



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE**  
**NUTRICION**

Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellifera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expandidos en el mercado “La Unión” - Trujillo.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE**  
**LICENCIADA EN NUTRICION**

**AUTOR:**

**CASTRO NAVARRO ERIKA PAMELA**

**ASESOR:**

**DRA. NELIDA MILLY ESTHER OTINIANO GARCÍA**  
**MG. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

**ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2017**

## JURADO CALIFICADOR

---

Dra. Gaby Mónica Felipe Bravo  
Presidente

---

Dra. Karyn Olascuaga Castillo  
Secretaria

---

Dra. Nelida Milly Otiniano Garcia  
Vocal

Trujillo, Junio de 2017

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Dedico esta muestra de trabajo por guiar siempre mi camino y estar conmigo en todo momento y darme la fortaleza para lograr que este sueño se haga realidad.

### **A Mis Padres e Hija**

Quiero dedicar mi investigación a mis queridos padres, Kely Navarro Macedo, Luis Alberto Castro Gutierrez a mis hermanos Jose Luis Castro Navarro, Amy Nicolle Catro Navarro, Gustavo Adolfo Castro Navarro y mi adorada hija, Ghia Gahella Guevara Castro, por brindarme la confianza para lograr siempre mis anhelos y por apoyarme en cada paso que he dado en mi vida, por el esfuerzo que día a día han hecho por mí, y por ser mi punto de apoyo en cada momento durante todo el desarrollo de mi tesis.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por darme siempre la fortaleza y mucha Fe y poder culminar con satisfaccion mi tesis. A mi familia por el gran apoyo que me ha dado siempre de principio a fin en este camino. A mi hija que es el motor y motivo de mi vida y cada paso que doy es por ella y para ella a la Universidad Cesar Vallejo, la Escuela Profesional de Nutricion y a mis maestros por todas las enseñansas brindadas en todos estos años. Agradezco a una persona en especial que me apoyó desde el primer momento Mg. Jaime Polo Gamboa que me asesoró en el desarrollo de mi tesis y agradecer por la amistad y cofianza.

La Autora

## **DECLARACION DE AUTENTICIDAD**

Yo Erika Pamela Castro Navarro con DNI N° 71466490, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Profesional de Nutrición, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, junio de 2017.

---

**DNI: 71466490**

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la tesis titulada “Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellifera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado ‘La Unión’ – Trujillo”. Con la finalidad de Evaluar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en los quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado La Unión en cumplimiento del reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo para obtener el Título Profesional de Licenciada en Nutrición esperando cumplir con los requerimientos de aprobación.

La autora

## ÍNDICE

Página del jurado .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimiento .....	iv
Declaración de autenticidad .....	v
Presentación .....	vi
Índice.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
I. INTRODUCCION .....	1
1.1 Realidad problemática.....	1
1.2 Trabajos previos.....	1
1.3 Teorías relacionadas al tema .....	4
1.4 Formulación del problema .....	6
1.5 Justificación del estudio.....	6
1.6 Hipótesis.....	7
1.7 Objetivos .....	7
II. MÉTODO.....	8
2.1 Diseño de investigación.....	8
2.2 Variables, operacionalización.....	8
2.3 Población y muestra .....	9
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad ...	9
2.5 Métodos de análisis de datos .....	11
2.6 Aspectos éticos .....	12
III. RESULTADOS .....	13
IV. DISCUSIÓN .....	16
V. CONCLUSIONES .....	18
VI. RECOMENDACIONES .....	19
VII. REFERENCIAS .....	20
ANEXOS .....	23

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* sobre los coliformes presentes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión” de Trujillo, Perú. Para ello, se trabajó un diseño experimental de estímulo creciente. Se establecieron 3 grupos para miel de abejas y 3 para algarrobina. Se agregó 50µL, 100µL y 150µL de miel de abejas por cada gramo de quesillo, a cada uno de los tres grupos. De forma similar, se procedió para la algarrobina, además, se trabajó con un grupo testigo al cual no se le adicionó nada. Después de 20 minutos de acción de las dos sustancias, se realizó la detección de coliformes mediante el método del número más probable (NMP). Los resultados indican que la miel de abejas tiene actividad antibacteriana contra coliformes a 100µL/g y 150µL/g, mientras que la algarrobina lo hace en las 3 concentraciones, pero tiene efecto total a 100µL/g y 150µL/g. Al realizar un análisis de varianza se obtuvo un valor p de 0.00, que indica que existe diferencia altamente significativa entre el efecto antibacteriano de las 2 sustancias. Se concluye que tanto la miel de abeja como la algarrobina presentan efecto antibacteriano sobre los coliformes, siendo mayor el efecto de la algarrobina que actúa a concentraciones menores que la miel de abejas.

**Palabras clave:** Miel de abejas, algarrobina, efecto antibacteriano, coliformes.

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine the antibacterial effect of *Apis mellifera* honey and *Prosopis pallida* algarrobina on coliforms present in handmade cheeses in the "La Unión" market in Trujillo, Peru. For this, an experimental design of increasing stimulus was applied. Three groups were established for honey and 3 for algarrobina. 50µL, 100µL and 150µL of honey were added for each gram of quesillo, to each of the three groups. The same way, we proceeded for algarrobina. beside, another group was made as a witness to which nothing was added. After 20 minutes of action of the two substances, coliforms were detected by the most probable number method (MPN). The results indicate that bee honey has antibacterial activity against coliforms at 100µL/g and 150µL/g, while algarrobina does at all 3 concentrations, but has a total effect at 100µL/g and 150µL/g. When performing a variance analysis, a p-value of 0.00 was obtained, indicating that there is a highly significant difference between the antibacterial effect of the two substances. It is concluded that both bee honey and algarrobina have an antibacterial effect on the coliforms, being greater the effect of the algarrobina that acts in concentrations lower than the honey of bees.

**Key words:** Honey of bees, algarrobina, antibacterial effect, coliforms.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Realidad problemática

Los productos lácteos, especialmente los diversos tipos de quesos y quesillos preparados artesanalmente, son muy susceptibles de contaminarse con bacterias que deterioran al alimento y bacterias patógenas para el humano; las cuales proceden de una inadecuada práctica de manipulación, sin ningún criterio de prevención al momento de la elaboración. En algunos casos incluso no cuentan con licencia sanitaria. Esto cobra mayor importancia de contaminación cuando la venta es ambulatória. Estos productos se adquieren porque se tiene la idea que son más frescos (sin preservantes) y más baratos. Según la FAO, entre el 25 al 30% del gasto familiar se destina al consumo de alimentos expendidos de forma no higiénica o ambulatória<sup>1</sup>.

Los quesillos que se expenden en los mercados de abastos de la ciudad de Trujillo, provienen mayormente de Cajamarca y la sierra liberteña como Otuzco, y son preparados artesanalmente, lo cual implica un riesgo mayor por la carga microbiana que presentan, y porque no tienen un buen control sanitario al momento de su elaboración, lo que podría devenir en una Enfermedad de Transmisión Alimentaria (ETA). Por otro lado, el quesillo contiene una actividad de agua elevada, con alta humedad (650g/Kg.) y alrededor de 130g/Kg. de materia grasa, lo que predispone el desarrollo de bacterias coliformes<sup>2</sup>.

### 1.2 Trabajos previos

Turcios<sup>3</sup> Realizó una investigación en Guatemala, en el año 2007, cuyo propósito fue estimar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la miel polifloral procedente de 5 departamentos de Guatemala, sobre *Escherichia coli*. La investigación se realizó en 2 etapas: En la primera se llevó a cabo la confrontación de la miel contra *Escherichia coli*; en donde se observó la actividad antibacteriana en cuatro de las muestras analizadas ( $p < 0.05$ ),

siendo la miel de Escuintla, en la que no se vio actividad inhibitoria. En la segunda etapa se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) mediante la metodología planteada por Mitscher *et al*, en donde se demostró que la miel procedente de Chiquimula y El Progreso presentan actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* a una concentración de 0.25 mg/ml, mientras que la miel del departamento de Quetzaltenango a 0.70 mg/ml. Con estos análisis se comprobó la eficaz actividad bactericida de cuatro de las cinco tipos de miel que fueron analizadas para combatir *Escherichia coli*, mostrando mayor porcentaje de eficacia de inhibición en las mieles de Guatemala, Chiquimula y El Progreso, llegando a concluir que la miel es un medio natural adecuado para inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*.

Gamboa y Figueroa<sup>4</sup> Estudiaron el comportamiento bactericida de las mieles de las especies de abejas *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula* fue evaluado y comparado luego de aplicar la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI) a 94 muestras de miel, de las cuales 50 correspondieron a la especie *A. mellifera* y 44 a *T. angustula* Para el caso de las mieles de *T. angustula* se evaluaron concentraciones de miel desde un 90% hasta un 5.6%, en 5 microdiluciones 1:1, mientras que mieles de *A. mellifera*, se evaluaron desde un 80% hasta un 5%. La actividad, se detectó por subcultivos incubados a 24h sobre agar Mueller Hinton Se utilizaron cepas bacterianas de referencia ATCC, del grupo Gram negativo, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium, ATCC 14028; *Escherichia coli*, ATCC 31617 y *Klebsiella pneumoniae*, subsp. pneumoniae, ATCC 700603 y del grupo Gram positivo *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii, ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* subsp. aureus Rosenbach, ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* Kocuria rhizophila, ATCC 9341. Los resultados fueron evaluados por distribución binomial con probabilidades de 0 a 1, para lo cual se observó que las cepas bacterianas altamente sensibles al comportamiento bactericida de las mieles de *A. mellifera* fueron *Micrococcus*, *Klebsiella* y *B. subtilis*, excepto para concentraciones de 5% de miel. Por otro lado *T. angustula* exhibe acción bactericida significativa sobre *Micrococcus* y *E.coli* en todas las

concentraciones y sobre *Klebsiella* y *Salmonella* solo en concentraciones de 90, 45 y 22.3% de miel. La resistencia de *S. aureus* se hizo evidente para mieles de ambas especies con probabilidades por debajo de 0.22.

Cabrera et al<sup>5</sup>, realizaron un trabajo que consistió en evaluar la actividad anti bacteriana de miel de abejas procedente de cuatro zonas apícolas del estado Zulia: Agronomía, La Rinconada, Mara y Caja Seca durante la época seca (Es): noviembre-abril y lluviosa (Ell): mayo-octubre. Se analizó una muestra representativa de 20 panales de miel por zona, llevando a cabo diluciones de 50 a 5% de concentración utilizando como diluyente agua destilada estéril. Las muestras fueron analizadas por triplicado utilizando cepas patógenas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Proteus mirabilis* en concentraciones de  $1 \times 10^6$  ufc/ml y utilizando la técnica de difusión en agar. La actividad antibacteriana fue evaluada como halos de inhibición medidos en milímetros. Los resultados obtenidos revelaron que la miel de abejas procedente de las cuatro zonas del estado Zulia, mostraron actividad antibacteriana del tipo bacteriostático contra las cepas bacterianas analizadas. La dilución de las muestras de miel, contribuyó a disminuir el efecto antibacteriano de manera independiente de la zona, época y concentración.

Cruzado et al<sup>6</sup> realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar los componentes químicos y el efecto de antibiosis "in vitro" de la miel de abeja, frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, comúnmente causantes de enfermedades prevalentes en la población. Químicamente determinaron metabolitos primarios y secundarios; a través de pruebas químicas, y encontraron que la miel de abejas presentan flavonoides, esteroides y leucoantocianidinas. Para determinar el efecto antimicrobiano "in vitro" se empleó el Método de Difusión en Discos de Kirby y Bauer. Encontraron como resultado que ejerce efecto antibacteriano para *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y no lo hace contra *Klebsiella pneumoniae*.

Aguilera et al<sup>7</sup>, desarrollaron un trabajo de investigación para determinar la actividad antimicrobiana de nueve mieles venezolanas, para ello, usaron cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las mieles que se evaluaron estuvieron concentradas y diluidas (1:2, 1:4, 1:8). Observaron la inhibición del crecimiento de *S. aureus* en la miel procedente del estado Trujillo sin diluir y en su dilución 1:2, y no se observó inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli*, por lo que deberían probarse otras bacterias para futuras aplicaciones.

### 1.3 Teorías relacionadas al tema

Las enterobacterias son una familia de bacilos gram negativos anaerobios facultativos que fermentan la glucosa; se encuentran en muchos sustratos incluyendo a los alimentos. Comprende los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, entre otras. Frecuentemente ocasionan casos de infecciones gastrointestinales por la ingesta de alimentos contaminados con estos patógenos. Pero no todas las enterobacterias son patógenas, existen algunas que son comensales y parte de nuestra microbiota intestinal. Sin embargo, la presencia de alguna de las especies de esta familia bacteriana en los alimentos, es indicador de contaminación fecal<sup>7,8</sup>.

La miel es una sustancia producida de forma natural de sabor dulce producida por la abeja *Apis mellifera* o por otras especies, lo elaboran a partir del néctar de flores y de otras secreciones extra florales y van almacenándolas en panales. Presenta una composición compleja con carbohidratos en la mayor parte de su peso total, como la fructosa y glucosa. Además presentan una gran variedad de sustancias menores dentro de las cuales están las enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales. La composición de la miel es dependiente de diversos factores que intervienen, como las flores de la planta, el suelo, el clima y las condiciones ambientales. Asimismo, están asociadas otras funciones, tales como algunas relacionadas con el tratamiento de afecciones de la salud<sup>9</sup>.

Diversos estudios demuestran que la miel de abeja presenta actividad antibacteriana contra las enterobacterias, tales como *Escherichia coli*<sup>7,10</sup>, *Salmonella typhimurium*<sup>11</sup> y *Klebsiella pneumoniae*<sup>4</sup>. El efecto antibacteriano de la miel se le atribuía a una sustancia denominada "inhibina". La cual era susceptible al calor y a la luz. Luego, en diferentes oportunidades los investigadores demostraron y establecieron que mieles de diversos orígenes tenían efecto sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas. El efecto no se debía a la acidez, ni a la alta concentración de azúcares, ni compuestos nitrogenados, sino a una sustancia bactericida que era susceptible al calor, a la luz solar y a un pH bajo, la inhibina. Plachy (1944) publicó que las mieles de altura (>1,000 msnm) tenían mayor porcentaje (el doble) de actividad antibacterial que aquellas mieles de procedencia de áreas menores a 1,000 msnm. Sin embargo, se observó que sobre los 1,000 m la mayoría de las mieles tenían un porcentaje más alto de mielada. Una sustancia denominada la mielada posee propiedades antibacteriales más marcadas que la miel floral. Después, se encontró que los efectos de la "inhibina" eran causados por la acumulación de peróxido de hidrógeno, producido por un sistema natural de oxidasa de glucosa<sup>12</sup>.

Por otro lado, la algarrobina es un derivado de la algarroba, fruto del "algarrobo", *Prosopis pallida* (Humboldt & Bonpland ex Willdenow) H.B.K. El extracto acuoso del fruto de algarrobo, de forma concentrada, es un alimento con alto valor energético, que es la algarrobina<sup>13</sup>. El fruto del algarrobo se divide en tres partes: pulpa, semilla y endocarpio. La pulpa constituye el 56% del fruto y posee un 60% de azúcares, de los cuales, el 96% es sacarosa<sup>14</sup>. El extracto del fruto de *Prosopis pallida* (EFPP) "algarrobina", presenta elevada cantidad de azúcares reductores, saponina, hemaglutinina, polifenoles, nitrato, oxalato, fitato, entre otros<sup>15</sup>.

La medicina alternativa utiliza la savia de los tallos de los "algarrobos" para curar heridas ulcerativas de la boca. La corteza es triturada para convertirse en harina, la cual también sirve para el tratamiento de mordeduras de serpientes y picaduras de escorpiones. Asimismo, es usada para dolores de estómago y cuadros diarreicos agudos. Las hojas del

algarrobo contienen un alcaloide llamado vialina, responsable del efecto antimicrobiano. La vialina actúa sobre las membranas celulares de las bacterias, desestabilizándolas y causando lisis o muerte celular alteración del transporte de sustancias para el desarrollo bacteriano. También, la harina de algarroba es empleada como antidiarreico por su elevada concentración de azúcares, los cuales pueden ser tolerados por lactantes y prematuros, y es adecuado por el olor y sabor agradable de la algarroba. Por otro lado, los cataplasmas del jugo de algarroba sirven para aliviar el dolor de muelas, mientras que los frutos cocidos son utilizados como astringentes en las diarreas<sup>16,17</sup>.

#### **1.4 Formulación del problema**

¿Cuál es el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en los quesillos preparados artesanalmente expandidos en el mercado “La Unión” - Trujillo?

#### **1.5 Justificación del estudio**

Las bacterias patógenas que pueden estar en los quesillos deberán ser erradicados utilizando formas prácticas como las mismas sustancias alimenticias, por ejemplo, la miel de abeja o la algarrobina, que normalmente son las que se acompañan cuando se consume los quesillos. En este trabajo se demostró la actividad antibacteriana de la miel de abeja y la algarrobina en el control de la proliferación de la carga microbiana de coliformes que trae consigo los productos artesanales como el quesillo.

Se demostró que estas dos sustancias tienen efectos antibacterianos y además, se estableció la dosis mínima requerida para que los microorganismos inhiban su crecimiento. Los resultados obtenidos sirven para que las personas, al consumir quesillo, tengan alimentos más seguros si le agregan miel de abejas y/o algarrobina, en dosis adecuadas.

## 1.6 Hipótesis

La miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* a diferentes concentraciones tienen efecto antibacteriano sobre los coliformes en los quesillos preparados artesanalmente.

## 1.7 Objetivos.

### Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en los quesillos preparados artesanalmente expandidos en el mercado “La Unión” - Trujillo.

### Objetivos Específicos

- Identificar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* a concentraciones de 50, 100 y 150  $\mu\text{L/g}$  sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente.
- Identificar el efecto antibacteriano de la algarrobina de *Prosopis pallida* a concentraciones de 50, 100 y 150  $\mu\text{L/g}$  sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente.
- Comparar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y algarrobina de *Prosopis pallida*.

## II. MÉTODO

### 2.1 Diseño de Investigación

Experimental de estímulo creciente

G1: X<sub>1</sub> O<sub>1</sub>

G2: X<sub>2</sub> O<sub>2</sub>

G3: X<sub>3</sub> O<sub>3</sub>

G4: O<sub>4</sub> –

Donde:

O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>: Observaciones después del tratamiento

O<sub>4</sub>: Observación de testigo al inicio

- X<sub>1</sub>: Tratamiento con 50µL miel de abejas o algarrobina / g de queso  
 X<sub>2</sub>: Tratamiento con 100µL miel de abejas o algarrobina / g de queso  
 X<sub>3</sub>: Tratamiento con 150µL miel de abejas o algarrobina / g de queso

## 2.2 Variables, Operacionalización.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Concentración de miel de <i>Apis mellifera</i>	Cantidad de miel que se encuentra en una proporción determinada de volumen-peso con otro producto.	Se agregó una cantidad de µL de miel por cada gramo de queso, y uniformizando la mezcla.	µL miel de <i>Apis mellifera</i> / g queso 50 100 150	Cuantitativa discreta
Concentración de extracto de <i>Prosopis pallida</i>	Cantidad de algarrobina que se encuentra en una proporción determinada de volumen-peso con otro producto.	Se agregó una cantidad de µL de algarrobina por cada gramo de queso, y uniformizando la mezcla.	µL extracto de <i>Prosopis pallida</i> / g queso 50 100 150	Cuantitativa discreta
Efecto antibacteriano	Actividad inhibitoria bacteriostática o bactericida de un agente antibacteriano en condiciones determinadas.	Se verificó el crecimiento de coliformes por el método microbiológico del Número más probable (NMP).	Recuento de coliformes: NMP/g	Cuantitativa discreta

## 2.3 Población y muestra:

**Población:** Estuvo constituida por todos los quesillos preparados artesanalmente expendidos en el Mercado “La Unión” de Trujillo.

**Muestra:** Se consideró a quince muestras de queso las cuales se recolectaron de cinco puestos de venta, tres muestras de cada puesto. El tamaño muestral se determinó utilizando la fórmula para la comparación de 2 medias:

$$n = \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{d^2}$$

$Z\alpha = 1,96$  asumiendo el 95% de confianza

$Z\beta = 0,842$  asumiendo una potencia de 80%

$S^2 = 1.16$

$d = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$

$\bar{x}_1 = 63.4$ ; según prueba piloto

$\bar{x}_2 = 64.5$ ; según prueba piloto

$N = 15$  repeticiones por cada tratamiento

Muestreo: Probabilístico, aleatorio simple.

#### **2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad:**

**Técnica:** Se aplicó la técnica de observación directa de los tratamientos.

La realización de las técnicas se hizo considerando las pruebas de laboratorio convencionales en microbiología de alimentos para determinar la cantidad de coliformes, Número más probable<sup>18</sup>. La técnica se aplicó a las muestras de quesillos, antes y después de someterlas a estímulo, tanto de la miel de abejas como de la algarrobina.

**Instrumento:** Los instrumentos utilizados fueron la ficha de recolección de datos (anexo 1), la tabla de Número más probable – NMP (anexo 2) y los criterios microbiológicos de la Norma técnica sanitaria N° 071 del MINSA para coliformes en productos lácteos (anexo 3).

#### **Procedimiento**

Se compró la miel de abejas y la algarrobina, certificada con registro industrial y sanitario, proveniente de la ciudad de Piura. Asimismo, se compró el queso fresco llamado “quesillo” preparado artesanalmente del mercado de abastos “La Unión” de la ciudad de Trujillo, proveniente de la provincia de Otuzco; el cual se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **Preparación del medio de cultivo**

Se preparó Caldo Verde Brillante y se agregó 5 ml en tubos de ensayo de 13x100mm, que contenían campanas de Durham, y se llevó a esterilizar a la autoclave a 121°C por 15 min.

### **Preparación de la muestra**

Se colocó sobre la mesa de trabajo 7 placas Petri estériles de 100mm de diámetro y se numeraron del 1 al 7. Se pesó 25g de quesillo en cada una de las 7 placas Petri. Inmediatamente, se agregó miel de abejas a las placas 1, 2 y 3, en dosis de 50, 100 y 150  $\mu\text{L}$  por cada gramo de quesillo, respectivamente; en total, a la placa 1 se le agregó 1250  $\mu\text{L}$ , a la placa 2 2500  $\mu\text{L}$  y a la placa 3 3750  $\mu\text{L}$ . De forma similar, se agregó algarrobina a las 4, 5 y 6. Después de agregar la miel de abejas y la algarrobina, se mezcló lo más uniformemente posible y se dejaron en reposo por 20 minutos.

### **Técnica del Número más probable (NMP)**

La placa 7 sirvió como muestra control y se trasvasó los 25 g de quesillo a un matraz de 500 mL estéril, y se le adicionó 225 mL de suero fisiológico estéril, formando una solución de  $10^{-1}$ . De esta solución, se tomó 1 mL y se agregó a un tubo de ensayo de 15x150mm que contenía 9 mL de suero fisiológico estéril, con ello se formó una solución de  $10^{-2}$ . De esta nueva solución, se tomó 1 mL y se agregó a otro tubo de ensayo de 15x150mm que contenía 9 mL de suero fisiológico estéril, con ello se formó una solución de  $10^{-3}$ . Se mezclaron agitándolos y luego, se tomó 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) y se agregaron a 3 tubos de ensayo con caldo verde brillante estéril.

Pasado los 20 minutos, se realizó el mismo proceso que para la muestra control.

Todos los tubos sembrados se llevaron a incubar a la estufa a 37°C durante 24 horas.

## **Interpretación**

Se realizó la lectura observando las campanas de Durham, para detectar la presencia de burbujas de gas dentro de la campana, lo que indica crecimiento de coliformes, en este caso se le atribuye el número 1 y si no hay burbuja se coloca cero (0)<sup>9</sup>. La suma de las 3 repeticiones indica un valor que fue comparado con la tabla de NMP.

## **2.5 Métodos de análisis de datos:**

Los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación, se analizaron estadísticamente en el software SPSS v22. Se aplicaron las pruebas estadísticas de Análisis de varianza ANOVA y prueba de Tukey, que evaluaron la diferencia entre los promedios de recuentos de bacterias antes y después del tratamiento tanto con algarrobina como con miel de abeja.

## **2.6 Aspectos Éticos**

Se tomó en cuenta los principios éticos de protección del medio ambiente y de la salud, procediendo con responsabilidad en el desecho de los materiales con microorganismos patógenos, previamente esterilizado; tal como lo estipula la Ley General del Ambiente N° 28611<sup>19</sup>:

**Artículo 66.- De la Salud ambiental:** “La prevención de riesgos y daños a la salud de las personas es prioritaria en la gestión ambiental. Es responsabilidad del Estado, a través de la Autoridad de Salud y de las personas naturales y jurídicas dentro del territorio nacional, contribuir a una efectiva gestión del ambiente y de los factores que generan riesgos a la salud de las personas.”

**Artículo 74.- De la responsabilidad general.** “Todo titular de operaciones es responsable por las emisiones, efluentes, descargas y demás impactos negativos que se generen sobre el ambiente, la salud y los recursos naturales, como consecuencia de sus actividades. Esta responsabilidad incluye los riesgos y daños ambientales que se generen por acción u omisión.”

### III. RESULTADOS

**Tabla 1.** Recuento de coliformes en quesillos tratados con diferentes concentraciones de miel de abejas, en 5 puestos de venta.

	Coliformes totales (NMP/g)*			
	50 $\mu$ L/g**	100 $\mu$ L/g	150 $\mu$ L/g	Control
Puesto 1	1100	3	0	1100
Puesto 2	1100	3	0	1100
Puesto 3	1100	6.1	0	1100
Puesto 4	1100	0	0	1100
Puesto 5	1100	0	0	1100

Fuente: Ficha de recolección de datos.

\* Número más probable de coliformes por cada gramo de quesillo.

\*\* Microlitros de miel de abejas por cada gramo de quesillo.

**Tabla 2.** Recuento de coliformes en quesillos tratados con diferentes concentraciones de algarrobina, en 5 puestos de venta.

	Coliformes totales (NMP/g)			
	50 $\mu$ L/g	100 $\mu$ L/g	150 $\mu$ L/g	Control
Puesto 1	160	0	0	1100
Puesto 2	210	0	0	1100
Puesto 3	460	0	0	1100
Puesto 4	290	0	0	1100
Puesto 5	53	0	0	1100

Fuente: Ficha de recolección de datos.

\* Número más probable de coliformes por cada gramo de quesillo.

\*\* Microlitros de algarrobina por cada gramo de quesillo.

**Tabla 3.** Prueba de análisis de varianza entre los grupos y dentro de cada grupo para tratamiento con miel de abejas.

ANOVA

**Recuento de coliformes**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6036711,96	3	2012237,32	1241738,55	0,000
Dentro de grupos	25,928	16	1,620	0	
Total	6036737,89	19			

**Tabla 4.** Prueba de análisis de varianza entre los grupos y dentro de cada grupo para tratamiento con algarrobina.

ANOVA					
MEDIDAS1					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4098739,350	3	1366246,450	234,995	0,000
Dentro de grupos	93023,200	16	5813,950		
Total	4191762,550	19			

#### IV. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* y la algarrobina de *Prosopis pallida* sobre los coliformes presentes en los quesillos preparados artesanalmente, expendidos en el mercado “La Unión” de la ciudad de Trujillo. Las muestras de quesillo utilizadas en el presente trabajo de investigación presentaron características organolépticas buenas; sin embargo, al analizarlos microbiológicamente en el laboratorio presentaron coliformes en cantidades mayores a  $10^3$  por gramo (Tablas 1 y 2) superiores a las permisibles por la NTS N°071 de la DIGESA (anexo3).

Los resultados de la Tabla 1, muestran que la miel de abejas a concentración de  $50\mu\text{L/g}$  de quesillo no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de los coliformes; a partir de concentraciones de  $100\mu\text{L/g}$  se observa el efecto antibacteriano sobre los coliformes; a ésta concentración, se observa que existe una inhibición casi total del crecimiento bacteriano, por lo que se deduce que el efecto inhibitorio comienza entre  $50$  y  $100\mu\text{L/g}$ . Las cantidades de miel de abejas utilizadas en las diferentes concentraciones, fueron  $50\mu\text{L/g}$ ,  $100\mu\text{L/g}$  y  $150\mu\text{L/g}$ , lo que equivale a 5%, 10% y 15% de la mezcla miel-quesillo. Vale decir que, al 10% tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de coliformes, casi total. Dato diferente al reportado por Estrada et al<sup>20</sup>, quienes evidenciaron un efecto inhibitorio recién a partir del 25% sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Esto se debería posiblemente al tipo de miel de abejas, ya que varía en la cantidad de sus componentes, según sea el tipo de flores que utilizan las abejas para la elaboración de la miel<sup>12</sup>.

El efecto antibacteriano de la miel de abejas puede ser diferente, según sea su procedencia y el tipo de néctar utilizado en la elaboración; sin embargo, existen componentes y propiedades comunes que determinan su actividad contra las bacterias. Uno de ellos es la acidez (pH bajo): La miel de abejas tiene un pH entre 3.2 a 4.5. La acidez, desestabiliza la permeabilidad de las células provocando lisis bacteriana. Otro es la

osmolaridad: La miel es una sustancia hiperosmolar debido a la alta concentración de glucosa que presenta, tiene alta presión osmótica y baja actividad de agua  $A_w$  0.5 (16% agua) en un rango de temperatura de 4° a 37°C. La alta osmolaridad crea un ambiente con poca cantidad de agua, lo cual hace que ninguna bacteria u hongo pueda desarrollarse. Asimismo la presencia de peróxido de hidrógeno, producido por la enzima glucosil-oxidasa presente en la miel de abejas, hace que sea tóxica para la célula bacteriana. Sin embargo, en el año 2010, Kwakman et al<sup>21</sup>, descubrieron que las abejas añaden una proteína a la miel, la defensina-1, similar a la producida por las células epiteliales de la cavidad oral y de los neutrófilos. Después del análisis que realizaron, los científicos concluyeron que la gran mayoría de las propiedades antibacterianas de la miel vienen de esa proteína. La defensina-1 actúa como toxina sobre las células bacterianas.

La tabla 2 muestra que la algarrobina ejerce efecto inhibitorio sobre los coliformes presentes en los quesillos. En promedio, la carga microbiana de coliformes bajó en más de la mitad, respecto a la carga microbiana que tenía; bajó de >1100 coliformes/g a menos de 400 coliformes/g, según el método del número más probable. Este control lo ejerce la algarrobina al 5% de la mezcla algarrobina-quesillo. Sandoval y Zúñiga<sup>22</sup>, encontraron un efecto concentraciones de menos de 0,25%, ya que ellos, purificaron el extracto y sólo utilizaron los polifenoles totales que tiene la algarroba y que le dan la propiedad antibacteriana. Los polifenoles presentes son el ácido gálico, catequinas, taninos condensados, entre otros<sup>13</sup>. Si se considera lo establecido por el departamento de agricultura de la FAO<sup>21</sup>, que en el extracto de algarrobo el 1% corresponde a los polifenoles, se puede decir que en este estudio se utilizó 0,05%, 0,10% y 0,15% de polifenoles. Comparando con el estudio de Sandoval y Zúñiga<sup>22</sup>, se tiene que la concentración que ejerce efecto antibacteriano es similar al encontrado en este estudio.

Los polifenoles actúan de forma selectiva sobre las estructuras bacterianas. Así, el ácido gálico, las catequinas y otros compuestos fenólicos, presentes a la algarrobina, actúan sobre las membranas celulares, inhibiendo los

canales iónicos<sup>23</sup>. Otros compuestos fenólicos pueden alterar las membranas y pared celular de las bacterias e inhibir la síntesis de enzimas, con la consecuente salida de proteínas, ácidos nucleicos, iones inorgánicos y otros elementos vitales para la célula bacteriana, con lo que conduciría a la muerte bacteriana<sup>24</sup>.

En la Tabla 3 se observa que la varianza entre los grupos de tratamiento a diferentes concentraciones de miel de abejas es muy significativa ( $< 0.05$ ), mas no así entre los elementos del mismo grupo. Al hacer la prueba de Tukey se observa que se forman 3 distintos grupos, de acuerdo al efecto que ejercieron sobre los coliformes (Anexo 4), en donde se muestra que la mejor concentración antimicrobiana es a partir de 150  $\mu\text{L/g}$ .

En la Tabla 4 se observa de forma similar a la Tabla 3, donde la varianza entre los grupos de tratamiento a diferentes concentraciones de algarrobina es muy significativa ( $< 0.05$ ), asimismo, no lo es dentro del grupo. Al hacer la prueba de Tukey, también se observa que se forman 3 distintos grupos, de acuerdo al efecto que ejercieron sobre los coliformes (Anexo 5). Aquí, la concentración de algarrobina a partir de 100  $\mu\text{L/g}$  es la mejor para ejercer efecto antibacteriano sobre los coliformes.

La técnica del NMP utilizada está validada por la FDA de los Estados Unidos de América, recomendada para este tipo de estudios en alimentos.

## V. CONCLUSIONES

- El efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* es significativo a concentración de 100µL/g y 150µL/g ( $p = 0.00$ ) sobre los coliformes presentes en los quesillos preparados artesanalmente, procedentes de Otuzco.
- El efecto antibacteriano de la algarrobina de *Prosopis pallida* es significativo a concentraciones de 50, 100 y 150 µL/g ( $p = 0.00$ ) sobre los coliformes presentes en los quesillos preparados artesanalmente procedentes de Otuzco.
- La algarrobina presenta efecto antibacteriano sobre los coliformes a concentraciones menores que la miel de abejas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se debe profundizar en la investigación del efecto antibacteriano de la miel de abejas y de la algarrobina de diferentes lugares del país para ver la variabilidad de la actividad antibacteriana.
- En investigaciones posteriores se debe considerar mayor número de concentraciones, de acuerdo a lo que se ha encontrado en este estudio y en otras referencias, para establecer la dosis exacta de inhibición.
- Se debe realizar estudios cuantitativos tanto de coliformes como de otros microorganismos presentes en los quesillos según sea el lugar de procedencia.
- En estudios posteriores, se debe utilizar miel de abeja y algarrobina muestreada directamente del proveedor y debe estar protegida de la luz y a temperatura controlada.

## VII. REFERENCIAS

1. Food and Agriculture Organization. Alimentación, nutrición y agricultura. Alimentos de Venta Callejera. Volumen 17/18. Roma; 1996. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W3699T/W3699T00.htm>
2. Brito C, Silva S, Molina LH, Pinto M, Carrillo B y Oyarzún E. Queso procesado laminable reducido en grasa elaborado de chanco y quesillo. Rev. Chil. Nutr. Diciembre 2003; 30(3): 272-278. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182003000300008>
3. Turcios JA. Evaluación del poder bactericida sobre Escherichia coli ATCC 25922, de cinco tipos diferentes de miel de abeja polifloral existentes en Guatemala. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. Febrero 2007. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2490.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2490.pdf)
4. Gamboa MV y Figueroa J. Comportamiento bactericida de mieles de Apis mellifera y Tetragonisca angustula. Apiciencia. Colombia 2009; 11(2): 41-48. Disponible en: <http://www.actaf.co.cu/revistas/apiciencia/2009-2/6.pdf>
5. Cabrera L, Ojeda G, Céspedes E y Colina A. Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (Apis mellifera scutellata) de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Revista Científica FCV-LUZ. Venezuela 2003; 13(3): 205-211. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27936/2/art7.pdf>
6. Cruzado L, Gutiérrez DP y Ruiz SG. Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos. Rev. Med. Vallejiana 2007; 4(2): 95-108. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rmv/v04n2/pdf/a02v4n2.pdf>
7. Aguilera G, Gil F, González AC, Nieves B, Rojas Y, Rodríguez A y Vit P. Evaluación de actividad antibacteriana de mieles de Apis mellifera, contra Escherichia coli y Staphylococcus aureus. Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel", 2009; 40 (1): 21-25. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/inhrr/v40n1/art04.pdf>
8. Murray P, Rosenthal K y Pfaller M. Microbiología Médica. 7ma ed. Edit. Elsevier España, S.L. Barcelona. 2014. Pp. 258-265.
9. Frazier WC y Westhoff DC. Microbiología de los alimentos. 4ta ed. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, 1993.

10. Adeleke OE, Olaitan JO, Okpekpe EI. Comparative antibacterial activity of honey and gentamicin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of Burns and Fire Disasters*. Diciembre 2006; 19(4): 201-204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3188119/pdf/Ann-Burns-and-Fire-Disasters-19-201.pdf>
11. Badawy OF, Shafii SS, Tharwat EE y Kamal AM. Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2004; 23(3): 1011-1022. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/D1340.PDF>
12. Libonatti C, Varela S y Basualdo M. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *J. Microbiol. Antimicrob.* Marzo 2014; 6(3): 51-56. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/journal/JMA/article-full-text-pdf/FA9B2D144111>
13. Flor E. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) H.B.K. Quito, Pichincha. Tesis de pregrado. Quito 2013. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/989/1/T-UCE-0004-14.pdf>
14. Grados N, Ruiz W, Cruz G, Díaz C y Puicón J. Productos industrializables de la algarroba peruana (*Prosopis pallida*): algarrobina y harina de algarroba. *Multequina* 2000; 9(2): 119-132. Disponible en: [http://www.cricyt.edu.ar/multequina/indice/pdf/09\\_02/9\\_2\\_8.pdf](http://www.cricyt.edu.ar/multequina/indice/pdf/09_02/9_2_8.pdf)
15. González A, Duarte A, Patto C, Piccolo. Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis* spp. procedente de Bolivia y Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2008; 58(3): 309-315. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v58n3/art15.pdf>
16. Arambarri AM, Novoa MC, Bayón ND, Hernández MP, Colares MN y Monti C. Anatomía foliar de arbustos y árboles medicinales de la región chaqueña semiárida de la Argentina. *Dominguezia* 2011; 27(1): 11. Disponible en: <http://dominguezia.org/volumen/articulos/2711.pdf>
17. Cuentas MA. Revalorizando el bosque seco de algarrobo. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de Letras y Ciencias Humanas. Agosto 2015. Pag. 119. Disponible en: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/6313>

18. Allaert C y Escolá Marta. Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. 1ra ed. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. pp. 43-45, 80,81.
19. Ministerio del Ambiente de Perú. Ley N° 28611 Ley General del Ambiente. Congreso de la República. Lima, 13 de octubre de 2005. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Ley-Nº-28611.pdf>
20. Estrada H, Gamboa M, Chaves C, Arias ML. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. ALAN [Internet]. Junio 2005 [Citado: 22 abril 2017]; 55(2): 167-171. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222005000200010](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222005000200010)
21. Kwakman HS, Te Velde AA, De Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls JE, Zaat AJ. How honey kills bacteria. The FASEB Journal, 2010; 24(7): 2576-82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228250>
22. Sandoval EJ, Zúñiga EM. Efecto antibacteriano in vitro de los alcaloides totales extraídos de hojas de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth “algarrobo” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Trujillo. 2016 [Citado: 13 de marzo 2017]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/1497/Sandoval%20Zavaleta%20Edwing%20Jeanpierre%20II.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. Galera FM. Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. Buenos Aires: FAO. Departamento de Agricultura; 2000. 269 pp. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/ad314s/AD314S00.htm#TOC>
24. Díaz RO. Efecto antibacteriano de del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Tesis de título. Universidad de Chile. 2012. Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112192/diaz\\_r.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112192/diaz_r.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
25. García A. Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los

- sulfitos durante la vinificación. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Junio 2012. Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/60799>
26. FDA. Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions. U.S. Department of Health and Human Services. October 2010. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>
27. Dirección General de Salud - DIGESA. NTS-071-MINSA/DIGESA-V01. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. MINSA, 2008. Disponible en: [https://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas\\_Legales/alimentos/RM591MINSANORMA.pdf](https://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas_Legales/alimentos/RM591MINSANORMA.pdf)

# I. ANEXOS

## ANEXO 1

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Puesto	Muestra	DILUCIONES												CODIGO	Coliformes totales NMP/g
		10 <sup>-1</sup>				10 <sup>-2</sup>				10 <sup>-3</sup>					
		T1	T2	T3	Σ1	T1	T2	T3	Σ2	T1	T2	T3	Σ3		
P1	M1	1	1	1	3	1	1	0	2	1	0	1	2	3 - 2 - 2	210
	M2														
	M3														
P2	M1														
	M2														
	M3														
P3	M1														
	M2														
	M3														
P4	M1														
	M2														
	M3														
P5	M1														
	M2														
	M3														

## ANEXO 2

Tabla del Número Más Probable de microorganismos por gramo de muestra de alimento, para serie de 3 tubos

Table 1 For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. Tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

Fuente: FDA. Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions<sup>26</sup>.

### ANEXO 3

#### Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para leche y productos lácteos

I.8 Quesos no madurados (queso fresco, mantecoso, ricotta, cabaña, crema, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	$10^2$
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	--
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	---

Fuente: Norma Técnica Sanitaria 071 - MINSA/DIGESA-V01<sup>27</sup>.

## ANEXO 4

Pruebas de normalidad<sup>a,d,e</sup> de los valores obtenidos en el recuento de coliformes mediante el número más probable, para miel de abejas.

	Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk (n<50)		
	Estadístic		Sig.	Estadístic		Sig.
	o	Gl		o	gl	
100mg/g MIEL	0,229	5	0,200*	0,881	5	0,312

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. 50mg/g MIEL es constante. Se ha omitido.

b. Corrección de significación de Lilliefors

d. 150mg/g MIEL es constante. Se ha omitido.

e. control es constante. Se ha omitido.

Sig. = 0.312 > 0.05 -----> los datos de M2 presentan distribución normal.

Por tanto aplicamos ANOVA.

Fuente: Ficha de recolección de datos

Valores estadísticos descriptivos del recuento de colonias, para miel de abejas

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
P1	5	1100,000	0,0000	0,0000	1100,000	1100,000	1100,0	1100,0
P2	5	2,420	2,5460	1,1386	-0,741	5,581	0,0	6,1
P3	5	0,000	0,0000	0,0000	0,000	0,000	0,0	0,0
P4	5	1100,000	0,0000	0,0000	1100,000	1100,000	1100,0	1100,0
Total	20	550,605	563,6693	126,0403	286,800	814,410	0,0	1100,0

Fuente: Ficha de recolección de datos

Establecimiento de homogeneidad entre grupos mediante la prueba de Tukey para tratamiento con miel de abejas.

**Recuento de coliformes**

HSD Tukey<sup>a</sup>

FACTOR	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
P3	5	,000		
P2	5		2,420	
P1	5			1100,000
P4	5			1100,000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.000.

Fuente: Ficha de recolección de datos

Pruebas Post Hoc – HSD Tukey: Comparaciones múltiples de recuento de colonias, para miel de abejas

(I) FACTOR	(J) FACTOR	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
P1	P2	1097,5800*	0,8051	0,000	1095,277	1099,883
	P3	1100,0000*	0,8051	0,000	1097,697	1102,303
	P4	0,0000	0,8051	1,000	-2,303	2,303
P2	P1	-1097,5800*	0,8051	0,000	-1099,883	-1095,277
	P3	2,4200*	0,8051	0,038	0,117	4,723
	P4	-1097,5800*	0,8051	0,000	-1099,883	-1095,277
P3	P1	-1100,0000*	0,8051	0,000	-1102,303	-1097,697
	P2	-2,4200*	0,8051	0,038	-4,723	-0,117
	P4	-1100,0000*	0,8051	0,000	-1102,303	-1097,697
P4	P1	0,0000	0,8051	1,000	-2,303	2,303
	P2	1097,5800*	0,8051	0,000	1095,277	1099,883
	P3	1100,0000*	0,8051	0,000	1097,697	1102,303

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Ficha de recolección de datos

## ANEXO 5

Pruebas de normalidad<sup>a,d,e</sup> de los valores obtenidos en el recuento de coliformes mediante el número más probable, para algarrobina

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
M11	0,164	5	0,200*	0,980	5	0,933

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

c. M22 es constante. Se ha omitido.

d. M33 es constante. Se ha omitido.

e. CONTROL1 es constante. Se ha omitido.

Sig. = 0.933 > 0.05 -----> los datos de M11 presentan distribución normal.

Por tanto aplicamos ANOVA.

Fuente: Ficha de recolección de datos

Valores estadísticos descriptivos del recuento de colonias, para algarrobina

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
P1	5	234,60	152,499	68,199	45,25	423,95	53	460
P2	5	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00	0	0
P3	5	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00	0	0
P4	5	1100,00	0,000	0,000	1100,00	1100,00	1100	1100
Total	20	333,65	469,701	105,028	113,82	553,48	0	1100

Fuente: Ficha de recolección de datos

Establecimiento de homogeneidad entre grupos mediante la prueba de Tukey para tratamiento con algarrobina.

MEDIDAS1

HSD Tukey<sup>a</sup>

FACTOR	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
P2	5	,00		
P3	5	,00		
P1	5		234,60	
P4	5			1100,00
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.000.

Fuente: Ficha de recolección de datos

Pruebas Post Hoc – HSD Tukey: Comparaciones múltiples de recuento de colonias, para algarrobina

(I) FACTOR	(J) FACTOR	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
P1	P2	234,600*	48,224	0,001	96,63	372,57
	P3	234,600*	48,224	0,001	96,63	372,57
	P4	-865,400*	48,224	0,000	-1003,37	-727,43
P2	P1	-234,600*	48,224	0,001	-372,57	-96,63
	P3	0,000	48,224	1,000	-137,97	137,97
	P4	-1100,000*	48,224	0,000	-1237,97	-962,03
P3	P1	-234,600*	48,224	0,001	-372,57	-96,63
	P2	0,000	48,224	1,000	-137,97	137,97
	P4	-1100,000*	48,224	0,000	-1237,97	-962,03
P4	P1	865,400*	48,224	0,000	727,43	1003,37
	P2	1100,000*	48,224	0,000	962,03	1237,97
	P3	1100,000*	48,224	0,000	962,03	1237,97

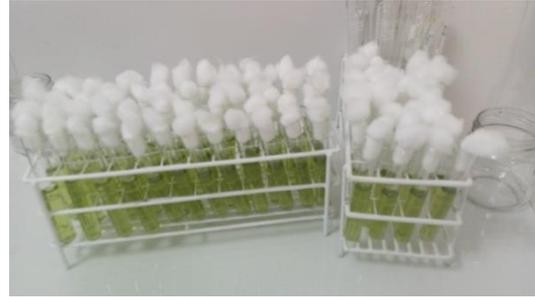
\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Ficha de recolección de datos

## ANEXO 6:



Esterilización de materiales de vidrio



Tubos con Caldo verde brillante y campana de Durham



Preparación de diluciones con suero fisiológico estéril.



Pesado del queso en 2 grupos de prueba.



Muestras de queso con miel de abeja y algarrobina



Siembra en tubo con caldo verde brillante e incubación a 37°C por 24 horas