

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE STEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO A,
PRESENTES EN LA MIEL EXPRESS DE *STEVIA* (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**



UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2007

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE STEVIÓSIDO Y REBAUDIÓSIDO A
PRESENTES EN LA MIEL EXPRESS DE *STEVIA* (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

CRISTINA RUALES CERÓN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar
al título de Química

Director

LUIS ALBERTO LENIS VELÁSQUEZ, Ph. D

Asesora

OLGA LUCIA HOYOS S, Ph.D

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2007

Nota de aceptación:

Director

LUIS ALBERTO LENIS V. Ph.D

Jurado

MAITE DEL PILAR RADA. Ph.D

Jurado

GERMAN CUERVO. M. Sc

Fecha de Sustentación: Popayán, 21 de Febrero de 2007

AGRADECIMIENTOS

Quiero ofrecerle este triunfo a DIOS por guiar mi camino y por haberme permitido lograr con éxito culminar una etapa más en mi vida.

Al señor JAVIER DE JESÚS ARROYAVE BOTERO, por sus valiosos aportes y enseñanzas que dieron inicio a esta idea, quien fue gerente propietario de la empresa PRODUCTOS NATURALES ARROYAVE-PRONAR Ltda. Al igual que a sus empleados, los cuales fueron parte vital en el trabajo de campo para este proyecto.

Al profesor LUÍS ALBERO LENIS por su apoyo, su amistad y grandes enseñanzas.

A la profesora OLGA LUCIA HOYOS, y a los profesores JAIME MARTIN y RICARDO BENITEZ por sus consejos y enseñanzas.

A CARMEN SOLARTE, ALFARO TANDIOY y DEYA PEREZ por su gran amistad, por sus valiosos aportes y enseñanzas para la culminación de esta investigación.

A cada uno de los profesores del Departamento de Química por sus valiosas enseñanzas, por ser nuestros guías en el transcurso de la carrera.

A mis padres SILVIO y SOCORRO un gracias infinito, por ese apoyo incondicional, siempre fueron mi fortaleza y consuelo en mis debilidades y por ese inmenso y gran amor.

A mi tía LUCY y demás familiares por esas palabras de aliento cuando quise flaquear y por haber compartido conmigo mis alegrías y tristezas en el transcurrir de mi vida.

A mis mejores amigas DIANA, MARA, ZULLY, LUISA Y SANDRA, a mi amigo ALEX, por los innumerables momentos vividos, por su gran apoyo, por la confianza que me brindaron y por su inmensa comprensión.

A mis compañeros del grupo de investigación Química de Productos Naturales, YESSENIA, JHON, WILLIAM, por su amistad, colaboración y paciencia en los días de trabajo.

A FABY por su amistad, su comprensión y por estar siempre ahí para escucharme cuando necesite de alguien.

A las abejas por su buen comportamiento ya que son las protagonistas principales de esta investigación.

A todas las personas que hacen parte de mi vida y que permitieron que lograra con éxito una etapa más en mi vida. Gracias.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	20
1.1 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	20
1.1.1 Origen, morfología y clasificación	20
1.1.2 Composición	22
1.1.3 Principios activos	22
1.1.4 Propiedades de los esteviósidos	25
1.1.5 Técnicas analíticas empleadas para la determinación de esteviósidos	26
1.1.6 Cromatografía líquida	26
1.1.7 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la determinación de esteviósidos, con detección Ultravioleta.	26
1.2 APICULTURA	28
1.2.1 Los habitantes de la colmena y sus tareas	28
1.2.2 Requisitos alimenticios de las abejas	29
1.2.3 Principales alimentos artificiales utilizados para la alimentación de las abejas.	30
1.2.4 Productos de la colmena y sus propiedades	31
1.3 LA MIEL	33
1.3.1 Miel express	34
1.3.2 Factores que intervienen en la calidad de la miel	34
1.4 ANÁLISIS SENSORIAL DE MIELES	35
2. METODOLOGÍA	37
2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS	37
2.1.1 Equipos	37
2.1.2 Reactivos	38
2.1.3 Solventes grado HPLC	38
2.2 TRABAJO EN CAMPO	39
2.2.1 Preparación de las colmenas	39
2.2.2 Preparación de los jarabes y alimentación de las colmenas	40
2.2.3 Recolección o cosecha de la miel express	43

2.3 TRABAJO EN EL LABORATORIO	44
2.3.1 Preparación de la muestra	44
2.3.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos para las muestras de miel express de <i>Stevia</i>	45
2.3.3 Determinación de parámetros de calidad para las muestras de miel express de <i>Stevia</i>	46
2.3.4 Metodología planteada para la extracción de steviósido y rebaudiósido A presentes en la miel de <i>Stevia</i>	47
2.3.5 Estandarización de la técnica de cuantificación de steviósido y rebaudiósido A por HPLC.	48
2.3.6 Estandarización del método analítico	49
2.4 ANÁLISIS SENSORIAL DE MIELES	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1 ANÁLISIS DE LOS JARABES DE EXTRACTO DE STEVIA	53
3.1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos	53
3.2 ANÁLISIS DE LAS MIELES DE STEVIA	54
3.2.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos	57
3.2.2 Determinación de parámetros de calidad	57
3.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE STEVIÓSIDO Y REBAUDIOSIDO A POR HPLC.	63
3.3.1 Selección de la columna	63
3.3.2 Determinación del flujo óptimo	64
3.3.3 Selección de la longitud de onda de trabajo	66
3.3.4 Condiciones cromatográficas óptimas	68
3.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	69
3.4.1 Linealidad	69
3.4.2 Precisión	72
3.4.3 Sensibilidad	74
3.4.4 Exactitud	78
3.4.5 Preparación de la muestra	79
3.4.6 Estimación de la concentración por HPLC de steviósido y rebaudiósido A en muestras de miel de <i>Stevia</i>	82
3.5 EVALUACIÓN SENSORIAL.	85
4. CONCLUSIONES	88
5. BIBLIOGRAFÍA	90
6. ANEXOS	97

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>Stevia</i>	21
Tabla 2. Esteviósidos encontrados en la planta de <i>Stevia</i>	23
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los esteviósidos	25
Tabla 4. Principales ventajas del uso de una fase estacionaria reversa en la separación cromatográfica.....	27
Tabla 5. Composición química de la miel natural	34
Tabla 6. Formulaciones para la preparación de los jarabes a base de <i>Stevia</i> y azúcar comercial.....	41
Tabla 7. Fechas de alimentación de las colmenas empleadas	43
Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos determinados a los jarabes de extracto de <i>Stevia</i>	53
Tabla 9. Resultados de los análisis realizados a las mieles de <i>Stevia</i> con doble poder edulcorante.	55
Tabla 10. Resultados de los análisis realizados a las mieles de <i>Stevia</i> con triple poder edulcorante.	56
Tabla 11. Requisitos para la miel de abejas.....	57
Tabla 12. Parámetros para la curva de van Deemter	65
Tabla 13. Establecimiento de las condiciones empleadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	68
Tabla 14. Curva de calibración para la cuantificación de esteviósido.....	70

Tabla 15. Curva de calibración para la cuantificación de rebaudiósido A.....	71
Tabla 16. Test estadístico	72
Tabla 17. Repetitivad de un estándar de steviósido de 40 ppm	72
Tabla 18. Repetitivad de un estándar de rebaudiósido A de 40 ppm	73
Tabla 19. Reproducibilidad de dos estándares de steviósido en un periodo de 30 días.	74
Tabla 20. Reproducibilidad de dos estándares de rebaudiósido A en un periodo de 30 días.	74
Tabla 21. Concentraciones del estándar de steviósido y sus respectivas áreas para calcular LD y LC	75
Tabla 22. Concentraciones del estándar de rebaudiósido A y sus respectivas áreas para calcular LD y LC.	76
Tabla 23. Límites de detección (LD) para steviósido y rebaudiósido A	76
Tabla 24. Límites de cuantificación (LC) para steviósido y rebaudiósido A.....	77
Tabla 25. t student y porcentajes de recuperación de estándares de steviósido.....	78
Tabla 26. t student y porcentajes de recuperación de estándares de rebaudiósido A.....	78
Tabla 27. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrado en muestras de miel de <i>Stevia</i> con doble y triple poder edulcorante.....	83
Tabla 28. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento de las mieles de <i>Stevia</i> con doble poder edulcorante sobre el % de humedad.....	98
Tabla 29. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento de las mieles de <i>Stevia</i> con triple poder edulcorante sobre el % de humedad.....	99

Tabla 30. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento de las mieles de <i>Stevia</i> con doble poder edulcorante sobre el % de acidez.	100
Tabla 31. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento de las mieles de <i>Stevia</i> con triple poder edulcorante sobre el % de acidez.	101
Tabla 32. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrados en muestras de miel de <i>Stevia</i> con doble poder edulcorante almacenadas a diferentes condiciones	107
Tabla 33. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrados en muestras de miel de <i>Stevia</i> con triple poder edulcorante almacenadas a diferentes condiciones.	108

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	20
Figura 2. Estructura general de los esteviósidos presentes en la planta	22
Figura 3. Estructura del steviósido (19-O-β-glucopiranosil-13-O-β-soforosil-steviol). C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	24
Figura 4. Estructura del rebaudiósido A (19-O-β-glucopiranosil-13-O-β-soforosil (3,1) glucosil steviol). C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	24
Figura 5. Colmena utilizada para producción de miel express	39
Figura 6. Diagrama de flujo para la preparación de los jarabes	40
Figura 7. Alimentación de las colmenas.....	42
Figura 8. Condiciones de almacenamiento a las que fueron sometidas las mieles express de <i>Stevia</i>	44
Figura 9. Diagrama de flujo para la separación de steviósido y rebaudiósido A en la miel de <i>Stevia</i>	48
Figura 10. Ficha para la prueba sensorial realizada a consumidores	52
Figura 11. Muestras de miel entregada a cada consumidor	52
Figura 12. Efecto del los diferentes condiciones de almacenamiento realizados en las mieles de <i>Stevia</i> . A) doble poder edulcorante, B) triple poder edulcorante sobre el % humedad.	59
Figura 13. Efecto del los diferentes condiciones de almacenamiento realizados en las mieles de <i>Stevia</i> . A) doble poder edulcorante, B) triple poder edulcorante sobre el % acidez.	61

Figura 14. Cromatograma del extracto de <i>Stevia</i> . Columna Hypersil ODS C ₁₈ (250mm x 4 mm x 5 μm), fase móvil: ACN-H ₂ O (30:70)	64
Figura 15. Cromatograma del extracto de <i>Stevia</i> . Analítica Agilent Zorbax NH ₂ (250 x 4,6 mm x 5μm), fase móvil: ACN-H ₂ O (70:30).....	64
Figura 16. Curva de van Deemter para determinar el flujo optimo.....	65
Figura 17. Espectro UV-Vis para el extracto de <i>Stevia</i>	66
Figura 18. Cromatograma del extracto de <i>Stevia</i> a una λ=190 nm	67
Figura 19. Cromatograma extracto de <i>Stevia</i> a una λ=194 nm.....	67
Figura 20. Cromatograma extracto de <i>Stevia</i> a una λ=210 nm.....	67
Figura 21. Cromatogramas de los patrones de: a) steviósido y b) rebaudiósido A, bajo las condiciones resumidas en el tabla 13.....	69
Figura 22. Curva de calibración para la determinación de steviósido en muestras de miel express de <i>Stevia</i>	70
Figura 23. Curva de calibración para la determinación de rebaudiósido A en muestras de miel express de <i>Stevia</i>	71
Figura 24. Curva de calibración para determinar LD y LC de steviósido en muestras de miel express de <i>Stevia</i>	75
Figura 25. Curva de calibración para determinar LD y LC de rebaudiósido A en muestras de miel express de <i>Stevia</i>	76
Figura 26. Cromatograma de una muestra de miel de <i>Stevia</i> después de la extracción	80
Figura 27. Cromatograma de una muestra de miel de <i>Stevia</i> sin extracción	80
Figura 28. Cromatograma para el blanco (miel natural) bajo las condiciones de la tabla 13.	81
Figura 29. Espectro UV-Vis para el blanco (miel natural)	82

Figura 30. Cromatograma de los patrones de fructosa, glucosa y sacarosa.	82
Figura 31. Cromatogramas bajo las condiciones de la tabla 13: A) muestra de jarabe B) muestra de miel de <i>Stevia</i>	84
Figura 32. Resultados de la prueba sensorial para una miel natural y las mieles de <i>Stevia</i> provenientes de las seis colmenas.....	86

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Resultados de la estadística realizada a los datos obtenidos de las mieles almacenados a diferentes condiciones.	98
ANEXO B. Ecuaciones y definiciones de los términos empleados para la estandarización de la técnica de cuantificación por HPLC	102
ANEXO C. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrados en muestras de miel de <i>Stevia</i> con doble y triple poder edulcorante almacenadas a diferentes condiciones	107
ANEXO D. Norma técnica colombiana NTC 1273, miel de abejas.	109
ANEXO E. Reseña histórica de Pronar Ltda.	119

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
BS	Base Seca
DPE	Doble poder edulcorante
HEPT	Altura Equivalente de plato teórico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HR	Humedad relativa
M	Molaridad
MDP	Miel doble poder edulcorante pasteurizada
MDSP	Miel doble poder edulcorante sin pasteurizar
MTP	Miel triple poder edulcorante pasteurizada
MTSP	Miel triple poder edulcorante sin pasteurizada
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
Min	Minutos
mL	Mililitros
Nm	Nanómetros
NTC	Norma Técnica Colombiana
°C	Grado centígrado
ppm	Partes por millón
T amb	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
t _r	Tiempo de retención
TPE	Triple poder edulcorante
UV-Vis	Ultravioleta visible
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La *Stevia* es un edulcorante natural alternativo al azúcar y a los edulcorantes artificiales; su extracto, cien a trecientas veces más dulce que el azúcar, no es hidrolizado por el organismo, razón por la cual no presenta aporte calórico.

Otro edulcorante natural es la miel de abeja, la cual es utilizada por estar constituida principalmente por azúcares simples, los cuales no necesitan ser digeridos ya que son asimilados directamente por el organismo, haciendo que la miel sea una fuente rápida de energía y un importante elemento en la dieta humana.

Dada las cualidades anteriores, en esta investigación se complementaron estos dos importantes elementos mediante el suministro de jarabes preparados a base de extracto de *Stevia* y azúcar comercial en la alimentación de las abejas, para la obtención de un producto denominado miel express, el cual se ha desarrollado como alternativa para diversificar los productos de miel en el mercado y para mejorar la calidad y la producción del fruto de las colmenas, siendo un producto muy llamativo, ya que con ella se puede obtener una miel enriquecida por la adición de los principios activos de la *Stevia*. Todo lo anterior brinda beneficios tanto al apicultor por incrementar sus ingresos ya que estos jarabes se proporcionan en épocas de lluvias, evitando la despoblación de las colmenas como al consumidor por el carácter nutritivo y/o medicinal que pueda brindar el producto como tal.

El estudio se realizó en seis colmenas, que se alimentaron con dos concentraciones diferente de jarabe:*Stevia*, obteniéndose de las primeras tres

colmenas una miel express con doble poder edulcorante y de las tres restantes una miel express con triple poder edulcorante.

Las muestras de miel de *Stevia* obtenidas se sometieron a dos condiciones (pasterizada y sin pasterizar); cada una de estas se almacenó a (4 °C y a T amb). El tratamiento estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con la cual se determinó los efectos de estas condiciones sobre los siguientes parámetros de calidad: humedad, acidez, azúcares reductores, azúcares totales, HMF e índice de diastasa; los cuales se determinaron siguiendo los procedimientos de la AOAC (2000), encontrándose que los porcentajes de acidez, azúcares reductores y azúcares totales, se ven afectados por las condiciones de almacenamiento a las que fueron sometidas las mieles, según el estadístico t ($t > 2.31$), y no así para el porcentaje de humedad, HMF e índice de diastasa, en los cuales no se encontraron diferencias significativas ($t < 2.31$) para las diferentes condiciones de almacenamiento a las que fueron sometidas las mieles. Los valores obtenidos fueron comparados con los estándares nacionales para miel de abejas (Norma NTC 1273), los cuales permitieron determinar que las muestras analizadas se encuentran dentro de los parámetros establecidos por ésta norma.

Se comprobó organolépticamente la incorporación de los principios activos de la *Stevia* en la miel, mediante una evaluación sensorial realizada a 50 consumidores, empleando la técnica de diferencia y el test de ordenamiento con respecto a la intensidad de dulzura.

Finalmente, se estandarizó la metodología para la cuantificación de esteviósidos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Los porcentajes de incorporación de steviósido y rebaudiósido A en la miel express de *Stevia*, variaron de 95-99%; con LD de 0,08 ppm para steviósido y 0.09 ppm para rebaudiósido A. El método desarrollado es simple, rápido y confiable, dentro de los límites establecidos

INTRODUCCIÓN

Por diferentes estudios, se ha demostrado que el sabor dulce ocupa el primer lugar dentro de las preferencias gustativas del ser humano¹; de ahí la gran importancia de los edulcorantes; de éstos, la sacarosa o azúcar de mesa ha sido extensamente usado tanto en la industria como en el hogar pero, el consumo excesivo del mismo, está asociado a la producción de dolencias, por ejemplo, enfermedades dentales, obesidad, presión alta, hipoglicemia, diabetes, entre otras¹. Por estas razones, muchos consumidores deben controlar la ingesta de azúcar, recurriendo a los edulcorantes artificiales, los cuales presentan menor aporte calórico; sin embargo, no es una opción segura debido al riesgo toxicológico que pudiese implicar el uso inadecuado de éstos², considerando también que su empleo esta prohibido en muchos países como Japón, China, Canadá, EE.UU., entre otros y en Colombia las cantidades empleadas de éstos son limitadas¹. Por ello, es necesario buscar nuevas alternativas en la obtención de edulcorantes no calóricos de forma natural, o potencializar los ya existentes.

La miel de abeja es un alimento que se ha consumido desde tiempos inmemoriales; es una sustancia dulce, producida por las abejas mediante la recolección del néctar, u otro fluido dulce de plantas vivas. Su acción fisiológica es distinta a la del azúcar común (sacarosa), ya que ésta es rápidamente asimilada y por su contenido de levulosa es mejor tolerada por los diabéticos, posee propiedades antisépticas y antibióticas, lo cual la convierte en un producto muy atractivo para el consumo humano³.

La miel express o frutimiel es una miel producida por las abejas en la colmena al consumir jarabes elaborados con jugos de fruta o plantas medicinales y azúcar, resultando un producto que reúne las propiedades de la miel de abejas y del jugo

administrado, cuya principal característica es la de adquirir el sabor y aroma de la sustancia adicionada⁴.

La miel express esta siendo producida actualmente en el departamento del cauca por el apiario los Alpes; los cuales han tenido éxito con mieles express de soya, eucalipto, maracuyá y *Stevia*; este tipo de alimentación brinda beneficios a los apicultores al generar un valor agregado en la miel, permitiéndoles ampliar el mercado para este sector además de ser una nueva alternativa de alimentación especialmente en época de invierno, debido a que la floración en estos períodos es escasa, causando una disminución en la producción de miel y conllevando muchas veces a la despoblación de las colmenas.

En esta investigación se ha logrado incorporar de forma natural en la miel los principios activos de la *Stevia*, con el fin de proporcionar un mayor poder edulcorante. Para comprobar su grado de incorporación, se identificó y cuantificó el steviósido y rebaudiósido A tanto en los jarabes preparados como en la miel express obtenida. Se empleó como método analítico la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), donde se optimizaron las variables cromatográficas: tiempo de retención, relación de fase móvil, resolución, entre otros. Para verificar la eficiencia de la incorporación de los principios activos en la miel express, se prepararon dos jarabes con diferente concentración de extracto de *Stevia* (doble y triple poder edulcorante). El mayor poder edulcorante en la miel se confirmó mediante un análisis sensorial realizado a consumidores. Este estudio se complementó con los análisis fisicoquímicos y de calidad en la miel express obtenida, y fueron comparados con una miel natural, la cual se empleo como tratamiento testigo.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni

1.1.1 Origen, morfología y clasificación. La *Stevia rebaudiana* Bertoni es nativa del norte del Paraguay y de zonas adyacentes del Brasil; grandes cantidades de ésta son cultivadas en China, y se encuentra industrializada en Paraguay, México, América Central, China, Malasia, Corea del Sur, España, Bélgica y Reino Unido. Los mayores consumidores de *Stevia* son Japón y Brasil, países que permiten el uso de esta planta como aditivo natural, algunos cálculos indican que la industria japonesa ha pasado de consumir cerca de 400 toneladas de hoja seca por año en la década del 80 a casi 2000 toneladas para finales de los noventa⁵.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un arbusto que crece entre los 500 y 3000 metros de altitud (Figura 1).

Figura 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni



Existen entre 150 y 300 especies de hierbas y arbustos que pertenecen al mismo género. Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Stevia*⁶

Reino	Plantae
División o filum	Spermatophyta (Magnoliophyta)
Clase	Dicotyledoneae (Magnoliopsida)
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae (Compositae)
Género	<i>Stevia</i>
Especie	<i>Stevia rebaudiana (Bertoni)</i>
Variedad	Bertoni

Las hojas de la planta han sido utilizadas por la tribu de indios Guaraní desde los tiempos pre-colombinos para endulzar los alimentos; ellos la denominan Kaa Jheé, lo que en esa lengua significa hierba dulce; sin embargo, no fué sino hasta 1887 que el científico americano Anthony Bertoni la descubrió⁶.

El cultivo de la *Stevia* en Colombia es relativamente nuevo, pero quienes la han sembrado, manifiestan su plena satisfacción por las bondades del mismo y su gran rentabilidad, sobre todo, por ser un cultivo de ciclo corto, adaptable a diversidad de climas y con manejo muy sencillo, adecuado para quienes se dedican a las labores cotidianas del agro. Investigadores japoneses lograron adaptarla en nuestro país para hacer viable su cultivo. En algunas regiones de los departamentos de: Antioquia, Valle, Córdoba, Cauca, Quindío, Cundinamarca, entre otras, se han realizado ensayos con óptimos resultados, y se está cultivando en pequeña escala⁵.

1.1.2 Composición. La *Stevia* presenta una composición variada, en ella es importante resaltar componentes como: terpenos, esteroides, ácido ascórbico, β -caroteno, niacina, taninos, flavonoides como quercetósido, apigenol y austroinulina, aceites esenciales tales como alcohol bencílico, α -bergamoteno, β -burboneno, α y γ -cadineno, calacoreno, clameneno, carvacrol y cosmosiína, así como minerales (Ca, Cr, Fe, Mg, P, K, Na, F, Zn, Se), y principios activos⁶.

1.1.3 Principios activos. Son denominados esteviósidos y se encuentran presentes especialmente en la hoja de la planta; son los responsables del sabor dulce, así como de las diversas propiedades encontradas en ella, estos son los edulcorantes naturales no nitrogenados más dulces que se encuentran en la naturaleza y están compuestos solamente de carbono, hidrógeno y oxígeno. Su fórmula estructural puede ser dividida en un aglicón (steviol) y tres o cuatro moléculas de glucosa según sea el caso⁷ (Figura 2). Estos son glicósidos diterpénicos, de los cuales se encuentran identificados ocho (Tabla 2). Presentan un esqueleto básico denominado steviol, el cual da origen biosintéticamente al resto de esteviósidos. Las diferencias entre estos compuestos radican en los grupos R_1 y R_2 ubicados en las posiciones C19 y C13, respectivamente (Figura 2). Otra característica de estos compuestos es la presencia de mono, di o trisacáridos, tales como la glucosa y/o ramnosa⁶.

Figura 2. Estructura general de los esteviósidos presentes en la planta

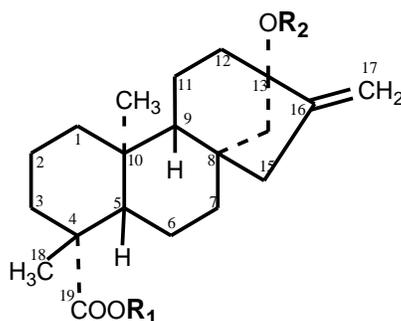


Tabla 2. Esteviósidos encontrados en la planta de *Stevia*^{8,9}

Diterpeno	R ₁	R ₂	Poder Edulcorante*	% Diterpeno en la planta (BS)
Esteviol glicósidos más comunes				
Steviol	H	H		
Steviósido	β-G	β-G-β-G(2-1)	250-300	4-13
Rebaudiósido A	β-G	β-G-β-G(2-1)/β-G(3-1)	350-450	2-4
Rebaudiósido C	β-G	β-G-α-Rha(2-1)	50-120	1-2
Dulcosido A	β-G	β-G-α-Rha(2-1)/β-G(3-1)	30	0.4-0.7
Esteviol glicósidos a nivel de trazas				
Rebaudiósido B	H	β-G-β-G(2-1)/β-G(3-1)	300-350	-
Rebaudiósido D	β-G-β-G(2-1)	β-G-β-G(2-1)/β-G(3-1)	200-300	-
Rebaudiósido E	β-G-β-G(2-1)	β-G-β-G(2-1)	250-300	-
Steviolbiosido	H	β-G-β-G(2-1)	100-125	-

*Respecto a la sacarosa= 1

Los diterpenos más comunes son los cuatro primeros; sin embargo, los más interesantes son el steviósido (Figura 3) y el rebaudiósido A (Figura 4), cada uno con una potencia edulcorante muy superior a la sacarosa (Tabla 2).

La importancia del steviósido radica en su mayor abundancia natural en la planta 4-13% (Tabla 2); la importancia del rebaudiósido A, es debida a que presenta las mejores propiedades sensoriales (bastante dulce, poco amargo), con relación a los cuatro glicósidos que están en mayor proporción⁶. Glicósidos como el Rebaudiósido C y Dulcosido A presentan un poder edulcorante mucho menor, tal como se observa en la Tabla 2, y adicionalmente presentan un ligero sabor amargo, esta propiedad esta asociada con la presencia del monosacárido α-ramnosa en la estructura del compuesto, lo que no sucede con el steviósido y rebaudiósido A¹⁰. El mecanismo exacto sobre la percepción del sabor dulce no es

conocido. Como se puede observar, las estructuras químicas sólo son ligeramente diferentes y algunos compuestos pueden ser bastante dulces y a veces bastante amargos¹¹.

Figura 3. Estructura del steviósido (19-O-β-glucopiranosil-13-O-β-soforosil-steviol).

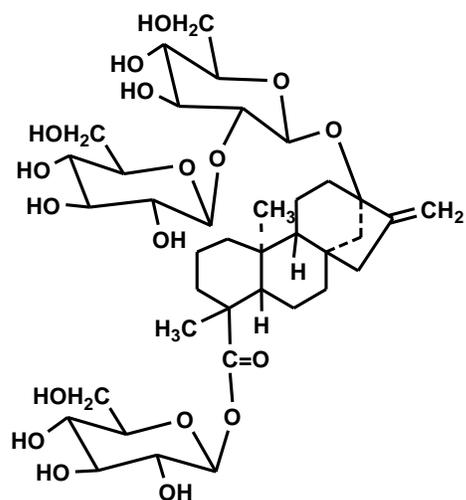
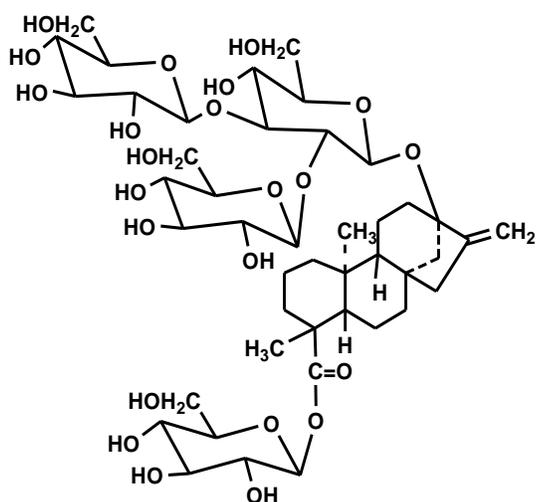


Figura 4. Estructura del rebaudiósido A (19-O-β-glucopiranosil-13-O-β-soforosil



Estos compuestos también presentan algunas características fisicoquímicas muy especiales como las que se encuentran en la Tabla 3. que los hacen bastante útiles como aditivos de alimentos.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los esteviósidos

Propiedades	Características ⁷
Aspecto	Polvo blanco, cristalino no higroscópico
Solubilidad	Altamente soluble en Agua, metanol, etanol e insoluble en éter
Estabilidad a la T	200 °C (392 °F), funde a 238° C
Estabilidad al pH	3-9
Fermentabilidad	Negativa
Toxicidad	Negativa

1.1.4 Propiedades de los esteviósidos. La *Stevia rebaudiana* ha sido utilizada por sus principios activos en el tratamiento de diferentes enfermedades¹². Se ha demostrado que el Steviósido estimula en forma directa las células β del páncreas generando una considerable secreción de insulina, por ello, es ideal para los diabéticos. De esta manera, mediante pruebas médicas se ha indicado que la *Stevia* podría tener un rol potencial como antihiper glucémico¹³.

Por otra parte, al no ser metabolizado en el organismo y no liberar calorías¹⁴, es recomendado para pacientes con sobrepeso; además, reduce la ansiedad por la comida disminuyendo el deseo por consumir dulces y/o grasas¹⁵.

Otros estudios realizados por TOMLINSON B. ¹⁶ lo clasifican como un hipotensor suave (baja la presión arterial)¹⁷, debido a su efecto vasodilatador, diurético y cardiotónico. También presenta actividad antibiótica⁸, puesto que previene e inhibe la reproducción de bacterias y organismos infecciosos como la *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium diphtheriae*.

1.1.5 Técnicas analíticas empleadas para la determinación de esteviósidos.

Un amplio rango de técnicas analíticas han sido empleadas para determinar y cuantificar los esteviósidos en la *Stevia rebaudiana*¹⁸; estas incluyen cromatografía en capa fina¹⁹, electroforesis capilar²⁰, técnicas enzimáticas²¹ y espectroscopía infrarroja²². El método analítico más común es el de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)²³ en la cual, las detecciones se realizan empleando el detector UV-vis, y las separaciones mediante columnas en fase reversa como: C18, hidroxapatita y amino²⁴, que han sido usadas para el análisis de esteviósido y glicósidos encontrados en alimentos y en bebidas²⁵.

1.1.6 Cromatografía líquida. Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en gran manera en los últimos años, debido no sólo al desarrollo de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a las necesidades crecientes por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas, entre las cuales se encuentra la separación de glicósidos obtenidos a partir de diversos alimentos²⁶.

1.1.7 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la determinación de esteviósidos, con detección Ultravioleta. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la técnica de separación más ampliamente utilizada; las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos y una cierta variedad de sustancias inorgánicas²⁷.

La mayoría de las separaciones de esteviósidos reportadas en la literatura involucran, el uso de fase reversa en HPLC, en lugar de fase normal²⁸. Las ventajas de la cromatografía en fase reversa se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales ventajas del uso de una fase estacionaria reversa en la separación cromatográfica

Características del uso de fase reversa	Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
	La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
	La adsorción irreversible, frecuentemente en gel de sílice, raramente ocurre.
	La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
	El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.
	El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.
	Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

Los parámetros enunciados en la anterior tabla determinan que, según las características de los esteviósidos, compuestos no iónicos, con grupos polares en las glucosas terminales, pueden ser separados fácilmente en una fase estacionaria apolar empleando una fase móvil medianamente polar, proceso en el que se encontraron tiempos de retención y de equilibrio bajos.

El detector ultravioleta-visible es uno de los detectores más frecuentemente empleados; se caracteriza porque tiene una respuesta prácticamente universal, si se considera un amplio rango de longitudes de onda (190-800 nm). Por lo tanto, es aplicable a los esteviósidos, los cuales presentan absorción aproximadamente a 200 nm.

Debido a su alta eficiencia, la cromatografía líquida de alta resolución es a menudo usada para determinar mezclas orgánicas complejas. Las técnicas cromatográficas han sido aplicadas a lo largo del tiempo para el estudio de compuestos naturales. Es así como STRIEDNER J., y CZYGAN E.²⁴ , han analizado los esteviósidos contenidos en las hojas de *Stevia* secas para el control de calidad, usando esta técnica, con lo cual se puede garantizar la efectividad de la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de steviósido y rebaudiósido A. La muestra fue analizada con un método de cromatografía isocrática usando una mezcla de acetonitrilo:agua (86:14) con una columna NH₂ y detección UV a 210 nm.

Por otro lado DACOME ANTONIO S²⁹ reporta la variación del contenido de steviósido y rebaudiósido A encontrados en un cultivo de *Stevia*, determinado a través de una columna NH₂-silica con modo isocrático, fase móvil acetonitrilo:agua (80:20) y con detección UV a 190 nm.

1.2 APICULTURA

Es el método de cría de las abejas más primitivo. Se practica manteniendo las abejas en recipientes diversos, que imitan los nidos naturales³⁰. Entre las abejas más utilizadas en apicultura se encuentra la *Apis mellifera* que pertenece al orden Himenoptera y la familia Apidae³¹.

1.2.1 Los habitantes de la colmena y sus tareas³². Las abejas son insectos sociales, es decir, viven formando colonias que pueden estar constituidas por alrededor de 40.000 a 120.000 individuos y que se reparten de forma muy ordenada la comida y el trabajo. En cada colonia hay tres tipos de individuos: Reina, abejas obreras y zánganos.

- **La reina.** Es el personaje central de la colonia y la única hembra perfecta y fecunda. Se distingue del resto por su longitud y por las alas, que son muy cortas en relación al cuerpo. Posee aguijón, pero sólo lo utiliza para luchar contra otras reinas. Si nacen varias reinas al mismo tiempo, se produce un combate a muerte en el que la reina triunfadora se convierte en máxima autoridad de la colonia.
- **Las abejas obreras.** Se desarrollan en celdas normales y forman la población más numerosa: 70.000 en primavera y unas 20.000 en invierno. Cumplen muchas funciones dependiendo de su edad. Apenas nacen, trabajan de limpiadoras, retirando de las celdillas los residuos. Al cuarto día se convierten en nodrizas, alimentan a las larvas y dan calor al nido de cría. A partir del décimo día atienden a la reina como damas de honor. Posteriormente, actúan como ventiladoras, segregan cera, fabrican miel, retiran los cuerpos extraños y velan por la seguridad de la colmena. Finalmente, a los veinte días y hasta su muerte, salen al campo en busca de néctar, polen, propóleos y agua. Suelen moverse en un radio de acción de 3 kilómetros.
- **Los zánganos.** Nacen de un huevo no fecundado. En cada colmena suele haber de 500 a 1.500. Cumplen una doble función: fecundar a la reina y proporcionar calor al nido de cría.

1.2.2 Requisitos alimenticios de las abejas. Las abejas, al igual que otros insectos, no tienen requisitos alimenticios excepcionales. Necesitan carbohidratos, proteínas, grasas, minerales, vitaminas y agua para su crecimiento, desarrollo, mantenimiento y reproducción. El néctar y la ligamaza son las principales fuentes de abastecimiento de carbohidratos en la dieta de las abejas, y el polen suministra todos los demás elementos indispensables.

La abeja adulta puede vivir de los carbohidratos: glucosa, fructosa, sucrosa, trehalosa, maltosa y melezitosa. No puede aprovechar galactosa, manosa, lactosa, rafinosa, xilosa ni arabinosa. Los apicultores a menudo alimentan a sus abejas con sucrosa si hay escasez de néctar o miel. Las abejas se alimentan también de jugos de frutas y ciertos jugos de plantas ocasionalmente. También obtienen del polen una pequeña cantidad de carbohidratos. La abeja adulta puede vivir únicamente a partir de carbohidratos, pero para la crianza de las que se hallan en etapas inmaduras, son indispensables las proteínas, grasas, minerales y vitaminas³⁰.

Una característica propia de las abejas africanizadas es que en los meses más lluviosos del año abandonan la colmena o se retiran cuando las reservas de miel o la afluencia de néctar son bajas. Para evitar esto, apicultores tienen que alimentar sus apiarios con alimentos artificiales³⁰.

1.2.3 Principales alimentos artificiales utilizados para la alimentación de las abejas³³.

- **Jarabes de maíz de alta fructosa (J.M.A.F.).** Estos jarabes se obtienen a partir de la hidrólisis (ruptura química) del almidón de maíz y poseen, de acuerdo al proceso de elaboración empleado, una composición química variable. Dos productos muy utilizados para la alimentación de las abejas son el J.M.A.F 42 y el J.M.A.F. 55. La composición de sólidos del J.M.A.F. 42 es de alrededor de un 42% de fructosa, un 53% de glucosa y un 5% de otros azúcares. El J.M.A.F. 55, por su parte, contiene un 55% de fructosa, un 41 % de glucosa y un 4 % de otros azúcares. El apicultor debe tratar de evitar aquellos jarabes con un alto contenido de azúcares superiores o dextrinas, ya que este tipo de azúcares son de muy difícil digestión para la abeja.

- **Azúcar de caña ó sacarosa.** El azúcar de caña es probablemente el sustituto de miel más utilizado en apicultura, ya que resulta muy atractivo y es de fácil digestibilidad para las abejas. El azúcar refinada contiene más del 99% de sacarosa y generalmente constituye la alternativa más económica para la alimentación artificial de las abejas.

La mejor forma de suministrar sacarosa a la colmena, es mediante la preparación de jarabe al 66% de sacarosa; esto equivale a dos partes de azúcar por una de agua. Se ha demostrado que no resulta conveniente para la salud de la abeja el agregado de ácidos (por ejemplo tartárico) para el desdoblamiento de la sacarosa en glucosa y fructosa. Lejos de resultar beneficioso, este desdoblamiento químico de la sacarosa por medio de ácidos resulta perjudicial debido a la producción de hidroximetilfurfural (H.M.F.), el cual disminuye el periodo de vida de las abejas. Para la preparación de los jarabes se recomienda calentar agua (80-90°C), adicionar la cantidad correspondiente de azúcar de buena calidad, agitación hasta lograr la disolución final y ningún tipo de agregados adicionales³¹.

1.2.4 Productos de la colmena y sus propiedades³². La colmena de abejas es como una pequeña fábrica, capaz de elaborar nutritivos productos naturales. Algunos de ellos tienen su origen en el campo y sólo sufren leves alteraciones como el néctar, el polen o los propóleos. Otros, en cambio, son producidos por las propias abejas como la jalea real, la cera o el veneno. Finalmente, los hay las cuales son el resultado del rendimiento en el trabajo, como la polinización.

- **Jalea real.** La jalea real o leche de abeja es el fruto de la secreción de las glándulas mandibulares de las abejas jóvenes, con menos de seis días de vida; forma parte de la dieta de las larvas de obreras y zánganos y constituye el único alimento de las reinas. Quizás esa sea la causa de que la reina viva 5 años en lugar de 4 meses como las obreras, puesto que se trata de un

verdadero concentrado nutritivo, que contiene vitaminas, minerales, enzimas, etc. Para esta sustancia, se han indicado los siguientes usos: revitalizador del organismo, ayuda a superar los estados de angustia y depresión, combate la anemia y la fatiga, aumenta el apetito, tonifica el corazón al dilatar los vasos coronarios y equilibra la tensión arterial. Por todo ello, está especialmente recomendada para las personas mayores y para los niños. Presenta un elevado precio comercial, dado que de ella sólo se puede obtener poca cantidad en las colmenas³².

- **Polen.** Es un polvillo que sirve para fecundar la flor. Las abejas lo recogen de las plantas y las flores y lo transportan en sus patas posteriores mediante unos cestillos o bolsas. Después lo mezclan con miel y forman una papilla con la que alimentan a las larvas. Es de diferentes colores, dependiendo de las plantas de las que procede. Es un rejuvenecedor natural, un euforizante que produce en sus consumidores una rápida recuperación de fuerza y peso. También ejerce una función reguladora de las funciones intestinales³².
- **Propóleos.** Las abejas utilizan los propóleos para mantener la asepsia en el interior de la colonia, sellar grietas y momificar los cadáveres de animales que por su tamaño no los pueden sacar fuera de la colmena. Hoy la medicina ha encontrado resultados muy positivos en el propóleo, usándolo en las afecciones del aparato respiratorio como catarrros, gripe, sinusitis, laringitis, asma bronquial y neumonía crónica³².
- **Cera.** La segregan las abejas entre los 12 y los 24 días a través de sus glándulas ceríferas, situadas en el abdomen. Se calcula que para producir un kilo de cera las abejas consumen unos ocho kilos de miel. Actualmente se utiliza para fabricar velas, ungüentos, barnices, betunes, pomadas, etc³².

- **Veneno.** Parece que Hipócrates ya trataba su reumatismo con este producto. Carlomagno también lo usó para aliviar sus fuertes dolores de gota. Hoy la apiterapia utiliza también esta sustancia³².

1.3 LA MIEL

La miel es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera* y *Apis lingüística*) con el néctar de las flores. Una vez lleno el panal, las abejas lo concentran y por acción de la invertasa desdoblan la sacarosa dando azúcar invertido³⁴.

La preparación de la miel se inicia en la misma planta; de allí, las abejas obreras extraen el néctar con su boca y ayudadas de su lengua, lo aspiran y lo guardan en su buche para llevarlo a la colmena; una vez en la colmena, esas gotitas de néctar van pasándose una y otra vez, de un buche a otro de 120 a 240 veces seguidas. Luego, la abeja buscará una celda hexagonal donde depositar la gotita de néctar para que siga el proceso hasta transformarse en miel, el cual es un líquido viscoso, translúcido, de color ámbar hasta pardo.

Además del azúcar invertido, sacarosa, pequeñas cantidades de gomas, dextrina, ceras, sustancias colorantes, aromáticas y granos de polen³⁵, la miel natural presenta la composición que se ilustra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición química de la miel natural³⁴

COMPONENTES MIEL	PROMEDIO
Fructosa (%)	38.20
Glucosa (%)	32.00
Sacarosa (%)	1.38
Maltosa (%)	6.80
Otros azúcares (%)	3.10
Humedad (%)	17.20
pH	3.91
Acidez Libre (meq/kg)	22.03
Acidez Total (meq/kg)	29.12
Cenizas (%)	0.17
Nitrógeno Total (%)	0.04
Índice de Diastasa	20.80
Hidroximetilfurfural (ppm)	10.00

1.3.1 Miel express. Se le denomina miel express, a la miel elaborada por las abejas en la colmena al consumir jarabes con jugos de frutas, leche, entre otros, resultando un exquisito producto que reúne las propiedades de la miel de abejas y del jugo suministrado. El nombre de express se le dió porque se produce en menos tiempo que la miel natural⁴.

1.3.2 Factores que intervienen en la calidad de la miel³³. Los siguientes factores deben tenerse en cuenta para cosechar mieles de buena calidad.

- Las condiciones medioambientales de la zona donde estén las colmenas, siendo determinantes el clima, la flora y la presión demográfica.

- Los tratamientos fitosanitarios que se utilicen para controlar las enfermedades de las abejas. Deben aplicarse productos autorizados, preferentemente de tipo natural.
- El control de los insecticidas y plaguicidas en las cercanías del apiario, respetando escrupulosamente las fechas y horas señaladas.
- La utilización exclusiva de láminas de cera pura, sin mezclas de parafina o sustancias afines; los panales viejos y ennegrecidos deben retirarse con frecuencia.
- El escaso uso de la alimentación artificial y en la época adecuada.
- Los panales que se van a extraer deben estar bien operculados, al menos en sus tres cuartas partes; además, esos panales deben provenir de la cámara de miel, no de la de cría, pues esto aumentaría el contenido de polen en la miel.
- La temperatura a la que almacenemos la miel y el tipo de materiales que utilicemos.

1.4 ANÁLISIS SENSORIAL DE MIELES³⁶

La evaluación de los alimentos desde el punto de vista sensorial, es una disciplina integrada que permite establecer la calidad desde el punto de vista de los atributos del producto. Igualmente, el análisis sensorial se refiere a la medición y cuantificación de las características de los productos, ingredientes o modelos evaluables por los sentidos humanos.

El control de calidad de la miel se realiza considerando los siguientes atributos: *Apariencia*: color, tamaño, forma, conformación, uniformidad. *Olor*: Los miles de

compuestos aromáticos que contribuyen al aroma. *Gusto*: Dulce, amargo, salado y ácido (posiblemente astringente o metálico entre otros) y *Textura*: Propiedades físicas como dureza, granulosisidad y viscosidad.

Desde luego, es complejo el uso de pruebas sensoriales para establecer los atributos que contribuyen a la calidad de las mieles. Implica tiempo y trabajo, está sujeto a errores debido a la variabilidad del juicio humano y por consiguiente, es costoso; sin embargo, no existen instrumentos mecánicos o eléctricos que puedan duplicar o sustituir el dictamen humano.

En la evaluación sensorial se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones: exigir al panelista no fumar, evitar perfumes y cosméticos con olores, porque influyen en la prueba. Entre prueba y prueba, el panelista debe hacer un enjuague bucal; las muestras se deben servir a la temperatura a la cual se consumen normalmente. La cantidad de muestra debe ser constante a través del test o prueba. Es aconsejable usar una onza de muestra de miel para la cata. Las muestras deben llevar un código que no permita al panelista obtener información alguna de la identificación de la muestra, ni introducir sesgos a la evaluación.

2. METODOLOGÍA

2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

La metodología de éste trabajo se desarrolló empleando reactivos y solventes grado analítico para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y de calidad a las muestras de miel de *Stevia* y reactivos de grado HPLC o grado cromatográfico para la determinación e identificación de los esteviósidos por cromatografía líquida de alta resolución. En la siguiente sección se listan los instrumentos y los reactivos empleados para las diferentes determinaciones.

2.1.1 Equipos

- Balanza analítica PRECISA XT 220A (220 g/0.001 g)
- Refractómetro 0-99% ABBE
- Mufla 0-1000°C
- Equipo de digestión y destilación BÜCHI
- Planchas CORNING PC-420
- Horno FISCHER SCIENTIFIC-Modelo 851 F
- Incubadora PRECISA-Modelo 815
- pH-metro METTLER TOLEDO MP 120
- Espectrofotómetro Ultravioleta- visible GENESIS 6
- Rota evaporador HEIDOLPH LABOROTA 4001
- Nevera Haceb
- Cromatógrafo de líquidos HEWLETT PACKARD 1100, desgasificador G 1322A, bomba cuaternaria G 1311A, detector UV-Vis G1314A, columna analítica Agilent Zorbax NH₂ - 5µm x 4,6 x 250 mm.

2.1.2 Reactivos

- Ácido sulfúrico 95-98%
- Ácido bórico comercial
- Ácido clorhídrico 36-38%
- Carbonato de sodio 99.9%
- Ftalato ácido de potasio 99.8%
- Tabletas Kjeldahl pro-análisis
- Sulfato de cobre (II) 98%
- Hidróxido de sodio 99%
- Éter etílico anhidro 99%
- Estándar steviósido (10 mg) ITI. Internacional Inc. Miami, Florida.
- Estándar rebaudiósido A (10 mg) ITI. Internacional Inc. Miami, Florida.
- Extracto de *Stevi.*, Bio-*Stevia* S.A., Santiago de Cali.

2.1.3 Solventes grado HPLC

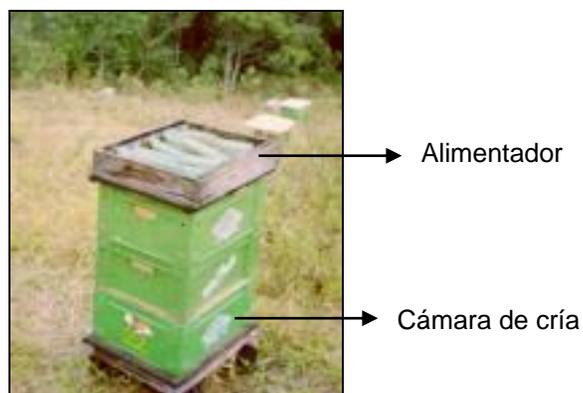
- Metanol 99.98 %
- Isopropanol 99.9 %
- Acetonitrilo 99.99 %
- Tetrahidrofurano 99.5 %

Para el desarrollo de la presente investigación, se dividió el trabajo en dos etapas: la primera se desarrolló en el apiario “Los Alpes”, de la empresa Productos Naturales Arroyave® -Pronar Ltda., ubicado en la vereda Florencia, municipio de Totoró, a 8.7 kilómetros de la ciudad de Popayán, vía Panamericana, Popayán-Cali. Esta zona se encuentra a 1780 metros sobre el nivel del mar, cuenta con una temperatura promedio de 17 °C y con una precipitación de 1700-2000 mm/año. La última etapa se realizó en el laboratorio del grupo de investigación en Química de Productos Naturales “QPN”, adscrito a la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, de la Universidad del Cauca.

2.2 TRABAJO EN CAMPO

2.2.1 Preparación de las colmenas. Las colmenas fueron suministradas por Pronar Ltda. Se trabajó con abejas africanizadas. Para la selección de las colmenas se tuvo en cuenta una característica importante, como es la fortaleza de la colmena, entendiéndose como aquella que posee una reina con buena postura para que haya una cantidad de obreras considerable (40000-120000 individuos entre abejas en estado larvario y estado adulto). Una de las colmenas empleadas para la producción de miel express se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Colmena utilizada para producción de miel express



2.2.2 Preparación de los jarabes y alimentación de las colmenas. Se prepararon dos jarabes con diferente concentración de extracto de *Stevia* en las siguientes relaciones:

Relación de doble poder edulcorante

Relación de triple poder edulcorante

Para la obtención del jarabe, se disolvió la totalidad del azúcar requerida en agua en ebullición; posteriormente, se adicionó el extracto de *Stevia* y se dejó ebullicir nuevamente durante 1 a 2 minutos. Una vez elaborada la solución, se dejó enfriar y se midió la densidad. Este parámetro se ajustó cuando fue necesario.

En la Figura 6, se muestra el diagrama de flujo para la preparación de los jarabes y las cantidades de cada uno de los insumos se describen en la Tabla 6.

Figura 6. Diagrama de flujo para la preparación de los jarabes

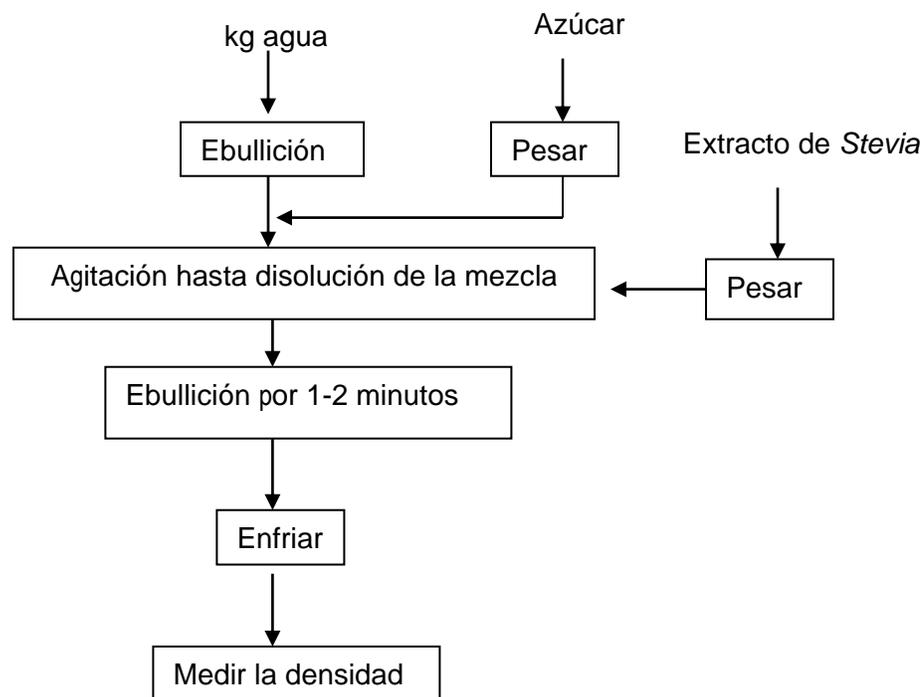


Tabla 6. Formulaciones para la preparación de los jarabes a base de *Stevia* y azúcar comercial

Formulación	kg de agua	kg de azúcar	kg extracto de <i>Stevia</i>	Colmenas
Doble poder edulcorante	1	1,3	0,005	Uno, dos y tres
Triple poder edulcorante	1	1,3	0,010	Cuatro, cinco y seis

Mediante estas relaciones de agua, azúcar y extracto de *Stevia*, se obtuvo un jarabe con la densidad adecuada que estuvo entre 1,29-1,32 g/mL, que es la recomendada por los apicultores para que sea consumida por las abejas.

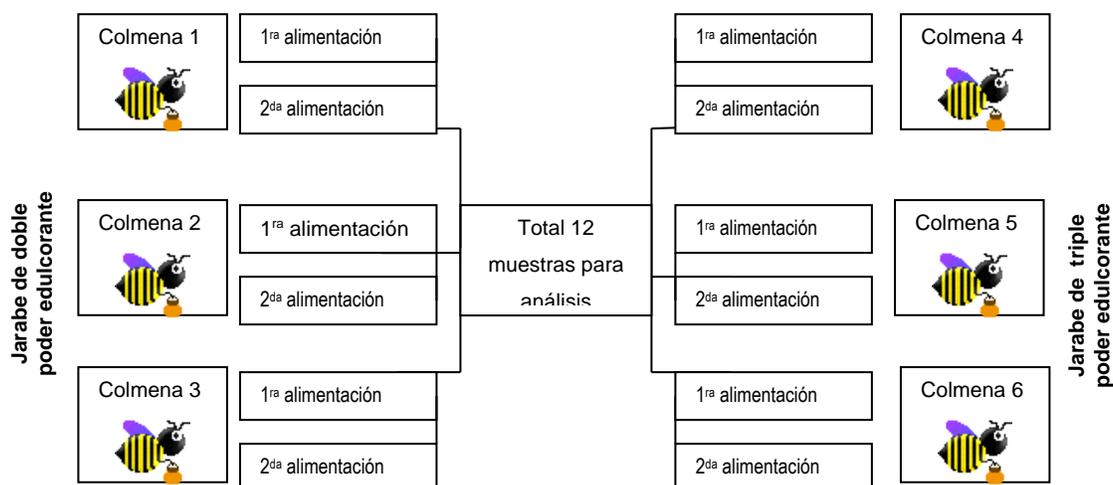
El tiempo de alimentación de las abejas, se determinó según las recomendaciones de los apicultores del apiario, garantizando la obtención de un producto con características adecuadas para el análisis.

Activación de las colmenas. Las colmenas seleccionadas fueron activadas mediante una alimentación que consistía solamente en un jarabe de azúcar, para garantizar que se llenaran con miel los marcos de la cámara de cría (Figura 5), ya que los otros marcos serían utilizados exclusivamente para el almacenamiento de la miel producida con el jarabe de *Stevia*.

Alimentación de las abejas. Se trabajó con seis colmenas, de las cuales, las tres primeras se alimentaron con jarabe de doble poder edulcorante y las tres restantes con jarabe de triple poder edulcorante, como se ilustra en la Figura 7; cada colmena se alimentó dos veces de forma secuencial después de aproximadamente veinte días, con el fin de obtener datos estadísticos como soporte de los estudios realizados. Previamente a la alimentación con jarabe de *Stevia*, se seleccionó una de las colmenas de estudio al azar, para la obtención de

una muestra de miel natural elaborada de las diferentes fuentes florales como tratamiento testigo (blanco).

Figura 7. Alimentación de las colmenas



Para la alimentación de las abejas, los jarabes preparados se adicionaron a la colmena en el alimentador con capacidad para 12 kilogramos (véase Figura 5); estas colmenas fueron revisadas periódicamente por el apicultor, con el fin de observar el consumo de jarabe y el estado de conservación del mismo, para determinar oportunamente posibles fermentaciones.

Las fechas según el calendario para suministrar la alimentación a las abejas, están asociadas a los períodos de lluvia o escasez de floración a lo largo del año y se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Fechas de alimentación de las colmenas empleadas

Colmena número	Alimentación	Fecha de alimentación
1 y 4	1 ^{ra}	Octubre 3 de 2005
1 y 4	2 ^{da}	Octubre 24 de 2005
2 y 5	1 ^{ra}	Noviembre 2 de 2005
2 y 5	2 ^{da}	Noviembre 28 de 2005
3 y 6	1 ^{ra}	Febrero 6 de 2006
3 y 6	2 ^{da}	Febrero 27 de 2006

2.2.3 Recolección o cosecha de la miel express. La recolección de la miel express de *Stevia*, se realizó bajo la supervisión del personal del apiario “Los Alpes”. Esta fué cosechada después de veinte días de iniciada la alimentación, periodo en el cual se considera que esta madura y teniendo en cuenta que los marcos estuvieran operculados♣.

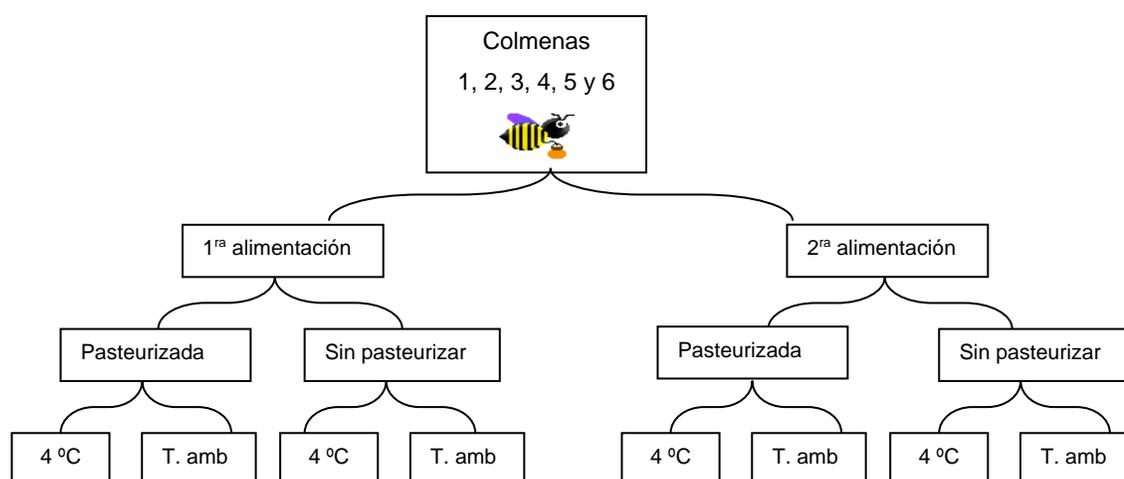
Posteriormente, se procedió a colocar los marcos operculados en una centrífuga para la extracción de la miel; ésta se recolectó en recipientes plásticos y se filtró a través de un lienzo fino, con el fin de retirar materiales extraños como partes de insectos u otras impurezas de la miel; los recipientes de recolección de la miel estaban adecuados con aspas para mezclar la miel, garantizando una completa uniformidad. Finalmente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio del grupo de investigación en Química de Productos Naturales, “QPN”.

* Opérculo: tapón de cera de las celdas del panal.

2.3 TRABAJO EN EL LABORATORIO

2.3.1 Preparación de la muestra. Cada una de las doce muestras de miel de *Stevia* provenientes de las seis colmenas, se sometieron a dos condiciones (pasteurizada y sin pasteurizar); cada una de éstas muestras se almacenó a dos temperaturas diferentes (4°C y temperatura ambiente) como se observa en la Figura 8, teniendo en total 48 muestras de miel express de *Stevia* y 12 muestras de jarabe para analizar. Lo anterior se realizó con el fin de determinar los efectos de las anteriores condiciones sobre algunos parámetros de calidad. Todas estas muestras fueron etiquetadas y almacenadas en recipientes de vidrio.

Figura 8. Condiciones de almacenamiento a las que fueron sometidas las mieles express de *Stevia*



El proceso de pasteurización consistió en someter la miel a calentamiento en baño maría a una temperatura de 70 °C por un minuto y enfriamiento inmediato en un baño de hielo para garantizar un choque térmico.

En el momento del análisis, cuando las muestras no estaban granuladas, estas sólo se agitaron antes de tomar la alícuota para efectuar las determinaciones; si lo estaban, éstas se colocaron en un recipiente (herméticamente cerrado) en un baño de agua y se calentaron durante 15 minutos a 60 °C, hasta disolución de estas partículas, y posteriormente, se enfrió rápidamente; luego se pesaron las alícuotas para efectuar las distintas determinaciones.

2.3.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos para las muestras de miel express de *Stevia*. Se determinaron los parámetros fisicoquímicos propuestos por la AOAC³⁸: cenizas, humedad, proteína y densidad para los jarabes y las mieles de *Stevia*; cada determinación se realizó por triplicado con el fin de establecer la confiabilidad de los datos.

- **Cenizas.** Una vez las muestras de miel se secan a fuego directo para eliminar el exceso de agua y así evitar la formación de espuma y la consiguiente pérdida de la muestra, se obtuvo finalmente un residuo inorgánico que quedó luego de calcinar la materia orgánica a 500-550 °C en una mufla.
- **Humedad.** Se empleó el método refractométrico; inicialmente se colocó una gota de miel con una varilla de vidrio, entre los prismas del refractómetro para determinar el índice de refracción de la muestra de miel a una temperatura de 20°C; se tuvo en cuenta un factor (0,00023 por °C) que se debe sumar o restar al índice de refracción de acuerdo a si la temperatura es superior o inferior a los 20°C. El valor leído se transforma en porcentaje de humedad a través de la tabla de Chataway³⁷.

Para la determinación del contenido de humedad en los jarabes, se aplicó la técnica de deshidratación completa con aire caliente, que consiste en eliminar el agua por completo, colocando la muestra en estufa a 70°C por dos horas, hasta peso constante.

- **Proteína.** Esta se determinó por el método Kjeldalh, donde se llevó a cabo una digestión con ácido sulfúrico hasta la ausencia de materia orgánica. Posteriormente, el nitrógeno fué recibido en ácido bórico mediante destilación. El porcentaje de nitrógeno se obtuvo mediante una titulación con ácido clorhídrico 0.1N y el porcentaje de proteína se calculó al multiplicar el porcentaje de nitrógeno encontrado por un factor de 5,7.

2.3.3 Determinación de parámetros de calidad para las muestras de miel express de *Stevia*. Se determinó a todas las muestras de miel de *Stevia* obtenidas, los siguientes parámetros: azúcares reductores, acidez, prueba cualitativa de hidroximetilfurfural e índice de diastasas.

- **Azúcares reductores.** Hace referencia al contenido de azúcares simples como fructuosa y glucosa e indica la madurez de la miel; para su determinación se empleó el método LANE-EYNON; el principio de la técnica consiste en reducir la solución de Fehling, titulándola en el punto de ebullición, con una solución de los azúcares reductores de la miel y utilizando como indicador interno una solución de azul de metileno. La solución de Fehling consiste en dos disoluciones acuosas: sulfato de cobre (II) e hidróxido de sodio y tartrato de sodio y potasio. Su determinación es un índice de la maduración de la miel.
- **Acidez libre.** Es un importante parámetro de calidad que indica el deterioro de la miel. Para su determinación, la muestra se disolvió en agua destilada neutra (pH: 6,5-7,0) y se tituló con hidróxido de sodio estandarizado, usando como indicador fenolftaleina hasta el cambio de color (incolora-rosado pálido) que persista por 40 segundos aproximadamente.
- **Diastasas.** Este parámetro es un indicador de la frescura y del tratamiento calórico al que ha sido sometida la miel. La determinación es cualitativa. El sustrato de almidón se incubó por una hora a 45°C con la muestra de miel,

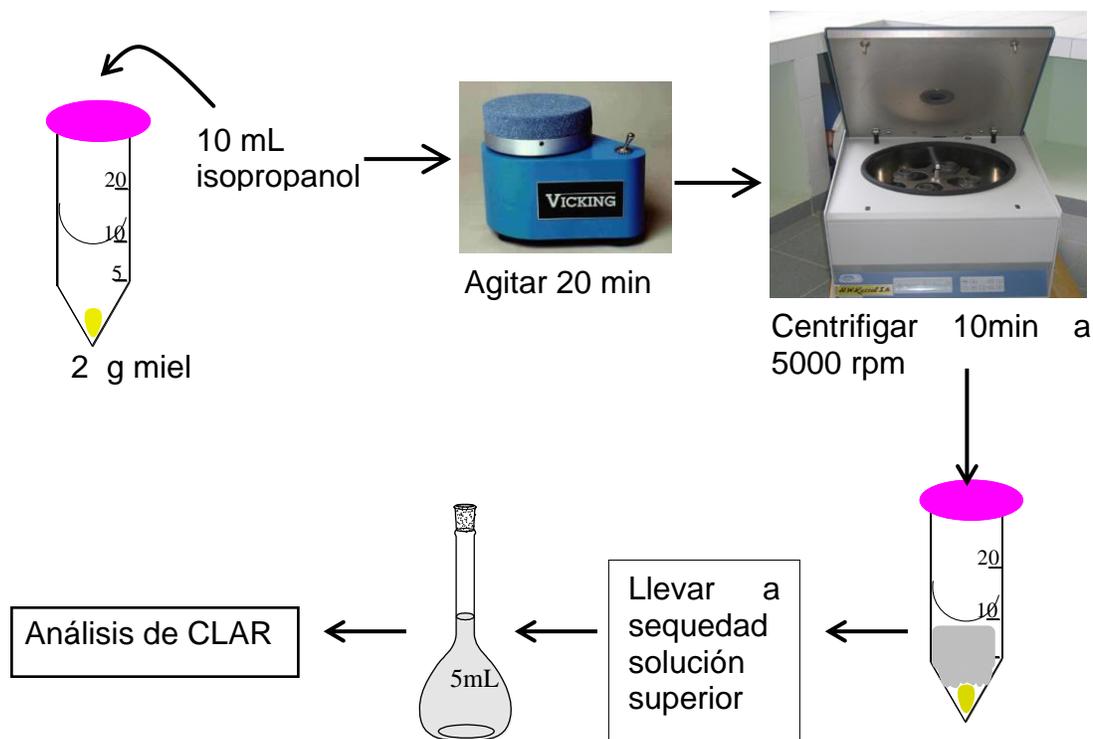
produciéndose la hidrólisis enzimática; finalmente se adiciona una solución de yodo/yoduro y se observa la coloración (una miel natural que contiene sus diastasas, no presenta cambio de color).

- **Hdroximetilfurfural (HMF).** Al igual que el contenido de diastasas, éste es un indicativo del deterioro de la miel. Para su determinación se empleó el ensayo de Fiehes, que consiste en disolver en un vaso de precipitados una cantidad de miel en agua destilada previamente hervida y fría; luego se extrae con éter etílico la fase orgánica, se evapora a temperatura ambiente, se humedece el residuo con resorcinol y se observa el cambio de coloración (positiva para color rojo cereza).

2.3.4 Metodología planteada para la extracción de steviósido y rebaudiósido

A presentes en la miel de *Stevia*. Basados en los trabajos de Pozo J.³⁸ y BELLIARDO F³⁹., se realizaron extracciones líquido-líquido, en la cual inicialmente se determino cuál solvente extractante era el más apropiado, se evaluaron solventes polares y medianamente polares, teniendo en cuenta que los esteviósidos son compuestos con alta polaridad por los grupos hidroxilo presentes en su estructura; los solventes evaluados fueron: Metanol, etanol, dioxano, n-butanol, pentanol e isopropanol. El solvente con el que se obtuvo óptimos resultados fue el isopropanol el cual solubilizó los esteviósidos y no así la miel; el diagrama de flujo de la metodología evaluada se muestra en la Figura 9.

Figura 9. Diagrama de flujo para la separación de steviósido y rebaudiósido A en la miel de *Stevia*.



2.3.5 Estandarización de la técnica de cuantificación de steviósido y rebaudiósido A por HPLC. Se estandarizaron los parámetros cromatográficos para la determinación de steviósido y rebaudiósido A para cada una de las muestras de miel express obtenidas. Se establecieron condiciones óptimas para el análisis tales como: Selección de la columna, velocidad de flujo, longitud de onda y fase móvil.

- **Selección de la columna.** Se evaluaron dos columnas, Hypersil ODS C₁₈ - 5µm x 4,0 x 250 mm y Agilent Zorbax NH₂ - 5µm x 4,6 x 250 mm, escogiendo la más adecuada para el análisis.

- **Velocidades de flujo.** Para su determinación, se inyectó una solución estándar de steviósido y rebaudiósido A variando la velocidad de flujo de la fase móvil desde 0,3 hasta 1,2 mL/min; estas inyecciones se realizaron por triplicado. Con estos flujos y su correspondiente HEPT, se construyó una curva de Van Deemter para seleccionar la velocidad de flujo óptimo.
- **Longitud de onda.** Se determinó realizando un barrido en el espectrofotómetro con los patrones de steviósido y rebaudiósido A, a una longitud de onda desde 190 a 700 nm, registrando valores cada 5 nm.
- **Elección de la fase móvil.** Teniendo en cuenta las diferentes investigaciones acerca de las condiciones para la separación y cuantificación de los esteviósidos presentes en la hoja de *Stevia*⁴⁰ y la magnitud de las interacciones para cada solvente empleado, se optimizó el tipo de fase móvil; para ello, se realizaron ensayos con diferentes solventes considerando las propiedades de los mismos²⁷ (acetonitrilo, agua, metanol, isopropanol); también se tuvo en cuenta la variación de las fuerzas eluotrópicas, empleando la ecuación de Snyder²⁷, con el fin de establecer el método de separación y cuantificación más apropiado por HPLC.

2.3.6 Estandarización del método analítico. Esta etapa se desarrolló con el fin de obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterio de confianza del método; éstos parámetros fueron: linealidad, precisión (Repetitividad y reproducibilidad), sensibilidad (Límite de detección y límite de cuantificación) y exactitud.

Para la determinación de steviósido y rebaudiósido A, se prepararon soluciones de referencia de 100 ppm para cada analito, a partir de los estándares correspondientes.

Las soluciones estándar de trabajo se prepararon por dilución de las soluciones anteriores con el fin de obtener un rango de concentraciones de 5 a 40 ppm para steviósido y de 5 a 50 ppm para rebaudiósido A. Estas soluciones de trabajo se prepararon en agua deionizada con conductividad de 0.5 μ S y se almacenó a temperatura ambiente.

- **Linealidad.** Para su determinación, cada solución estándar de steviósido y rebaudiósido A se midió por triplicado y a partir de los datos obtenidos de las áreas y sus respectivas concentraciones, se trazaron las curvas de calibración correspondientes.
- **Precisión.** Con el fin de observar el grado de concordancia entre los datos individuales y la repetitividad de la técnica, se inyectó en el cromatógrafo líquido una solución estándar de steviósido y rebaudiósido A de 40 ppm, en forma consecutiva diez veces, determinándose la desviación estándar (S) y la desviación estándar relativa (RSD).

Para determinar la reproducibilidad del método, dos soluciones estándar de steviósido y rebaudiósido A de diferente concentración fueron analizadas durante un mes consecutivo cada ocho días, con el fin de observar la desviación estándar relativa después de un mes de analizadas.

- **Sensibilidad.** Para calcular el límite de detección LD y el límite de cuantificación LC⁴¹ de steviósido y rebaudiósido A, fue necesario construir una curva de calibración adicional con un rango de concentración menor, 1 a 5 ppm. Cada punto de las curvas se midió por triplicado y de ésta manera se calculó la mínima concentración de steviósido y rebaudiósido A detectable y cuantificable por la técnica de HPLC.

- **Exactitud.** La exactitud se calculó evaluando la recuperación porcentual de steviósido y rebaudiósido A a partir de las curvas de trabajo empleadas para determinar la linealidad del método, las cuales tienen un rango de concentración desde 5 a 40 ppm para steviósido y desde 5 a 50 ppm para rebaudiósido A.

2.4 ANÁLISIS SENSORIAL DE MIELES⁴²

Se realizó una prueba sensorial a 50 consumidores, 27 mujeres y 23 hombres, en edades comprendidas entre los 20 y 25 años. Se les entregó la ficha de evaluación (Figura 10) junto con nueve muestras divididas en tres grupos (Figura 11); cada grupo provenía de una colmena diferente; en cada grupo se encontraban tres muestras que correspondían a una miel natural (blanco), miel doble y miel triple poder edulcorante codificadas al azar. Así:

Códigos

I: Miel *Stevia* doble poder edulcorante

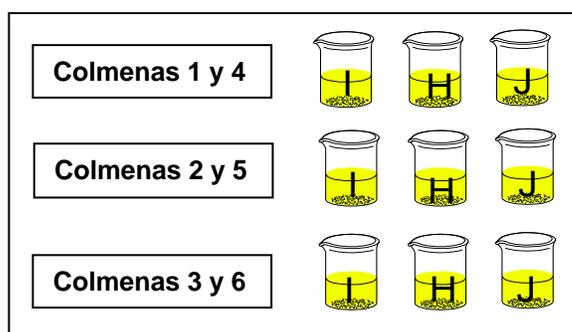
H: Miel natural (blanco)

J: Miel *Stevia* triple poder edulcorante

Figura 10. Ficha para la prueba sensorial realizada a consumidores

FICHA			
Nombre:.....			Edad:.....
Fecha:.....			Sexo:.....
Hora:.....			Producto: <u>Miel</u>
Sírvase degustar las muestras que se presentan. Ordénelas según el grado de dulzura. Enjuague la boca con agua luego de probar cada muestra			
	menos dulce	moderadamente dulce	Muy dulce
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3

Figura 11. Muestras de miel entregada a cada consumidor



Las muestras se entregaron en una cantidad aproximada de 5g, se dispusieron en vasos desechables de plástico y provistos de una cuchara de plástico blanca para cada muestra para permitir una mejor evaluación. Por último, se les explicó la metodología y la significación del test con el fin de lograr una mayor colaboración.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS DE LOS JARABES DE EXTRACTO DE STEVIA

3.1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos. Los datos obtenidos de los parámetros fisicoquímicos correspondientes a los jarabes con relación de doble y triple poder edulcorante se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos determinados a los jarabes de extracto de *Stevia*

Jarabe	Colmena	Alimentación	Humedad* %	Cenizas %	Acidez (meq/100 g)	ρ g/mL
Doble poder edulcorante	1	1	40,90	0,019	0,153	1,28
		2	42,07	0,024	0,090	1,28
	2	1	39,97	0,037	0,109	1,28
		2	41,57	0,028	0,102	1,28
	3	1	42,00	0,020	0,110	1,29
		2	41,87	0,030	0,101	1,29
Triple poder edulcorante	4	1	40,73	0,039	0,185	1,29
		2	42,02	0,035	0,094	1,29
	5	1	38,99	0,040	0,141	1,30
		2	41,85	0,041	0,101	1,29
	6	1	42,97	0,036	0,131	1,30
		2	42,25	0,035	0,121	1,30

*Determinación por deshidratación en estufa a 70° C

Los resultados de la determinación de humedad para los jarabes de *Stevia* con doble y triple poder edulcorante se encuentra entre un 39 y 43%; estos jarabes fueron fluidos, lo cual facilitó su consumo por parte de las abejas y su conservación durante el periodo de alimentación. La densidad de estos jarabes

estuvo alrededor de 1,28-1,30 g/mL, cerca del mínimo requerido para lograr un jarabe de buena calidad. La combinación de estos factores (humedad y densidad) determinaron las condiciones del jarabe para ser usado como alimento para las abejas; las densidades de éstos jarabes fueron obtenidas luego de numerosos ensayos en cuanto a proporciones de agua, azúcar y extracto de *Stevia*. Cuando se prepararon jarabes con densidades por debajo de 1,28 g/mL, éstos presentaron fermentaciones y deterioro por ataque de hongos y otros microorganismos, como resultado de su mayor actividad acuosa presente en el producto, siendo más fluidos y su consumo por parte de las abejas fue menor. De la misma manera, cuando los jarabes presentaron densidades superiores a 1,32 g/mL, conllevó a que éstos cristalizaran, y por su mayor viscosidad dificultó su consumo, por lo que se puede deducir, que jarabes muy fluidos o muy densos no son aceptados por las abejas de éste apiario. Atendiendo a estas razones, se apreció que los jarabes elaborados fueron óptimos, lo que se vió reflejado por el rápido consumo del alimento, la abundante oviposición de la reina y la sanidad de las colmenas. No se observó fermentación o algún tipo de deterioro en el sustrato alimenticio. Las relaciones de agua, azúcar y extracto de *Stevia* requeridas para la preparación de los jarabes se encuentran en la Tabla 6 (sección 2.2.2).

3.2 ANÁLISIS DE LAS MIELES DE STEVIA

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos y de calidad correspondientes a las mieles de *Stevia* con DPE y TPE se presentan en las Tablas 9 y 10. Los valores permitidos por la Norma Técnica Colombiana NTC 1273, para una miel de abejas se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 9. Resultados de los análisis realizados a las mieles de *Stevia* con doble poder edulcorante.

Colmena	Alimentación	Identificación de la miel	Condiciones almacenam.	Densidad g/ml	Porcentaje					Diasasas	HMF	
					Cenizas	Proteína	Humedad	Acidez	Azúcares reductores			Azúcares reductores totales
Colmena 1	1	MDP	4°C*				18,12	0,88	70,17	79,96	+	-
			Tamb**	1,42	0,05	0,05	18,01	0,93	71,70	79,86	+	-
		MDSP	4°C				18,65	0,90	70,45	80,27	+	-
			Tamb				18,18	1,01	72,19	80,31	+	-
	2	MDP	4°C				19,31	0,98	68,06	79,46	+	-
			Tamb	1,41	0,11	0,09	19,45	1,08	70,14	80,85	+	-
		MDSP	4°C				19,61	1,05	69,17	80,00	+	-
			Tamb				19,41	1,23	73,28	81,49	+	-
Colmena 2	1	MDP	4°C				20,11	1,00	59,58	78,46	+	-
			Tamb	1,41	0,14	0,07	20,18	1,16	61,06	79,21	+	-
		MDSP	4°C				20,40	1,12	60,56	79,39	+	-
			Tamb				20,12	1,38	64,56	79,69	+	-
	2	MDP	4°C				21,33	1,03	52,87	75,12	+	-
			Tamb	1,42	0,05	0,06	21,43	1,23	60,74	75,13	+	-
		MDSP	4°C				20,94	1,10	54,73	74,48	+	-
			Tamb				21,54	1,42	63,40	76,12	+	-
Colmena 3	1	MDP	4°C				18,43	0,89	71,18	81,51	+	-
			Tamb	1,40	0,08	0,07	18,03	0,96	72,28	81,63	+	-
		MDSP	4°C				17,98	0,91	72,24	81,03	+	-
			Tamb				18,32	1,03	73,16	82,69	+	-
	2	MDP	4°C				18,45	0,90	71,73	79,89	+	-
			Tamb	1,40	0,07	0,06	18,55	1,00	73,29	80,01	+	-
		MDSP	4°C				18,41	0,98	72,23	80,12	+	-
			Tamb				18,78	1,08	73,93	81,43	+	-

*4°C: cuatro grados centígrados

**Tamb: Temperatura ambiente

Tabla 10. Resultados de los análisis realizados a las mieles de *Stevia* con triple poder edulcorante.

Colmena	Alimentación	Identificación de la miel	Condiciones almacenam,	Densidad (g/ml)	Porcentaje						Diastasas	HMF
					Cenizas	Proteína	Humedad	Acidez	Azúcares reductores	Azúcares reductores totales		
Colmena 4	1	MTP	4°C				17,73	0,81	72,01	81,76	+	-
			Tamb	1,42	0,06	0,06	17,94	0,88	73,56	81,67	+	-
		MTSP	4°C				17,87	0,85	72,42	81,49	+	-
			Tamb				18,07	0,96	73,80	82,19	+	-
	2	MTP	4°C				18,72	0,90	71,87	79,95	+	-
			Tamb	1,41	0,12	0,04	18,86	1,00	72,35	80,20	+	-
		MTSP	4°C				18,89	0,98	72,18	80,11	+	-
			Tamb				19,04	1,20	73,11	80,09	+	-
Colmena 5	1	MTP	4°C				20,02	0,87	59,34	75,79	+	-
			Tamb	1,41	0,17	0,07	20,09	1,15	60,22	76,32	+	-
		MTSP	4°C				20,18	1,10	59,98	76,28	+	-
			Tamb				20,24	1,36	64,18	75,82	+	-
	2	MTP	4°C				19,93	1,00	61,09	76,76	+	-
			Tamb	1,42	0,06	0,09	19,86	1,18	63,35	76,63	+	-
		MTSP	4°C				20,01	1,07	63,87	76,52	+	-
			Tamb				19,94	1,30	64,95	77,19	+	-
Colmena 6	1	MTP	4°C				17,34	0,77	73,89	81,89	+	-
			Tamb	1,40	0,09	0,06	17,12	0,80	74,18	82,27	+	-
		MTSP	4°C				17,22	0,78	74,09	82,17	+	-
			Tamb				17,03	0,83	75,05	82,59	+	-
	2	MTP	4°C				18,33	0,86	70,59	79,74	+	-
			Tamb	1,40	0,08	0,07	18,13	0,94	71,17	79,96	+	-
		MTSP	4°C				17,78	0,93	71,43	79,71	+	-
			Tamb				18,00	1,11	72,49	80,29	+	-

Tabla 11. Requisitos para la miel de abejas

Requisitos	Mínimo	Máximo
Cenizas en %		0,25
Humedad a 20°C en %		20
Acidez en meq/100g		4
Azúcar reductor en %	65	

3.2.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos. Como se observa en las tablas 9 y 10, el porcentaje de cenizas y de proteína para la miel de *Stevia* DPE oscila entre 0,05-0,14% y 0,05-0,09% respectivamente; para la miel de *Stevia* TPE se encontró un porcentaje de cenizas entre el 0,06-0,17% y proteína entre el 0,04 al 0,09%, siendo estos porcentajes menores al compararlos con la miel natural los cuales son: cenizas 0.25% y proteína 0.37%, estas diferencias se pueden explicar considerando que las primeras mieles fueron preparadas a partir de un jarabe que consistía únicamente en agua, azúcar y *Stevia*, donde su mayor proporción esta compuesta de carbohidratos; a diferencia de la miel natural que procede del néctar de las flores, el cual se encuentran compuesto principalmente por azúcares y por una baja pero variable cantidad de aminoácidos y sustancias minerales que dependen fundamentalmente de su procedencia, por ejemplo de las características del suelo y el clima de la región⁴³.

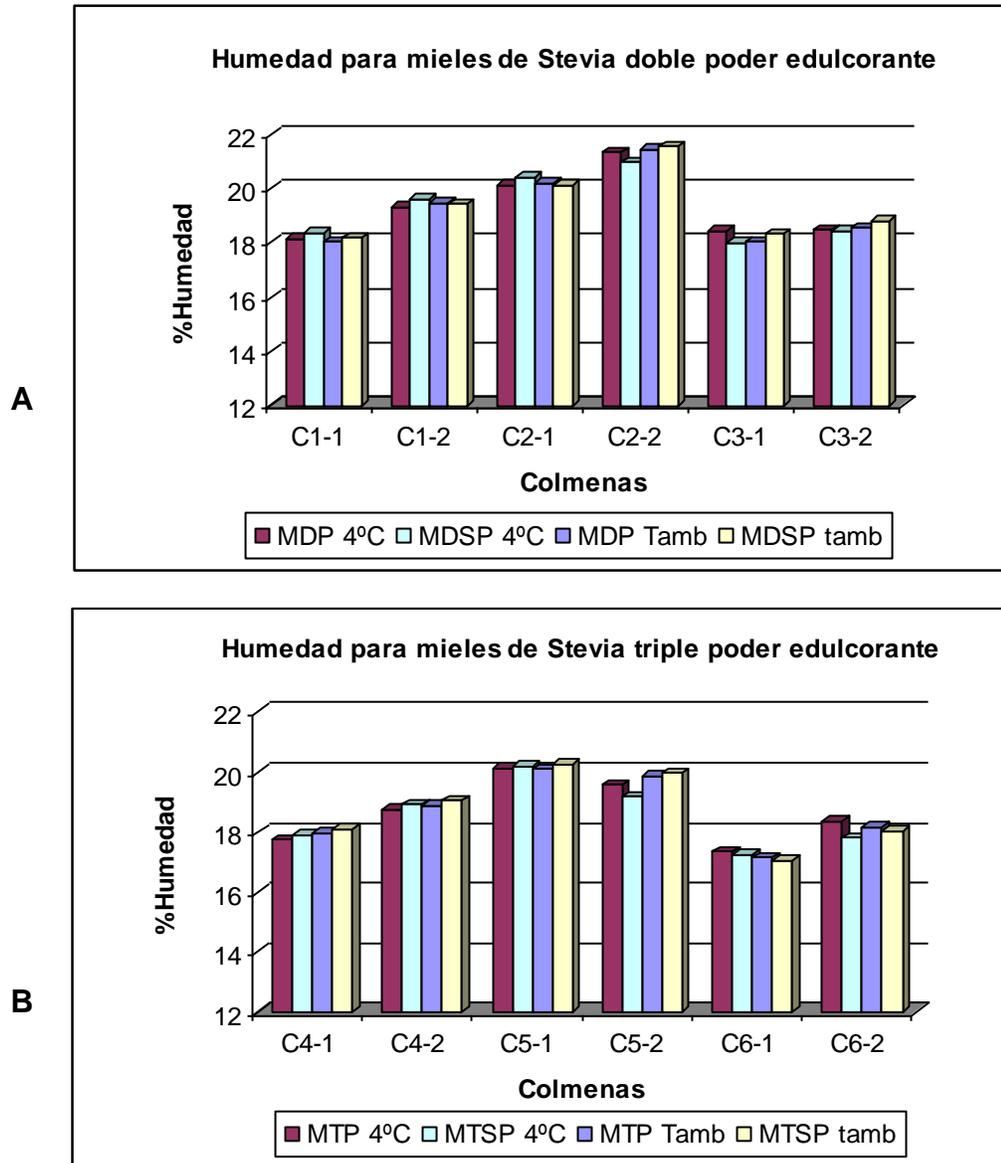
3.2.2 Determinación de parámetros de calidad. Como se observa en la Figura 8 (sección 2.3), las doce muestras de miel de *Stevia* fueron sometidas a dos condiciones (pasteurización y no pasteurización) y cada una de éstas se almacenó a dos temperaturas diferentes (4 °C y Temperatura ambiente), esto con el fin de evaluar el efecto de las anteriores condiciones sobre los parámetros de calidad.

El contenido de humedad en mieles, hace referencia al contenido de agua de la miel como el resultado final de la deshidratación activa, por parte de las abejas. La humedad en las mieles es utilizada como un indicador de la madurez y de la capacidad de permanecer estable durante el almacenamiento.

Se puede apreciar de las tablas 9 y 10 y de la Figura 12, que los valores obtenidos del porcentaje de humedad para las mieles sometidas a las dos condiciones y almacenadas a 4 °C y a temperatura ambiente, no son significativamente diferentes ($t < 2.31$) (Tablas 28 y 29, Anexo A). Las mieles presentaron un contenido de humedad del 17-20%, valores que se encuentran dentro de lo establecido por la NTC que es del 20%, (Tabla 11), ya que se tuvo la precaución de cosecharlas cuando los marcos estaban en un alto porcentaje de operculación; sin embargo, los porcentajes de humedad para las mieles de la colmena 2 y 5 sobrepasan el nivel permitido por la norma. Esto se puede explicar considerando que las fechas en que se recolectaron las mieles de estas colmenas eran de alta precipitación (lluvia constante) (noviembre 28/05), encontrándose una mayor humedad relativa en el ambiente, que hizo que la miel por su elevada higroscopicidad capturara agua; es por ello que estas mieles presentan alto porcentaje de humedad.

Por lo anterior, se considera que el contenido de agua es una de las características más importantes que influye en la viscosidad, en el sabor, y condiciona por ello la conservación, la palatabilidad, la solubilidad y, en definitiva el valor comercial.

Figura 12. Efecto de los diferentes condiciones de almacenamiento realizadas en las mieles de *Stevia*. A) doble poder edulcorante, B) triple poder edulcorante sobre el % humedad.

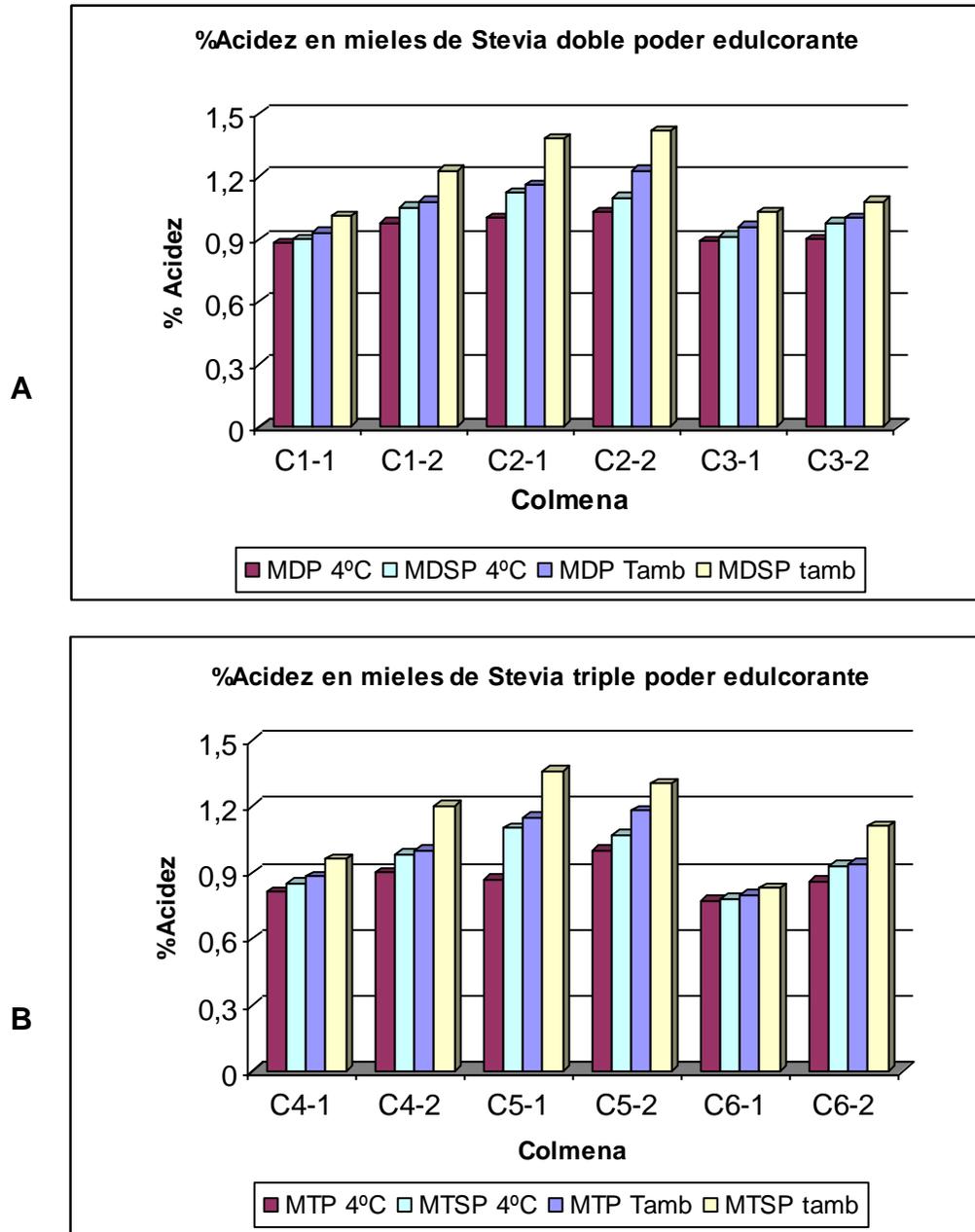


Con respecto al porcentaje de acidez, en las tablas 9 y 10 y en la figura 13, se observa que las condiciones de almacenamiento a las que fueron sometidas las mieles influyeron de forma significativa sobre este parámetro ($t > 2.31$) (Tablas 30 y 31, Anexo A); se encontró un mayor porcentaje de acidez para las muestras de miel sin pasteurizar almacenadas a temperatura ambiente, como resultado de la mayor actividad enzimática presente en las mieles; el menor porcentaje de acidez correspondió a las mieles pasteurizadas almacenadas a 4°C puesto que el proceso de pasteurización evita posibles fermentaciones y a bajas temperaturas la actividad enzimática es mínima; sin embargo, el porcentaje promedio para la acidez encontrado para todas las condiciones de almacenamiento, se encuentran dentro del rango establecido por la NTC que es de 4 meq/100g (Tabla 11).

Para la colmena seis en la primera alimentación sucedió algo particular al no encontrarse diferencia significativa cuando las mieles fueron sometidas a los diferentes condiciones de almacenamiento, lo que puede ser atribuido a la buena maduración encontrada en la miel (% humedad 17,34), que corresponde, según STEFAN BOGDANOV⁴⁴, a un valor adecuado para una óptima maduración, con lo que se retarda la fermentación, puesto que el contenido en levaduras es bajo.

Se observa en general, una relación lineal entre el porcentaje de humedad y la acidez, puesto que las muestras que presentaron alto contenido de humedad (poca maduración), presentaron alta acidez, teniendo en cuenta que la baja maduración en la miel indica poca inversión de los azúcares y un alto contenido de glucosa que es convertida a través de la D-glucosa-oxidasa (de la abeja), en ácido glucónico que es el principal ácido orgánico encontrado en la miel y que es el responsable del incremento de la acidez.

Figura 13. Efecto de los diferentes condiciones de almacenamiento realizadas en las mieles de *Stevia*. A) doble poder edulcorante, B) triple poder edulcorante sobre el % acidez.



Otro parámetro de evaluación fue el contenido de azúcares reductores, es decir el contenido de azúcares simples (fructosa, glucosa); en las tablas 9 y 10 se observa que las mieles provenientes de las colmenas 2 y 5 (alimentaciones 1 y 2) no se encuentran dentro de los requisitos exigidos por la NTC (mínimo 65%), las cuales presentan porcentajes de azúcares reductores entre el 53 al 64%, como resultado de la baja maduración de la miel (alto % de humedad); a diferencia de las muestras que no se pasteurizaron y que fueron almacenadas a temperatura ambiente, las cuales presentaron porcentajes de azúcares reductores del 75-78%, puesto que bajo estas condiciones se producen transformaciones mucho más rápidas favorecidas por la mayor actividad enzimática, haciendo que mucho azúcares se hidrolicen. Las muestras de miel provenientes de las colmenas restantes, presentan porcentajes de azúcares reductores superiores al 70%. Los porcentajes de azúcares reductores se ven afectados al igual que para el porcentaje de acidez por las diferentes condiciones de almacenamiento.

La determinación de hidroximetilfurfural (HMF) e índice de diastasas se realizó de forma cualitativa; como se puede observar en las tablas 9 y 10. Se obtuvo una prueba negativa de HMF para todas las muestras de miel almacenadas a las diferentes condiciones, indicando un buen proceso de pasteurización, puesto que el HMF se forma cuando las mieles han sufrido un calentamiento excesivo, ya que los productos azucarados son muy sensibles al calor y pueden deteriorarse durante el almacenamiento; la prueba cualitativa para índice de diastasas dió positiva; estos son parámetros importantes de calidad, son indicadores de la frescura y del tratamiento calórico al que ha sido sometida la miel⁴⁵ porque no debe existir hidroximetilfurfural (HMF) en las mieles frescas.

3.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE STEVIÓSIDO Y REBAUDIOSIDO A POR HPLC.

Para la estandarización del método de cuantificación por HPLC, primero se establecieron las condiciones de trabajo óptimas para lograr una metodología adecuada en la identificación de los esteviósidos en la miel.

3.3.1 Selección de la columna. Las columnas ensayadas fueron: Hypersil ODS C₁₈ (250mm x 4 mm x 5 µm) y Analítica Agilent Zorbax NH₂ (250 x 4,6 mm x 5µm). La Figura 14 muestra la máxima separación de los picos de steviósido y rebaudiósido A conseguida con la columna Hypersil ODS C₁₈, donde se presentó una baja resolución con solapamiento de los picos que no fue posible separar luego de numerosos ensayos con variaciones en la composición de fase móvil para modo isocrático y en gradiente; por lo tanto, se escogió la columna analítica Agilent Zorbax -NH₂, con la que fue posible mejorar la resolución de los picos de steviósido y rebaudiósido A luego de muchos ensayos en la composición de la fase móvil; el cromatograma se muestra en la Figura 15. Esta columna resultó ser apta para el análisis de steviósido y rebaudiósido A, debido a que presenta afinidad por el compuesto con la fase estacionaria de la columna, lo cual hace que el steviósido y el rebaudiósido A sean retenidos en forma efectiva. Además, KOLB N HERRERA J.E.⁴¹ y ANTONIO S. DACOME²⁹, reportan que se han obtenido excelentes resultados en la separación de estos compuestos empleando una columna amino.

Figura 14. Cromatograma del extracto de *Stevia*. Columna Hypersil ODS C₁₈ (250mm x 4 mm x 5 μm), fase móvil: ACN-H₂O (30:70)

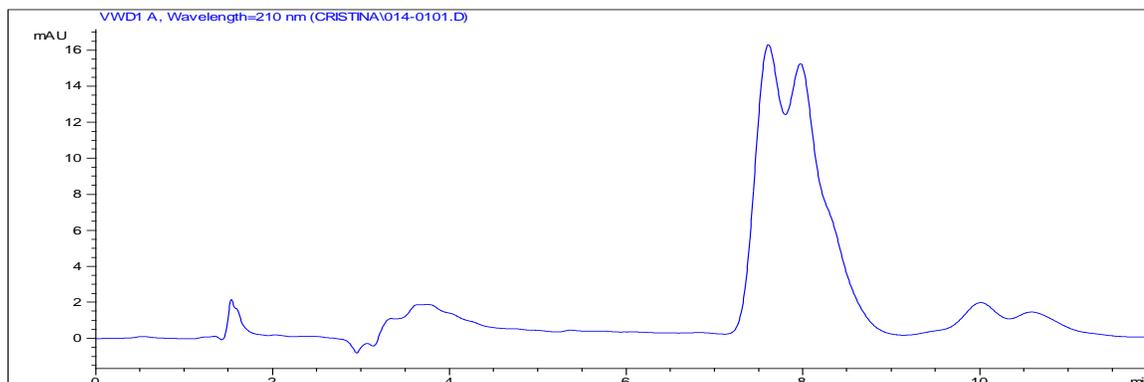
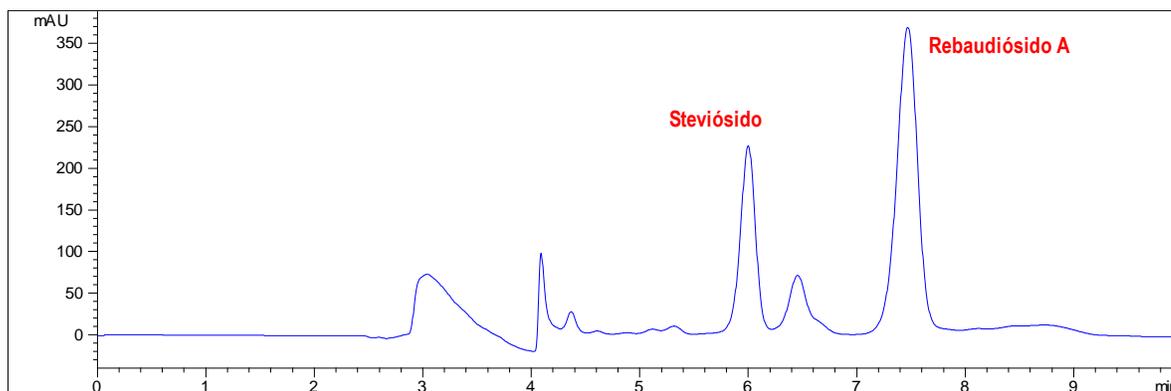


Figura 15. Cromatograma del extracto de *Stevia*. Analítica Agilent Zorbax NH₂ (250 x 4,6 mm x 5μm), fase móvil: ACN-H₂O (70:30)

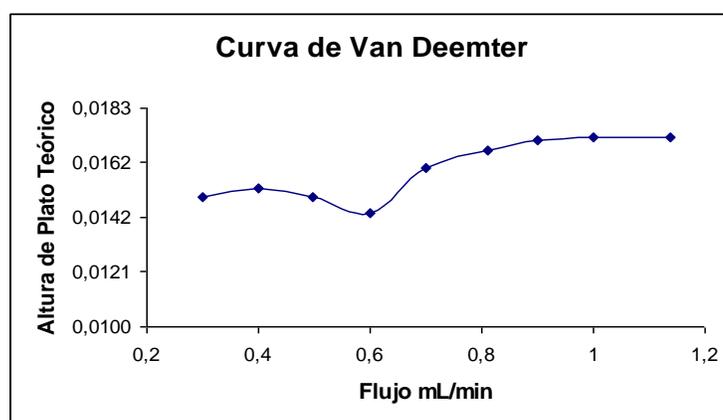


3.3.2 Determinación del flujo óptimo. Para seleccionar el flujo de la fase móvil adecuado, se realizó la curva de Van Deemter con los datos reportados en la Tabla 12. Se graficó el flujo en mL /min vs HEPT en cm como se observa en la Figura 16.

Tabla 12. Parámetros para la curva de van Deemter

Flujo (mL/min)	AETP (cm)
0,3	0,0149
0,4	0,0153
0,5	0,0149
0,6	0,0143
0,7	0,0161
0,8	0,0167
0,9	0,0171
1.0	0,0172
1.1	0,0172

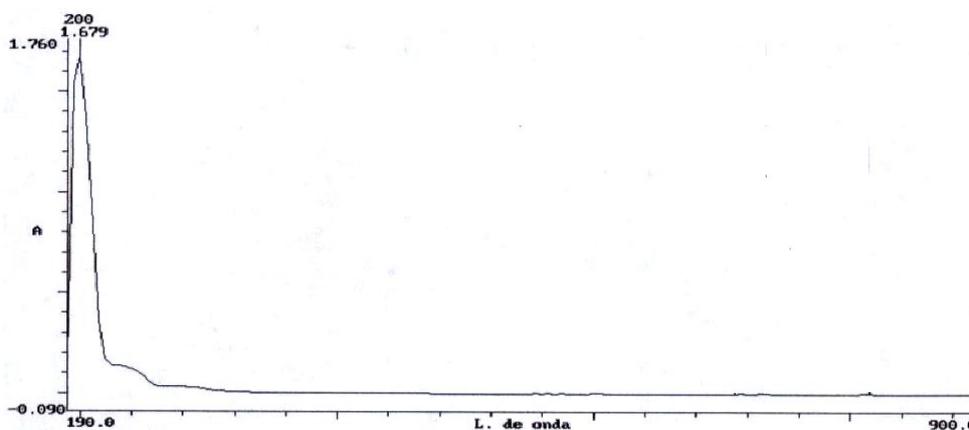
Figura 16. Curva de van Deemter para determinar el flujo óptimo



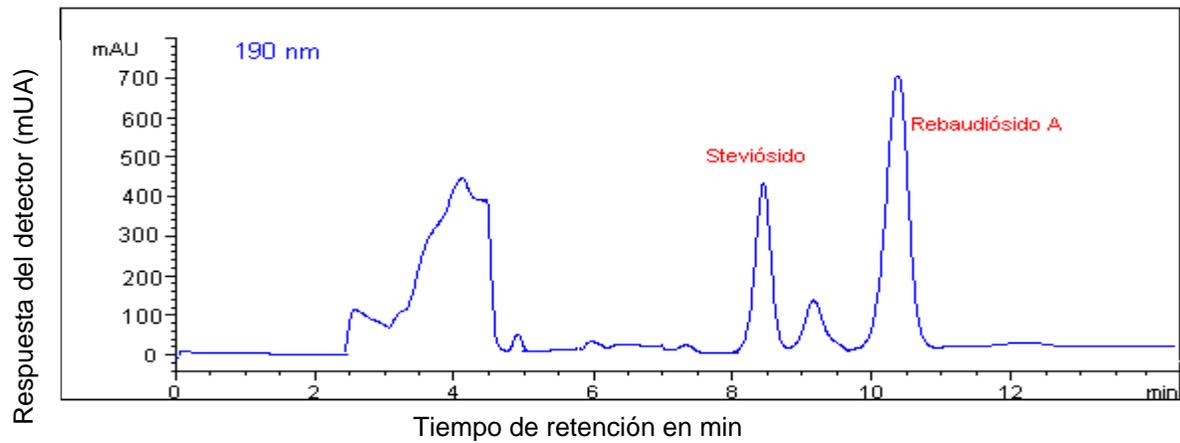
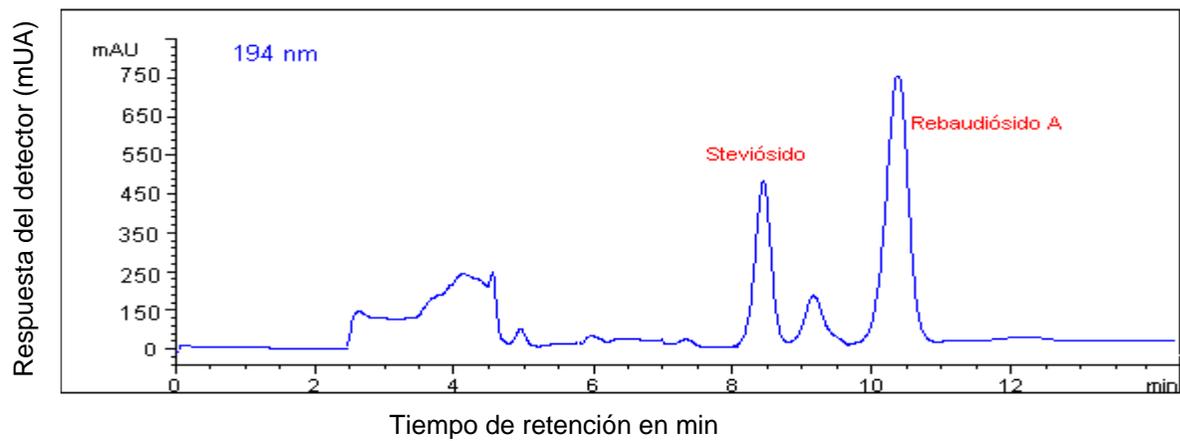
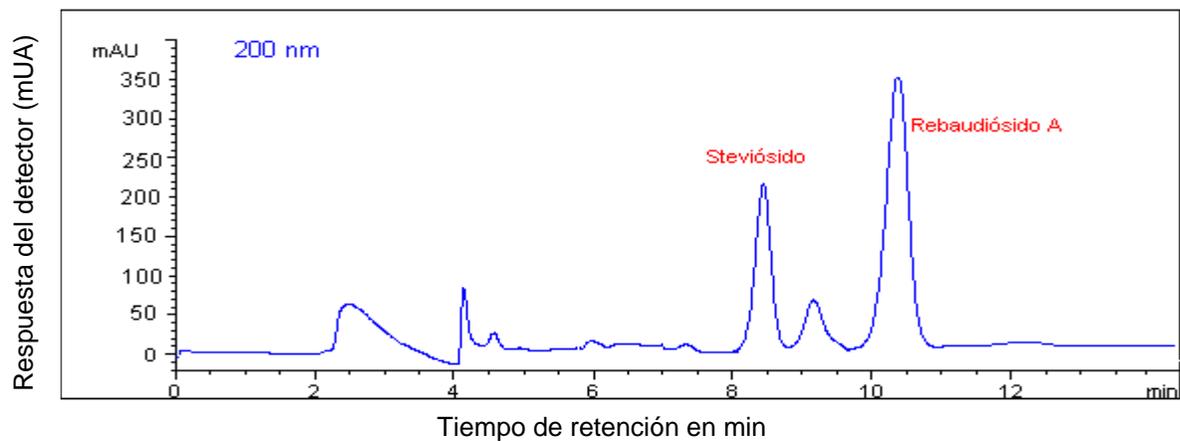
De dicha grafica se puede observar que el flujo de trabajo se encuentra en 0.6 mL/min, donde la curva presentó la menor altura equivalente del plato teórico (0,0143 cm), generando así un aumento de número de platos teóricos que es el ideal a la hora de determinar el flujo para la columna escogida (Analítica Agilent Zorbax NH₂ 250 x 4,6 mm y 5µm de tamaño de partícula).

3.3.3 Selección de la longitud de onda de trabajo. Con el fin de obtener una buena intensidad de señal con el detector UV, se realizaron inyecciones del extracto de *Stevia* a diferentes longitudes de onda desde 190 a 210 nm, puesto que los esteviósidos presentan su máximo de absorción en una baja longitud de onda, como lo confirma el espectro ultravioleta de la Figura 17.

Figura 17. Espectro UV-Vis para el extracto de *Stevia*



Las figuras 18, 19 y 20 muestran las señales cromatográficas de los esteviósidos a longitudes de onda de 190, 194 y 200 nm. Se puede observar que todos estos cromatogramas presentan picos bien resueltos y bien definidos.

Figura 18. Cromatograma del extracto de *Stevia* a una $\lambda=190$ nm**Figura 19.** Cromatograma extracto de *Stevia* a una $\lambda=194$ nm**Figura 20.** Cromatograma extracto de *Stevia* a una $\lambda=200$ nm

Si se realiza la comparación de áreas, puesto que estas son al igual que la altura de los picos, un parámetro analítico adecuado para analizar cromatogramas⁴⁵, se observa que los picos de steviósido y rebaudiósido A a 194 nm presentan mayores áreas 6186.6 y 13635, en comparación con las longitudes de onda de 200 nm que muestran áreas menores 2927.1 y 5656.4, y la longitud de onda de 190 nm 5575.7 y 11973.2, demostrándose así con esta comparación, que los esteviósidos presentan el máximo de absorción a 194 nm y que esta longitud de onda resultó ser óptima para el análisis de esteviósidos, ya que se obtuvieron bajos límites de detección y cuantificación.

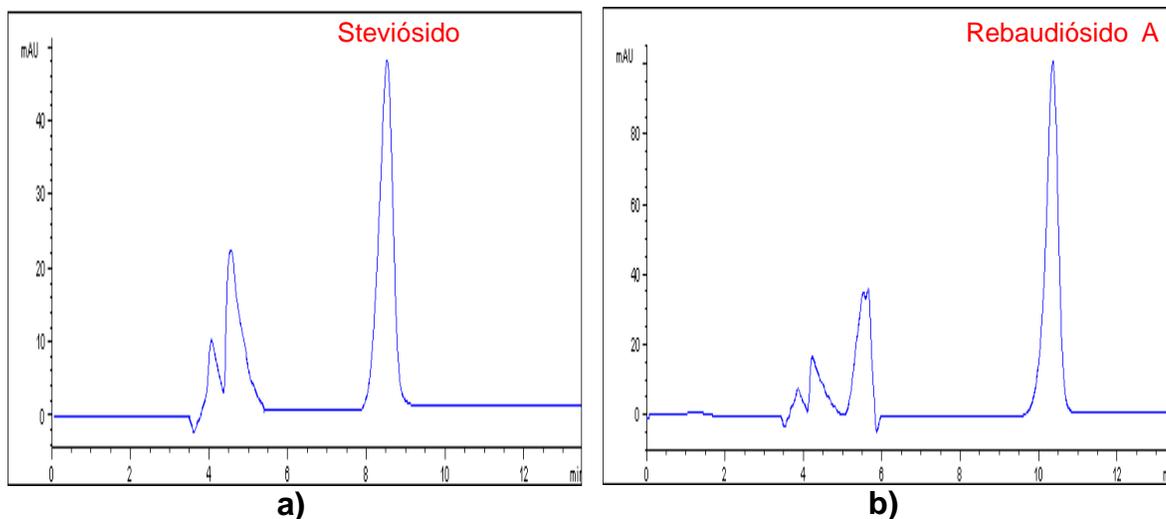
3.3.4 Condiciones cromatográficas óptimas. En la tabla 13 se reportan las mejores condiciones para el análisis de steviósido y rebaudiósido A en miel de *Stevia* por cromatografía líquida de alta resolución.

Tabla 13. Establecimiento de las condiciones empleadas en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Parámetro	Características
Detección	λ : 194nm
Elusión	Isocrática
Flujo	0.6 mL/min
Columna	Analítica Agilent Zorbax NH ₂ (250 x 4,6 mm x 5 μ m)
Fase Móvil	ACN:H ₂ O (70:30)
Tiempo de retención	Steviósido: 8.5 min. - Rebaudiosido A: 10.3 min.

En la Figura 21 se muestra los cromatogramas del patrón de steviósido y rebaudiósido A, obtenido bajo las condiciones óptimas determinadas.

Figura 21. Cromatogramas de los patrones de: a) steviósido y b) rebaudiósido A, bajo las condiciones resumidas en el tabla 13.



3.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La estandarización del método cromatográfico permitió establecer los límites prácticos de la técnica y la metodología empleada, además de asegurar la precisión y exactitud de los datos obtenidos. Para tal efecto, se emplearon los enunciados y definiciones del anexo B.

3.4.1 Linealidad. Se realizó una curva para steviósido y rebaudiósido A en la que se graficó el área en función de la concentración de cada una de las soluciones estándar, donde el área bajo la curva es proporcional a la concentración. Las curvas se construyeron teniendo en cuenta los parámetros cromatográficos y experimentales especificados en la tabla 13 (sección 3.3.4 Condiciones cromatográficas óptimas).

Las curvas de cuantificación de steviósido y rebaudiósido A se encuentran en un rango de concentración entre 5 y 40 ppm para steviósido y 5 y 50 ppm para rebaudiósido A.

Figura 22. Curva de calibración para la determinación de steviósido en muestras de miel express de *Stevia*. Condiciones experimentales: Tabla 13.

Concentraciones y áreas: Tabla 14

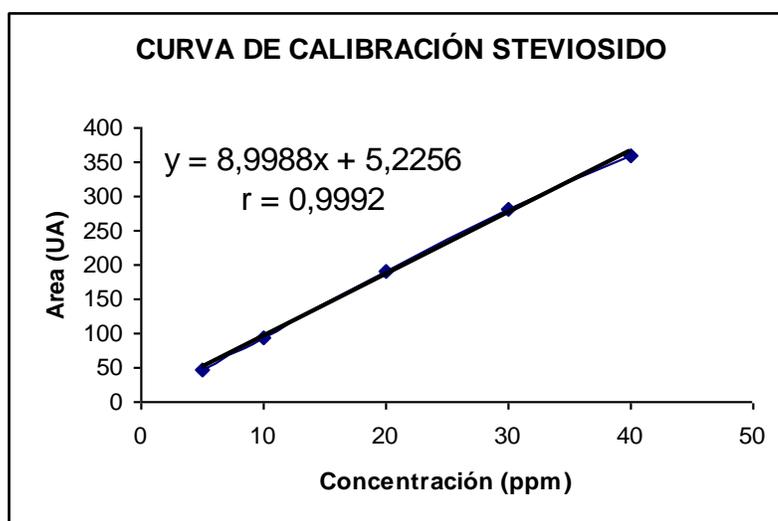


Tabla 14. Curva de calibración para la cuantificación de steviósido

Concentración (ppm)	5	10	20	30	40
Área Promedio (mUA)	48,4	92,3	189,4	281,9	359,0
Número de datos (n): 5					

Figura 23. Curva de calibración para la determinación de rebaudiósido A en muestras de miel express de *Stevia*. Condiciones experimentales: Tabla 13.

Concentraciones y áreas: Tabla 15

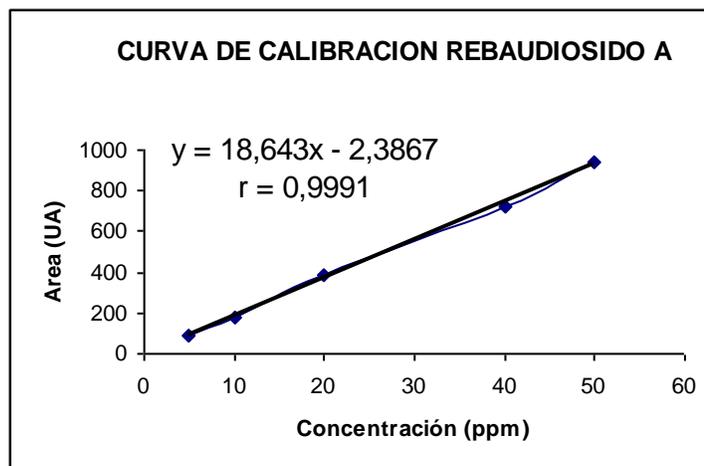


Tabla 15. Curva de calibración para la cuantificación de rebaudiósido A

Concentración (ppm)	5	10	20	40	50
Área Promedio (mUA)	91,4	181,3	381,2	719,5	945,0
Número de datos (n):	5				

De acuerdo a las curvas anteriores y a los coeficientes de correlación obtenidos (valores cercanos a 1), se demuestra la respuesta lineal que presenta el área registrada en el análisis cromatográfico con el rango de concentraciones trabajadas; Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal es el test estadístico, el cual se calculó siendo mayor en ambos casos al compararlo con el t tabulado para un 95 % de confianza y n-2 grados de libertad, indicando el rechazo de la hipótesis nula, que en este caso es la no correlación entre X e Y, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada (Tabla 16). Las medidas realizadas de las áreas de cada solución estándar se realizaron por triplicado con el fin de estandarizar el método.

Tabla 16. Test estadístico

Esteviosidos	t _{cal}	t _{tabla*}
Rebaudiosido	43.28	3.18
Steviósido	40.80	

* Para un 95% de confianza

3.4.2 Precisión

- **Repetitividad.** Para determinar la precisión del método se midió diez veces en forma consecutiva el área de dos soluciones estándar de steviósido y rebaudiósido A de 40 ppm y se calculó la desviación estándar relativa del área promedio, con el fin de evaluar la repetitividad.

Tabla 17. Repetitividad de un estándar de steviósido de 40 ppm

Número de medidas	Área (mUA)
1	352,21
2	360,74
3	355,89
4	359,85
5	357,69
6	356,85
7	351,52
8	367,25
9	363,25
10	360,08
Promedio	358,53
S	4,80
RSD (%)	1,34

Tabla 18. Repetitivad de un estándar de rebaudiósido A de 40 ppm

Número de medidas	Área (mUA)
1	717,78
2	718,56
3	717,06
4	716,34
5	721,56
6	720,05
7	717,36
8	718,82
9	718,19
10	721,71
Promedio	718,74
S	1,83
RSD (%)	0,25

De acuerdo a los resultados obtenidos en las tablas anteriores, se puede observar que los valores de RSD, bajo un parámetro de confianza del 95% son bajos, por lo que el método de cuantificación de steviósido y rebaudiósido A por HPLC presentó repetitividad.

- **Reproducibilidad.** Para determinar la reproducibilidad del método, se utilizaron dos soluciones estándar de steviósido y rebaudiósido A de diferente concentración. Las medidas fueron realizadas por triplicado durante treinta días, obteniéndose los datos que se muestran a continuación.

Tabla 19. Reproducibilidad de dos estándares de steviósido en un periodo de 30 días.

Concentración (ppm)	Día 1 (mUA)	Día 3 (mUA)	Día 7 (mUA)	Día 15 (mUA)	Día 30 (mUA)	Área promedio (mUA)	S	RSD (%)
10	91,68	92,25	91,58	91,84	92,61	91,99	0,38	0,41
40	358,63	357,85	359,47	359,12	357,86	358,59	0,65	0,17

Tabla 20. Reproducibilidad de dos estándares de rebaudiósido A en un periodo de 30 días.

Concentración (ppm)	Día1 (mUA)	Día3 (mUA)	Día 7 (mUA)	Día 15 (mUA)	Día 30 (mUA)	Área promedio (mUA)	S	RSD (%)
10	180,58	181,42	179,79	183,59	180,24	181,12	1,34	0,74
50	943,21	945,85	943,56	946,12	945,31	944,81	1,20	0,13

Las tablas anteriores indican que el método cromatográfico es reproducible, ya que la desviación estándar relativa (RSD) presenta valores menores del 1,5 %, los cuales son bajos⁴⁶, indicando que los datos obtenidos en el método de cuantificación de steviósido y rebaudiósido A es confiable.

3.4.3 Sensibilidad

- **Limite de detección (LD).** Para calcular el LD de steviósido y rebaudiósido A se construyeron dos curvas de calibración adicionales en un rango de concentraciones entre 1 a 5 ppm para steviósido y para rebaudiósido A, con el fin de evaluar la sensibilidad del instrumento y para calcular la mínima concentración detectada de steviósido y rebaudiósido A. Las Figuras 24 y 25 representan los resultados obtenidos, las ecuaciones empleadas se encuentran en el anexo B.

Figura 24. Curva de calibración para determinar LD y LC de steviosido en muestras de miel express de *Stevia*. Condiciones experimentales: Tabla 12. Concentraciones y áreas Tabla 21.

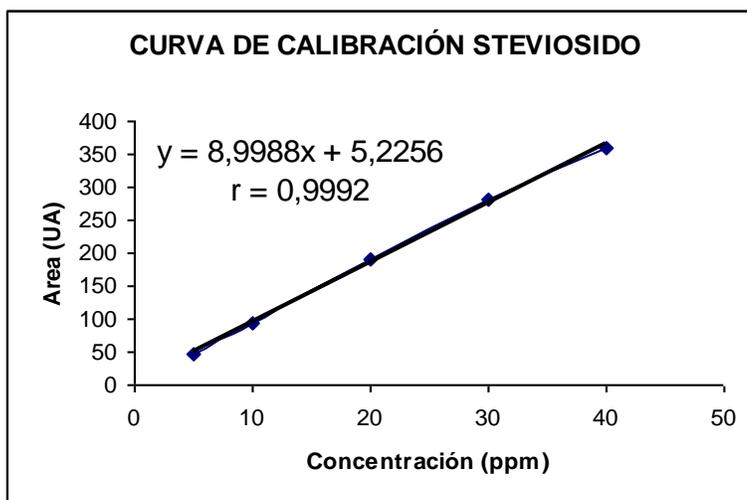


Tabla 21. Concentraciones del estándar de steviosido y sus respectivas áreas para calcular LD y LC

Concentración (ppm)	1	2	3	4	5
Área Promedio (mUA)	9,5	17,5	29,2	38,5	48,7
Número de datos (n): 5					

Figura 25. Curva de calibración para determinar LD y LC de rebaudiósido A en muestras de miel express de *Stevia*. Condiciones experimentales: Tabla 12.

Concentraciones y áreas: Tabla 20.

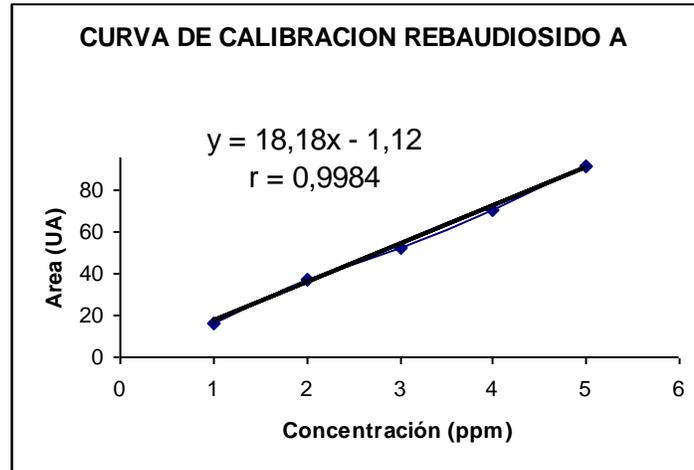


Tabla 22. Concentraciones del estándar de rebaudiósido A y sus respectivas áreas para calcular LD y LC.

Concentración (ppm)	1	2	3	4	5
Área Promedio (mUA)	16,5	37,3	52,3	69,9	91,1
Número de datos (n): 5					

Tabla 23. Límites de detección (LD) para steviósido y rebaudiósido A

Esteviósidos	Desviación estándar de la pendiente S_B	Intercepto Con eje y Y_B	Valor y	Límite de detección LD (ppm)
Steviósido	0,2788	-1,14	-0,3036	0,0841
Rebaudiósido A	0,5900	-1,12	0,6501	0,0944

Comparando el límite de detección obtenido (Tabla 23), se encontró que la metodología propuesta es sensible porque se encuentran niveles hasta de 0.08 ppm para determinar este tipo de compuestos por cromatografía líquida de alta resolución. A concentraciones más bajas, las señales obtenidas no eran lineales, por lo cual se descartaron para hacer más fácil la cuantificación de steviósido y rebaudiósido A.

Límite de cuantificación (LC). A partir de las mismas curvas de steviósido y rebaudiósido A utilizadas para calcular LD y las ecuaciones del anexo B, se procede a determinar el LC, obteniéndose los datos de la tabla 24.

Tabla 24. Límites de cuantificación (LC) para steviósido y rebaudiósido A

Esteviósidos	Desviación estándar de la pendiente S_B	Intercepto Con eje y Y_B	Valor y	Límite de cuantificación LC (ppm)
Steviósido	0,2788	1,14	1,6481	0,2805
Rebaudiósido A	0,5900	1,12	4,7803	0,3245

De acuerdo a los resultados obtenidos, el valor mínimo cuantificable es de 0,2805 ppm, para steviósido y 0,3245 para rebaudiósido A, lo cual indica que el detector UV es ideal, ya que tiene una buena sensibilidad para generar una señal mínima de estos compuestos. A concentraciones inferiores, los valores de desviación estándar son superiores y no se da un coeficiente de correlación aceptable, afectando así, la linealidad de la curva.

3.4.4 Exactitud. Con el fin de establecer la exactitud del método analítico, se realizó el test student con base en los datos obtenidos en las curvas de calibración de steviósido y rebaudiósido A.

Tabla 25. t student y porcentajes de recuperación de estándares de steviósido

Concentración (ppm)	Recuperación porcentual (R)			R promedio	S	RSD
5	99.47	99.33	96.64	98.48	1.59	1.61
10	95.57	96.70	96.76	96.34	0.67	0.70
20	100.97	102.38	103.64	102.33	1.36	1.33
30	102.11	102.86	102.49	102.49	0.38	0.37
40	97.90	98.56	98.39	98.28	0.34	0.35
Promedio =				99.58	0.87	0.87
						t_{cal} = 1.87

* t_{tab} = 2.14 para 95%

Tabla 26. t student y porcentajes de recuperación de estándares de rebaudiósido A

Concentración (ppm)	Recuperación porcentual (R)			R promedio	S	RSD
5	99.61	98.43	93.22	97.09	3.40	0.21
10	98.40	92.61	95.50	95.50	2.89	0.10
20	102.75	103.30	101.55	102.53	0.89	0.63
40	96.68	97.00	95.72	96.47	0.67	0.17
50	108.50	103.76	99.64	103.97	4.43	0.60
Promedio =				99.11	2.46	2.48
						t_{obt} = 1.44

t_{tab} = 2.78 para 95%

La recuperación porcentual (R) promedio se da como resultado de cada concentración, teniendo en cuenta que cada una fue leída por triplicado, obteniéndose tres resultados que son promediados para dar la concentración obtenida por curva. De esta manera, el número de datos es 5 para steviósido y rebaudiósido A, los grados de libertad son 4 para un 95 % de confianza. Cabe

aclarar que R corresponde a la relación de la concentración del estándar preparado.

Para que la exactitud exista, es necesario que t_{cal} sea menor que t_{tab} , parámetro que se cumple para steviósido y rebaudiósido A, verificándose de esta manera la exactitud del sistema.

3.4.5 Preparación de la muestra. Según los reportes bibliográficos^{39,40,47,48,49, 50}, no existe una miel en la que se hayan incorporado los principios activos de la *Stevia*; es por ello, que para lograr extraer los esteviósidos de la miel se realizaron una gran cantidad de ensayos basados en la extracción de diferentes analitos (pesticidas y antibióticos) encontrados en la miel, con el fin de escoger una metodología con la que se pudiera minimizar el contenido de interferencias en la matriz; sin embargo, los procedimientos ensayados no arrojaron resultados satisfactorios, ya que luego de las extracciones los residuos quedaban amarillos y viscosos, indicando que las extracciones no habían purificado lo suficiente; esto es razonable, teniendo en cuenta que en la composición de la miel, el mayor porcentaje (90%), es de los monosacáridos glucosa y fructosa que tienen una polaridad similar a los compuestos de interés (esteviósidos).

Otro de las razones por las cuales no se empleó el método de extracción reportado en la sección (2.3.4) fue debido a que uno de los picos de interés (steviósido) después de la extracción, presentó una asimetría anterior, lo que no permitió realizar una cuantificación confiable de este compuesto, como se observa en la Figura 26; a diferencia de la Figura 27, donde se muestran los dos picos de interés bien definidos que corresponde a una de las muestras de miel de *Stevia* sin extracción.

Figura 26. Cromatograma de una muestra de miel de *Stevia* después de la extracción

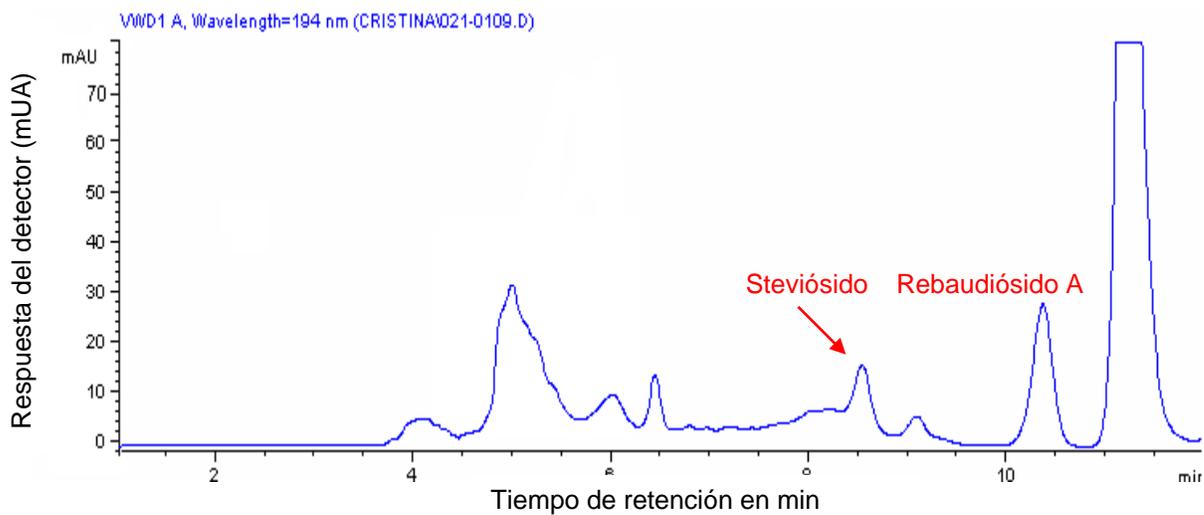
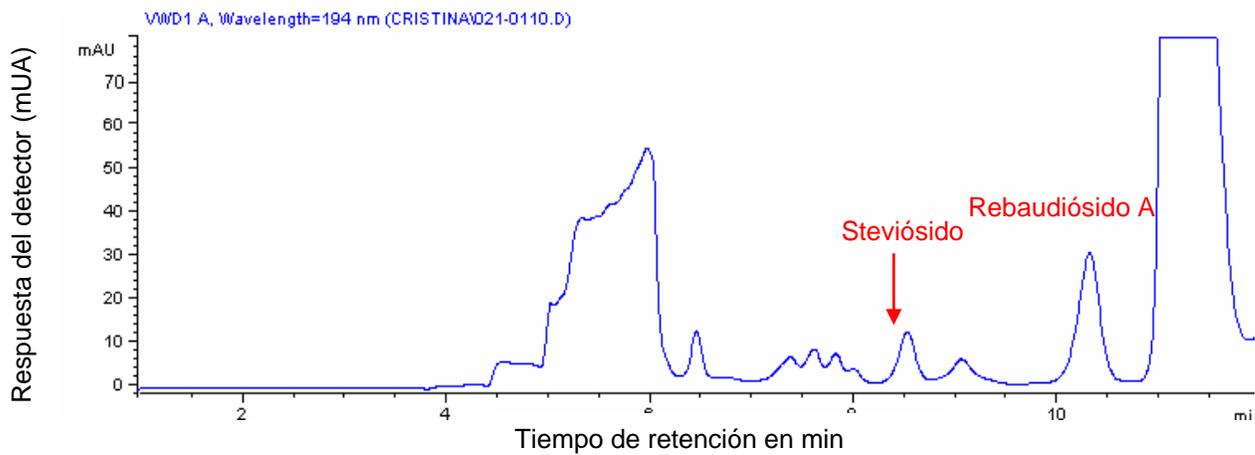


Figura 27. Cromatograma de una muestra de miel de *Stevia* sin extracción



Al inyectar en el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución el blanco (miel natural), directamente sin extraer, Figura 28, se observan dos picos de gran intensidad a tiempos de retención de 10,9 y 11,9 minutos, los cuales no interfieren con los tiempos de retención de los picos de interés que son de 8,5 y 10,3 minutos; por ello, se decidió inyectar las muestras de miel sin realizar previa extracción, considerando que no se iba a alterar la vida de la columna, puesto que uno de los principales usos de ésta es para la determinación de carbohidratos; igualmente, porque la estabilización de la línea base es muy rápida, indicando la fácil eliminación de estos compuestos de la columna. Al realizar un análisis en el UV-Vis para la muestra de miel (Figura 29), se observó que sólo había un máximo de absorción a (200 nm), al igual que en los esteviósidos, lo que garantizaba que la columna queda limpia al estabilizar la línea base a la longitud de onda de trabajo.

En la Figura 30 se muestra el cromatograma para los patrones de fructosa, glucosa y sacarosa, bajo las condiciones resumidas en el tabla 13.

Las muestras fueron filtradas con filtros de 0,45µm de poro, para eliminar impurezas. Con el fin de comprobar la efectividad de la técnica establecida, cada muestra se inyectó por triplicado en el cromatógrafo líquido.

Figura 28. Cromatograma para el blanco (miel natural) bajo las condiciones de la tabla 13.

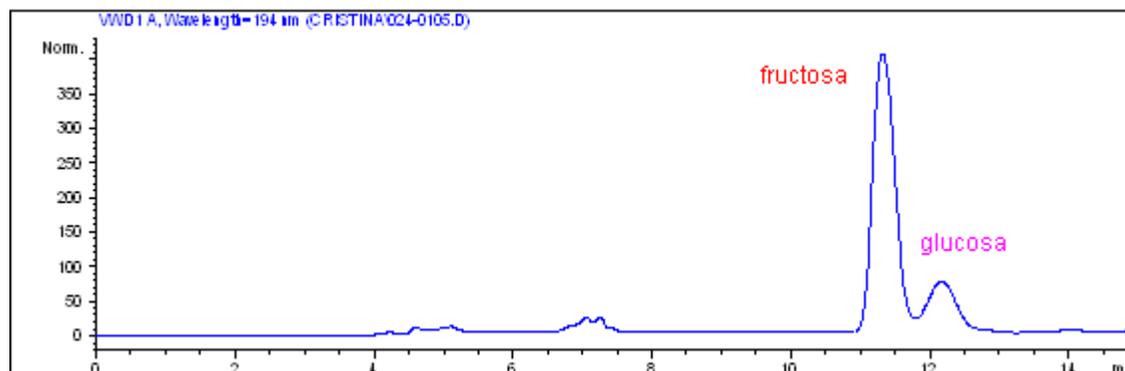


Figura 29. Espectro UV-Vis para el blanco (miel natural)

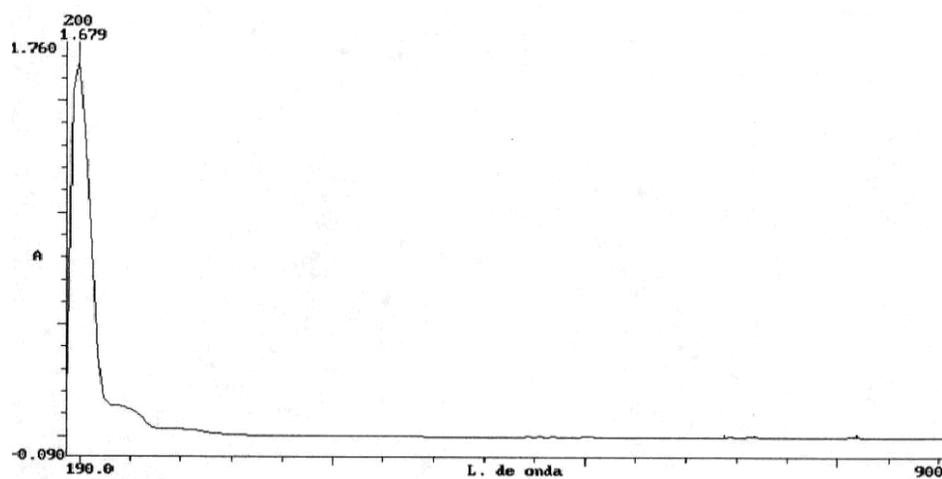
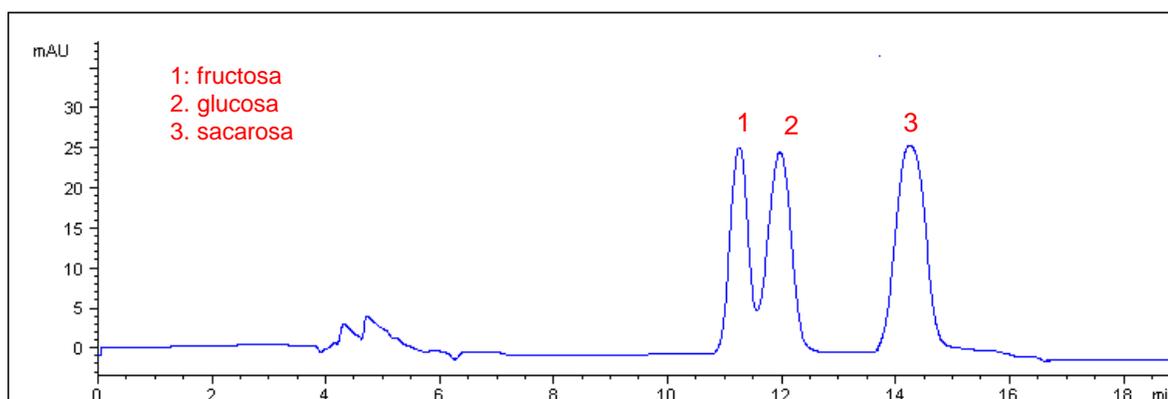


Figura 30. Cromatograma de los patrones de fructosa, glucosa y sacarosa.



3.4.6 Estimación de la concentración por HPLC de steviósido y rebaudiósido

A en muestras de miel de *Stevia*. De acuerdo a los parámetros ya establecidos por curva de calibración (pendiente e intercepto) de steviósido y rebaudiósido A, se determinó la concentración de steviósido y rebaudiósido A relacionando el área bajo la curva con las ecuaciones lineales obtenidas en cada una de las curvas de calibración.

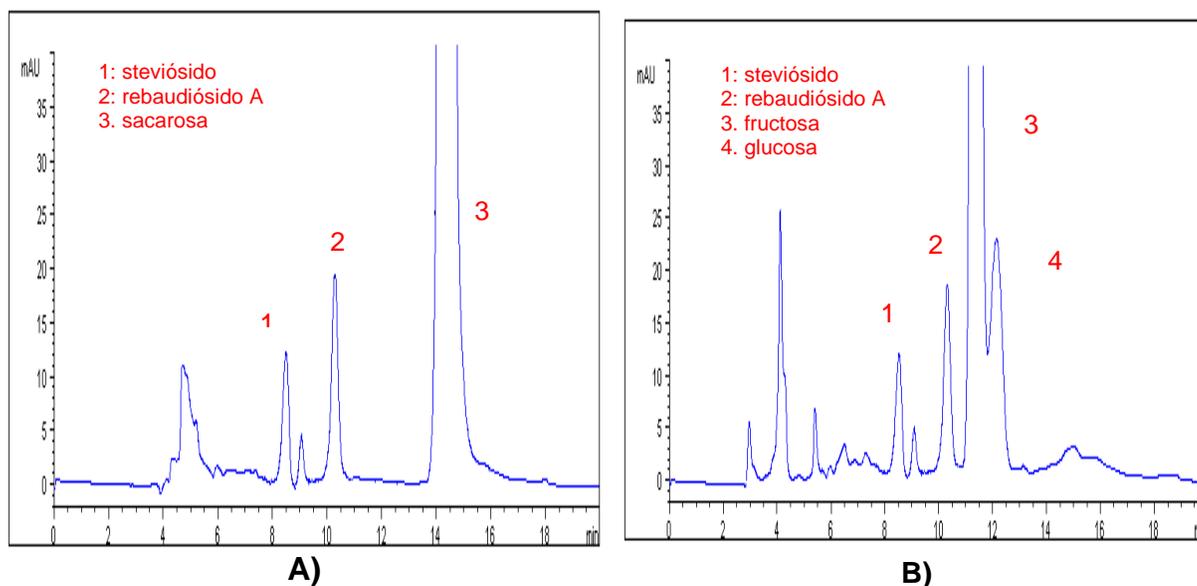
Los valores obtenidos de steviósido y rebaudiósido A para las muestras de jarabe y para la miel de *Stevia* con doble y triple poder, están relacionados en la Tabla 27. En la Figuras 31 se muestran los cromatogramas para: a) una muestra de jarabe y b) una muestra de miel de *Stevia*.

Tabla 27. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrado en muestras de miel de *Stevia* con doble y triple poder edulcorante

Colmena	Alimentación	Concentración	Jarabe		Miel de <i>Stevia</i> *		% Incorporación Steviósido	% Incorporación Rebaudiósido A
			Concentración Steviósido mg/g muestra	Concentración Rebaudiósido A mg/g muestra	Concentración Steviósido mg/g muestra	Concentración Rebaudiósido A mg/g muestra		
1	1	Doble poder edulcorante	1,44	3,12	1,41	3,06	97,91	97,44
	2		1,42	3,14	1,40	3,00	98,59	96,54
2	1		1,39	3,07	1,35	3,05	97,12	99,35
	2		1,40	3,13	1,38	3,07	98,57	98,08
3	1		1,31	3,18	1,29	3,14	98,47	98,74
	2		1,39	3,20	1,35	3,17	97,12	99,09
4	1	Triple poder edulcorante	2,87	6,11	2,79	5,90	97,21	96,56
	2		2,88	5,85	2,82	5,67	97,92	96,92
5	1		2,77	6,08	2,72	5,90	98,19	97,04
	2		2,83	6,13	2,75	5,99	99,28	97,72
6	1		2,62	6,00	2,57	5,78	98,09	96,80
	2		2,86	6,16	2,78	5,89	97,20	97,62

*Miel de *Stevia* pasteurizada almacenada a T amb.

Figura 31. Cromatogramas bajo las condiciones de la tabla 13: A) muestra de jarabe B) muestra de miel de *Stevia*



La Tabla 27 muestra que las mieles de *Stevia* con doble poder edulcorante contienen alrededor de 0,97 a 1,1 mg/g muestra de steviósido y de 3 a 3,2 mg/g de muestra de rebaudiósido A; las mieles de *Stevia* con triple poder edulcorante contienen alrededor del 2,6 a 2,8 mg/g muestra de steviósido y 5,7 a 6 mg/g muestra de rebaudiósido A. Con respecto a estos datos, se puede concluir que al incrementar la concentración del extracto de *Stevia* en los jarabes suministrados, se incrementa el porcentaje de incorporación en la miel obtenida, con lo que se puede determinar que las abejas asimilaron estos compuestos de forma apropiada además de considerar que los porcentajes de incorporación son superiores al 97% para steviósido y por encima del 96% para rebaudiósido A.

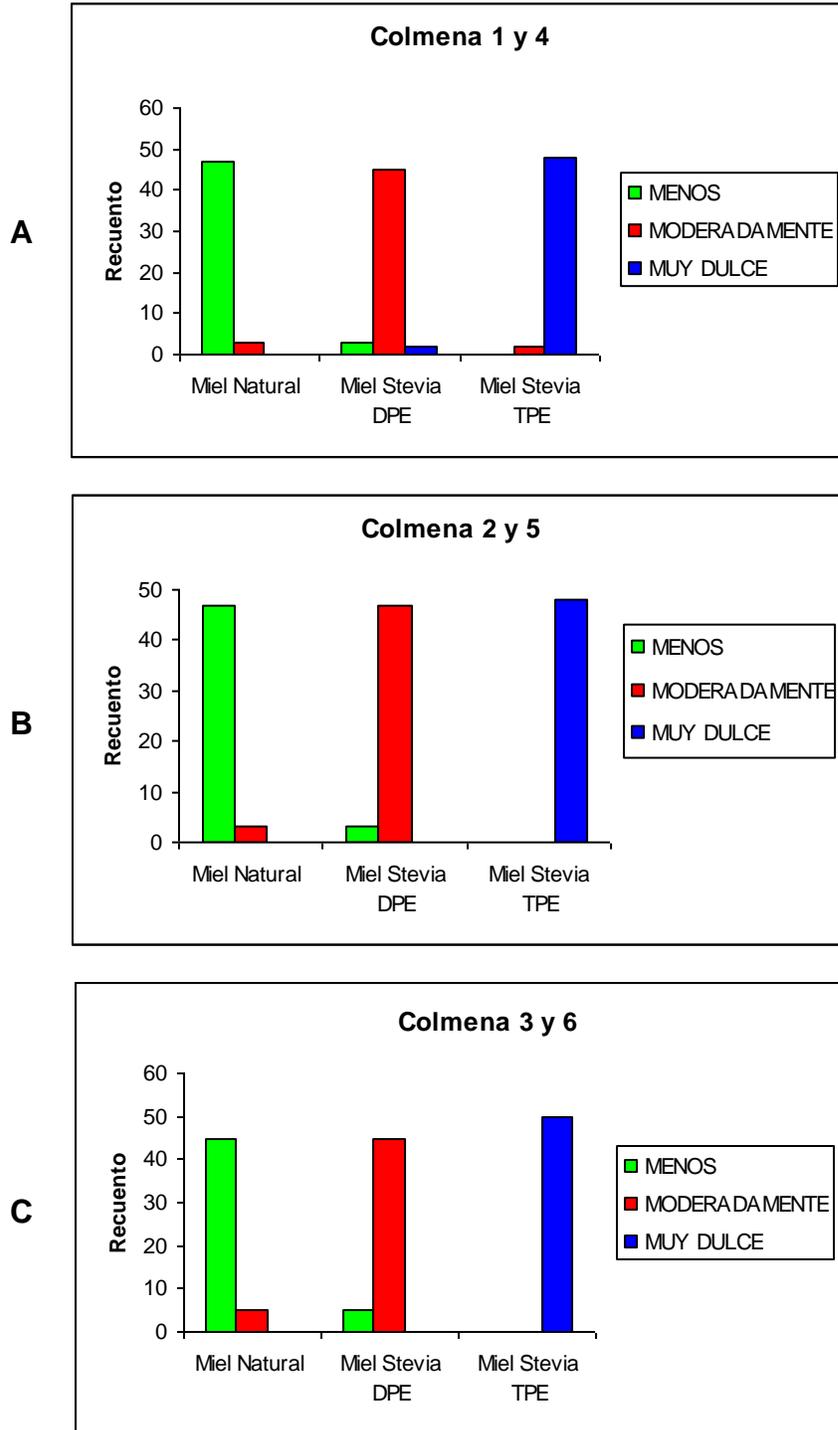
3.5 EVALUACIÓN SENSORIAL.

La evaluación sensorial se realizó con el fin de comprobar organolépticamente el mayor poder edulcorante de las mieles de *Stevia* con respecto a una miel natural (blanco).

Se empleó la prueba de diferencia y el test de ordenación; en donde cada consumidor debía colocar los códigos de las muestra de miel degustadas en las fichas entregadas y clasificarlas como: menos dulce, moderadamente dulce y muy dulce.

Para el análisis de los resultados se empleó la estadística de ANOVA, con la prueba de Chi cuadrado. En la Figura 32 se muestra que los consumidores eligieron la miel de *Stevia* triple poder edulcorante como la más dulce, seguida por la miel doble y finalmente eligieron la miel natural como la menos dulce, que era lo que se esperaba, ya habiendo corroborado por HPLC la presencia de los esteviósidos en miel. No se encontraron diferencias en los resultados para las muestras provenientes de las seis colmenas evaluadas; sin embargo, algunos eligieron la miel doble poder edulcorante como la menos dulce; este resultado puede ser debido a que al evaluar tantas muestras, pudo generar confusión en los evaluados, además que la miel doble presenta una dulzura intermedia entre la miel triple poder edulcorante y la miel natural; finalmente, se observó una asociación significativa entre la respuesta y la concentración de *Stevia* en la miel. Este tipo de alimentación brinda beneficios a los apicultores al generar un valor agregado en la miel, permitiéndoles ampliar el mercado para este sector además de ser una nueva alternativa de alimentación especialmente en época de invierno, debido a que la floración en estos períodos es escasa, causando una disminución en la producción de miel y conllevando muchas veces a la despoblación de las colmenas.

Figura 32. Resultados de la prueba sensorial para una miel natural y las mieles de *Stevia* provenientes de las seis colmenas



En esta investigación se logró incorporar de forma natural en la miel los principios activos de la *Stevia*, lo que se confirmó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y mediante el panel de catación; este tipo de miel a partir de *Stevia* se constituye como una alternativa productiva para los apicultores de la región, teniendo en cuenta que este es un nuevo producto que combina las bondades ya existentes en la miel con las que aporta la *Stevia*, dentro de las cuales se destaca el alto poder edulcorante, facilitando para el consumidor final el uso de ella en bajas cantidades. Pero no solamente el mercado se restringe a su uso como edulcorante, sino también con el consumo por parte de personas que puedan presentar problemas de salud asociados con la ingesta de azúcares.

Un aspecto relevante de este trabajo está estrechamente relacionado con los procesos productivos, ya que el empleo de este tipo de jarabes para la alimentación de las colmenas en los periodos invernales prolongados, facilita el abastecimiento de ciertos nutrientes para el desarrollo de éstas, garantizándose de cierta forma la productividad en los apiarios.

Igualmente ésta investigación, abre el camino hacia el desarrollo de la miel express como vehículo para la incorporación de compuestos con actividad biológica que permitan expandir su uso hacia el sector farmacéutico.

4. CONCLUSIONES

- Las dos relaciones de jarabe doble y triple poder edulcorante estudiadas para la elaboración de miel express, produjeron resultados satisfactorios, esto se evidenció por el rápido consumo del alimento, la abundante oviposición de la reina y la sanidad de las colmenas. No se observó fermentación o algún tipo de deterioro en el sustrato alimenticio.
- Se determinaron las formulaciones más adecuadas para la correcta alimentación de las colmenas y de este modo se obtuvieron mieles de buena calidad. La calidad de estas mieles está ubicada dentro de los parámetros establecidos por la Norma Técnica Colombiana NTC 1273, exigidos para las mieles naturales, esto sin lugar a dudas representa un punto a favor en la búsqueda de abrir espacios para la diversificación de la oferta de la cadena apícola en el departamento del Cauca.
- El análisis de los parámetros fisicoquímicos y de calidad indican que la composición de la miel no se ve afectada por la concentración de edulcorante (relación de doble o triple poder edulcorante) presentes en las materias primas utilizadas para la elaboración de los jarabes, destinados a la alimentación de las abejas.
- Las condiciones de almacenamiento a las que fueron sometidas las mieles (pasteurizada y sin pasteurizar) y almacenamiento a (4°C y T amb.) alteraron significativamente los principales indicadores de calidad, excepto en el porcentaje de humedad, actividad diastásica e hidroximetilfurfural (HMF) para ambos tipos de miel (doble y triple poder edulcorante).

- Los resultados obtenidos en éste proyecto han permitido encontrar una nueva alternativa para la producción de miel express, obteniendo un producto con un valor agregado y características que la hacen atractiva para los diferentes mercados nacionales y con gran proyección a nivel internacional.
- Se infiere que las condiciones climáticas y el grado de operculación de los marcos destinados a la recolección de miel son dos de los factores más importantes que influyen sobre el contenido de humedad en las mieles, y este factor es determinante sobre la calidad y estabilidad del producto final.
- Los parámetros de humedad se correlacionan muy bien con el contenido de acidez, puesto que las muestras de las colmenas dos y cinco que presentaron alta humedad sufrieron transformaciones más rápidas en la acidez.
- La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detección Ultravioleta, demostró ser una técnica adecuada y una herramienta útil para la confirmación de la existencia de steviósido y rebaudiósido A en las muestras de miel de *Stevia* y para su determinación cuantitativa.
- Se lograron optimizar los parámetros cromatográficos tales como: linealidad en el rango de trabajo, precisión, exactitud y sensibilidad del método, para la estandarización de la metodología analítica que permitió determinar la presencia de steviósido y rebaudiósido A en las muestras de miel de *Stevia* en forma eficiente y confiable.
- Con el desarrollo de este estudio se pudo determinar que las abejas asimilaron de forma apropiada el los principios activos de la *Stevia*, lo que se evidenció por los altos porcentajes de incorporación que superan el 97 % para steviósido y el 96 % para rebaudiósido A.

6. ANEXOS

ANEXO A

Tabla 28. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento para las mieles de *Stevia* con doble poder edulcorante sobre el % de humedad.

Colmena	Alimentación	Parámetros estadísticos	MDP		MDSP		T amb		4°C	
			Tamb	4°C	Tamb	4°C	MDP	MDSP	MDP	MDSP
1	1	X	18,01	18,12	18,18	18,35	18,01	18,18	18,12	18,35
		S	0,158	0,227	0,161	0,413	0,158	0,161	0,227	0,413
		F ^a	0,49		0,15		0,97		0,30	
		t ^b	0,84		2,16		1,60		2,30	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	19,45	19,31	19,41	19,61	19,45	19,41	19,31	19,61
		S	0,201	0,318	0,580	0,524	0,201	0,580	0,318	0,524
		F	0,40		1,22		0,12		0,37	
		t	2,19		1,75		0,15		0,67	
		DS	No		No		No		No	
2	1	X	20,18	20,11	20,12	20,40	20,18	20,12	20,11	20,40
		S	0,117	0,384	0,298	0,515	0,117	0,298	0,384	0,515
		F	0,09		0,33		0,15		0,56	
		t	0,33		0,97		0,34		0,94	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	21,43	21,33	21,54	20,94	21,43	21,54	21,33	20,94
		S	0,038	0,471	0,086	0,622	0,038	0,089	0,471	0,622
		F	0,01		0,02		0,19		0,57	
		t	2,12		1,91		2,29		0,02	
		DS	No		No		No		No	
3	1	X	18,03	18,43	18,32	17,98	18,03	18,32	18,83	17,98
		S	0,091	0,699	0,249	0,391	0,091	0,249	0,699	0,391
		F	0,02		0,40		0,14		3,19	
		t	2,28		1,59		2,22		2,26	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	18,55	18,45	18,78	18,41	18,55	18,78	18,45	18,41
		S	0,061	0,585	0,191	0,491	0,061	0,191	0,585	0,491
		F	0,01		0,15		0,10		1,43	
		t	1,70		2,19		2,27		0,43	
		DS	No		No		No		No	

^a Prueba F para la comparación de desviaciones estándar. Para una prueba de dos colas ($P=0.05$) y cuatro grados de libertad $F= 9.605$

^b Prueba t para la comparación de las medias de dos muestras. Para una prueba de dos colas con un intervalo de confianza del 95% y 8 grados de libertad $t=2.31$

Tabla 29. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento para las mieles de *Stevia* con triple poder edulcorante sobre el % de humedad.

Colmena	Alimentación	Parámetros estadísticos	MTP		MTSP		T amb		4°C	
			Tamb	4°C	Tamb	4°C	MTP	MTSP	MTP	MTSP
4	1	X	17,94	17,73	18,07	17,87	17,94	18,07	17,73	17,87
		S	0,050	0,718	0,111	0,482	0,050	0,111	0,718	0,482
		F	0,01		0,05		0,21		2,22	
		t	0,58		0,81		2,24		0,35	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	18,86	18,72	19,04	18,94	18,86	19,04	18,72	18,94
		S	0,122	0,246	0,105	0,228	0,122	0,105	0,246	0,228
		F	0,25		0,21		1,37		1,17	
		t	1,08		0,76		2,30		1,43	
		DS	No		No		No		No	
5	1	X	20,09	20,12	20,24	20,18	20,09	20,24	20,12	20,18
		S	0,146	0,214	0,071	0,674	0,146	0,071	0,214	0,674
		F	0,46		0,01		4,21		0,10	
		t	0,56		0,17		2,02		0,39	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	19,86	19,93	19,94	20,01	19,86	19,94	19,93	20,01
		S	0,090	1,845	0,156	1,07	0,090	0,156	1,845	1,07
		F	0,01		0,01		0,33		2,98	
		t	0,36		1,43		0,82		0,37	
		DS	No		No		No		No	
6	1	X	17,12	17,34	17,03	17,22	17,12	17,03	17,34	17,22
		S	0,094	0,173	0,128	0,132	0,094	0,128	0,173	0,132
		F	0,29		0,95		0,53		1,72	
		t	2,27		2,22		1,23		1,16	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	18,13	18,33	18,00	17,78	18,13	18,00	18,33	17,78
		S	0,106	0,782	0,153	0,145	0,106	0,153	0,782	0,145
		F	0,02		0,02		0,48		0,47	
		t	0,51		0,38		1,53		0,82	
		DS	No		No		No		No	

Tabla 30. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento de las mieles de *Stevia* con doble poder edulcorante sobre el % de acidez.

Colmena	Alimentación	Parámetros estadísticos	MDP		MDSP		T amb		4°C	
			Tamb	4°C	Tamb	4°C	MDP	MDSP	MDP	MDSP
1	1	X	0,93	0,88	1,01	0,90	0,93	1,01	0,88	0,90
		S	0,032	0,012	0,011	0,029	0,032	0,011	0,012	0,029
		F	6.87		0.16		7.92		0.18	
		t	2.95		7.63		5.70		2.37	
		DS	Si		Si		Si		Si	
	2	X	1.08	0.98	1,23	1,05	1.08	1,23	0.98	1,05
		S	0.021	0.017	0,026	0,013	0.021	0,026	0.017	0,013
		F	1.54		3,78		0.63		1.56	
		t	8.01		13,38		9.37		6.97	
		DS	Si		Si		Si		Si	
2	1	X	1,16	1,00	1,38	1,12	1,16	1,38	1,00	1,12
		S	0,096	0,068	0,067	0,78	0,096	0,067	0,068	0,78
		F	2,02		0,74		2,07		0,76	
		t	2,85		5,35		4,08		2,36	
		DS	Si		Si		Si		Si	
	2	X	1,23	1,03	1,42	1,10	1,23	1,42	1,03	1,10
		S	0,041	0,021	0,049	0,063	0,041	0,049	0,021	0,063
		F	3,88		0,60		0,70		0,11	
		t	9,42		8,46		6,24		2,95	
		DS	Si		Si					
3	1	X	0,96	0,89	1,03	0,91	0,96	1,03	0,89	0,91
		S	0,037	0,021	0,014	0,015	0,037	0,014	0,021	0,015
		F	3,14		0,87		6,75		1,87	
		t	3,81		11,75		3,91		2,34	
		DS	Si		Si		Si		Si	
	2	X	1,00	0,90	1,08	0,98	1,00	1,08	0,90	0,98
		S	0,074	0,026	0,051	0,021	0,074	0,051	0,026	0,021
		F	8,10		5,98		2,11		1,56	
		t	2,88		4,25		2,88		4,76	
		DS	Si		Si		Si		Si	

Tabla 31. Comparación de las diferentes condiciones de almacenamiento de las mieles de *Stevia* con triple poder edulcorante sobre el % de acidez.

Colmena	Alimentación	Parámetros estadísticos	MTP		MTSP		T amb		4°C	
			Tamb	4°C	Tamb	4°C	MTP	MTSP	MTP	MTSP
4	1	X	0,88	0,81	0,96	0,85	0,88	0,96	0,81	0,85
		S	0,040	0,030	0,086	0,040	0,040	0,086	0,030	0,040
		F	1,78		4,76		0,21		0,56	
		t	3,12		2,58		2,84		2,93	
		DS	Si		Si		Si		Si	
	2	X	1,00	0,90	1,20	0,98	1,00	1,20	0,90	0,98
		S	0,144	0,152	0,109	0,060	0,144	0,109	0,152	0,060
		F	0,90		3,28		1,74		6,35	
		t	1,03		3,88		2,39		2,32	
		DS	Si		Si		Si		Si	
5	1	X	1,15	0,87	1,36	1,10	1,15	1,36	0,87	1,10
		S	0,053	0,042	0,107	0,085	0,053	0,107	0,042	0,085
		F	1,62		1,58		0,15		0,68	
		t	9,01		4,36		2,32		2,56	
		DS	Si		Si		Si		Si	
	2	X	1,18	1,00	1,30	1,07	1,18	1,30	1,00	1,07
		S	0,087	0,073	0,095	0,048	0,087	0,095	0,073	0,048
		F	1,43		3,97		0,83		0,14	
		t	3,39		4,72		2,75		2,33	
		DS	Si		Si		Si		Si	
6	1	X	0,80	0,77	0,83	0,78	0,80	0,83	0,77	0,78
		S	0,007	0,028	0,037	0,015	0,007	0,037	0,028	0,015
		F	0,06		5,96		0,04		3,35	
		t	2,25		3,41		2,85		0,55	
		DS	No		No		No		No	
	2	X	0,94	0,86	1,11	0,93	0,94	1,11	0,86	0,93
		S	0,011	0,009	0,010	0,016	0,011	0,010	0,009	0,016
		F	1,62		0,40		1,30		0,32	
		t	12,97		19,82		23,24		8,35	
		DS	Si		Si		Si		Si	

ANEXO B

Una vez se ha implementado la técnica cromatográfica y el método de análisis, se requiere la conformación de los resultados obtenidos para observar que cumplan con las especificaciones requeridas.

LINEALIDAD. Para poder determinar la linealidad (dentro de un rango específico), se elaboraron una serie de seis disoluciones a partir del estándar de referencia, con el fin de analizar cada una por triplicado en el cromatógrafo, y así, obtener la curva por regresión lineal, la cual tiene la siguiente fórmula matemática.

$$y = bx + a$$

Donde **b** es la pendiente de **a** es el intercepto con el eje **y**. De ésta manera se obtiene un coeficiente de correlación (**r**), el cual determina la linealidad de dicha curva.

En este caso, la hipótesis nula es la no correlación entre **x** y **y**. Si el valor observado de t_r es mayor que t_{tabla} , se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

PRECISIÓN. La precisión una medida de la concordancia de los resultados con los de otros obtenidos exactamente en la misma forma. Este término se utiliza para describir qué tan reproducible son las mediciones; es decir que tan semejantes son los resultados que se han obtenido exactamente de la misma

forma. Por lo general, la precisión de una medición se puede determinar simplemente repitiendo la medición en proporciones semejantes de la muestra. Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: la desviación estándar y la desviación estándar relativa.

Media de la muestra: \bar{X}

Es el valor promedio de una muestra limitada obtenida de una población de datos y se define por la ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Desviación estándar: S

La desviación estándar es una medida de la precisión o dispersión de una población de datos, y está dada por la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Desviación estándar relativa: RSD

Es el porcentaje de la desviación estándar y se calcula así:

$$RSD = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

EXACTITUD. El término exactitud indica qué cerca está una medición de su valor verdadero o aceptado, y se expresa como error. Para determinarla se utiliza el *t* de student:

$$t_{obt} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{RSD}$$

Donde **R** es la recuperación porcentual y **t_{cal}** es el valor de **t** obtenido experimentalmente.

El **t_{cal}** es comparado con el valor **t_{tab}** (valor de **t** tabulado para *n*-1 grado de libertad); si **t_{cal}** es menor que **t_{tab}**, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación, y de esta forma, la exactitud es aprobada.

SENSIBILIDAD. La sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración de analito, para lo cual se tiene que los parámetros para evaluar la sensibilidad del método son los límites de detención y cuantificación.

Límite de detención: (LOD)

Es la concentración o peso mínimo de analito que puede detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionando una señal significativa diferente de la “señal de fondo”, lo cual se expresa matemáticamente como:

$$y = y_B + 3S_B$$

Donde **y** es la señal analítica, **y_B** es la señal media del blanco (abcisa igual a cero) y **S_B** es la desviación estándar del mismo.

Sustituyendo y en la ecuación (1) y reordenando, se obtiene finalmente la expresión adecuada para calcular la concentración del límite de detección.

Límite de cuantificación: (LOQ)

Es la concentración o peso mínimo de analito más pequeño con la que pueden realizarse medidas cuantitativas, en donde las medidas cuantitativas, generalmente se toman cuando éste (LOQ) es igual a diez veces la desviación estándar del blanco. Análogamente al LOD se tiene:

$$y = y_B + 10S_B$$

COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE DOS MUESTRAS

Una forma por la que los resultados de un método analítico nuevo pueden comprobarse es por comparación de los obtenidos empleando un segundo método. En este caso se tienen dos medias muestrales, si las dos muestras no tienen desviaciones estándar significativamente diferentes, se emplea la siguiente fórmula:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Se demuestra entonces que t está dado por:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

donde t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

Si las dos muestras presentan desviaciones estándar significativamente diferentes, se emplea la siguiente fórmula:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

LA PRUEBA F PARA LA COMPARACIÓN DE DESVIACIONES ESTÁNDAR

La prueba F compara las desviaciones estándar de dos conjuntos de datos, y se define por la siguiente ecuación:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Donde s_1^2 y s_2^2 son las desviaciones estándar de dos grupos de datos

ANEXO C

Tabla 32. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrados en muestras de miel de *Stevia* con doble poder edulcorante almacenadas a diferentes condiciones

Colmena	Alimentación	Identificación de la miel	Condiciones almacenam.	Steviósido Concentración mg/g muestra	Rebaudiósido Concentración mg/g muestra
Colmena 1	1	MDP	4°C	1,40	3,05
			Tamb	1,44	3,06
		MDSP	4°C	1,43	3,10
			Tamb	1,43	3,15
	2	MDP	4°C	1,38	3,01
			Tamb	1,31	3,00
		MDSP	4°C	1,38	3,05
			Tamb	1,40	3,02
Colmena 2	1	MDP	4°C	1,43	3,02
			Tamb	1,41	3,05
		MDSP	4°C	1,43	3,06
			Tamb	1,44	3,07
	2	MDP	4°C	1,40	3,05
			Tamb	1,41	3,07
		MDSP	4°C	1,38	3,02
			Tamb	1,39	3,08
Colmena 3	1	MDP	4°C	1,40	3,15
			Tamb	1,43	3,14
		MDSP	4°C	1,38	3,10
			Tamb	1,44	3,09
	2	MDP	4°C	1,38	3,19
			Tamb	1,42	3,17
		MDSP	4°C	1,42	3,18
			Tamb	1,41	3,20

Tabla 33. Cantidad de steviósido y rebaudiósido A encontrados en muestras de miel de *Stevia* con triple poder edulcorante almacenadas a diferentes condiciones.

Colmena	Alimentación	Identificación de la miel	Condiciones almacenam.	Steviósido Concentración mg/g muestra	Rebaudiósido Concentración mg/g muestra
Colmena 4	1	MTP	4°C	2,75	2,92
			Tamb	2,79	5,90
		MTSP	4°C	2,80	5,99
			Tamb	2,76	5,91
	2	MTP	4°C	2,85	2,68
			Tamb	2,82	5,67
MTSP	4°C	2,89	5,56		
	Tamb	2,79	5,89		
Colmena 5	1	MTP	4°C	2,75	5,98
			Tamb	2,72	5,90
		MTSP	4°C	2,74	5,92
			Tamb	2,68	5,91
	2	MTP	4°C	2,74	5,99
			Tamb	2,75	5,99
		MTSP	4°C	2,76	5,96
			Tamb	2,65	5,89
Colmena 6	1	MTP	4°C	2,53	5,87
			Tamb	2,57	5,78
		MTSP	4°C	2,59	5,70
			Tamb	2,48	5,71
	2	MTP	4°C	2,60	5,70
			Tamb	2,78	5,89
MTSP	4°C	2,79	5,87		
	Tamb	2,75	5,80		

ANEXO D

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 1273

MIEL DE ABEJAS.

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

1.1 La presente norma se aplica a todas las mieles producidas por abejas obreras y regula todos los tipos de formas de presentación de la miel que se ofrecen para el consumo directo.

1.2 La norma se aplica también a la miel envasada en envases no destinados a la venta al por menor (a granel) y destinada al reenvasado en envases para la venta al por menor.

2. DESCRIPCIÓN

2.1 DEFINICIÓN DE MIEL DE ABEJAS. Se entiende por miel de abejas la sustancia dulce natural producida por abejas obreras a partir del néctar producido por nectarios florales y extraflorales, que las abejas recogen transforman y combinan con sustancias específicas propias y almacenan en el panal para que madure.

2.2 DESCRIPCIÓN. La miel de abejas se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente glucosa y fructosa. El color de la miel de abejas varía desde casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede presentarse fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada. El sabor y el aroma varían, pero en general posee los de la planta de que procede.

OTRAS DEFINICIONES Y DENOMINACIONES

2.3.1 Según su origen. La miel de flores o néctar es la miel que procede principalmente de los néctares de las flores.

2.3.2 Según el método de elaboración

- La miel centrifugada es la miel obtenida mediante la centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
- La miel prensada es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado.

2.3.3 Según su presentación. La miel que satisface todos los criterios de composición y calidad establecidos en el numeral 3 de esta norma, puede ser presentada de las siguientes formas:

- a) Miel de abejas, la miel en estado líquido.
- b) Miel de abejas en panal, la miel almacenada por las abejas en panales, sin larvas, y vendida en panales enteros cerrados o secciones de tales panales, cuyos bordes no han sido cortados.
- c) Miel de abejas en trozos, la miel que contiene uno o más trozos de panales de miel.
- d) Miel de abejas cristalizada (en granos finos o en granos gruesos), la miel que ha experimentado un proceso natural de solidificación como consecuencia de la cristalización de la glucosa.
- e) Miel de abejas cremosa es la miel que tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura y que la haga fácil de untar.

3. FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD

3.1 La miel no deberá tener ningún sabor, aroma o contaminación inaceptable que haya sido absorbido de una materia extraña durante su elaboración y almacenamiento. La miel no debe haber comenzado a fermentar o producir efervescencia.

3.2 No debe calentarse la miel en medida tal que se menoscabe su composición y calidad esenciales.

3.3 CONTENIDO APARENTE DE AZÚCAR REDUCTOR, CALCULADO COMO AZÚCAR INVERTIDO. 65 % como mínimo

3.4 CONTENIDO DE HUMEDAD. 20 % como máximo

3.5 CONTENIDO APARENTE DE SACAROSA. 5 % como máximo

3.6 CONTENIDO DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA. 0,1 % como máximo

3.7 CONTENIDO DE SUSTANCIAS MINERALES (CENIZAS). 0,6 % como máximo

3.8 ACIDEZ. 40 miliequivalentes de ácido por 1000 gramos como máximo

3.9 ACTIVIDAD DE LA DIASTASA. 3 como mínimo

3.10 CONTENIDO DE HIDROXIMETIFURFURAL. 40 mg/kg como máximo

3.11 La miel de abejas no debe contener glucosa comercial

4. ADITIVOS ALIMENTARIOS

No se permite ninguno

5. HIGIENE

5.1 Se recomienda que los productos regulados por las disposiciones de esta norma se preparen de conformidad con las secciones pertinentes del Código Internacional Recomendado de Prácticas -Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969, Rev. 2 (1985), Volumen 1 del Codex Alimentarius).

5.2 En la medida que lo permita las buenas practicas de manufacturas, la miel estará exenta de materias objetables orgánicas e inorgánicas

5.3 El producto cuando sea analizado con métodos adecuados de muestreo y análisis no deberá contener:

- a) Microorganismos en cantidades que puedan representar un peligro para la salud.
- b) Parásitos que puedan representar un peligro para la salud
- c) Sustancias que deriven de microorganismos y plantas en cantidades que puedan representar un peligro para la salud

5.4 La miel debe estar libre de antibióticos y de residuos de acaricidas.

6. ENVASE Y ROTULADO

6.1 ENVASE. Debe ser envasado en recipientes de boca ancha, de materiales inocuos para la salud humana, que no alteren las características organolépticas ni de composición del producto

6.2 ROTULADO. Además de las disposiciones de la norma NTC 512-1, debe contener cualquier otra información que establezca la legislación nacional vigente o que el fabricante solicite y sea aprobada por la autoridad sanitaria competente. También, se aplicarán las siguientes disposiciones específicas:

6.2.1 NOMBRE DEL ALIMENTO

- Con sujeción a las disposiciones que figuran en el numeral 6.2.1.4, los productos que satisfagan las disposiciones de la norma deberán ser designados con el término "miel de abejas".
- Ninguna miel podrá designarse con una de las denominaciones que figuran en el numeral 2.3, a menos que se ajuste a la descripción correspondiente que figura en dicho numeral. Se indicarán las formas de presentación descritas en el numeral 2.3.3.
- La miel podrá designarse con el nombre de la región geográfica o topográfica, si ha sido producida exclusivamente en el área a que se refiere la denominación.
- La miel podrá designarse de acuerdo con su origen, ya sea este de nectarios florales o extraflorales, si procede total o principalmente de esas fuentes en particular y si posee las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas que corresponden a dicho origen.

6.2.2 ROTULADO DE ENVASES DESTINADOS A LA VENTA AL POR MAYOR

Además de las disposiciones de la norma NTC 512-1 se aplicarán específicamente lo siguiente:

- La información sobre rotulado que se especifica en este numeral se facilitará ya sea en el envase o en los documentos que lo acompañan, salvo que el nombre del producto, la identificación del lote, y el nombre y la dirección del envasador deben aparecer en el envase.
- La identificación del lote, el nombre y la dirección del envasador, podrán ser sustituidos por una señal de identificación, a condición de que dicha señal pueda identificarse claramente con los documentos que acompañan al envase.
- Los embalajes que contengan alimentos preenvasados en unidades pequeñas (véase la NTC 512-1) deben estar rotulados cabalmente.

6.2.3 ROTULADO DE ENVASES DESTINADOS A LA VENTA AL POR MENOR.

Además de lo indicado en el numeral 6.2.1 debe incluirse el nombre del envasador y la fecha de envasado.

6.2.4 La miel de abejas que cumpla con las especificaciones de la presente norma, no requiere de fecha de vencimiento.

7. APÉNDICE

7.1 NORMAS QUE DEBEN CONSULTARSE. Las siguientes normas contienen disposiciones que, mediante la referencia dentro de este texto constituyen disposiciones de esta norma. En el momento de la publicación eran válidas las ediciones indicadas. Todas las normas están sujetas a actualización; los participantes, mediante acuerdos basados en esta norma, deben investigar la posibilidad de aplicar la última versión de las normas mencionadas a continuación. NTC 512-1:1996, Industrias alimentarias. Rotulado. Parte 1. Norma General.

7.2 DOCUMENTO DE REFERENCIA. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION.

Miel de abejas. Vol.11, Roma, 5 p, (CODEX STAN - 12-1981, Rev 1987)

Anexo A (Informativo), Recomendaciones para el procesamiento, envase y almacenamiento de la miel

A.1 Contenido de agua La calidad de la miel, así como su evolución fisicoquímica y biológica, durante la conservación depende muy directamente de este factor. Un contenido de miel con un exceso de humedad (18 % - 19 % o cualquier otro superior) sufre con frecuencia una cristalización defectuosa; la miel se endurece o sus cristales se amalgaman; se puede fermentar consecutivamente y de todos modos, su degradación bioquímica natural será acelerada en función principalmente de sus condiciones de almacenamiento.

A.2 Contenido de HMF (Hidroximetilfurfural) Esta sustancia química que aparece en la miel es un derivado de la degradación de los azúcares y principalmente de la fructosa. La fructosa es un azúcar “noble” de la miel; ésta es también la más frágil, si se expone a temperaturas muy elevadas, en un medio naturalmente ácido, se descompone en HMF. Un tiempo de conservación de la miel demasiado largo, a una temperatura no controlada pero superior a 20 °C produce el mismo resultado que un calentamiento intenso de corta duración. La verificación del contenido de HMF de una miel es contrastante con su “estado de frescura”. Una miel natural, recolectada en calentamiento particular, no contiene más de 5 mg de HMF por kilogramo, el recalentamiento, indispensable para la refundición antes del acondicionamiento, por ejemplo, puede desarrollar algunos miligramos de HMF. Se debe tener en cuenta también las condiciones de comercialización, los tiempos y temperaturas de almacenamiento. Se señala que la calidad biológica total de una miel: presencia de enzimas, de vitaminas, de aromas volátiles está ligada a su nivel de HMF en un factor inversamente proporcional. Generalmente, el conjunto de estos parámetros es muchas veces difícil de evidenciar, en tal caso, las

dosificaciones de los derivados del furfural, pueden ser analizadas por espectrometría, de manera simple y rápida.

En resumen la presencia de HMF en la miel es siempre revelador de las degradaciones térmicas que sufrió el producto y es un indicador muy importante de la calidad y de la frescura.

A.3 Contenido en granos de polen y de elementos representativos diversos. Una miel debe obligatoriamente contener los elementos microscópicos representativos y notablemente los granos de polen. Estos elementos estarán presentes en proporción y en calidades variables y se derivan de la naturaleza del muestreo natural que hacen las abejas durante la cosecha de miel.

La calidad de la miel puede estar relacionada, por una parte, con la presencia natural de granos de polen que la abeja mezcla con el alimento. Además, los elementos representativos microscópicos en su conjunto (polen, algas, líquenes, etc.) constituyen las principales señales del origen (botánico, fisiológico o geográfico) de las mieles. La calidad de la miel es indispensable en los tratamientos de preservación. En consecuencia, las filtraciones forzadas (a través de tierra diatomácea o infusorios) o la ultracentrifugación de las mieles son imposibles.

A5. Estabilidad y cristalización. El mejor medio de llegar a un estado físico estable es el de certificar para estos productos una estructura cristalina perfectamente unida, fina y homogénea.

La mayoría de las mieles no son estables físicamente en el estado cristalino y esta cristalización espontánea puede ser producida según las estructuras naturales muy diversas y algunas veces heterogéneas, se aconseja a todos los apicultores la práctica de la siembra y de la cristalización dirigida.

En cambio, ningún método totalmente satisfactorio no puede ser aconsejado para guardar duraderamente una miel estable en estado líquido, a excepción de las mieles de la acacia (*Robinia pseudacacia*) así como de ciertas mieladas, las cuales, cuando son puras, permanecen naturalmente estables en fase líquida. Un recalentamiento medio de la miel cristalizada (40 °C a 45 °C) conlleva a la refundición de la ésta, pero la estabilidad en este estado no excede generalmente de tres meses.

A5. Toma de muestras. Para proceder a los controles, la toma de muestra puede ser efectuada sólo por una de las siguientes maneras:

A5.1 Toma de muestras antes del rotulado.

A5.2 Toma de muestras en una tina después de mezclar y antes del acondicionamiento de la miel.

A5.3 Toma de muestra de toneles antes de la mezcla y en este caso un control posterior a su gravamen.

A6. Otras recomendaciones

A6.1 Se recomienda que las centrifugas utilizadas en el procesamiento sean de acero inoxidable

A6.2 Se recomienda transportar la miel en canecas o recipientes de materiales no reciclados, de acero inoxidable y de uso exclusivo para alimentos.

A6.3 El recubrimiento de las canecas metálicas debe ser de un lacado a 360°C y con lacas para uso alimenticio.

PRÓLOGO.

El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, **ICONTEC**, es el organismo nacional de normalización, según el Decreto 2269 de 1993.

El **ICONTEC** es una entidad de carácter privado, sin ánimo de lucro, cuya Misión es fundamental para brindar soporte y desarrollo al productor y protección al consumidor. Colabora con el sector gubernamental y apoya al sector privado del país, para lograr ventajas competitivas en los mercados interno y externo.

La representación de todos los sectores involucrados en el proceso de Normalización Técnica está garantizada por los Comités Técnicos y el período de Consulta Pública, este último caracterizado por la participación del público en general.

Esta norma está sujeta a ser actualizada permanentemente con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias actuales.

DIRECCIÓN DE NORMALIZACIÓN

ANEXO E

RESEÑA HISTÓRICA DE PRONAR Ltda.

La empresa Apiario Los Alpes, surge cuando Javier de Jesús Arroyave, frente al deseo de tener trabajo independiente, el cual no demandara demasiado tiempo y a su vez fuese productivo, responde a la invitación que en esa época hiciera el Comité de Cafeteros del Cauca, para que se iniciara en el cultivo de abejas o apicultura. Este comité realiza los estudios de factibilidad de los terrenos propuestos para el montaje de las colmenas, encontrando que era una zona adecuada por el aislamiento existente de áreas con alta densidad de población.

La empresa inicia labores en octubre de 1980, con la aprobación del préstamo que realiza el Banco Cafetero para ejecutar el proyecto. Los nulos conocimientos del dueño sobre el manejo de las abejas, hacen que comience la etapa de capacitación para el manejo de estos insectos (charlas con otros apicultores, cursos dictados por el Comité de Cafeteros y libros). Las primeras adquisiciones, fueron unas colmenas abandonadas, las cuales se llevaron a una finca alquilada, dos días después adquiere en Cali los primeros cajones para instalar las abejas y otras colmenas.

Así transcurren los primeros años de la empresa sin que se obtuviera un buen resultado. En 1982, se obtiene la primera gran cosecha de miel y por fin se pudo envasar miel de Apiario los Alpes, pero ya que no existían canales de distribución y el producto no era conocido en el mercado, la miel no se vendió. Hasta este momento la empresa cuenta con una línea de producción, miel de abejas.

En 1983, luego del terremoto de Popayán, el producto entra en el mercado de Cali, mediante su codificación en los supermercados La 14, después es codificado para los almacenes CADENALCO en Cali y Popayán. Se realizan fuertes campañas de

degustación e información al cliente sobre el producto, logrando un buen posicionamiento en el mercado de Popayán. Esta estrategia hizo que las personas conocieran el producto, su calidad y confiaran en la empresa, ya que la miel era un producto de la cual las personas desconfiaban. Empezó así la capacitación del consumidor para que reconociera una miel de alta pureza.

A mediados del año 86 la empresa comienza a expandir su mercado a otras ciudades del Valle, Barranquilla, Medellín, Pereira, Cartago, Armenia, Pasto, Ipiales, Ibagué, Neiva y los productos llegaron al mercado del Ecuador. La empresa pasa también de tener a su dueño como único empleado, a tres empleados quienes realizaban la limpieza del envase, el envasado de la miel y el manejo de los panales. Pero la empresa empieza a crecer realmente cuando diversifica sus productos como son la cera, el polen, los propóleos y la jalea real. Estos eran productos apícolas que el consumidor desconocía pero que poco a poco fueron abriéndose un espacio en el mercado. Muy pronto todos los productos de Arroyave llegaron a las tiendas naturistas y obtienen reconocimiento. La empresa comienza a asistir a ferias agrícolas y artesanales en el ámbito local y nacional, participando en un mercado más competitivo.

A mediados de 1995 la empresa que hasta entonces funcionaba en una residencia de la ciudad de Popayán, y con colmenas en diferentes fincas alquiladas, adquiere sede propia para recolectar, envasar, y etiquetar sus productos, en la cual se labora actualmente. A mediados del año 1999, se decide aprovechar las prebendas que la ley Páez ofrece a la conformación de nuevas empresa, tomando la decisión de aunar esfuerzos con su familia y conformar una Sociedad Ltda. conocida hoy con el nombre de PRONAR Ltda., pero debido al no-cumplimiento de todos los requisitos exigidos para ser acreedores a todos estos beneficios, optaron por seguir adelante, aunque bajo esta modalidad (Sociedad Ltda.), con la empresa en aras del fortalecimiento de la misma.

Fuente: PRONAR Ltda.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ FÁLDER RIVERO A. Alimentación en España. Enciclopedia de los Alimentos Mercasa. Noviembre (2004); p. 113-125.
- ² CARDELLO HM, DA SILVA MA, DAMASIO MH. Measurement of the relative sweetness of *Stevia* extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. En: Plant Foods Hum Nutr 54(2), (1999); p.119-30.
- ³ Apicultores Ecológicos. En: INTEGRAL: vida sana y natural. No. 261 (2001); p. 38-45.
- ⁴ ARROYAVE, Javier. Información personal. Apicultor. Apiario Los Alpes, (2002)
- ⁵ MARIN. W. Sondeo del mercado de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Biocomercio Sostenible. Bogotá Colombia (2004). p. 23-24
- ⁶ BRANDLE J.E., STARRATT A.N., y GIJZEN M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. En: Canadian Journal of Plant Science. Vol. 78 (4), (1998); p.527-536.
- ⁷ BRANDLE J. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. En: Canadian Journal of Plant Science. Vol. 79(1), (1999); p. 85-92.

- ⁸ KOHDA H. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. En: Phytochemistry. Vol. 15(6), (1976); p. 981-983.
- ⁹ RAJBHANDARI A., ROBERTS M. Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana*. The flavonoids of *Stevia rebaudiana*. En: Agricultural & Biological Chemistry. Vol. 47(1), (1983); p. 133-135.
- ¹⁰ KOBAYASHI M. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia*. En: Phytochemistry. Vol. 16(9), (1977); p. 1405-1408.
- ¹¹ KINGHORN A.D., *et al.*, Sweet constituents of some medicinal plants. Revista Latinoamericana de Química. Vol. 25(2), (1997); p. 49-61.
- ¹² KINGHORN A.D. Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. En: Journal of Natural Products. Vol. 50(6), (1987); p. 1009-1024.
- ¹³ JEPPESEN P.B., GREGERSEN S., POULSEN C.R., *et al.* Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K_{sup} -channel activity. En: Metab. clin. Vol. 49 (2), (2000); p 208-214.
- ¹⁴ MEGEJI N.W., KUMAR J.K., AHUJA P.S. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. En: Current Science. Vol. 88 (5), (2005); p. 801-804.
- ¹⁵ HUTAPEA A.M., *et al.*, Digestion of Stevioside, a Natural Sweetener, By Various Digestive Enzymes. En: Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition. Vol. 23(3), (1997); p. 177-186.

- ¹⁶ TOMLINSON B., CHAN P., CHEN Y.J., et al. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. En: Br. J. clin. pharmacol. Vol 50 (3), (2000); p 215-220.
- ¹⁷ MELIS M.S. Effects of steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. En: Phytomedicine. Vol 3, (1997); p. 349-352.
- ¹⁸ ZAIRISMAN A.A., ATMAWINATA O. Determination of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia*. Menara Perkebunan. Vol. 53(4), (1985); p. 121-123.
- ¹⁹ NIKOLOVA D, BANKOVA B and POPOV S. Separation and quantitation of stevioside and rebaudioside A in plant extracts by normal-phase high performance liquid chromatography and thin-layer chromatography: a comparison. En: Phytochem. Anal. Vol 5, (1994); p.81-85.
- ²⁰ MAURI, P. Analysis of *Stevia* glycosides by capillary electrophoresis. En: Electrophoresis. Vol. 17 (2), (1996); p. 367-371.
- ²¹ MIZUKAMI, H., SHIIBA, K. and OHASHI, H. Enzymatic determination of stevioside in *Stevia rebaudiana*. En: Phytochemistry. Vol. 21, (1982); p.1927-1930.
- ²² NISHIYAMA, P., ALVAREZ, M. and VIEIRA, L. G. E. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. En: J. Sci. Food Agric. Vol. 59 (1992); p.277-281.
- ²³ TOMAS V., ALES N. Determination of Stevioside in Plant Material and Fruit Teas. En: Journal of Food Composition and Análisis. Vol 14, (2001); p. 383-388.

- ²⁴ STRIEDNER J., CZYGAN E.C., BRAUNEGG G. Contributions to the Biotechnological Production of Sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni I. A Method for the Serial Analysis of Diterpene Glycosides by CLAR. En: Acta Biotechnol. Vol. 11(5), (1991); p. 495-499.
- ²⁵ CHANG S. S. AND COOK J. M. Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages. En: J. Agric. Food Chem. Vol 31, (1983); p. 409-412.
- ²⁶ SKOOG D., HOLLER F., NIEMAN T. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Mc Graw Hill. Quinta Edición. España. (2001). p. 731-754,793.
- ²⁷ QUATTROCCHI O., ABELAIRA S.I., LABA R. Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. Argentina: Editorial Artes Graficas Farro S.A. (1992); p. 106-109, 242-265.
- ²⁸ KHACHLIK F., SPANGLER C., CANFIELD L., STECK A. and PFANDER H. En: Analytical Chemistry. Vol. 69, (1997); p.1893.
- ²⁹ ANTONIO S. DACOME. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. En: Process Biochemistry. Vol. 40, (2005); p.3587-3594.
- ³⁰ MCGREGOR, S.E. La apicultura en los Estados Unidos. México: Editorial Limusa, (1985); p. 150.
- ³¹ ENCICLOPEDIA AGROPECUARIA TERRANOVA. Producción pecuaria. Santafé de Bogotá. Terranova editores. Vol. 4, (1995); p. 280-290.

- ³² FÉLIX HERRERO GARCÍA. Lo que usted debe saber sobre las abejas y la Miel. Edición Caja España. Depósito Legal: LE-593-2004I. S.B.N 84-95917-14-9.
- ³³ GARCIA GIROU NORBERTO. Contaminación de la Miel Con Alimentos Artificiales. Extractado de Informe Apícola – Boletín Trimestral Nº25. SAGPyA. [08/2003] UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR. Bahía Blanca. 2003.
- ³⁴ KIRK R.S., SAWYER R. Y EGAN H. Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson. Segunda edición. México: Compañía Editorial Continental, (1996); p. 11-35, 319-323, 695-721.
- ³⁵ BERNAL RAMÍREZ, Inés. Análisis de alimentos. Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, (1994); p.313
- ³⁶ WITTIG DE PENNA EMMA., Evaluación Sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos, Resúmenes de Comunicaciones, 2das. Jornadas Científicas. Universidad de Chile. (1979). p. 5-134.
- ³⁷ WILLIAM HORWITZ., AOAC Official Methods Of Analysis 969.38, the scientific of Analisis dedicated to Analytical excellence, Food composition; additives; natural contaminants Sugars and Sugar Products. Chapter 44, volumen II, 17th edition (2000); p. 23.
- ³⁸ POZO J.K., MANQUIAN N., Evaluación de un método de análisis de residuos de sulfamida, en miel, por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento. En: Agro sur. Vol. 32 (2). (2004); p. 87-93

- ³⁹ BELLIARDO F., Determination of sulphonamide residues in honey by high pressure liquid chromatography. En: Journal of the Association of Official Analytical Chemists. Vol.20 (1981); p. 44-48.
- ⁴⁰ KOLB N., HERRERA J.E., FERREYRA, D.J. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudina*: Improved HPLC Method. En: J. Agric Food Chem. Vol. 48. (2001); 4538-4541.
- ⁴¹ IUPAC, Analytical Chemistry Division. En:Spectrochim Acta 33B. (1978); p. 241-245.
- ⁴² Anzaldúa Morales, A..La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia Zaragoza España (1994).
- ⁴³ WHITE, J. W. Honey. En: Advances in Food Research. Vol. 24, (1978); p. 287-374.
- ⁴⁴ STEFAN BOGDANOV; CORD LÜLLMANN. Calidad de la miel de abejas y estándares de control: Revisión realizada por la comisión internacional de la miel. Federal Dairy Research Station, Bee Department, 3097 Liebefeld, Switzerland; *Codex Alimentarius*, Unión Europea (EU). (2001)
- ⁴⁵ SKOOG, DOUGLAS. Análisis Instrumental. Ed Mc Graw-Hill. México (1994). p 730-732.
- ⁴⁶ MILLER, J.C y MILLER, J.N. Statistic for analytical Chemistry, Ellis Horwood Limited Publ., Chichester, (1984); p 96-100.

-
- ⁴⁷ PAGLIUCA G., GAZZOTTI T. A scientific note on the determination of oxytetracycline residues in honey by high-performance liquid chromatography with UV detection. EN: Apidologie. Vol. 33 (2002); p. 583–584.
- ⁴⁸ DIEGUEZ S., SORACI A. Metodología analítica para la detección de residuos de Oxitetraciclina en miel. En: INTA Argentina. Vol. 31 (1); p. 159 – 166.
- ⁴⁹ LICHTENBERG-KRAAG B and HEDTKE C. Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey En: Apidologie Sciences. Vol 33. (2002); p. 327–337
- ⁵⁰ THOMAS D., SEELEY. The effect of drone comb on a honey bee colony's production of honey. En: Apidologie. Vol. 33. (2002); p. 75-86.