividad eléctrica (Rodríguez-Suazo, 2014).

2.4.5 Azúcares

los azúcares representan del 80% al 95% de la materia seca de la miel (Solares, 2013). La mayoría de estudios se centran en la miel de *A. mellifera* donde reportan que la proporción de azúcares tiene un efecto decisivo sobre las propiedades físicas y químicas. Entre los monosacáridos con mayor presencia en la miel están la fructosa (38%) y glucosa (31%) (Cauich Kumul, Ruiz Ruiz, Ortíz Vázquez, & Segura Campos, 2015). La sacarosa se encuentra generalmente en porcentajes inferiores al 5%, y el resto de disacáridos reductores como la maltosa oscilan alrededor del 7.5% (Solares, 2013).

Los azúcares presentes en la miel especialmente la glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa se asocian a parámetros de calidad, como la viscosidad, higrometría, granulación y valor energético (Coll Cárdenas, Villat, Laporte, Noia, & Mestorino, 2008).

Según Solares, (2013), los componentes de la miel de *A. mellifera* son:

Tabla 2

Composición de la miel de Apis mellifera.

<i>Componente</i>	<i>%</i>
Agua	17,2 %
Levulosa (d - fructosa)	38,19 %
Dextrosa (d- glucosa)	31,28 %
Sacarosa	1,31 %
Maltosa y otros disacáridos reductores	7,32 %
Azúcares superiores	1,50 %
Total, de azúcares	80 %
Ácidos (glucónico, cítrico, málico, succínico, fórmico, etc.)	0,57 %
Proteína (aminoácidos, ácido glutámico, alanina, arginina, etc.)	0,26 %
Cenizas (minerales, potasio, sodio, magnesio, calcio, hierro, etc.)	0,17 %
Componentes menores (pigmentos, sus. Aromáticas, enzimas, etc.)	2,21 %

Fuente: (Kushnir, 2000) tomando de (Solares, 2013)

2.4.5.1 Glucosa

Entre de los hidratos de carbono se encuentra la glucosa, es un monosacárido ($C_6H_{12}O_6$). Producto de la hidrólisis de la sacarosa del néctar de las plantas y por acción de la enzima invertasa producida por las abejas se transforma a glucosa (Maradiaga, 2005)

2.4.5.2 Fructuosa

La fructosa es un azúcar monosacárido relacionado con la cristalización de miel, a menor contenido de fructosa y mayor contenido de glucosa se produce la cristalización (Coll Cárdenas et al., 2008).

2.4.5.3 Sacarosa

La sacarosa es el disacárido con mayor presencia en las mieles. Se encuentra en las normas internacionales como indicador de maduración de la miel, cuando este se encuentra en grandes cantidades (>5%) indica la inmadurez de la miel o una adulteración (Coll Cárdenas et al., 2008).

2.4.5.4 Maltosa

La maltosa es el disacárido más abundante en mieles de plantas uniflorales. En mieles de plantas multiflorales su valor es de 6.925% y en plantas frutales de 7.86 % (Coll Cárdenas et al., 2008)

2.5 Medición de azúcares

2.5.1 Colorimetría

La colorimetría es una forma de evaluar la energía radiante que da un color. La utilización de la espectrofotometría permite la obtención de espectros una especie de carnet de identidad, así cualquier material tiene un espectro característico que indica la radiación que absorbe o refleja a una determinada longitud de onda de la radiación incidente (Sánchez, 1999).

2.5.1.1 Medición de azúcares totales.

La determinación de los azúcares totales se lo realiza por el método de la antrona el cual consiste en la hidrólisis de los polisacáridos en medio ácido en caliente. La antrona reacciona con las hexosas y aldopentosas para dar un complejo de color azul-verde, con una absorbancia de 625nm (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

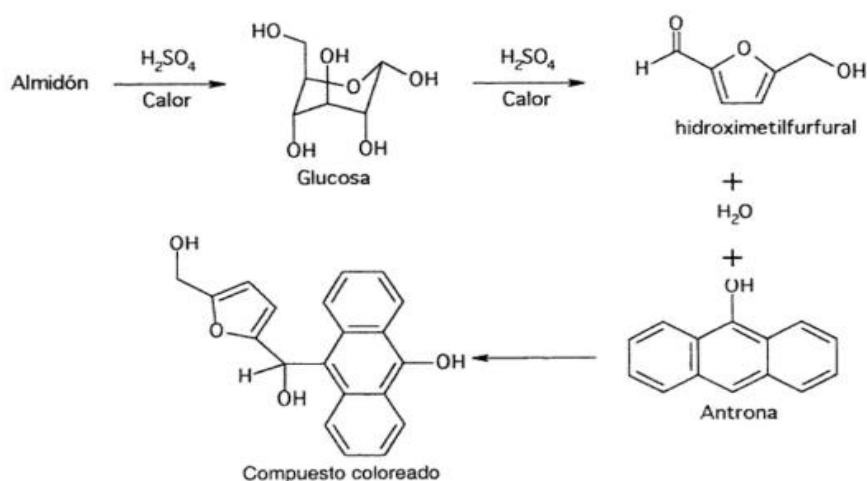


Figura 2. Determinación de azúcares totales por el método de antrona.

Fuente: Yugsi Lita, (2017).

2.5.1.2 Medición de azúcares reductores.

Para poder medir los azúcares reductores según Goel et al., (2009), existen dos métodos: Nelson-Somogyi (Somogyi, 1952) y del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

El primero método consiste en someter a los azúcares reductores a calor con una solución alcalina de tartrato de cobre, donde el cobre en estado cúprico cambia a cuproso formando el óxido cuproso. El óxido cuproso reacciona con el ácido arsenomolíbico produciéndose una reducción a ácido molíbdico dando un color azul, que se mide a 620nm (Somogyi, 1952).

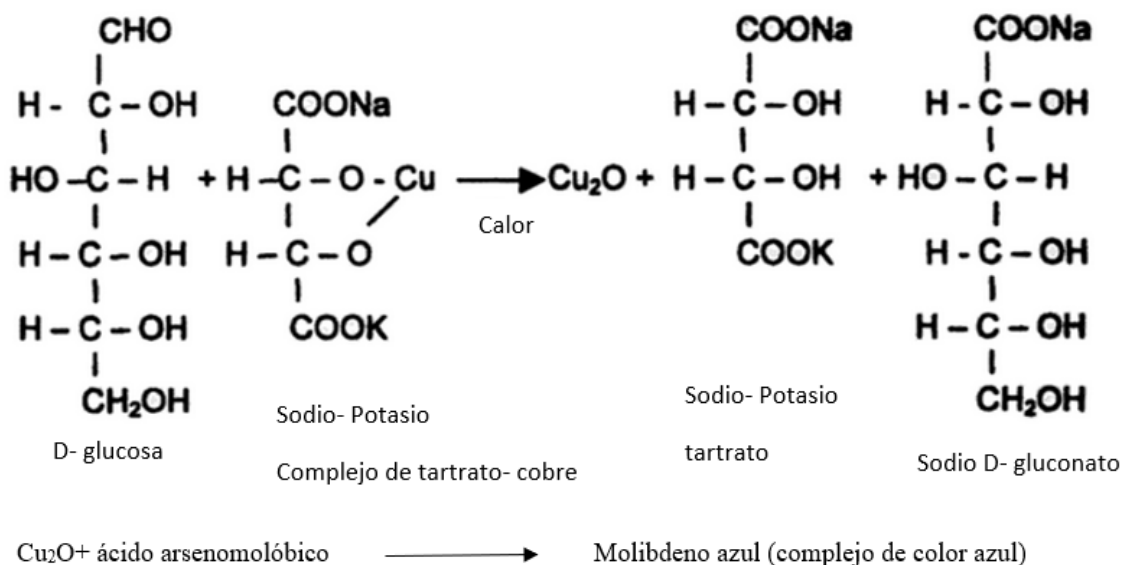


Figura 3. Diagram modificado de reacciones en el método de Nelson-Somogyi para determinar azúcares reductores.

Fuente: Goel et al., (2009).

El segundo método consiste en la reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5 nitrosalicílico por el grupo carbonilo libre de los azúcares reductores. El complejo formado es de color naranja medido espectrofotométricamente a 540 nm, siendo la densidad óptica proporcional a la concentración de azúcares reductores (Miller, 1959).

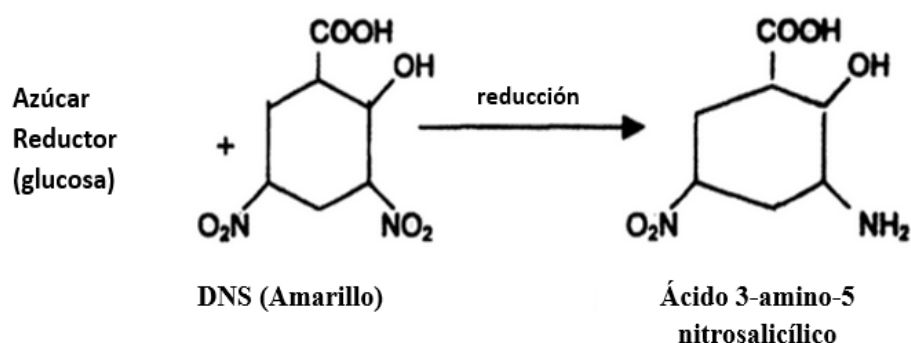


Figura 4. Diagrama modificado de la reacción del método dinitrosalicílico para determinar azúcares reductores.

Fuente: Goel et al., (2009).

2.5.1.3 Medición de azúcares por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la identificación de los azúcares existen técnicas como la cromatografía de gases (Foitzich Molina, 2013), electroforesis capilar (Foitzich Molina, 2013) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Foitzich Molina, 2013). El HPLC separa diferentes compuestos como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especie órgano metálicas (Foitzich Molina, 2013). Además usa detectores como índice de refracción (IR), ultra violeta/visible (UV/Vis), fluorescencia

(Contreras, 2014). El proceso consiste en fuerzas que compiten de manera selectiva por un compuesto, para fijarlo a la columna o llevarlo disuelto en los líquidos que fluyen a través de la columna o fase móvil (Foitzich Molina, 2013).

2.6 Fuentes de contaminación de la miel.

La miel de abejas contiene microorganismos provenientes del polen, néctar, tracto digestivo de las abejas, y del medio ambiente (Sereia et al., 2011). Según Snowdon & Cliver, (1996) existen dos tipos de contaminación, la primaria causada por el polen, tractos digestivos de las abejas, el polvo, el aire, la tierra y el néctar; y la secundaria ocasionada por malas prácticas de extracción y recolección de la miel.

Existen diferentes microorganismos en la miel, algunos patógenos para el ser humano otros descomponedores. Entre ellos se encuentran: *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Salmonella*, Mesófilos aerobios, *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales, Mohos y Levaduras (Vázquez et. al, 2018).

2.6.1 *Escherichia coli*.

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por colonizar el intestino del hombre y producir graves síntomas como diarrea acuosa, calambres abdominales, vómitos, después de uno a tres días de la ingesta y los síntomas pueden durar de tres a siete días (FDA, 2018). Usualmente se transmite por alimentos o agua contaminados con heces humanas (Rodríguez, 2002).

2.6.2 *Clostridium*

Las bacterias esporulantes como *Clostridium perfringens* causa alteraciones gastrointestinales o *C. botulinum* causa botulismo infantil en niños menores de un año de edad, provocando insuficiencia respiratoria y muerte (Vázquez *et al.*, 2018). Los signos y síntomas del botulismo en adultos son: vómitos, diarrea, visión borrosa, visión doble, dificultad para tragar, y debilidad muscular (FDA, 2018). Por otra parte, los signos y síntomas característicos de *C. perfringens* son calambres abdominales intensos y diarrea acuosa, se presenta usualmente a las 8 o 6 horas después de la ingesta de alimentos contaminados (FDA, 2018).

2.6.3 *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* tienen una zoonosis de mayor prevalencia en países en desarrollo, causando graves enfermedades gastrointestinales, se estiman 93 800 000 casos anuales, con 155 000 muertes (Quesada *et al.*, 2016). La forma de transmisión más frecuente (95 %) es considerada por alimentos de origen animal (Quesada *et al.*, 2016).

2.6.4 Mesófilos aerobios

Son organismos capaces de desarrollarse en condiciones ambientales a 35 °C +/- 2°C, refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y las condiciones higiénicas de la materia prima, es un recuento total de bacterias, mohos y levaduras (Campuzano F, Mejía Flórez, Madero Ibarra, & Pabón Sánchez, 2017).

2.6.5 *Bacillus*

El género *Bacillus* se caracteriza por ser una bacteria aeróbica formadora de esporas que se encuentra en suelo, verduras y en alimentos crudos o procesados. *Bacillus cereus* es relacionado a intoxicaciones por alimentos cuando han sido mal manipulados y se mantienen sin refrigeración (Tallent, Rhodehamel, Harmon, & Bennett, 2012). Existen dos tipos de síntomas atribuidos a *B. cereus* el primero se caracteriza por dolor abdominal y diarrea; y el segundo, náuseas y vómitos, los síntomas se presentan después de la ingesta de alimentos contaminados de 4 a 16 h y de 1 a 5 h respectivamente (Tallent et al., 2012).

2.6.6 Mohos y Levaduras

Los mohos y levaduras son microorganismos aeróbicos en su mayoría, su nutrición es heterótrofa, adquieren su energía de compuestos orgánicos del suelo y del agua (Campuzano F et al., 2017). Según la norma ecuatoriana (Norma INEN 1572, 2016) para miel de abejas, el requisito microbiológico un máximo de 1×10^2 UPC/g (unidades propagadoras de colonias por gramo).

Las levaduras son unicelulares esféricas, ovaladas o alargada. Son microorganismos anaerobios facultativos, se estima un 25% de levaduras puede alterar los alimentos causando deterioro debido a la utilización de ácidos orgánicos, carbohidratos, proteínas y lípidos (Campuzano F et al., 2017).

Tanto mohos como levaduras son las causantes de la fermentación de las mieles. Algunos de ellos producen micotoxinas generando problemas digestivos como: *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. (Maradiaga, 2005).

2.6.7 *Staphylococcus aureus*.

S. aureus es una bacteria Gram positiva, con forma de coco. Es considerado el microorganismo ubicuo que produce intoxicaciones de origen alimentario, puede colonizar la nasofaringe, la piel y las mucosas de hombres y animales. La producción de una toxina emética muy resistente al calor y a las enzimas proteolíticas es una característica de esta bacteria. Los síntomas se presentan a las pocas horas de ingesta (menos de tres horas) y comprenden: náuseas, vómitos intensos, espasmo abdominal y diarrea (Jordá, Marucci, Guida, Pires, & Manfredi, 2012).

2.6.8 Coliformes totales

Los coliformes totales son Gram negativas , aerobios y anaerobios facultativas, móviles e inmóviles, no esporuladas (Norma INEN 1529-7, 2013). Son considerados como indicadores de contaminación de agua y alimentos , son bacterias homeotermos, es decir, se encuentran en animales de sangre caliente, aunque también se encuentran en la naturaleza en suelos, semillas y vegetales (Campuzano F et al., 2017).

2.7 Métodos de identificación microbiológica.

Forbes et al., (2009) señala que los criterios fenotípicos más utilizados son:

- Morfología microscópica y características de tinción
- Morfología macroscópica (colonia)
- Las condiciones ambientales para el crecimiento
- La resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos

- Requerimientos nutricionales y propiedades metabólicas

En cambio, los métodos genotípicos son técnicas moleculares para el análisis del ADN y ARN (Forbes et al., 2009).

2.8 Sistema de Hipótesis.

H₀: La miel de la tribu Meliponini presenta características fisicoquímicas y microbiológicas propias y específicas.

H₁: La miel de la tribu Meliponini no presenta características fisicoquímicas y microbiológicas propias y específicas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica de las zonas de estudio.

Se obtuvo un total de 15 muestras obtenidas de cuatro haciendas ubicadas en las parroquias de Dayuma y Taracoa, en la provincia de Orellana entre el periodo de agosto 2018 a diciembre del 2019, cuya ubicación geográfica se indica en la Tabla 3 y Figura 5.

Tabla 3

Coordenadas geográficas de parroquias muestreadas en Orellana-Ecuador

Parroquia	Comunidad	Coordenadas geográficas GMS
Dayuma	Justicia Social	0° 39' 01.8" S, 76° 52' 46.7" O
Taracoa	La Merced	0° 37' 02.6" S, 76° 46' 21.9" O

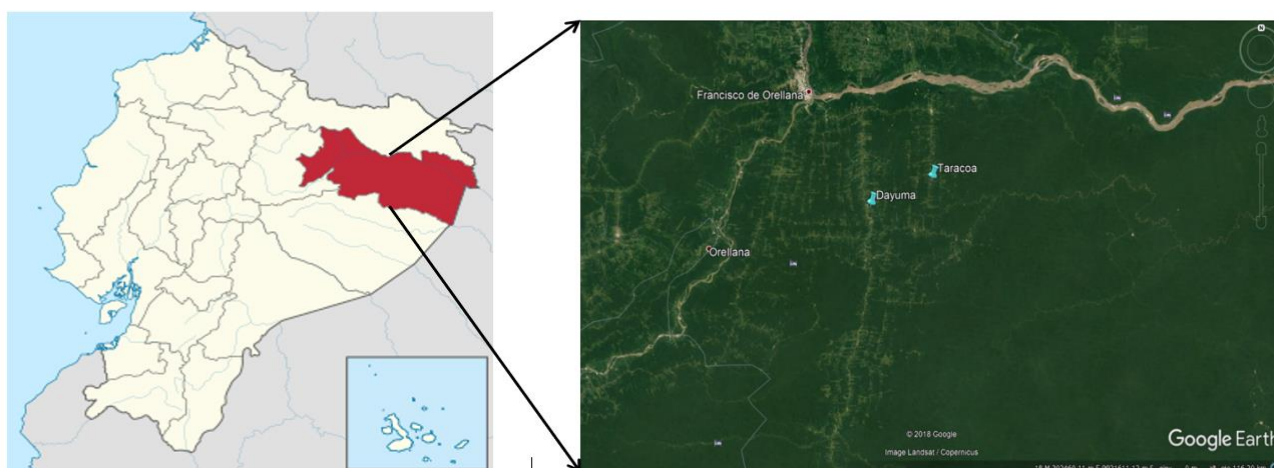


Figura 5. Ubicación geográfica de las parroquias visitadas en el catón Francisco de Orellana, provincia de Orellana-Ecuador.

De un total de cuatro meliponarios muestreados se obtuvieron 15 muestras las cuales, se detallan en la Tabla 4

Distribución de las muestras en la provincia de Orellana. De los 43 nidos visitados, se obtuvieron 15 muestras (34.8%) del total de muestras, debido principalmente a: falta de colaboración por parte de los productores, ciertos nidos no producían miel y algunos nidos aún se encontraban en estado natural (lo que dificultaba la apertura de los potes).

Tabla 4

Distribución de las muestras en la provincia de Orellana.

No. de meliponario	No.de nidos	Nidos muestreados	Porcentaje de distribución de la muestra (%)
1	15	6	40
2	16	6	37,5
3	4	1	25
4	8	2	25
Total	43	15	34,8

3.2 Tamaño Muestral

El tamaño de muestra dependió del número de productores de cada zona y número de nidos de cada productor.

Es por ello que se aplicó la siguiente fórmula:

EC. 1

$$n = \frac{k^2 \times p \times q * N}{e^2 * (N - 1) + k^2 * p * q}$$

Dónde:

n: tamaño de muestra (número de meliponarios muestreado).

N: tamaño de la población o universo (número total de meliponarios).

k: constante que depende del nivel de confianza asignada.

p: proporción de población poseen la característica de estudio.

q: proporción de población no poseen la característica de estudio.

e: error muestral esperado.

3.2.1 Cálculos de obtención del número de muestras

Para obtener el número total de meliponarios en la provincia de Orellana, se consideró un registro levantado por el Ing. Fernando Espinoza (técnico del proyecto quien tiene contacto directo con los productores y trabaja en las zonas), existiendo un total de 10 meliponarios (N).

En cuanto al error muestral esperado (e), que es la diferencia entre el resultado que obtenemos muestreando a la población representativa y al total de la población, será un valor del 20% (ya que no existe un registro oficial de cuántos meliponicultores existen en la provincia de Orellana).

En cuanto a la proporción de población que cumplen las características, es un dato generalmente desconocido y se suele suponer que $p=q=0.5$ es la opción más segura.

Aplicando la EC 1:

$N= 10$

$K= 1,96$ (95% de confianza)

$p: 0.5$

$q: 0.5$

$e: 20\%$

$$n = \frac{k^2 \times p \times q * N}{e^2 * (N - 1) + k^2 * p * q}$$

$$n = \frac{1,96^2 \times 0.5 \times 0.5 * 10}{20^2 * (10 - 1) + 1,96^2 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = 7$$

Los meliponarios cuentan con un aproximado de 10 a 20 nidos y/o cajas (dato proporcionado por el técnico del proyecto), con una media de 15 cajas y/o nidos, el porcentaje muestreado fue del 60% de nidos y/o cajas, con el objetivo de elevar el nivel de precisión del estudio.

3.3 Fase de campo

Los muestreos en campo se realizaron en fincas (n=4) de las parroquias de Dayuma y Taracoa en la provincia de Orellana. Se obtuvieron 15 muestras de miel en el periodo de agosto a diciembre del 2018 dentro del proyecto de sinergia: “Mejoramiento de la meliponicultura en Ecuador, a través de investigación científica aplicada, transferencia de tecnología y capacitación”

3.3.1 Colecta de muestras

Se usó una pinza estéril para abrir los alveolos o potes de miel, se absorbió mediante una pipeta Pasteur desechable y se colocó en frascos estériles de 100 mL de capacidad, se identificó cuidadosamente cada muestra con un código alfanumérico (ejemplo: H1N1M1, donde H1: Primer hacienda, N1: Primer nido, M: Primera miel), fecha, y lugar. La etiqueta era impermeable. Después se almacenó en un termo con bloques de hielo hasta que la muestra llegue al laboratorio.

3.4 Fase de laboratorio.

3.4.1 Procesamiento de muestras.

El procesamiento de muestras se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Carrera de Ingeniería de Biotecnología en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicada en Sangolquí- Ecuador, y en el laboratorio de Sanidad Animal de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Las muestras se almacenaron en frascos con tapa rosca de 100 mL etiquetados respectivamente, conservados a 4°C.

3.4.2 Metodología para la caracterización fisicoquímica de la miel.

3.4.2.1 Determinación de la acidez total.

Primero se estandarizó el método pesando 10 g, 5 g, 2 g y 0,5 g, de miel se diluyó la muestra con 75 mL, 37.5 mL, 15 mL, y 3.75 mL respectivamente de agua exenta de CO₂, se agitó y se determinó el pH mediante un pH-metro (Orion™ 3-Star). Después se tituló con una solución de 0.05 N de hidróxido de sodio usando una micropipeta y se detuvo la adición de NaOH cuando se alcanzó el pH de 8.3. Inmediatamente se añadió 10 mL, 5 mL, 2 mL y 0,5 mL respectivamente de hidróxido de sodio 0.05 N y después se retituló rápidamente con ácido clorhídrico 0,05 N, con una micropipeta y se fue aumentando de 100 µl hasta un pH de 8.5. Una vez que se determinó que no existió una diferencia significativa en la estandarización se hizo el mismo procedimiento con 2 g y 0.5 g de cada muestra. (Norma INEN 1634, 2012)

Para determinar la acidez total se sumó la acidez libre más las lactonas usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Acidez libre} = \frac{(\text{mL de NaOH } 0,05 \text{ N} - \text{mL del título en blanco}) * 50}{\text{g de muestra}}$$

$$\text{Lactonas} = \frac{(\text{VNaOH } 0,05 \text{ N} - \text{VHCL } 0,05 \text{ N}) * 50}{\text{g de muestra}}$$

3.4.2.2 Determinación de la humedad

Para la determinación de la humedad se hizo circular agua por la camisa del refractómetro a temperatura conveniente para que el equipo adquiriera una temperatura de 20 °C, a continuación,

se colocó una gota de muestra entre los prismas del refractómetro (ATAGO®), se observó, la lectura del refractómetro, y la temperatura del termómetro. El contenido de humedad se evaluó según la norma técnica INEN 1632, donde se hizo una regresión para obtenerla (Norma INEN 1632, 2012).

3.4.2.3 Contenido de sólidos insolubles

Se estandarizó el método pesando 20 g, 10 g, y 1 g de miel de abejas con precisión al centésimo más próximo, y se disolvió con 100 mL, 50 mL, y 10 de agua destilada a 80°C respectivamente hasta estar bien mezclada, a continuación, se filtró las diluciones por medio de papel walmat, el residuo sin azúcares se colocó en un crisol fino sinterizado, previamente secado y tarado. Por último, se dejó secar el crisol durante dos horas a 135°C, se enfrió y pesó con una aproximación al 0,1mg (Norma INEN 1635, 2012).

Para los cálculos se expresó en porcentaje en masa y de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$S = \frac{m_2 - m_1}{m} * 100$$

Donde:

S= contenido de sólidos insolubles en agua, en porcentaje en masa.

m= masa de la muestra, en gramos

m1= masa del crisol vacío, en gramos

m2= masa del crisol con el residuo, en gramos

(Norma INEN 1635, 2012)

3.4.2.4 Determinación de las Cenizas.

Se estandarizó el método pesando 5 g, 1 g y 0,5 g de la muestra, se colocó en una cápsula de sílice calcinada y previamente tarada. Luego la muestra se evaporó mediante un baño maría a temperatura entre 60 a 65 °C. El residuo se calcinó en una mufla a 600°C hasta que haya la presencia de cenizas blancas, se enfrió en un desecador y se pesó con una aproximación de 0.1 mg (Norma INEN 1632, 2012).

Cálculos se obtendrán en porcentaje de cenizas:

$$C = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} * 100$$

Donde:

C= Contenido de cenizas en la muestra de miel de abejas, porcentaje en masa.

m= masa de la cápsula vacía en gramos.

m₁= masa de la cápsula conteniendo la muestra en gramos

m₂= masa de la cápsula conteniendo las cenizas en gramos

(Norma INEN 1632, 2012).

3.4.2.5 Determinación de azúcares presentes en miel

3.1.1.1.1 Azúcares totales

Primero se realizó una curva estándar de glucosa donde se pesó 0,5 g de glucosa D-(+)-glucosa $C_6H_{12}O_6$, se disolvió y aforó a 100 mL con agua destilada, después se tomó 1 mL de esta solución y se diluyó en 100 mL de agua, para determinar las diferentes concentraciones se diluyó la glucosa como se observa en la Tabla 5 (Dubois et al., 1956).

Tabla 5

Concentración de glucosa para curva de calibración.

Concentración (mg/L)	Glucosa (mL)	Agua (mL)
0	0	1.25
10	0.25	1.00
20	0.50	0.75
30	0.75	0.50
40	1.00	0.25
50	1.25	0

La preparación de la muestra consistió en pesar 1 g de miel y disolver en 100 mL de agua destilada, después se hizo una dilución 1:100. En cuanto a la cuantificación se tomó 1.25 mL de la dilución (muestra y estándar en tubos diferentes) y se añadió 2.5 mL de reactivo de antrona, se mezcló con

ayuda de un vórtex, y después se colocó en un baño de ebullición durante 10 min, se enfrió y se procedió a medir las absorbancias en 625nm en el espectrofotómetro (Dubois et al., 1956).

Cálculo para obtener el porcentaje de azúcares totales presentes en miel.

$$\%Azúcares\ totales = \frac{LR \left(\frac{mg}{L}\right) * V(L) * FD * 10^{-3} \left(\frac{g}{mg}\right)}{Pm(g)} * 100$$

LR= Lectura de regresión

V= Volumen final

FD= Factor de dilución

Pm= Peso de la muestra

3.1.1.1.2 Azúcares Reductores.

Primero se realizó una curva estándar de glucosa donde se pesó 0,5 g de glucosa D-(+)-glucosa $C_6H_{12}O_6$, se disolvió y aforó a 25 mL con agua destilada, y se procedió a hacer diluciones como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6*Concentración de glucosa para curva de calibración.*

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Glucosa (μL)	Agua (μL)
0	0	500
200	50	450
400	100	400
600	150	350
800	200	300
1000	250	250
1200	300	200
1400	350	150
1600	400	100
1800	450	50
2000	500	0

La preparación de la muestra consistió en pesar 1 g de miel y disolver en 100 mL de agua destilada, después se hizo una dilución 1:5. La cuantificación se tomó 0.5 mL de la dilución (muestra y estándar en tubos diferentes) y se añadió 0.5 mL de hidróxido de sodio a 1 M y 1.5 mL de DNS, se mezcló con ayuda de un vórtex, y después se colocó en baño de ebullición durante 5 min, se enfrió y se añadió 9.5 mL de agua destilada y agitó. Por último se procedió a medir las absorbancias en 540 nm en el espectrofotómetro (Miller, 1959).

Cálculo para obtener el porcentaje de azúcares totales presentes en miel.

$$\%Azúcares\ reductores = \frac{LR \left(\frac{\mu g}{mL} \right) * V(mL) * FD * 10^{-6} \left(\frac{g}{\mu g} \right)}{Pm(g)} * 100$$

LR= Lectura de regresión

V= Volumen final

FD= Factor de dilución

Pm= Peso de la muestra

3.5 Análisis microbiológico de la miel

Se pesará 1 g de miel y se disolvió en 9 mL de agua peptonada al 0.1% (Suspensión madre). Después se hizo diluciones seriadas en relación de 1:10, 1:100, 1:1000, en agua peptonada al 0.1%, y se homogenizó con ayuda de un agitador vortex modelo MX-S (Pucciarelli et al., 2014).

Los siguientes análisis microbianos se llevarán a cabo:

3.5.1.1 Bacterias mesófilas aerobias totales (TAMB)

Se tomó 1 mL de la suspensión madre y se sembró en placas de conteo para mesófilos aerobios (Petrifilm 3M). El recuento microbiano se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de miel (UFC / g) (Gobierno de Chile SAG, 2000).

3.5.1.2 Coliformes totales

Para la determinación de coliformes totales se tomó 1 mL de la suspensión madre y se sembró en placas para conteo de coliformes totales (Petrifilm 3M). Se incubó a 35 °C por 24 h. Por último paso se contó las colonias y expresó en UFC/g (Gobierno de Chile SAG, 2000).

3.5.1.3 *Escherichia coli*.

Primera se tomó 1 mL de las diluciones y se sembró en placas de conteo para *E. coli* (Petrifilm 3M), e incubó a 35 °C por 48 h. Se realizó el conteo de colonias expresando UFC/g (Fernández, Ghilardi, Hoffmann, Busso, & Gallez, 2017; Gobierno de Chile SAG, 2000; Pucciarelli et al., 2014)

3.5.1.4 *Clostridium*.

Se tomó 5 mL de la dilución de 1:10 y se trató a 80°C por 5 min. Después se tomó 1 mL y se inoculó en un tubo con medio RCM, el cual tuvo una temperatura de 46°C, se colocó vaselina en la tapa del tubo para tener condiciones anaerobias, se incubó por cinco días a 45°C. Los resultados que presentaron gas se hizo una tinción Gram y una tinción de esporas con verde malaquita, se observó la morfología con un microscopio óptico (Olympus, Inc., Japón). Por último para la confirmación se aplicó las pruebas bioquímicas de catalasa, crecimiento con un 7% NaCl, fermentación de carbohidratos (glucosa, sacarosa, y maltosa), hidrólisis lecitinasa, hidrólisis de caseína, citrato, ureasa y Voges Proskauer (Pucciarelli et al., 2014).

3.5.1.5 *Bacillus*.

Las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 fueron activadas a 70 o 80°C por 10 min, y enfriada inmediatamente con agua fría por otros 10 min. Después se sembró en agar nutriente, se incubó por tres días a 35°C. La confirmación se realizó con pruebas de: catalasa, crecimiento con un 7% NaCl, fermentación de carbohidratos (glucosa, sacarosa, y maltosa), hidrólisis lecitinasas, hidrólisis de caseína, citrato, ureasa y Voges Proskauer. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de *Bacillus* (Fernández et al., 2017; Sandoval Vargas, 2010).

3.5.1.6 *Salmonella*.

Para determinar la presencia de *Salmonella* spp. se usó la suspensión madre como medio enriquecido, se incubó a 35°C por un día. Posteriormente se tomó 1 mL de la suspensión y se colocó en caldo tioglicolato y caldo bilis verde brillante 2% se incubó a 37°C por un día. Después se sembró en medio agar salmonella- shigella (SS), y se incubó a 35 °C por un día. (Fernández et al., 2017).

3.5.1.7 *Staphylococcus aureus*.

Se tomó 1 mL de la suspensión madre se colocó en placas de conteo para *Staphylococcus aureus* (PetriFilm 3M) y se incubó a 35 °C por un día, las de colonias de color negro o azul-verdosas se les añadió el disco Staph Express PetriFilm, para confirmar si son *S. aureus*, las colonias que no presentaron cambio a color rosa se indica como no presencia de *S. aureus*. Se contabilizó las colonias y se expresó como UFC/ g de muestra (PetriFilm 3M, 2014)

3.5.1.8 Determinación de mohos y levaduras

Se tomó 1 mL de la dilución madre y se sembró en placas de conteo de mohos y levaduras (PetriFilm 3M), se incubó a 22 °C de tres a cinco días. Después se contó el número de colonias y se expresó como UFC/g de muestra (Bonifaz, 2015).

3.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo donde se muestra la media, máximo, mínimo y desviación estándar de los datos fisicoquímicos y microbiológicos, según los géneros. Para analizar si existe una diferencia entre los géneros encontrados se utilizó el test no paramétrico Kruskal- Wallis el cual consiste en un análisis para dos o más muestras independientes, con un nivel de significancia del 95% (Corzo, 2005). Utilizando el software INFOSTAT.

El estadístico de Kruskal- Wallis está dado por la prueba H:

$$H = \frac{12}{N(N + 1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{N_j} - 3(N + 1)$$

K= número de muestras

N_j=número de casos en muestra de orden j

N= número de casos de todas las muestras combinadas

R_j= suma de rangos en la muestra de orden j

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Agrupación de miel según su género.

Para analizar la información obtenida se agrupó la miel, según el género de abejas sin aguijón, basándose en el trabajo de investigación “Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) en las provincias de Orellana, Sucumbíos y Loja, Ecuador” realizado por (Prado et al., 2018). Las muestras fueron obtenidas de tres géneros: (n = 3/15, 20%), *Scaptotrigona* sp. (n = 2/15, 13%), *Tetragonisca* sp. (n = 6/15, 40%) y en 4 géneros no identificados (ver Anexo 1 y Tabla 7).

Tabla 7

Frecuencia según género

Variable	Categoría	FA*	FR*
Género	<i>Melipona</i>	3	0,20
Género	No identificado Sp2	1	0,07
Género	No identificado Sp3	1	0,07
Género	No identificado Sp4	1	0,07
Género	No identificado Sp5	1	0,07
Género	<i>Scaptotrigona</i>	2	0,13
Género	<i>Tetragonisca</i>	6	0,40

*FA (Frecuencia absoluta); *FR (Frecuencia relativa)

4.2 Estandarización de los análisis fisicoquímicos.

Los resultados de la estandarización de las pruebas de sólidos insolubles, cenizas, acidez total no presentan una varianza significativa (ver Tabla 8, Tabla 9y Tabla 10).

Tabla 8

Estandarización del análisis de sólidos insolubles.

N	Peso de muestra (g)	Peso de crisol vacío (g)	Peso de crisol + sólidos insolubles (g)	Peso final + sólidos insolubles (g)	% Sólidos insolubles	Med ia	Desviación estándar	H	p
1	20,19	28,2948	28,3668	28,3668	0,356612	0,36	0,011704	1.	0.6
						4748		14	667
2	20,033	28,2948	28,3695	28,3695	0,372885				
3	10,23	39,012	39,0482	39,0482	0,353861	0,34			
						1345			
4	10,066	39,012	39,0451	39,0451	0,32883				
5	1,022	35,8286	35,8325	35,8325	0,381605	0,35			
						2637			
6	1,01956	35,8286	35,8319	35,8319	0,323669				

Tabla 9

Estandarización para el análisis de cenizas

No.	Peso muestra (g)	Peso crisol (g)	Peso de crisol+ muestra (g)	Peso de crisol + cenizas (g)	% Cenizas	Media	Desviación Estándar	H	p
1	0,543	22,4148	22,9578	22,4765	0,113628	0,126638	0,0246		
2	0,512	22,4148	22,9268	22,4863	0,139648			3.71	0.200

3	1,0102	22,4414	23,4516	22,4433	0,188082	0,172449
4	1,0203	22,4414	23,4617	22,443	0,156817	
5	5,0777	28,4597	33,5374	28,4657	0,118164	0,133918
6	5,345	28,4597	33,8047	28,4677	0,149673	

Tabla 10

Estandarización para el análisis de acidez libre, láctónica y total.

No.	Peso muestra	pH	Vol. NaOH	Vol. HCl	Ac. Libre (meq/kg)	Lactonas (meq/kg)	Ac. Total (meq/kg)	Media	Desviación estándar	H	p
1	0,52	3,51	0,96	0,4	92,019	9,615385	101,635	101,46			
2	0,50	3,52	0,93	0,42	93,3399	7,952286	101,292				
3	2,01	3,08	3,70	1,6	92,0398	9,950249	101,99	101,85	0,2666	2,00	0,533
4	2,04	3,07	3,60	1,45	88,2352	13,48039	101,716				
5	10,12	3,08	18,5	7,9	91,4031	10,37549	101,779	101,34			
6	10,03	3,06	18,35	8,1	91,4391	9,467809	100,910				

4.3 Resultados del análisis fisicoquímico de la miel.

Los resultados del análisis fisicoquímicos se describen en la Tabla 11, donde se determinó que la humedad de la miel fue de 30.57%, acidez libre, láctica y total fue de 44.17 meq/kg, 10.39 meq/kg, y 54.56 meq/kg respectivamente, los sólidos insolubles 0.52%, cenizas 0.40%, pH 3.48, azúcares totales, reductores y no reductores de 45.65%, 41.54% y 4.11% respectivamente

Tabla 11*Tabla de parámetros fisicoquímicos general*

No.		Humedad	Acidez	Acidez	Acidez	Sólidos	Cenizas	pH	Azúcares	Azúcares	Azúcares no
Muestra		(%)	libre	Lactónica	total	Insolubles	(%)		totales	reductores	reductores
			(meq/kg)	(meq/kg)	(meq/kg)	(%)			(%)	(%)	(%)
15	Media	30.57	44.17	10.39	54.56	0.52	0.40	3.48	45.65	41.54	4.11
	D.E.	3.34	26.29	4.39	24.08	0.53	0.46	0.51	21.89	20.46	3.96
	Mín	25.35	10.78	1.24	23.53	0.02	0.006	2.92	11.39	8.25	0.09
	Máx	36.85	91.82	16.18	101.80	1.70	1.61	4.64	95,68	85.82	11.79

4.3.1 Humedad

La humedad no varió entre los diferentes géneros de abejas sin aguijón: *Melipona* (\bar{x} =31.32 %), *Scaptotrigona* (\bar{x} =34.13 %), *Tetragonisca* (\bar{x} =28.40 %) y demás géneros ($H = 3,64$ y el valor de $p>0,05$). Los rangos de humedad variaron entre 28.40 % para miel de *Tetragonisca* y un máximo de 35.5 % para miel del género no identificado Sp3 (ver Figura 6 y Anexo 2).

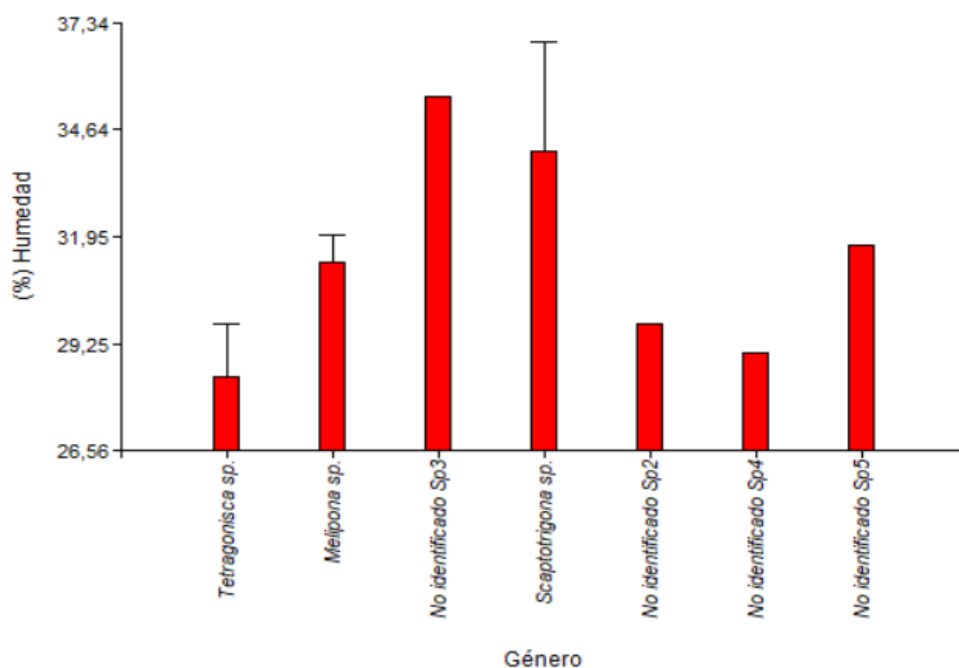


Figura 6. Contenido de humedad (%) de miel según género.

4.1.2 Sólidos insolubles

El análisis de los sólidos insolubles no varió entre los géneros de abejas sin aguijón: *Melipona* (\bar{x} =0.17 %), *Scaptotrigona* (\bar{x} =0.13 %), *Tetragonisca* (\bar{x} =0.69 %), no identificados Sp2, Sp3, Sp4 y Sp5 (\bar{x} = 1.04 %, 0.09 %, 1.42 % y 0.37 %) respectivamente ($H = 2.38$ y el valor de $p>0.05$). El

valor máximo fue de 1.42 % para la miel del género no identificado Sp4 y el valor mínimo es 0.09 % fue en el género no identificado Sp3 (ver Anexo 2y Figura 7).

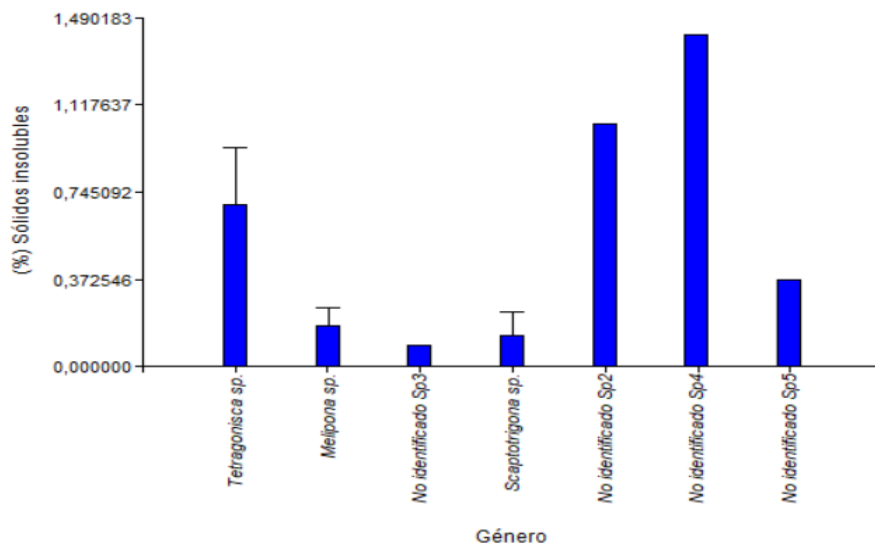


Figura 7. Contenido de sólidos insolubles en miel según el género

4.1.3 Cenizas

En el análisis de cenizas no varío entre los diferentes géneros de abejas sin aguijón: *Melipona* (\bar{x} =0.59 %), *Scaptotrigona* (\bar{x} =0.13 %), *Tetragonisca* (\bar{x} =0.32 %) y para los géneros no identificados Sp2, Sp3, Sp4, y Sp5 (\bar{x} =0.13%, 0.06%, 0.22% y 1.61% respectivamente) ($H =1.41$ y el valor de $p > 0,05$). Como se puede observar el valor máximo fue para el género no identificado Sp5 y el mínimo para género no identificado Sp3 (ver Anexo 2y Figura 8).

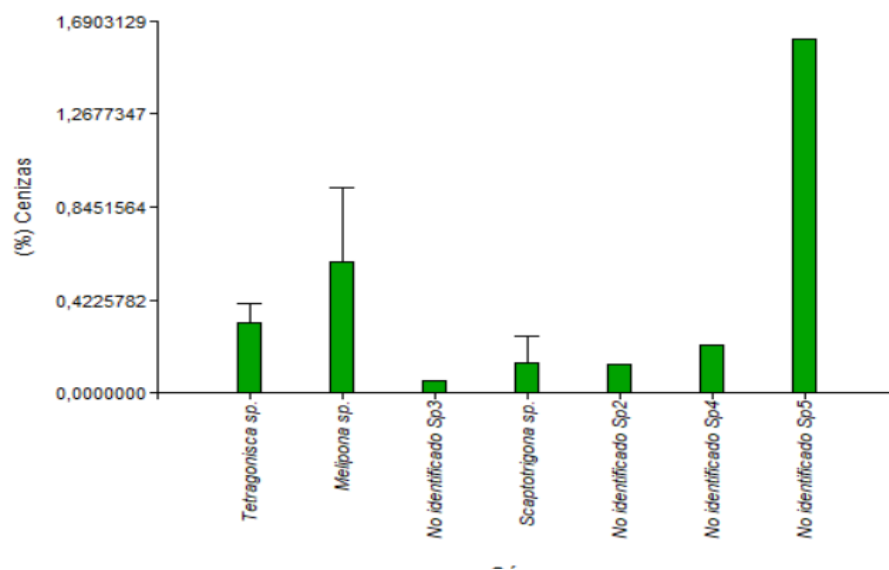


Figura 8. Porcentaje de cenizas encontradas en la miel, clasificadas según género.

4.1.4 pH, Acidez libre, láctónica, y total.

El pH no varió para los tres géneros analizados: *Melipona* ($\bar{x} = 3.25$), *Scaptotrigona* ($\bar{x} = 3.05$), *Tetragonisca* ($\bar{x} = 3.85$) y para los géneros no identificados Sp2, Sp3, Sp4 y Sp5 ($\bar{x} = 3.13, 3.53, 3.53$ y 3.08 respectivamente) ($H = 5.23$ y el valor de $p > 0,05$).

La acidez libre no varió para los géneros de abejas sin aguijón: *Melipona* ($\bar{x} = 62.81$ meq/ Kg), *Scaptotrigona* ($\bar{x} = 50.63$ meq/Kg), *Tetragonisca* ($\bar{x} = 31.78$ meq/Kg) y para los géneros no identificados Sp2, Sp3, Sp4, y Sp5 ($\bar{x} = 49.25$ meq/ Kg, 12.75 meq/ Kg, 28.43 meq/ Kg y 91.82 meq/ Kg respectivamente).

La acidez láctónica no varió para los géneros de abejas sin aguijón: *Melipona* ($\bar{x} = 8.85$ meq/ Kg), *Scaptotrigona* ($\bar{x} = 7.02$ meq/Kg), *Tetragonisca* ($\bar{x} = 12.67$ meq/Kg) y para los géneros no identificados Sp2, Sp3, Sp4, y Sp5 ($\bar{x} = 3.37$ meq/ Kg, 12.75 meq/ Kg, 13.11 meq/ Kg y 9.98 meq/ Kg respectivamente).

Los suma de la acidez libre más la acidez lactónica dan la acidez total la cual no varió para los géneros estudiados: *Melipona* ($\bar{x} = 71.66$ meq/ Kg), *Scaptotrigona* ($\bar{x} = 57.65$ meq/Kg), *Tetragonisca* ($\bar{x} = 44.65$ meq/Kg) y para los géneros no identificados Sp2, Sp3, Sp4, y Sp5 ($\bar{x} = 52.61$ meq/ Kg, 25.49 meq/ Kg, 41.54 meq/ Kg y 101.8 meq/ Kg respectivamente) ($H = 4.85$ y el valor de $p > 0,05$). El valor máximo fue de 101.8 meq/Kg para el género no identificado Sp5, y el valor mínimo de 25.49 meq/Kg para el género no identificado Sp3 (ver Anexo 2 y Figura 9)

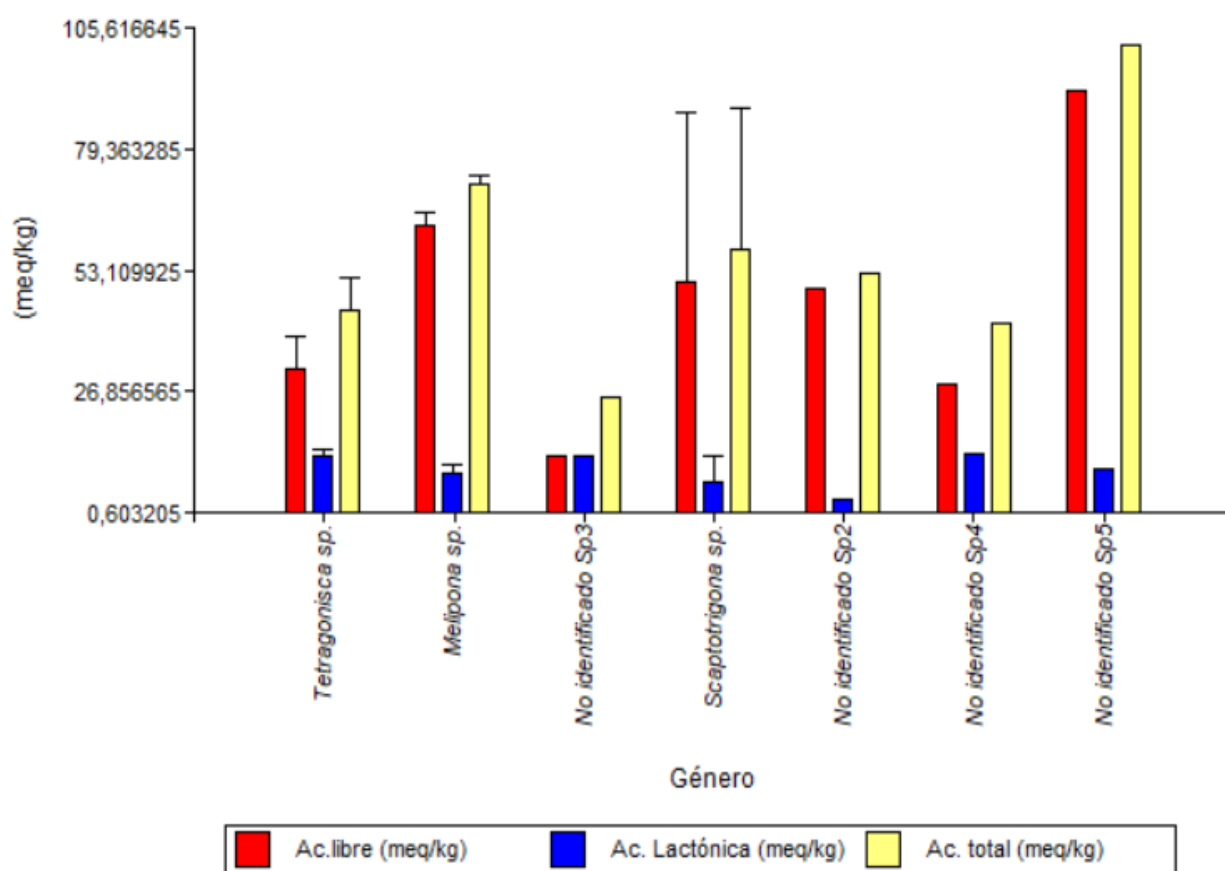


Figura 9. Determinación de acidez libre, lactónica y total (meq/Kg), para cada tipo de miel

4.1.5 Azúcares totales, reductores y no reductores en la miel.

Los resultados de azúcares totales fueron de un máximo fue de 56.17 % para *Tetragonisca* y un mínimo 11.39% para el género no identificado Sp4. Los azúcares reductores son considerados la suma de la glucosa y fructosa, se obtuvo un máximo de 48.50 % en *Tetragonisca* y un mínimo con 8.25 % en el género no identificado Sp4. En cuanto a los azucars no reductores o también conocido como sacarosa aparente se obtuvo el valor máximo fue de 7.67 % para *Tetragonisca* y el mínimo fue de 0.31 % para el género no identificado Sp3 (ver Anexo 2y Figura 10). Los resultados de azúcares totales, reductores, no reductores no presentaron diferencia entre los géneros con valores de H del test de Kruskal- Wallis de: 3.64, 3.14, 1.52 respectivamente, con un valor de $p > 0.05$.

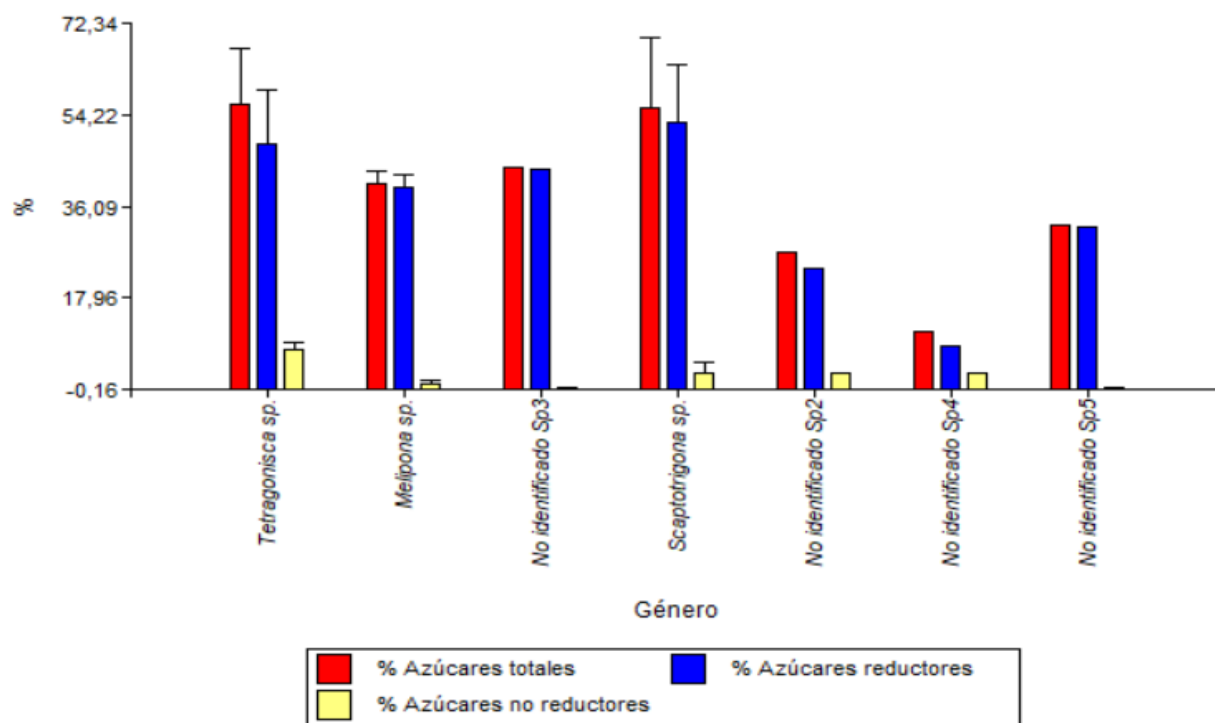


Figura 10. Porcentaje de azúcares totales, reductores y no reductores clasificados según el género.

4.4 Resultados del análisis microbiológico de la miel.

4.4.1 Resultados de microorganismos indicadores de contaminación en la miel.

Se pudo observar la presencia de microorganismos indicadores de contaminación en la miel de la tribu Meliponini, en los diferentes medios de cultivos selectivos y diferenciales (ver Anexo 3). Se encontraron aerobios mesófilos (n= 14/15, 93.33%), mohos y levaduras (n= 12/15, 80%), coliformes totales y *Bacillus* (n= 6/15, 33.33%) y *E. coli* (n= 5/15, 26.67%) (Figura 11).

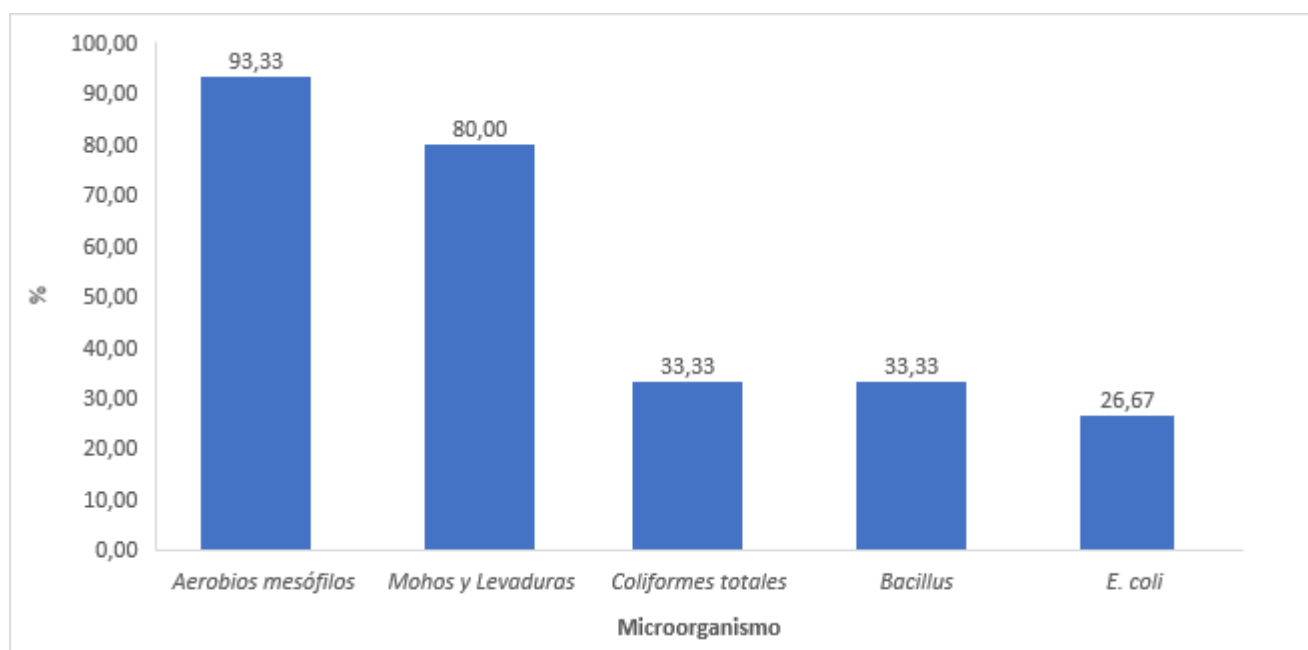


Figura 11. Porcentaje de microorganismos presentes en las 15 muestras de miel.

No se determinó la presencia de *Clostridium*, *Salmonella*, y *Staphylococcus aureus* en las 15 muestras de miel estudiadas.

4.4.2 Descripción morfológica celular

Los aislamientos presuntivos para *Bacillus*, y *Clostridium* fueron sometidos a una tinción Gram y tinción de Wirts, donde se hallaron bacilos Gram positivos y la presencia de esporas (Figura 12).

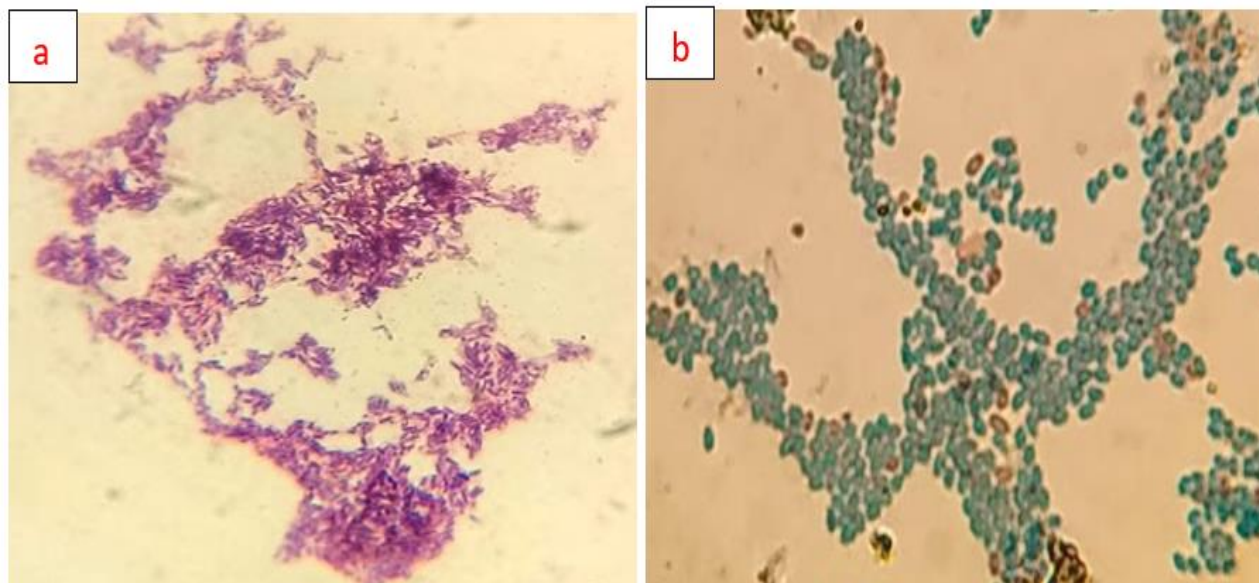


Figura 12. Tinción presuntiva de *Bacillus*: a) tinción Gram positiva, y b) tinción de Wirtz, donde se observa las esporas (100x).

4.4.3 Análisis Bioquímico

Al aplicar las pruebas bioquímicas realizadas para diferenciar de *Bacillus* y *Clostridium* (Figura 13 y Anexo 3), se confirmó la presencia de *Bacillus*, al no existir positivos para la hidrólisis de lecitinasa.

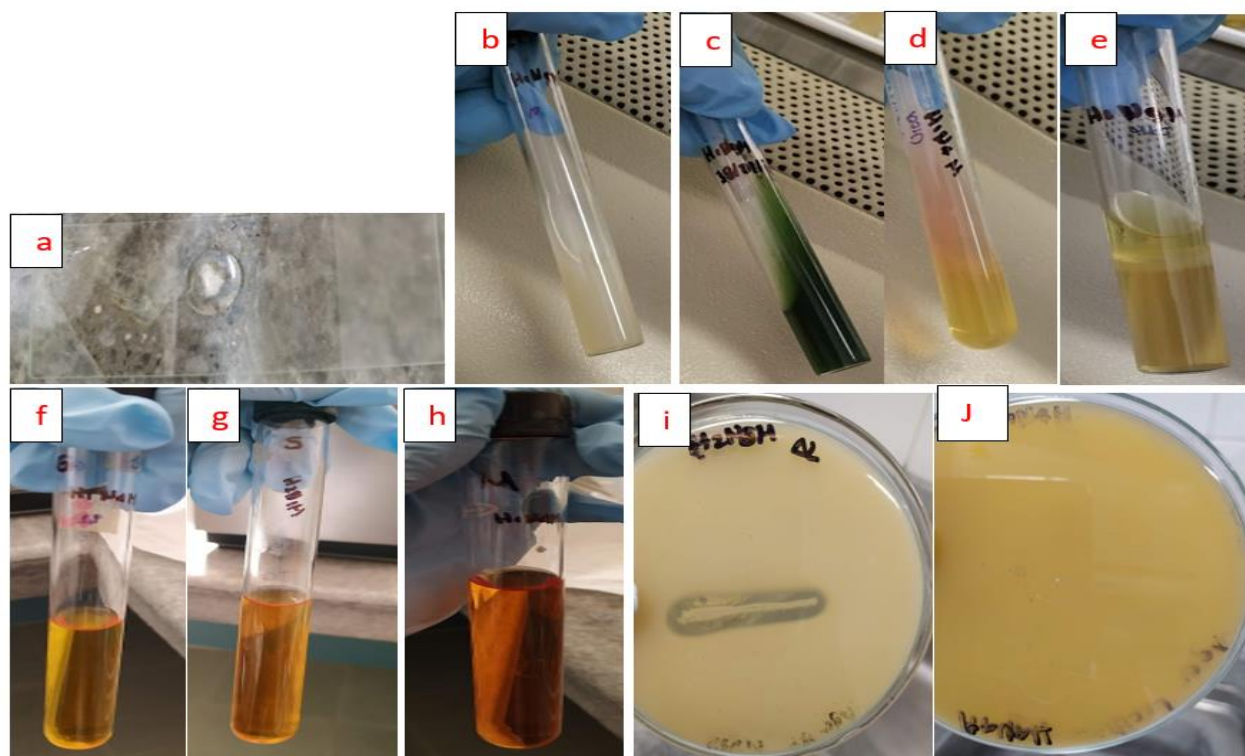


Figura 13. Pruebas bioquímicas aplicadas para la diferenciación de *Bacillus*. y *Clostridium*.

a) prueba de la catalasa positiva, b) prueba de Voges Proskauer positiva, c) prueba del citrato negativa, d) prueba de ureasa positiva, e) prueba SIM negativa, f) fermentación de glucosa positiva, g) fermentación de sacarosa positiva, h) fermentación de manitol negativa, i) hidrolisis de caseína positiva, y j) hidrolisis de lecitinasas negativa.

4.4.4 Cuantificación de microorganismos presentes en miel

En la Tabla 12, se puede observar la cuantificación microbiológica en la miel distribuida según el género con valores máximos de: muy numerosos para contar (MNPC) en aerobios mesófilos, 84 UFC/g en mohos y levaduras, 10 UFC/g en coliformes totales y 5 UFC/g en *E. coli*.

Tabla 12

Cuantificación microbiológica de miel según el género.

Género	Muestra	Aerobios mesófilos		Mohos y Levaduras		Coliformes Totales		E. coli	
		Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo
Melipona	3	2 (66,6%)	MNPC*	3(100%)	61- 83	2(66,6%)	< 10	2(66,6%)	ND*
		1(33,4%)	1			1 (33,4%)	ND	1(33,4%)	2
Scaptotrigona	2	1(50%)	MNPC	2(100%)	ND	1(50%)	1	1(50%)	1
		1(50%)	1			1(50%)	ND	1(50%)	ND
Tetragonisca	6	1(16,67%)	49	6(100%)	1-6	1(16,67%)	10	1(16,67%)	5
		4(66,66%)	1-13			5(83,33%)	ND	5(83,33%)	ND
		1(16,67%)	ND						
No identificado Sp2	1	1(100%)	3	1(100%)	ND	1(100%)	ND	1(100%)	ND
No identificado Sp3	1	1(100%)	MNPC	1(100%)	22	1(100%)	ND	1(100%)	ND
No identificado Sp4	1	1(100%)	140	1(100%)	57	1(100%)	4	1(100%)	3

No identificado Sp5	1	1(100%)	MNPC	1(100%)	4	1(100%)	2	1(100%)	ND
---------------------------	---	---------	------	---------	---	---------	---	---------	----

Conteo (UFC/g);*MNPC muy numeroso para contar; *ND no detectado.

En la Tabla 13, se presenta la frecuencia de positivos y negativos para *Bacillus*, según el género, con un total de 6 muestras (33.3%) positivas y 9 (66.6%) muestras negativas, encontrando que el género *Melipona* posee mayor cantidad de presencia de *Bacillus*.

Tabla 13

Frecuencia de muestras positivas para Bacillus.

Género	Muestra Total de miel	<i>Bacillus</i>	
		Positiva	Negativas
<i>Melipona</i>	3	2 (66,6%)	1(33.4%)
<i>Scaptotrigona</i>	2	1(50%)	1(50%)
<i>Tetragonisca</i>	6	1(16,67%)	5 (83,33%)
No identificado Sp2	1		1(100%)
No identificado Sp3	1		1(100%)
No identificado Sp4	1	1(100%)	
No identificado Sp5	1	1(100%)	

CAPITULO V

DISCUSIÓN

5.1 Análisis fisicoquímicos de la miel de abejas sin aguijón

La miel de abejas sin aguijón no tiene una normativa establecida, sin embargo. Existen estudios realizados en Guatemala (Vit et.al, 2004), México (Vit et.al, 2004), Brasil (Villas-Bôas & Malaspina, 2005; Sousa, 2008) y Venezuela (Vit et.al, 2004; Vit, 2013) que sugieren establecer estándares normativos para el control de calidad en la Tabla 145 se presenta los valores encontrados en este estudio, así como los estándares máximos y mínimos sugeridos. Sin embargo, como se puede observar las sugerencia de los estándares para el género *Melipona* presentada por Vit et.al, (2004) cambia en su publicacion de miel para *Melipona favosa* Vit, (2013).

En la Tabla 14 se puede observar que la humedad del género no identificado Sp3 no cumple con el estándar sugerido máximo de 35%. Según Soto, (2008) algunos factores que intervienen en el aumento de la humedad en miel es la estación del año en que se recolecto y el grado de madurez de la miel. La zona amazónica como lo es Orellana no posee estaciones definidas.

Los valores encontrados para sólidos insolubles de: *Tetragonisca* sp, género no identificado sp3,sp4 son superiores a lo reportado como se observa en Tabla 14, se puede relacionar a una filtración inadecuada y/o problemas de higiene, ya que en la miel puede existir granos de arena y trozos de panal (Correa, 2015). En el Anexo 5;**Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede evidenciar que los meliponarios no presentan condiciones adecuadas.

Al comparar la cantidad de cenizas encontrado en el género *Melipona* (0.59%) observamos un valor elevado según lo sugerido. Sin embargo Souza et al., (2006), describe valores de ceniza en

abejas sin aguijón entre 0.01-1.18%. La miel del género no identificado Sp5 tiene un valor alto (1.61%), esto puede estar influenciado por el origen botánico de la miel, y también correlacionado ionoma de la miel (Dardón, Maldonado-Aguilera, & Enríquez, 2013).

La acidez total es la suma de la acidez libre más la acidez lactónica, en la investigación el valor del género no identificado Sp5 no cumple los estándares propuestos. Pero se han reportado valores medios de acidez total 105.1 meq/kg (Chuttong, Chanbang, Sringarm, & Burgett, 2015). Este análisis se relaciona a la madurez de la miel, y/o factores climáticos, que intervienen en reacciones enzimáticas y microbiológicas capaces de liberar compuestos ácidos en la miel (Pucciarelli et al., 2014).

Como se puede observar en la Tabla 14, los géneros que no cumplen para el estándar de azúcares reductores son: *Melipona*, *Tetragonisca*, los géneros no identificados sp2, sp3, sp4 y sp5. Y en comparación a los azúcares no reductores no cumplen *Melipona* y *Tetragonisca*. La miel cambia según el tiempo almacenado, los azúcares de fructosa y glucosa disminuyen, mientras los disacáridos aumentan, como se puede observar en la Tabla 14 para el género de *Tetragonisca* se observa un aumento de azúcares no reductores (Chuttong, Chanbang, Sringarm, & Burgett, 2016). Los azúcares de la miel están relacionados a la fuente botánica, así como las enzimas secretadas por las abejas (Vit et al., 1994). Se ha reportado que las abejas sin aguijón prefieren exudados antes que los recursos florales (Yurrita & Vásquez, 2013).

Tabla 14

Comparación de resultados del estudio con sugerencias de estándares para parámetros fisicoquímicos

Parámetro fisicoquímico/ Género	Estudio							Brazil	Venezuela	Guatemala, Venezuela ^d	México,	
	Me ¹	Sca ²	Te ³	Sp2 ⁴	Sp3 ⁵	Sp4 ⁶	Sp5 ⁷	<i>Meliponini</i> ^a	<i>Tetragonisca angostula</i> ^b	<i>Melipona favosa</i> ^c	<i>Scaptotrigona</i>	<i>Melipona</i>
Humedad (%)	31.32	34.13	28.40	29.75	35.50	29.0	31.75	Máx. 35.0	Máx. 35	Máx. 35	Máx. 30.0	Máx.30.0
Sólidos insolubles (%)	0.17	0.13	0.69	1.04	0.09	1.42	0.37	Máx. 0.4	Máx. 0.4	-		
Cenizas (%)	0.59	0.13	0.32	0.13	0.06	0.22	1.61	Máx. 0.6	Máx.0.6	Máx. 0.5	Máx.0.5	Máx 0.5
pH	3.25	3.05	3.85	3.13	3.52	3.53	3.08	-	-	-	-	-
Acidez libre (meq/kg)	62.81	50.63	31.78	49.25	12.75	28.43	91.82	-	-	Máx. 100	-	-
Acidez láctónica (meq/kg)	8.85	7.02	12.67	3.37	12.75	13.11	9.98	-	-	-	-	-
Acidez total (meq/kg)	71.66	37.65	44.45	52.61	25.49	41.54	101.80	Máx. 85.0	Máx. 85	-	Máx.85.0	Máx.70
Azúcares totales (%)	40.65	55.63	56.17	26.86	43.76	11.39	32.49	-	-	-	-	-
Azúcares reductores (%)	39.67	52.75	48.5	23.77	43.45	8.25	32.14	Mín.50.0	Mín. 60	Mín. 60	Mín.50.0	Mín.50
Azúcares no reductores (%)	0.98	2.088	7.67	3.09	0.31	3.14	0.35	Máx. 6.0	Máx. 6.0	-	Máx. 2.0	Máx.6.0

1. *Melipona*; 2. *Scaptotrigona*; 3 *Tetragonisca*; 4,5,6,7 Géneros no identificados; a)Villas-Bôas & Malaspina, (2005); b) Sousa, (2008); c)Vit, (2013); d)Vit, Medina, & Enríquez, (2004).

5.2 Microbiología de la miel de abejas sin aguijón.

La contaminación como se había mencionado antes puede deberse a una contaminación primaria o una contaminación secundaria. Este estudio tratamos de evitar la contaminación secundaria usando material estéril para el muestreo. Sin embargo, la miel mostró una amplia gama de recuentos para mohos y levaduras con un mínimo de 1 UFC/g en *Tetragonisca*, y un máximo de 82,5 UFC/g en *Melipona*. Según la Norma INEN 1529-10,(2013) el máximo permitido es de 1×10^2 UFC/g lo cual indica que todas las mieles están dentro del rango. Según Pucciarelli et al., (2014), los mohos y levaduras tiene una gran capacidad de crecer en altos contenidos de azúcares, además este hecho también es relacionado a la gran cantidad de humedad.

Según Kounga & Aotearoa, (2016), el máximo permitido para mesófilos aerobios de 1×10^4 UFC/g para el 10% del total de las muestras. Los resultados de esta investigación muestran que 26,66% de las 15 muestras presentan un conteo MNPC (muy numeroso para contar), indicando que no cumplen para ser consumidos.

Los *Bacillus* encontrados en un tercio de las muestras, puede deberse a que son comunes en el aire, suelo y polvo convirtiéndose en una fuente primaria de contaminación, por lo que es comúnmente encontrada en la miel (Pucciarelli et al., 2014). Además, *Bacillus* se han encontrado en varias mieles de abejas sin aguijón de climas tropicales, así como en el abdomen de las abejas y en la comida proporcionada a las larvas (Gilliam & Prest, 1987). Según Kounga & Aotearoa, (2016), el máximo permitido para *Bacillus cereus* es de 1×10^2 UFC/g, en este estudio no se realizó el conteo, ya que como objetivo solo fue determinar si había la presencia de *Bacillus* en las muestras de miel.

En cuanto al recuento de coliformes totales según Maradiaga, (2005) el límite máximo permitido es menos de 10 UFC/g en miel, solo una muestra perteneciente al género *Tetragonisca* no cumple con lo establecido. Cabe recalcar que de las seis pruebas positivas para coliformes totales, cinco presentaron contaminación fecal. La presencia de *E. coli* no es permitida según la Norma INEN 1529-8, (2016), el 26,67% del total de muestras analizadas presentaron este tipo de contaminación. *E. Coli* es una bacteria que se encuentra en tracto entérico de animales, y es un indicador de contaminación fecal (Sanz, Gradillas, Fuencisla, Perez, & Juan, 2016). Este tipo de contaminación por coliformes y *E. coli* se puede explicar, ya que el lugar donde se encontraron los nidos de las abejas era cercano a chancheras, y corrales de aves, así como letrinas (ver Anexo 5) o también se puede deber a la ecología de la abeja como es el caso de *Partamona orizabaensis* que ha sido capturada en heces de animales (Yurrita & Vásquez, 2013)

No se determinó la presencia de *Clostridium*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en las 15 muestras de miel estudiadas. Esto puede deberse a que esta miel ha sido relacionada con propiedades antibacterianas, aunque existe una resistencia por parte bacterias Gram negativas (Sgariglia, Vattuone, Sampietro, Soberón, & Sampietro, 2010). Sin embargo, la miel al tener una alta osmolaridad inhibe el crecimiento de bacterias evitando que usen las moléculas de agua, además de contener peróxido de hidrogeno proveniente de las enzimas digestivas de las abejas (Castellanos-Ramirez et al., 2014)

5.3 Comparación general de los resultados.

El tamaño de muestra para cada género fue muy pequeño para poder sacar conclusiones tanto en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

El género *Scaptotrigona* cumple los parámetros fisicoquímicos, pero no los microbiológicos, al comparar dentro de este género se observó que la miel del nido H2N7M cumple con todos los parámetros (ver Anexo 6).

En el género *Tetragonisca* tanto la miel de los nidos H1N13M y H2N3M cumplen con los estándares microbiológicos, mientras que en los parámetros fisicoquímicos no cumplen con el porcentaje de azúcares no reductores, como ya se había mencionado antes esto puede deberse a que las mieles estuvieron mucho tiempo almacenadas transformándose los monosacáridos a disacáridos, un parámetro que se podría controlar (ver Anexo 6).

CAPITULO VI

CONCLUSIONES. Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Se identificó las propiedades fisicoquímicas cumpliendo con los estándares sugeridos para Brasil, Venezuela, México y Guatemala, el género *Scaptotrigona*.
- Dentro del género *Tetragonisca* los nidos H1N13M y H2N3M, cumplieron los estándares microbiológicos internacionales para alimentos.
- Se identificaron microorganismos como: aerobios mesófilos en el 93.33 % (n=14/15), mohos y levaduras en el 80 % (n=12/15), coliformes totales en el 33.33 % (n= 6/15), *Escherichia coli* en el 26.67 % (n= 5/15) y *Bacillus* en el 33.33% (n= 6/15).
- Se acepta la hipótesis.

6.2 Recomendaciones.

Implementar una norma nacional de la calidad fisicoquímica y microbiológica para miel de abejas sin aguijón

Realizar un estudio sobre propiedades antioxidantes de la miel, así como de la estabilidad en diferentes tiempos de almacenamiento y temperatura.

Además, los meliponicultores deben capacitarse sobre buenas prácticas de manejo de nidos y aprovechamiento de sus productos.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Arana, L., & Beltrán, R. (2012). *Estudio de factibilidad financiero para incrementar la producción de miel de abeja Melipona en los cantones Portovelo, Zaruma y propuesta de comercialización en la ciudad de Guayaquil*. Universidad Politécnica Salesiana sede Guayaquil. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9966/1/UPS-GT000998.pdf>
- Bogdanov, S., Vit, P., & Kilchenmann, V. (1996). Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie*, 27(6), 445–450.
<https://doi.org/10.1051/apido:19960602>
- Bonifaz, D. (2015). *Evaluación de la actividad bactericida del agua de plata sobre ensaladas listas para el consumo en cafeterías de una Institución de Educación Superior*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from
[http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/10163 %09](http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/10163%09)
- Campuzano F, S., Mejía Flórez, D., Madero Ibarra, C., & Pabón Sánchez, P. (2017). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Nova*, 13(23), 81.
<https://doi.org/10.22490/24629448.1708>
- Castellanos-Ramirez, D. K., Gonzalez-Villordo, D., Gracia-Bravo, L. J., Castellanos-Ramirez, D. K., Gonzalez-Villordo, D., & Gracia-Bravo, L. J. (2014). Manejo de heridas. *Cirujano*

General, 36(2), 112–120. Retrieved from

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-00992014000200112

Cauch Kumul, R., Ruiz Ruiz, J. C., Ortíz Vázquez, E., & Segura Campos, M. R. (2015).

Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1432–1442.

<https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>

Chuttong, B., Chanbang, Y., Sringarm, K., & Burgett, M. (2015). Effects of long term storage on

stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) honey. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 441–451. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1186404>

Chuttong, B., Chanbang, Y., Sringarm, K., & Burgett, M. (2016). Physicochemical profiles of

stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*, 192, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.089>

Codex Alimentarius Commission. (2001). Standard for honey codex standards 12-1981, 12, 1–8.

<https://doi.org/10.1007/978-3-540-88242-8>

Coll Cárdenas, F., Villat, C., Laporte, G., Noia, M., & Mestorino, N. (2008). Microbial

characteristic of honey. *Research Articles*, 1(2), 29–34.

Contreras, P. (2014). *Comparación del método HPLC y método de infrarrojos para la*

determinación de azúcares en la miel. Universidad de la Rioja. Retrieved from

http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/R000001910.pdf

- Correa, A. R. (2015). *Deterioro de miel de diferentes especies de abejas Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas*. Universidad Nacional de Colombia.
- Corzo, J. (2005). *Notas de clase. Estadística no paramétrica (Métodos basados en rangos)*. (Univ. Nacional de Colombia, Ed.) (Primera ed). Colombia. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=paXp0kwQB8sC>
- Dardón, M. J., Maldonado-Aguilera, C., & Enríquez, E. (2013). The Pot-Honey of Guatemalan Bees. In *Pot-Honey* (pp. 395–408). New York, NY: Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_28
- Dubois, M., Gilles, K. ., Hamilton, J., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination. *Biochemistry*, 350–356.
- FDA. (n.d.). Consumers - Foodborne Illnesses: What You Need to Know. Retrieved April 23, 2019, from <https://www.fda.gov/food/resourcesforyou/consumers/ucm103263.htm>
- Fernández, L. A., Ghilardi, C., Hoffmann, B., Busso, C., & Gallez, L. M. (2017). Microbiological quality of honey from the Pampas Region (Argentina) throughout the extraction process. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 55–61.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.010>
- Foitzich Molina, A. C. (2013). Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR., 1–59. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/faf659d/doc/faf659d.pdf>

- Forbes, B. A., Bailey, W. R. (William R., Scott, E. G., Sahn, D. F., Weissfeld, A. S., & Trevino, E. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Panamericana.
- Gilliam, M., & Prest, D. B. (1987). Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(1), 70–75. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(87\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90127-3)
- Gobierno de Chile SAG. (2000). Instructivo técnico para Recuento de Coliformes y E.coli mediante técnica Petrifilm® AOAC Official Method 991.14 Ó 998.08, 1–12. Retrieved from <http://historico.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hB17Pf6lazkmq89cmzNMQGw%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=23275>
- Goel, K. (2007). *Laboratory Techniques In Sericulture*. (2007 APH Publishing, Ed.). Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=SxLUwt6PSYcC>
- Huicochea, G. L. (2011). Dulce manjar...Sabores, saberes y rituales curativos en torno a la miel de las meliponas. *Ecofronteras*, No. 42, 22–25. Retrieved from <http://revistas.ecosur.mx/ecofronteras/index.php/eco/issue/view/97/showToc>
- Jordá, G., Marucci, R., Guida, A., Pires, P., & Manfredi, E. (2012). *Revista argentina de microbiología*. *Revista Argentina de Microbiología* (Vol. 44). Asociación Argentina de Microbiología. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/2130/213024208009/>
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary*

- and Alternative Medicine : ECAM*, 2015, 297425. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Kounga, T. M., & Aotearoa, A. (2016). *Compendium of Microbiological Criteria for Food. Food Standards Australia New Zealand 2016*. <https://doi.org/978-0-642-34594-3>
- Lorenzo, C. (2002). *La miel de Madrid*. (Consejería de Economía e Innovación Tecnológica, Ed.). España.
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Maradiaga, D. (2005). *Physical-chemistry and microbiological characterization of honey bee of five departments of Honduras*. Zamorano.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press (Vol. 85). [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0290:FMBLZH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0290:FMBLZH]2.0.CO;2)
- Miguel, M. G., & Antunes, M. D. (2011). Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 3(4), 479–495. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.90101>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. *Acta Amazonica* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200021>
- Norma INEN 1529-10. (2013). *Norma Técnica Ecuatoriana nte inen 1529-10: 2013 Primera*

Revisión Control microbiológico de los Alimentos. Mohos primera edición. Retrieved from <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>

Norma INEN 1529-7. (2013). Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias, 1–8. Retrieved from <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>

Norma INEN 1529-8. (2016). Control Microbiológico de los Alimentos. Detección y recuento de *Escherichia coli* presuntiva por la técnica del número más probable., 1–8. Retrieved from <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>

Norma INEN 1572. Miel de Abejas Requisitos (2016). Retrieved from <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>

Norma INEN 1632. (2012). Determinación de la Densidad relativa a 27°C y de la Humedad.

Norma INEN 1634. (2012). Miel de Abejas. Determinación de la acidez total. Retrieved from <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>

Norma INEN 1635. (2012). Miel de Abejas. Determinación del contenido de sólidos insolubles.

Petrifilm 3M. (2014). *Recuento de Staphylococcus aureus*. Retrieved from <https://multimedia.3m.com/mws/media/467012O/3m-petrifilm-staph-express-interpretation-guide-spanish.pdf>

Prado, A., García, C., Araujo, P., Hernández, A., Ron-Román, J., Saegerman, C., ... Carrillo, G. (2018). *Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) en las provincias de*

Orellana, Sucumbíos y Loja, – Ecuador. Quito, Ecuador.

Pucciarelli, A. B., Schapovaloff, M. E., Kummritz, S., Seňuk, I. A., Brumovsky, L. A., &

Dallagnol, A. M. (2014). Microbiological and physicochemical analysis of yateí (

Tetragonisca angustula) honey for assessing quality standards and commercialization.

Revista Argentina de Micrología, 46(4), 325–332. <https://doi.org/10.1016/S0325->

7541(14)70091-4

Quesada, A., Reginatto, G. A., Ruiz Español, A., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016).

Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(1), 32.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1899>

Ramírez Viteri, J. S. (2016). Producción y comercialización de miel de abejas meliponas en la

ciudad de Quito. Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5958>

Rodríguez-Suazo, G. E. (2014). Caracterización física, química y microbiológica de la miel de

Melipona beecheii, 22.

Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de

Escherichia coli. *Salud Publica de Mexico*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/S0036->

36342002000500011

Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and Health: A Review of Recent

Clinical Research. *Pharmacognosy Research*, 9(2), 121–127. <https://doi.org/10.4103/0974->

8490.204647

- Sánchez, J. (1999). La espectrofotometría UV-VIS aplicada al estudio del color y estabilida en morteros coloreados. *Materiales de Construcción*, 49(254), 17–29.
- Sandoval Vargas, P. (2010). Aislamiento e identificación de especies del género *Bacillus* desde miel para su empleo como antagonistas a *Paenibacillus larvae*, 113.
- Sanz, S., Gradillas, G., Fuencisla, J., Perez, C., & Juan, T. (2016). Fermentation Problem in Spanish North-Coast Honey. *Journal of Food Protection*, 58(5), 515–518.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-58.5.515>
- Sereia, M. J., Alves, E. M., Toledo, V. de A. A. de, Marchini, L. C., Faquinello, P., Sekine, E. S., & Wielewski, P. (2011). Microbial flora in organic honey samples of africanized honeybees from Parana river islands. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 462–466.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000200028>
- Sgariglia, A. M., Vattuone, M. A., Sampietro, M., Soberón, R. J., & Sampietro, A. D. (2010). Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina*. *Apidologie*, 41, 667–675. <https://doi.org/10.1051/apido/2010028>
- Snowdon, J. A., & Cliver, D. O. (1996, August 1). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00970-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00970-1)
- Solares, C. (2013). *Estudio Comparativo de los Niveles de Sacarosa y Azúcares reductores (glucosa + fructosa) de la miel de abeja (Apis mellifera)*. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 19–23.

Soto, C. (2008). Estudio de mieles monoflorales a través de análisis palinológico , físico , químico y sensorial. Tesis pregrado Licenciado en Agronomía. *Cybertesis.Uach.Cl*, 1–152.
<https://doi.org/10.1017/S0266467403001032>

Sousa, G. L. (2008). *Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Composição e qualidade de méis de abelhas (Apis mellifera) e méis de abelhas Jataí (Tetragonisca angustula)*. Universidad de Sao Paulo. Retrieved from
www.teses.usp.br/teses/.../Graziela_Leal_Sousa_Mestrado.pdf

Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., ... Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: setting quality standards, *31*, 867–875.
<https://doi.org/10.1007/s00464-010-1064-4>

Tallent, S., Rhodehamel, J., Harmon, S., & Bennett, R. (2012). Laboratory Methods - BAM: *Bacillus cereus*. Retrieved from
<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>

Ulloa, J. A., Mondragón, P. M., Rodríguez, R., Reséndiz, J. A., & Rosas-Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*, 2(4), 11–18.

Vázquez-Quiñones, C. R., Moreno-Terrazas, R., Natividad-Bonifacio, I., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2018). Calidad microbiológica de la miel en México. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.005>

- Villas-Bôas, J., & Malaspina, O. (2005). Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil . Retrieved June 21, 2019, from <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/82/artigo2.htm>
- Vit, P., Bogdanov, S., & Kilchenmann, V. (1994). Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 25(3), 278–288. <https://doi.org/10.1051/apido:19940302>
- Vit, Patricia. (2013). *Melipona favosa* Pot-Honey from Venezuela. In *Pot-Honey* (pp. 363–373). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_25
- Vit, Patricia, Medina, M., & Enríquez, M. E. (2004). Bee World Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala , Mexico and Venezuela. *Bee World*, (Marzo). <https://doi.org/10.1080/0005772X.2004.11099603>
- Vit, Patricia, Medina, M., & Eunice Enríquez, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, 85(1), 2–5. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2004.11099603>
- Vit, Patricia, & Silvia, P. (2013). *Pot- Honey*. Springer.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/308249>
- Wille, A. (1976). Las abejas jicotes del género *Melipona* (Apidae : Meliponini) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropic*a, 24, 123–147.

- Yugsi Lita, J. Y. (2017). *Estudio comparativo de los Métodos Fenol- Ácido Sulfúrico y Antrona para determinar la pureza de dos almidones ; usando muestras de almidon de maíz (Zea mays) y papa (Solanum tuberosum)*. Universidad San Francisco de Quito. Retrieved from <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=5bd6dab2-e3ec-6db5-16a4-a146c46d6479&documentId=8d9e5aef-05bf-379b-8cc4-2bebc327f729>
- Yurrita, C. L., & Vásquez, M. (2013). Stingless Bees of Guatemala. In *Pot-Honey* (pp. 99–111). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_6