

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EUCALIPTOL (1,8-CINEOL) EN
MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*) MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE GASES

SONIA MARLEN ESCANDON RIVERA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EUCALIPTOL (1,8-CINEOL) EN
MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*) MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE GASES

SONIA MARLEN ESCANDON RIVERA

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de químico

Director

Olga Lucia Hoyos s. Ph.D

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006

NOTA DE ACEPTACION

Directora: Dra. Olga Lucía Hoyos S. Ph.D.

Jurado: Mg. Germán Cuervo

Jurado: Mg. Edier Humberto Pérez

Fecha de sustentación: 6 de diciembre de 2006

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme su apoyo desde el momento en que decidí tomar este rumbo.

A mi directora de tesis, la doctora Olga Lucía Hoyos, por transmitirme sus conocimientos con humildad, por su colaboración incondicional en todo el desarrollo experimental de este proyecto y por brindarme su amistad.

Al señor Javier de Jesús Arroyave Q.E.P.D., por sus asesorías en la preparación de los jarabes y el préstamo de las colmenas del apiario para realizar el trabajo de campo.

A mis jurados, el Mg Germán Cuervo quien considero una persona correcta en todo el sentido de la palabra, por sus observaciones y aclaraciones a cerca de este trabajo con la honestidad que lo caracteriza. Al Mg Edier Pérez por colaborarme como jurado de tesis y por las correcciones realizadas a mi anteproyecto que fueron provecho para mi posterior desarrollo experimental.

A los profesores del grupo de investigación en Química de Productos Naturales: Dra. Olga Lucía H, Dr. Jaime Martín F, Dr. Alberto Lennis y el Mg Ricardo Benitez, por permitirme ingresar al grupo de investigación donde se desarrollan trabajos con calidad y distinción. Además por la buena voluntad al colaborar con la participación en los diferentes eventos como seminarios y encuentros de semilleros de investigación.

Al profesor Ricardo Benitez por sus asesorías para iniciar este proyecto ya que a comienzos de este iba a ser mi director, y al profesor Luis Alberto Lennis quien siempre buscó solución a mis problemas en el trabajo de campo y en laboratorio.

Al ingeniero Alfaro Tandioy por su colaboración con la parte de trabajo de campo.

A los ingenieros Jordan Alegría y Julián Prado por su empeño en fortalecer el grupo de investigación.

A los apicultores trabajadores del apiario Los Alpes PRONAR quienes recolectaron la miel y me dieron orientación acerca de la vida de las abejas: Albeiro y Willinton.

A la Dra Maite Rada por su cooperación con los equipos que requería para el trabajo en la unidad de análisis industriales.

A mis amigos y compañeros de carrera, Cristina Narváez, Jhon Eri Vega, Manuel Amézquita, Mauricio Campo y Andrés Yanza. Especialmente a Alejandra Suarez en quien siempre encontré una mano amiga desde primer semestre hasta siempre.

A las personas que conocí en el transcurso de la carrera que han formado parte importante en mi vida y agradezco haberlos conocido: Jorge Ortega, Diana Bolaños, Gaby Ariza, Julie Maya.

A todas las personas que conocí y que me permitieron sacarles una que otra sonrisa.

A mis tías especialmente Ana Rivera Y Elena Rivera por tomarme como madres adoptivas durante mi carrera.

A mis hermanos que fortalecían la presentación de mis trabajos con sus conocimientos en la tecnología. Especialmente a Adriana quien estuvo a mi lado siempre como una amiga.

A Felipe Andrade que me apoyó siempre en mis momentos de tristeza y alegrías.

A las abejas por haber aceptado el jarabe que les suministré y haber incorporado el cineol en la miel en buena proporción.

A los profesores del departamento de química por transmitirme sus conocimientos: considero que todos los profesores de mi promoción son de un excelente nivel.

A la universidad del Cauca por brindarme la formación académica necesaria para esta etapa.

CONTENIDO

RESUMEN

▪1MARCO TEÓRICO	
▪1.1DEFINICIÓN DE MIEL.....	
▪ 1.1.1Composición de la miel natural	
▪1.2TIPOS DE MIEL de abejas	
▪1.3MIEL EXPRESS	
▪1.4TIPOS DE ALIMENTACIÓN DE LAS ABEJAS.	
▪1.4.1Azúcar Granulada o Azúcar Flor (SECA).	
▪ 1.4.2Jarabe Nutritivo	
▪ 1.4.3Pasta de Azúcar	
▪ 1.4.4Pasta Alimenticia.....	
▪ 1.4.5Jarabe estimulante	
▪ 1.4.6Candy	5
▪1.5ALIMENTADORES DE COLMENAS DE MIEL.	
▪ 1.5.1Alimentadores atmosféricos	
▪1.6PLANTAS MEDICINALES	7
▪1.7EUCALIPTO	8
▪ 1.7.1Identificación de la especie	8
▪ 1.7.2Descripción y distribución geográfica	
▪ 1.7.3Composición, propiedades y aplicación	9
▪ 1.7.4Aceites esenciales.....	0
▪1.8....TÉCNICAS DE ESTUDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MIEL DE	
▪ABEJAS1
▪ 1.8.1 ..Hidrodestilación (HD) y destilación de vapor microsimultánea (MSDE)	
▪ 1.8.2Extracción por ultrasonido asistido (USE).	
▪ 1.8.3Microextracción en fase sólida (SPME).3	
▪1.9CROMATOLOGRAFÍA DE GASES	
▪2OBJETIVOS.....	
▪2.1OBJETIVO GENERAL	
▪2.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	
▪3METODOLOGÍA	
▪3.1REACTIVOS	
▪3.2EQUIPOS	
▪3.3MATERIA PRIMA Y ACCESORIOS PARA TRABAJO DE CAMPO	
▪3.4TRABAJO DE CAMPO	
▪3.5.. ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS Y EL PRODUCTO TERMINADO	
▪ 3.5.1Análisis de las muestras de jarabe.....	
▪ 3.5.2Análisis de las muestras de la miel express de eucalipto inido .	
▪3.6. EXTRACCIÓN DEL 1,8-CINEOL EN LA MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO	
▪3.7ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA MIEL.5	
▪ 3.7.1 Estandarización de las técnica cromatográfica para la identificación	

▪ y cuantificación del eucaliptol (1,8-cineol) en la miel express de eucalipto;	
▪4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN7
▪4.1 TRABAJO DE CAMPO7
▪ 4.1.1 Elección y preparación de las colmenas	7
▪ 4.1.2 Recolección de las hojas de eucalipto	.8
▪ 4.1.3 Preparación de los jarabes.....	.9
▪ 4.1.4 Alimentación de las colmenas	40
▪ 4.1.5 Obtención de las muestras de miel	40
▪4.2 TRABAJO EN EL LABORATORIO	42
▪ 4.2.1 Preparación y almacenamiento de muestras	42
▪ 4.2.2 Análisis fisicoquímicos de los jarabes	43
▪4.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE MIEL EXPRESS COSECHADAS	
▪ 4.3.1 Análisis fisicoquímicos y de calidad en la miel de esencia de eucalipto.....	48
▪ 4.3.2 Análisis fisicoquímicos y de calidad en la miel de hoja de eucalipto.....	56.
▪4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EUCALIPTOL (1,8-CINEOL) EN LA MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO	62
▪ 4.4.1 Estandarización de la técnica cromatográfica para la cuantificación del eucaliptol en la miel.....	62
▪ 4.4.2 ... Extracción del cineol en las muestras de jarabe de hoja y de esencia de eucalipto.....	69
▪ 4.4.3 Extracción del cineol en las muestras de miel de hoja y de esencia de eucalipto.....	75
▪	
CONCLUSIONES.....	87
▪	B
IBLIOGRAFÍA	89
▪5 ANEXOS.....	93
▪5.1 Tabla 20. Determinación del contenido de humedad*	93
▪5.2 FORMULAS ESTADISTICAS.....	93
▪5.3..... CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO	95
5.3 CÁLCULOS DE LA CUANTIFICACIÓN DEL CINEOL EN LAS MUESTRAS	

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Alimentador de colmenas	8
Figura 2. 1,8-cineol	11
Figura 3. Hojas de eucalipto <i>eucalyptus sp</i>	22
Figura 4. Levantamiento de la tapa	25
Figura 5. Retiro de marcos con de la colmena para recolección de miel express	25
Figura 6. Instalación de marcos vacíos	25
Figura 7. Alimentación de la colmena de miel express de esencia de eucalipto	25
Figura 8. Centrífuga para marcos de miel.	26
Figura 9. Esquema de muestras de miel recolectadas de las colmenas	27
Figura 10. Titulación de acidez en miel de abejas	29
Figura 11. Refractómetro Abbé	31
Figura 12. Proceso de cuantificación de proteína	31
Figura 13. Determinación de azúcares reductores	33
Figura 14. Colmena de abejas de miel express	38
Figura 15. Abejas tomando jarabe	38
Figura 16. Apiario LOS ALPES PRONAR Ltda	39
Figura 17a. Jarabe de hojas de eucalipto	39
Figura 17b. Jarabe de esencia de eucalipto	39
Figura 18. Forma de suministro de jarabe a las colmenas de miel express	40
Figura 19. Cantidad de miel obtenida en una alimentación de una colmena	42
Figura 20. Miel express almacenada	43
Figura 21. Comparación de la humedad con respecto al almacenamiento en las colmenas de miel express de esencia de eucalipto	50
Figura 22. Comparación de la acidez en las muestras de miel de esencia de eucalipto	52

Figura 23. (a) Sacarosa; (b) Glucosa; (c) Fructosa	54
Figura 24. Comparación de azúcares reductores con el almacenamiento	54
Figura 25. Porcentaje de humedad entre las diferentes condiciones de almacenamiento de la miel express de hoja de eucalipto	58
Figura 26. Comparación de la humedad entre los dos tipos de miel express	58
Figura 27. Comparación del porcentaje de cenizas entre los tipos de miel express	59
Figura 28. Comparación de azúcares reductores con la condición de almacenamiento	61
Figura 29. Cromatograma de la curva de calibración del patrón 1,8-cineol (0.30 a 0.65 ppm)	64
Figura 30. Curva de calibración del patrón de cineol de 0.30ppm a 0.65 ppm	64
Figura 31. Cromatograma de la extracción de la muestra de jarabe de hoja de eucalipto	70
Figura 32. Comparación de las concentraciones del cineol en las muestras de jarabe de hoja de eucalipto	72
Figura 33. Cromatograma de la extracción de la muestra de jarabe de esencia de eucalipto	73
Figura 34. Comparación de las concentraciones del cineol en las muestras de jarabe de esencia de eucalipto	74
Figura 35. Comparación de la concentración del cineol en todas las muestras de los dos tipos de jarabe	75
Figura 36. Cromatograma de la extracción del cineol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto	76
Figura 34 Cromatograma de la extracción del cineol en las muestras de miel express de hoja de eucalipto	76

Figura 38. Concentración del cineol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto almacenadas a temperatura ambiente	79
Figura 39. Condiciones de concentración del cineol entre las muestras almacenadas a temperatura ambiente de la miel express de esencia de eucalipto	80
Figura 40. Comparación de concentración del cineol entre las muestras de la miel express de esencia de eucalipto	80
Figura 41. Concentración del cineol en las muestras de miel express de hoja de eucalipto pasteurizada a temperatura ambiente	84
Figura 40. Comparación de la concentración del cineol entre las muestras almacenadas a temperatura ambiente	84
Figura 41. Comparación de la concentración del cineol entre las muestras almacenadas a temperatura ambiente y 4°C	84
Figura 42. Comparación de la concentración del cineol entre las muestras almacenadas a temperatura ambiente y 4°C	85
Figura 43. Curva de la desviación estándar versus concentración para hallar límites de cuantificación y detección	95
Figura 44. Curva de las áreas obtenidas versus concentración para hallar límites de cuantificación y detección	96
Figura 45. Curva de calibración del patrón de cineol (0.3 a 0.65 ppm)	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la miel natural	2
Tabla 2. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en el estudio de las colmenas	41
Tabla 3. Cuadro comparativo del tiempo de producción de la miel express.	42
Tabla 4. Datos obtenidos en las colmenas de jarabe de hoja de eucalipto	43
Tabla 5. Datos obtenidos en las colmenas de jarabe de esencia de eucalipto	44
Tabla 6. Características organolépticas de las muestras de miel express de hoja de eucalipto	45
Tabla 7. Características organolépticas de las muestras de miel express de esencia de eucalipto	46
Tabla 8. Requisitos fisicoquímicos para la miel de abejas tipos I y II según NTC 1273	47
Tabla 9. Datos obtenidos de las muestras de miel express de esencia de eucalipto	48
Tabla 10. Datos obtenidos de las muestras de miel express de hoja de eucalipto	57
Tabla 11. Límite de detección y límite de cuantificación	65
Tabla 12. Optimización del tiempo de extracción por ultrasonido	67
Tabla 13. Determinación de la repetitividad del método de extracción	68
Tabla 14. Determinación de la reproducibilidad del método	69
Tabla 15. Concentración del cineol en las muestras de jarabe de hoja de eucalipto	70
Tabla 16. Concentración del cineol en las muestras de jarabe de esencia de eucalipto	73

Tabla 17. Resultados obtenidos de la concentración del eucaliptol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto	78
Tabla 18. Concentración obtenida del cineol en la miel express de hoja de eucalipto	83
Tabla 19. Determinación del contenido de humedad	93
Tabla 20. Curva de calibración del 1,8-cineol de 0.10 a 0.25 ppm.	95
Tabla 21. Repetitividad de un patrón de 0.45 ppm de cineol en tres días consecutivos.	97
Tabla 22. Reproducibilidad del método de cuantificación para un patrón de 0.45 ppm de cineol cada 8 días durante un mes.	97
Tabla 23. Determinación de la concentración de una solución de 0.45 ppm de patrón de cineol	98

RESUMEN

La miel se define como la sustancia dulce producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas que las abejas recogen, transforman, y combinan con sustancias específicas propias, y almacenan y dejan madurar en los panales¹. La miel express es producida por las abejas al alimentarse con jarabes elaborados con jugos de fruta o plantas medicinales y azúcar, cuya principal característica es la de adquirir el sabor y aroma de la sustancia de la cual proviene.

Al elaborar jarabes con la planta de eucalipto para alimentar a las abejas y así obtener la miel express, se esperaba encontrar la presencia del principio activo de la planta en la miel, logrando enriquecer el producto especialmente en sus propiedades medicinales. Para comprobar, su grado de incorporación, se identificó y cuantificó el eucaliptol (1,8-cineol) que es el aceite esencial del eucalipto, tanto en los jarabes preparados como en la miel express obtenida. Para ello se realizó una extracción de los volátiles en la miel utilizando el método de ultrasonido y una mezcla de solvente orgánico éter:hexano (2:1). Luego se inyectó en un cromatógrafo de gases y se identificó con un patrón de cineol mediante un detector de ionización de llama y una columna HP-5MS. Para verificar la eficiencia de incorporación del eucaliptol a la miel express, se partió de dos jarabes preparados de forma diferente, el primero, a partir de la esencia pura del eucalipto y el segundo incorporando las hojas de la planta al jarabe. Se complementó el análisis por medio de estudios fisicoquímicos y análisis de calidad sobre el jarabe y la miel express obtenida.

¹ BERNAL RAMIREZ, Inés. Análisis de alimentos. Santafé de Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1993, 84-85

1 MARCO TEÓRICO

La miel es un líquido viscoso, transparente, de color ámbar hasta pardo, de acuerdo con la procedencia con el tiempo se enturbia por cristalización de la glucosa, mientras que la fructosa queda en solución.

1.1 DEFINICIÓN DE MIEL

“La miel es el fluido viscoso dulce elaborado por las abejas del néctar obtenido de los nectarios de las plantas, principalmente de las flores. Después de ser transportado a la colmena en el estómago melífero, este fluido se madura y almacena en el panal para servir de alimento”².

Otra definición de miel según la norma Codex para miel es: “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 invertido.”²

Hay que observar que existen mieles procedentes de líquidos vegetales diferentes al néctar de las flores, como las mieles de coníferas y hay mieles tóxicas procedentes del néctar de plantas venenosas.

Además del azúcar invertido, en la miel puede encontrarse sacarosa y pequeñas cantidades de gomas, dextrina, enzimas, ceras, sustancias

² NORMA DEL CODEX PARA LA MIEL, (citado 28-nov-2005) disponible en la página web: http://www.agrobit.com.ar/Info_tecnica/alternativos/apicultura/AL_000011ap.htm

colorantes y aromáticas, granos de polen, ácidos orgánicos y sustancias minerales, principalmente fosfatos”.¹

1.1.1 Composición de la miel natural

La miel de abejas está compuesta en su mayoría por azúcares y agua, pero también se encuentran presentes otro tipo de nutrientes (tabla 1) como minerales (cenizas), proteína y otros.

Tabla N° 1. Composición química de la miel de abejas natural³

COMPONENTE O CARACTERÍSTICA	VALORES PROMEDIO
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido.	65.0
Contenido de sacarosa % (g/100g).	5.00
Contenido glucosa % (g/100g).	38.0
Humedad % (g/100g)	20
Sólidos insolubles en agua % (g/100g)	0.30
Cenizas % (g/100g)	0.6
Acidez expresada como miliequivalentes de ácido/kg.	40
Hidrometilfurfural (HMF), expresado en mg/kg	8.0*
Índice de diastasa.	

*Para las mieles con bajo contenido enzimático, el índice mínimo de diastasa en la escala de Gothe será de 3.0 siempre y cuando no exceda en el contenido en HMF de 15 mg/kg.

³ KIRK, R.S., SAWYER, R. y EGAN, H. *Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson*. 2 ed. México: Compañía Editorial Continental, 1996. p. 11-35, 319-323, 695-721.

1.2 TIPOS DE MIEL DE ABEJAS

Según la época de producción se diferencia entre **miel de primavera** (producida hasta finales de mayo), **miel principal** (producida en junio y julio) y **miel tardía** (producida en agosto y septiembre). De acuerdo con el origen vegetal, se diferencian entre **miel de flores** y **miel de rocío** (la primera es la obtenida del brezo, tilo, acacia, romero, árboles frutales, etc.). Es transparente espesa cuando es fresca. La miel de rocío es la que procede del abeto, abeto rojo o de hoja, y se solidifica con dificultad. En general, es menos dulce y no es extraño que exhiba olor y sabor especiados, resinosos.⁴

1.3 MIEL EXPRESS

“Se le denomina miel express, a la miel elaborada por las abejas en la colmena al consumir jugos naturales de frutales, leche, etc., resultando un exquisito producto que reúne las propiedades de la miel de abejas y del jugo administrado”.⁵

1.4 TIPOS DE ALIMENTACIÓN DE LAS ABEJAS

Tomando en cuenta el irrefutable hecho de que el alimento complemento de las abejas es la miel, debemos considerar otras alternativas alimentarias que según las circunstancias nos pueden ayudar a solucionar un problema nutricional de la familia, evitándole así situaciones de hambre que comprometan la integridad de las abejas o bien para estimular la postura que esté retrasada por parte de la reina⁶.

⁴CONSUMER.ES EROSKY, Fundación EROSKY boletines alimentación , la miel, (citado 29-09-2005) http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/miscelanea/2001/04/10/35025.php

⁵ Apiario los ALPES- Javier de Jesús Arroyave

⁶ **ING. AGR. OSCAR BARALDI**, (citado 14-NOV-2005) **Agro noticias online, diciembre de 2002, alimentación de abejas, disponible en** http://www.rosario.com.ar/agronoticias/archivos/dest_1.htm.

Se debe tomar la decisión de alimentar artificialmente a las abejas cuando la cámara de cría contenga menos de 10 kilogramos de miel de reserva (aproximadamente 4 marcos de miel operculada). Se debe buscar un equilibrio que sea beneficioso para ambas partes, a saber, el apicultor y las abejas.

A continuación se detalla la preparación de algunos alimentos como sustituto para las abejas:

1.4.1 Azúcar Granulada o Azúcar Flor (SECA)

Se utiliza principalmente en situaciones de escasez en el cual es necesario proporcionar un alimento en forma urgente a aquellas familias que ya no cuentan con reservas de miel. La administración de este producto es bastante útil para prevenir casos de pillaje, ya que no hay emisión de olores que alteren la tranquilidad del apiario. Se aplica por lo general sobre un papel o cartón que se ubica directamente sobre los cabezales de los marcos. De esa manera las abejas acceden fácilmente a consumirla⁶.

1.4.2 Jarabe Nutritivo

Se trata de un jarabe espeso a administrar con el mismo objetivo anterior. Se prepara con: 2 kg de azúcar + 1 L de agua. Se hierve a fuego lento por un lapso de 10-15 minutos. Es necesario mantener una temperatura tal que evite que el azúcar se queme. Dejar enfriar el jarabe y administrar al atardecer, para evitar así actos de pillaje. Es recomendable poner piquera para evitar un posible pillaje en las colmenas alimentadas⁶.

1.4.3 Pasta de Azúcar

Se utiliza a inicio de la temporada, recién salida de invierno teniendo la característica de ser semisólida. Se prepara con: 4 kg de azúcar + 1 L de agua.

Todo esto se calienta a fuego lento, esto se debe revolver constantemente para evitar que se queme o se caramelize. Se retira del fuego al momento que se evapora el agua. Revolver por algunos minutos y extender en una capa delgada en una bandeja la pasta, la que una vez enfriada se troza y se distribuye⁶.

1.4.4 Pasta Alimenticia

Además de suministrar miel, la adición de leche en polvo contribuye a suplir la deficiencia de polen que pudiera tener la familia. Se prepara de la siguiente manera. Se mezcla: 20 % de miel, 20 % de leche en polvo o Sustituto lácteo para terneros, 60 % de azúcar granulada o azúcar flor⁶.

1.4.5 Jarabe estimulante

Especial para estimular la postura de la reina. Se recurre a él también en casos de crianza de reinas. Se debería proporcionar unos 30- 45 días antes de la fecha en que se inicia la gran mielada o recolección de néctar. Su preparación es a partes iguales entre azúcar (o miel) y agua, es decir: 1 L de agua + 1 kg de azúcar o miel. Se hierve a fuego lento minutos removiendo constantemente, Se debe suministrar al atardecer, debido a la posibilidad de desarrollarse pillaje en el apiario. Se recomienda ir paulatinamente aumentando la administración de este jarabe día por medio⁶.

1.4.6 Candy

Se utiliza prácticamente para alimentar reinas que serán enviadas a lugares distantes. El candy se prepara con miel extraída de muy buena calidad o bien utilizando azúcar flor. Es necesario constatar la ausencia de almidón en el azúcar, debido a que es perjudicial para las abejas. Su preparación consiste en licuar la miel hasta unos 60 C° y dejar enfriar hasta unos 38 C°, momento en que se

adiciona azúcar flor hasta transformar la mezcla en una masa dura no pegajosa. A continuación se espolvorea azúcar sobre una superficie lisa en la cual se amasará la pasta recién confeccionada al igual que la masa de pan⁶.

1.5 ALIMENTADORES DE COLMENAS DE MIEL⁷.

Se han inventado y ofrecido en el comercio, cientos de tipos de alimentadores. Algunos son muy complicados, y los más poco útiles. Si se desea gastar poco dinero, se puede utilizar como alimentador una olla común de hojalata; esta olla se llena de jarabe y se pone encima de la colmena. Sobre la parte superior del jarabe se coloca un poco de bramante que haya sido previamente humedecido con agua. Las abejas se arrastrarán sobre la tela de bramante sin riesgo de ahogarse.

1.5.1 ALIMENTADORES ATMOSFÉRICOS

Se trata de un frasco cualquiera, de boca ancha, lleno con jarabe, cubierto con un platito común y luego invertido; este dispositivo constituye un excelente alimentador para abejas. Para que la salida del jarabe sea efectiva, conviene colocar tres o cuatro mondadientes entre el platito y el frasco. A medida que las abejas sacan jarabe, entrará aire en el frasco, asegurando en esta forma la salida del líquido.

Puede fabricarse un alimentador atmosférico mucho mejor con un frasco de boca ancha con tapa de rosca; en la tapa se practican algunos agujeritos de diámetro como el de la sección de un alfiler. Se llena el frasco con el jarabe, se enrosca la tapa y se invierte. Este alimentador se coloca mediante cualquier dispositivo apropiado, en forma tal que se asegure con las pilladoras y las abejas puedan ir

⁷ Root A. I., ABC y XYZ DE LA APICULTURA, Enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas, A. I. ROOT COMPANY, Medina, Ohio, Estados Unidos de América, 1986, pág 15.

debajo de él a tomar el jarabe que sale a través de los agujeritos antes mencionados.

Basado en el alimentador descrito, los fabricantes construyeron uno especial que viene acompañado de un trozo de madera perforada para que pueda enchufarse el frasco invertido. La pieza de madera retiene el frasco alrededor de un centímetro del fondo de la cavidad del bloque. A través del fondo hay una muesca o ranura que comunica con la piquera cuando el alimentador es aplicado a la colmena. El bloque termina por una saliente que se inserta en la piquera.



Figura 1 Alimentador de colmenas.

1.6 PLANTAS MEDICINALES⁸

Plantas medicinales son todas aquellas plantas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general. Se calcula en unas 260.000 las especies de plantas que se conocen en la actualidad, de las que el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas en los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas, por presentar algún uso, evidentemente, sobre todo en las

⁸ Plantas Medicinales, FITOMED II P La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1993, (citado 23-OCT-2005) http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol21_3_02/ibi12302.htm

regiones ecuatoriales, la proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora.

El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos en general. Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar), que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. El primer heterósido que se descubrió fue la salicina (extraído de *Salix alba*). Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas.

1.7 EUCALIPTO

Entre las plantas medicinales predominantes en el departamento del Cauca, se encuentra el eucalipto que es utilizado como tratamiento para enfermedades del sistema respiratorio.

1.7.1 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Nombre científico: *Eucalyptus sp.*

Nombre común: "Eucalipto" (Perú), "eucalipto", "ocalito" (Costa Rica) **Familia:** Myrtaceae

1.7.2 DESCRIPCIÓN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Árbol de gran porte que puede rebasar los 100m de altura, verde todo el año. Hojas largas y estrechas, ligeramente curvadas, puntiagudas y de borde entero, coriáceas.

Especie ampliamente distribuida en el continente australiano entre los 15°30' y los 38°C, en el que ocupa grandes superficies a lo largo de los ríos, formando masas puras. Ha sido introducido con éxito en diferentes regiones del mundo. En Argentina se ha adaptado muy bien a las condiciones más diversas de suelos y climas, soportando bien los fríos de invierno y calores fuertes de verano, como así mismo las sequías y los terrenos inundados. Se distinguen dos formas, una meridional o templada y otra tropical.⁹

1.7.3 COMPOSICIÓN, PROPIEDADES Y APLICACIÓN

Dentro de su composición química se destaca su contenido en aceite esencial, cuyo principal constituyente es el cineol o eucaliptol (éter óxido terpénico). Contiene también: terpineol, carburos terpénicos (alfa-pineno), alcoholes alifáticos y sesquiterpénicos (eudesmol), aldehídos (butírico, valeriánico, caprónico) y cetonas. Posee además taninos (sustancia detoxificante), pigmentos flavónicos (heterósidos del quercetol) y un heterósido fenólico complejo, el caliptósido, ácidos fenólicos (gálico, caféico), resina y un principio amargo.

Sus acciones, debidas fundamentalmente al aceite esencial, son: Antiséptico de vías respiratorias y urinarias, por eliminarse su esencia a nivel pulmonar y por riñón, expectorante y balsámico, por estimulación directa de las células secretoras de la mucosa bronquial, hipoglucemiante, vermífugo (contra los gusanos

⁹ ADEFOR. 1995. Comportamiento de 25 procedencias de 3 especies forestales del género *Eucalyptus* (*E. camaldulensis* Dehn, *E. maculata* Hook. F. y *E. tereticornis* Sm.) en Chancay (Cajamarca, Perú). Informe de investigación N° 5. ADEFOR. 24 pp

intestinales), antibiótico (específico para toxina tetánica, diftérica, bacterias Gram.+, por su contenido en esencia y tanino), antifúngido y antiinflamatorio.¹⁰

En uso externo es balsámico, antiséptico y cicatrizante. Las hojas contienen taninos, resinas, etc., y sobre todo **esencia de eucalipto**, compuesta de 1,8-cineol o eucaliptol 80% y otras sustancias.

Se usa en afecciones respiratorias: bronquitis, gripes, faringitis, sinusitis, tos irritativa, asma, etc. Infecciones urinarias, parásitos intestinales, diabetes. En uso externo para dermatosis, úlceras varicosas, etc. Puede ser neurotóxico por acelerar el metabolismo hepático de algunos anestésicos, analgésicos y tranquilizantes. A dosis elevadas su aceite esencial puede producir molestias gástricas, hematuria, proteinuria, náuseas, taquicardia, convulsiones y delirio. No se recomienda tomar durante el embarazo y lactancia.

1.7.4 ACEITES ESENCIALES

Llamados también aceites volátiles, etéreos y esencias, porque se creyó que en su olor y sabor se concentraba la quinta esencia de las plantas, difieren en composición y en propiedades de los ácidos grasos o fijos que se componen de glicéridos y de los aceites minerales que se componen de hidrocarburos.

EUCALIPTOL

Es el aceite esencial de la planta de eucalipto. El eucaliptol (1,8-cineol) es un éter óxido terpénico soluble en hexano, etanol, éter y cloroformo. No sólo incrementa la fase secretoria bronquial sino también disminuye la tensión superficial entre agua y aire en la superficie del alveolo, lo cual contribuye con la acción

10. Plantas Medicinales, FITOMED II P La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1993, (citado 23-OCT-2005) http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol21_3_02/ibi12302.htm

expectorante. También ha demostrado ser un buen inductor enzimático a nivel del hepatocito, promoviendo la metabolización de algunos medicamentos.¹¹

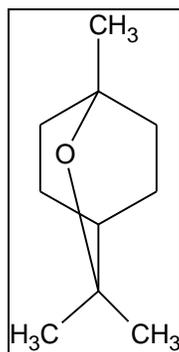


Figura 2 1,8-cineol

1.8 TÉCNICAS DE ESTUDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MIEL DE ABEJAS

Estudios de la composición del aroma de la miel como en todos los productos alimenticios, tradicionalmente involucra los extractos aromáticos. El aroma de la miel es muy complejo ya que existen más de diez compuestos volátiles. El aislamiento de la fracción volátil de la miel es llevado a cabo usando diferentes técnicas. Como un resultado, la composición de los aromas obtenidos es muy dependiente del procedimiento empleado.¹²

Existen diferentes técnicas de estudios de compuestos volátiles en la miel como por ejemplo:

¹¹ Plantas Medicinales, FITOMED II P La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1993, (citado 23-OCT-2005) http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol21_3_02/ibi12302.htm

1.8.1 Hidrodestilación (HD) y destilación de vapor microsimultánea (MSDE)

La técnica más utilizada para la obtención de los aceites volátiles, tanto a nivel industrial como de laboratorio, es la destilación. De ella existen tres modalidades: a) hidrodestilación; b) destilación en corriente de vapor de agua y c) mixta.

a) Hidrodestilación : La droga está sumergida en el agua dentro de un recipiente o alambique que se calienta directamente hasta ebullición.

b) Destilación en corriente de vapor: La droga se sitúa en un alambique a través del cual se hace pasar vapor de agua generado en otro recipiente.

c) Destilación mixta : El vapor se produce en el mismo recipiente o alambique en el que se encuentra la planta, sostenida sobre el nivel del agua por una rejilla metálica.

Son las técnicas más comunes usadas para extracción de volátiles de una matriz. Sin embargo en el caso de la miel, tales condiciones drásticas llevan a la formación de productos, principalmente debido al efecto del calor en azúcares. Además, los compuestos sensibles son altamente oxidados o descompuestos y surgen nuevos componentes no correspondientes al aroma de la miel.¹³

1.8.2 Extracción por ultrasonido asistido (USE)

Ha sido recientemente introducido en el análisis del aroma de los volátiles de la miel. Este proceso no requiere calor y se evita la formación térmica de artefactos. Se aíslan por esta técnica, compuestos de bajo y alto peso molecular, supliendo buenos potenciales marcadores para la determinación del origen de la miel.¹²

La principal ventaja de este método consiste en que es un proceso muy suave, se usa en aquellos casos en que el contenido en esencia es bajo o cuando sus

constituyentes son muy delicados. Los disolventes utilizados clásicamente son: éter etílico, éter de petróleo, hexano y benceno. Una vez extraída la esencia se elimina el solvente a presión reducida. El residuo obtenido se denomina "concreto de esencia" y por lo general es de consistencia semisólida debido a otras sustancias acompañantes (ceras y otros). Se purifica por tratamiento con alcohol absoluto y constituye la "esencia absoluta".

1.8.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

Aísla el aroma de espacio de cabeza (fase gaseosa) de una muestra matriz que se encuentra en un vial. Ha sido reciente mente introducida en la industria de alimentos y es ampliamente usada en los análisis de los compuestos volátiles. En el caso de la miel los datos en la literatura son escasos.¹²

1.9 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es la técnica analítica de separación que ha experimentado un desarrollo más espectacular desde sus inicios en los años cincuenta. Se ha utilizado para resolver numerosos problemas en la industria, medicina, biología y análisis ambiental. Actualmente se emplea como técnica de rutina y control en una gran variedad de áreas.

Esta técnica cromatográfica es la que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles. Los solutos deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización.

¹² Eleftherios Alissandrakis, Petros A Tarantilis, *J Sci Food Agric* **85**:91–97 (2005).

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser: a. un líquido adsorbente o b. un líquido retenido en un soporte sólido. Hay dos tipos de cromatografía de gases:

- Cromatografía de gas-sólido (CGS): (cromatografía de adsorción).
- Cromatografía de gas-líquido (CGL): (cromatografía de partición).

El fundamento de las separaciones mediante CGS se encuentra en las diferencias en volatilidad de la mezcla de los solutos a separarse y en su capacidad para ser absorbidos por el sólido activo. En el caso de las separaciones por CGL, tienen como fundamento las diferencias en volatilidad de la mezcla de los solutos a separar.

Los principios teóricos de CG no difieren básicamente de los estudiados para la cromatografía en general. De hecho, el concepto dinámico del plato teórico (Ecuación de Van Deemter) es el que más se adecua a la situación experimental de la CGL.

La CGS es mucho menos utilizada que la CGL debido a que presenta los problemas siguientes:

- a. Falta de linealidad de las isotermas de adsorción (variación de la relación de distribución con la concentración), lo que da lugar a picos asimétricos, volúmenes de retención dependientes del tamaño de muestra y recuperación incompleta para algunos solutos.
- b. Tiempos de retención excesivamente grandes, en especial, para moléculas voluminosas y polares, las cuales necesitan una temperatura elevada para conseguir tiempos o volúmenes de retención adecuados, lo que pueden afectar

a la estabilidad térmica de las mismas; por ello, el campo de aplicación de la CGS se restringe normalmente a solutos de bajo peso molecular.

- c. Falta de reproducibilidad debido a que los sólidos adsorbentes son más difíciles de estandarizar y preparar de forma reproducible que los líquidos. Además la variedad de adsorbentes comercialmente asequibles es mucho menor que la de fases líquidas utilizables en CGL.

A pesar de estos inconvenientes, existen algunas razones que justifican el empleo de la CGS en casos concretos:

- a. La selectividad es frecuentemente mayor en la separación de gases inorgánicos, isómeros geométricos e hidrocarburos de bajo peso molecular.
- b. Los sólidos adsorbentes son más estables frente a la temperatura y el oxígeno que las fases líquidas.

Con todo, la CGL es la técnica utilizada normalmente y a ella se refiere fundamentalmente el término CG.

En lo referente al cromatógrafo de gases, es de destacar que este actúa globalmente como instrumento, ya que utiliza tanto la separación como la determinación cualitativa y cuantitativa de los solutos. Por tanto, la CG se encuadra dentro de las técnicas de separación que tienen incorporado un sistema de detección, generalmente continuo (on-line)

En CG, la mezcla de solutos, una vez volatilizada, se hace pasar a través de una columna con la ayuda de un gas portador, basándose la separación en la distinta velocidad de los solutos, estos van llegando al sistema de detección. Las señales del detector registran una serie de picos que constituyen el cromatograma. El

tiempo de retención se utiliza con fines cualitativos, mientras que el tamaño de los mismos se relaciona con la concentración de los solutos.

El origen de la miel ha sido estudiado y caracterizado mediante sus propiedades palinológicas y fisicoquímicas, además de su análisis de calidad, el cual también se usa como método analítico para su clasificación, éstos han sido validados y concordados por la Internacional Honey Comisión y puede ser usado con el alcance del Codex de Alimentarios Honey Standard¹³. Estos métodos son difundidos en la página web del Internacional Honey Comisión (IHC) y son constantemente mejorados. Se realizan diferentes estudios como: medida de color, actividad óptica, conductividad eléctrica, carbohidratos, pH y acidez; contenido de diastasas, porcentaje de agua, hidroximetilfurfural, análisis de compuestos volátiles, volátiles marcadores específicos, aminoácidos y proteínas.¹⁴

El estudio de los volátiles en mieles por cromatografía de gases es el mejor método, ya que estos compuestos pueden interactuar fácilmente con la columna cromatográfica. Para este estudio se requiere un paso anterior a la inyección de estos, puesto que la miel es una mezcla compleja de azúcares la cual puede dañar la columna cromatográfica. Por lo tanto, se realiza la extracción con cualquier método de los nombrados anteriormente y posteriormente se recurre a la inyección en el cromatógrafo de gases aplicando unas condiciones dependiendo de los compuestos a analizar. En estudios anteriores se ha utilizado la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas usando una rampa de temperatura y operando el espectrómetro de masas con el modo de impacto del electrón lo cual ha dado buenos resultados sobre los volátiles.¹⁵

En cuanto a los estudios realizados a las mieles derivadas de plantas como eucalipto, se ha llevado a cabo la extracción de sus volátiles y posteriores análisis

¹³ Codex Alimentarios (2001) (citado 28-NOV-2005) <http://www.vfu.cz/acta-vet/vol74/74-147.pdf>

¹⁴ Stefan Bogdanov, Kaspar Rufo, Livia Persano, Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review, Internacional Honey Comisión, 11 junio 2004

por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas. Se ha logrado identificar algunos compuestos orgánicos volátiles como marcadores característicos de su origen volátil, realizando una previa extracción por espacio de cabeza, purga y trampa o microextracción en fase sólida, obteniendo algunos tipos de carotenoides y algunas hidroxi-acetonas como originarios del árbol de eucalipto.^{15,16}.

En este proyecto se estudió la elaboración de una miel express de eucalipto alimentando las abejas con jarabes de hoja de la planta y con esencia al 99%. Esta miel fue sometida a análisis fisicoquímicos para examinar sus parámetros funcionales en diferentes formas de almacenamiento. Después se realizó la estandarización del método de cuantificación del eucaliptol en la miel express de eucalipto elaborando una curva de calibración con un patrón del terpeno 1,8-cineol evaluando sus diferentes parámetros como linealidad y sensibilidad. Luego se dopó una muestra de miel normal, habiéndose asegurado previamente que no contenía el volátil en ella (realizando una extracción e inyectando en el cromatógrafo de gases), y se extrajo por el método de ultrasonido estudiando los datos estadísticos como reproducibilidad y repetitividad. Una vez realizada la estandarización de este método, se procedió a ejecutar la extracción del cineol en una miel express de eucalipto y la cuantificación obteniendo buenos resultados en todas las muestras.

¹⁵ B.S. Radovic, Contribution of dynamic headspace CG-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey, Food Chemistry, ELSEVIER, 72:511-520 2001.

¹⁶ Piasenzotto Lara, Solid Phase Microextraction (SPME) applied to honey quality control, Journal of Science and Agriculture, 83:1037-1044, 2003, Society of Chemical Industry.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar el terpeno eucaliptol (1,8-cineol), en la miel express de eucalipto (*Eucalyptus sp.*), por cromatografía de gases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar la técnica de extracción del 1,8-cineol presente en la miel express por ultrasonido a temperatura constante.

Estandarizar el método para la cuantificación de 1,8-cineol por cromatografía de gases.

Identificar y cuantificar 1,8-cineol en el jarabe proporcionado a las abejas y en la miel express obtenida.

Evaluar la calidad de la miel express de eucalipto mediante el análisis de los parámetros fisicoquímicos más importantes del jarabe y el producto obtenido.

Suministrar información al apicultor acerca de la calidad del producto elaborado en la región motivándolo a continuar con la elaboración de este tipo de productos y perfeccionar su trabajo en el mercado.

METODOLOGÍA

REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados para el desarrollo experimental, fueron de grado analítico.

Ácido sulfúrico 97% (Mallinckrodt)

Catalizador para proteína (tabletas kjeldalh) de Hg y Se (Merck)

Eter etílico 99.9% (Mallinckrodt)

Sulfato de cobre en cristales (Mallinckrodt)

Tartrato ácido de sodio y potasio en cristales (Mallinckrodt)

Azul de metileno

Almidón 1%

Fenolftaleína 1% en etanol

Patrón de sacarosa en cristales (Mallinckrodt)

Patrón de 1,8-cineol 99.9% (Merck)

Hexano HPLC (Fisher)

Ácido clorhídrico concentrado 99.9% (Mallinckrodt)

Hidróxido de sodio en lentejas 99.9% (Merck)

EQUIPOS

Para realizar los análisis fisicoquímicos, de calidad y de cuantificación del 1,8-cineol en las muestras de miel se emplearon los siguientes equipos.

Balanza analítica METTLER AE 200 (200g/ 0.0001)

Plancha CORNING PC -240

Horno WINDER WTB

Baño Maria ISOTEMP 205 Fisher Scientific

Refractómetro Abbé

Centrífuga Sorvall T6000B

pH-metro 744 Metrohm

Mufla Terrigeno F2PGA

Campana de extracción

Cromatógrafo de gases HP-6890

Microjeringa de 5 microlitros HAMILTON 87930

Ultrasonido Branson 15-10

MATERIA PRIMA Y ACCESORIOS PARA TRABAJO DE CAMPO

Colmenas

Vestimenta de protección

Palanca

Alzamarcos

Cepillo o escobilla de cerdas

Ahumador

Soportes de colmenas o banquillos

Carretilla de alzas

Centrífuga o extractor de miel

La parte experimental fue realizada en dos etapas, la primera, el trabajo en campo donde se preparan los jarabes, se alimentaron las colmenas y se cosechó la miel express. La segunda, el análisis en el laboratorio que consiste en los ensayos fisicoquímicos, y la cuantificación del terpeno en la miel, para verificar su calidad y la incorporación del principio activo.

TRABAJO DE CAMPO

Las hojas, la esencia de eucalipto y el azúcar hacen parte de la materia prima utilizada para preparar los jarabes que se proporcionan a las abejas. En cuanto a su tratamiento se tuvo en cuenta lo siguiente:

a. ELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS COLMENAS

Las colmenas utilizadas fueron propiedad del apiario Los Alpes PRONAR Ltda. La elección de las colmenas fue ejecutada por los trabajadores del apiario donde se tuvo en cuenta la fortaleza de la colmena, es decir, que tenga una cantidad razonable de abejas (entre 40000 y 120000 individuos) que produzcan la miel rápidamente.

Se trabajó en 6 colmenas (3 para obtener miel express de hoja de eucalipto y 3 para obtener la miel express de esencia de eucalipto), con el fin de obtener datos estadísticos que proporcionen certidumbre en los resultados. La preparación de estas colmenas se realizó de la siguiente forma: Se alimentaron con un jarabe que solo contenía agua y una fuente de carbohidratos por un período de tres días, garantizando así la saturación de los marcos de la cámara de cría con esta clase de jarabe evitando una posible mezcla entre la miel realizada a partir del néctar de las flores cercanas que posiblemente contengan alguna cantidad del terpeno en estudio con la miel express proyectada. Luego se procedió a alimentar las abejas con el jarabe de interés, y obteniendo la miel express de interés sin ser mezclada ni utilizada como alimento para las crías.

b. RECOLECCIÓN DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO

Se recolectaron hojas frescas de la especie *Eucalyptus sp.* descartando las que presentaron daños y seleccionando las de buena fragancia. Esta recolección se

realizó el día de la preparación de cada jarabe, para evitar pérdidas del aceite esencial en las hojas. La figura 3 muestra la forma de la hoja recolectada para preparar los jarabes.



Figura 3 Hojas de eucalipto *eucalyptus* sp.

c. PREPARACIÓN DE LOS JARABES

Para la preparación de los jarabes, se realizaron ensayos de relaciones agua:azúcar donde se logró obtener una densidad adecuada (1.29-1.33, recomendada por los apicultores) para una mejor apetencia por parte de las abejas. La relación agua: sacarosa: materia prima (hoja de eucalipto, esencia de eucalipto) fue de 1:2:1. Se prepararon dos tipos de jarabe, de hoja y de esencia, cada tipo de jarabe se realizó de modo que la concentración de eucaliptol en los jarabes de hoja y de esencia, sean aproximadamente iguales, es decir, el porcentaje de eucaliptol en la hoja es del 1% (según estudios realizados en las hojas de la planta)³⁴, por lo tanto, se intentó agregar la cantidad de eucaliptol al jarabe de esencia igual al que podrían aportar las hojas.

³⁴ C. Susana Albornoz P. de Ponce de León, Cátedra de Toxicología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán - San Lorenzo 456. C.P. 4000 - San Miguel de Tucumán, Argentina. Disponible en http://www.filo.unt.edu.ar/centinti/cehim/jornadas_antrop/practicas%20medicinales%20caseras%20con%20principios%20activos%20de%20vegetales.pdf.

PREPARACION DEL JARABE DE HOJA DE EUCALIPTO

El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera: se prepararon 6kg de jarabe para cada alimentación y se almacenó 1kg para análisis y la parte restante se proporcionó a las abejas para obtener una cantidad de aproximadamente 2-2.5kg de miel. El procedimiento para la elaboración del jarabe de hoja fue el siguiente: 1.72kg de agua se dejaron en ebullición durante 5 minutos y se agregaron 3.44kg de azúcar poco a poco hasta homogenizar la mezcla. Después de que el jarabe tomó una tonalidad acaramelada, se dejó enfriar un poco y se agregaron 0.80kg de hojas mezclando y se tapó herméticamente hasta el día siguiente.

PREPARACIÓN DE JARABE DE ESENCIA DE EUCALIPTO

El mismo procedimiento se realizó para el jarabe de esencia, pero, en este caso se dejó enfriar el caramelo hasta temperatura ambiente y luego se adicionó el volátil para evitar pérdidas por calentamiento del aceite esencial.

Después de realizar los jarabes, se dejan reposar durante un día antes de alimentar a las abejas.

d. ALIMENTACIÓN DE LAS ABEJAS

Se realizó la alimentación de las seis colmenas con los dos jarabes preparados, como se explicó anteriormente, con el fin de obtener datos estadísticos como soporte de los estudios realizados, para esto se llevó a cabo el siguiente tratamiento:

Se alimentó dos veces cada colmena con cada uno de los jarabes suministrados con el fin de obtener datos estadísticos en la cantidad del aceite esencial incorporado a la miel express fabricada por las abejas. El tiempo de suministro de

la alimentación a las abejas fue determinado por los apicultores de la siguiente forma: Se proporcionó el jarabe a las colmenas, utilizando un tipo de jarabe en cada colmena al mismo tiempo, es decir, se alimenta una colmena con jarabe de hojas de eucalipto y a la vez se alimenta otra colmena con el jarabe de esencia de eucalipto, teniendo en cada alimentación igualdad de condiciones climáticas. Las colmenas se revisaron cada tres días para observar la cantidad de jarabe consumido por las abejas y su estado de conservación. Una vez obtenida la muestra de miel en la primera alimentación, se retiraron los marcos llenos con la miel express de eucalipto y se realiza una segunda alimentación con los jarabes de eucalipto ya sea de hoja o de esencia. El tiempo contabilizado entre la alimentación de la colmena con el jarabe y la obtención de la miel express en los dos casos, fue un intervalo entre 9 y 10 días y con la preparación de la colmena de 13 días promedio.

RECOLECCIÓN O COSECHA DE MIEL

La recolección o cosecha de la miel express de eucalipto, se realizó por el personal del apiario donde se trabajó, el cual está capacitado para llevar a cabo esta operación.

Lo primero a tener en cuenta en la recolección de la miel fue el total consumo de los jarabes por parte de las abejas. Una vez verificado esto, se procedió a la recolección del néctar, utilizando un ahumador como defensa al ataque de la furia de las abejas (figura 4), se levantó la tapa que es la misma que cumple la función de alimentador. Se retiraron los marcos llenos de miel (figura 5) y se reemplazaron por nuevos marcos vacíos para la segunda alimentación (figura 6). Posteriormente, se realizó el suministro de jarabes (figura 7) recién preparados para la obtención de la segunda muestra de miel express.



Figura 4. Levantamiento de la tapa de la colmena para recolección de miel



Figura 5. Retiro de marcos con miel express



Figura 6. Instalación de marcos vacíos en la colmena para la segunda alimentación



Figura 7. Alimentación de la colmena de miel express de esencia de eucalipto

Una vez recolectados los marcos, se llevaron a centrifugación para extraer la miel express contenida en ellos y evitar dañar las celdas de cera para poder reutilizarlos (figura 8). Posteriormente se filtraron para eliminar los sólidos en suspensión como trozos de cera o extremidades de abejas y luego se envasaron en botes plásticos para ser llevados al laboratorio.



Figura 8 Centrífuga para marcos de miel.

TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE MIEL

Se obtuvieron en total 12 muestras de miel (6 de miel express de hoja de eucalipto y 6 de miel express de esencia de eucalipto), que se dividieron en cuatro condiciones diferentes como:

Pasteurizada a temperatura ambiente

Pasteurizada a 4°C

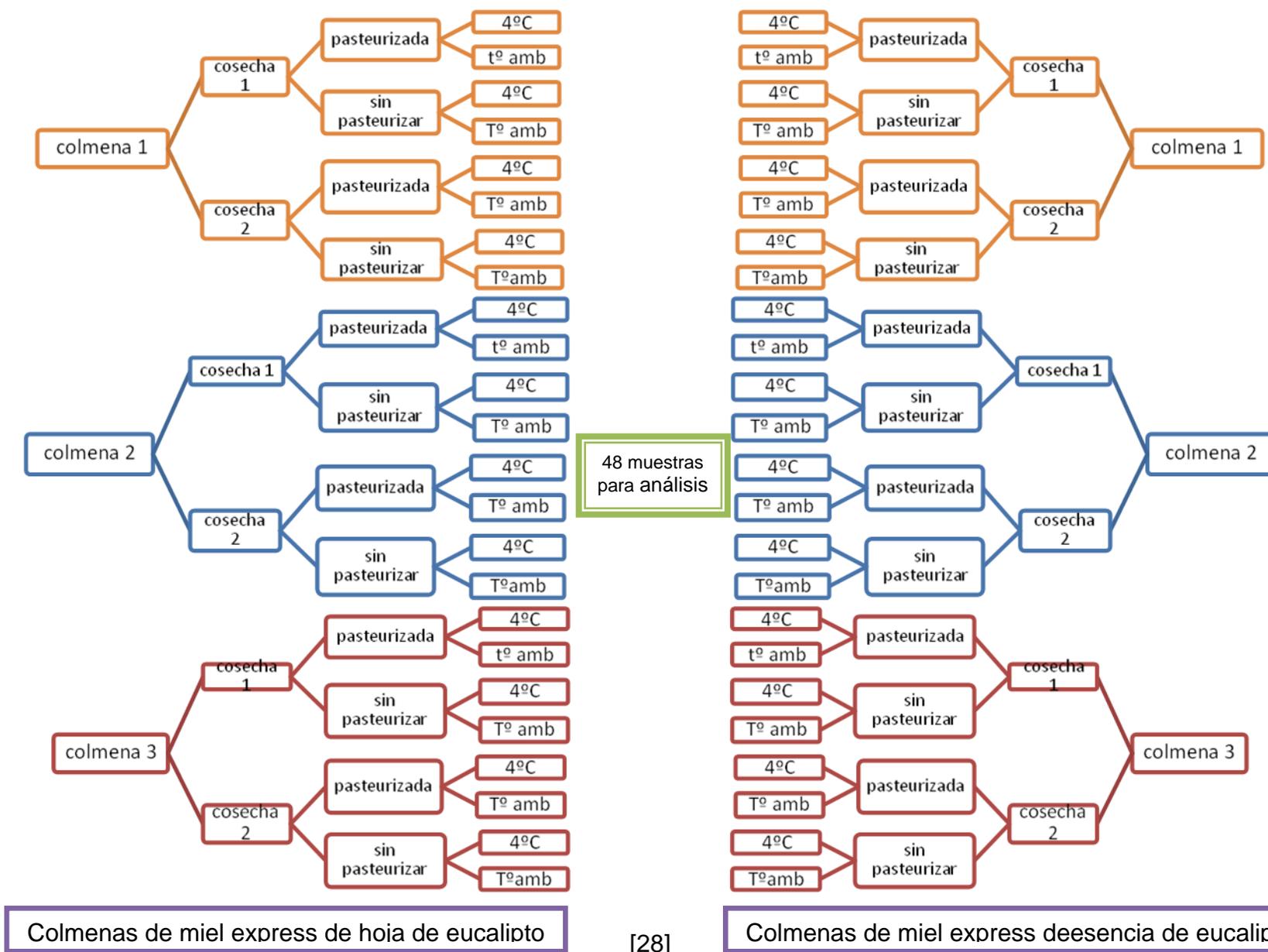
Sin pasteurizar a temperatura ambiente

Sin pasteurizar a 4°C

Envasados en frascos de vidrio de 250g. A partir de las 12 muestras de miel cosechadas se obtuvieron un total de 48 muestras de miel (figura 9) al almacenarlas para su posterior tratamiento y 12 muestras de jarabe para analizar en el laboratorio. La pasteurización de la miel se realizó calentando la muestra a 70°C por 1 minuto y bajando bruscamente la temperatura para eliminar levaduras que fermenten la miel.

Figura 4

Figura 5 Figura 9. Esquema de muestras de miel recolectadas de las colmenas



Las muestras de jarabe se almacenaron a 4°C para su posterior análisis. La miel de abejas es un alimento designado como un producto natural, que puede sufrir de diversos ataques por bacterias que se encuentran en el medio ambiente, por lo tanto las condiciones de almacenamiento que se establecieron fueron con el fin de evaluar cual de todas conservaba en mayor concentración y por más tiempo el principio activo incorporado a la miel.

Se esperaba una mayor conservación de la miel, es decir, una homogenización total sin cristalización alguna, en la miel pasteurizada a temperatura ambiente, ya que almacenada a 4°C podría causar cristalización debido a su baja temperatura.

ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS Y EL PRODUCTO TERMINADO

Se realizó un análisis fisicoquímico a las muestras de miel express y de jarabe para describir sus propiedades organolépticas y resaltar sus propiedades alimenticias. Este análisis se llevó a cabo de la siguiente manera:

Análisis de las muestras de jarabe

Todas las muestras de jarabe fueron analizadas al día siguiente de la preparación con respecto a su densidad, acidez, cenizas y humedad. Estos procedimientos se llevaron a cabo con el fin de verificar su buen estado físico y comparar sus resultados con los datos citados por la norma ICONTEC para una miel de tipo I (para consumo humano).

a. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Se pesó con una precisión de ± 0.0001 , 1.5000g de jarabe en un crisol previamente secado y pesado con su tapa, se llevó a una mufla a 550°C durante dos horas, se llevó a desecador y se pesó.

$$\% \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso cenizas}}{\text{Peso muestra}} \times 100\%$$

b. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

En una caja de petri limpia, seca y previamente pesada, se pesaron 10.0000g de muestra con precisión de ± 0.0001 , se llevó a estufa a 60°C durante tres días hasta obtener una muestra completamente seca, se dejó enfriando a temperatura ambiente en desecador y se pesó nuevamente.

$$\% \text{Humedad} = \frac{(\text{PESO MUESTRA HUMEDA} - \text{PESO MUESTRA SECA})}{\text{PESO MUESTRA HUMEDA}} \times 100\%$$

c. ACIDEZ

Se estandarizó una solución NaOH pesando 0.0300g del ftalato seco con una precisión de ± 0.0001 y se diluyó en agua, se agregaron 4 gotas de fenolftaleína y se tituló con el NaOH. Para la determinación de la acidez se pesó 1.0000g de miel y se diluyó en 150 mL de agua y posteriormente se tituló con el NaOH 0.0100 N estandarizado. La figura 6

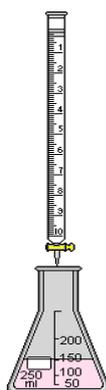


Figura 10 Titulación de acidez en miel de abejas

d. DETERMINACIÓN DE DENSIDAD

Se pesó un picnómetro hasta peso constante (con una precisión de ± 0.0001) y se aforó a su volumen con la muestra, se pesó nuevamente

18.

$$\text{densidad} = \frac{\text{peso picnómetro jarabe} - \text{peso picnómetro}}{\text{volumen jarabe}}$$

Análisis de las muestras de la miel express de eucalipto

Según los tratamientos de análisis de calidad para mieles propuestos por la AOAC¹⁹ y contempladas por la norma NTC 1273²⁰, se realizaron los siguientes estudios: Prueba cualitativa de hidroximetilfurfural, contenido de azúcares reductores, índice de diastasas, acidez y grados brix. Para análisis fisicoquímicos se tuvo en cuenta: densidad, humedad, cenizas y proteína. Las muestras de miel se analizaron al mes para determinar el efecto del almacenamiento sobre las mismas.

a. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La humedad se determinó por refractometría con un refractómetro Abbé (figura7), leyendo en él, el índice de refracción de la muestra de la siguiente manera: se colocó una pequeña gota de miel en el prisma donde se le hizo incidir un haz de luz y se ajustó su manualmente hasta que su dispersión fuera exactamente igual a la producida por el refractómetro y el líquido. Esto da una lectura que se convierte en contenido de humedad en porcentaje utilizando tablas teóricas presentadas en el anexo 1²¹.

¹⁸ H. Olga Ph. D., V. Patricia, Análisis de alimentos, Manual de prácticas de lab, Universidad Del Cauca, Facultad de Educación, Departamento de Química, Popayán, Mayo 2001, Pág 15

¹⁹ Ibid pág. 42

²⁰ Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, Norma 1273. Miel de Abejas. P. 93

²¹ William Horwitz, AOAC Oficial Methods Of Analisis (2000), the scientific of Analisis dedicated to Analytical excellence, Food composition; additives; natural contaminants, Sugar and sugar products, chapter 44, p 23, 17th edition, volumen II.



Figura 11 Refractómetro Abbé

b. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Se realizó por el método de Kjeldahl. Se pesó 1.0000g de muestra con 2.0000g de catalizador para proteína, se agregó 9 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calentó hasta obtener un color verdoso en la muestra, se dejó enfriar y se agregaron tres gotas de fenoltaleína. A parte en un erlenmeyer con una solución de 50 mL de ácido bórico al 4% y 50 mL de agua con dos gotas de indicador de tashiro donde se recoge el destilado, se lleva al equipo de destilación para proteína donde se instala también la muestra digerida. Se titula con HCl 0.1000 N la cantidad de nitrógeno como NH₃ que se depositó en el erlenmeyer por medio de la destilación y se obtiene el porcentaje de nitrógeno.

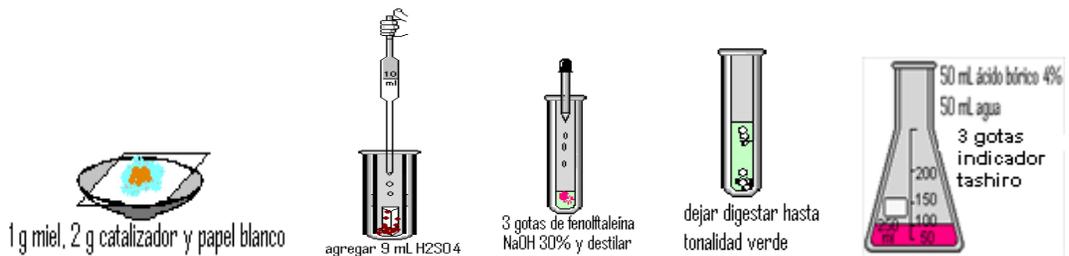


Figura 12 Proceso de cuantificación de proteína.

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{volumen de titulación con HCl(L)} \times [\text{HCL}] \times 14 \times F}{\text{peso muestra (g)}} \times 100\%$$

Donde F es el factor de conversión para proteína en alimentos (6.25)

c. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES

- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN A: (solución de fehling modificada) se pesó 17.4500g de sulfato de cobre pentahidratado y se diluyó en agua destilada hasta 250 mL. Debe prepararse un día antes de la titulación para asegurar la oxidación total en la solución.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN B: Se pesaron 86.5000 gramos de tartrato sódico-potasico penta hidratado y 25.0000g de NaOH y se diluyó en agua hasta 250 mL.

SOLUCIÓN PATRÓN: Se debe preparar 3 días antes de la titulación para que se inviertan totalmente los azúcares del patrón utilizado (en este caso la sacarosa). Se pesó 0.9500g de sacarosa pura con una precisión de ± 0.0001 y se adicionó 0.500 mL de HCl puro y 8 mL de agua destilada. Luego se diluyó la solución hasta 100 mL y se neutralizaron 50 mL de esta con NaOH 1 N y esta nueva solución se diluyó hasta 250 mL.

- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

TITULACIÓN PRELIMINAR: Se pesó 1.0000g de muestra y se disolvió en agua a 200 mL, esta solución se vertió en una bureta de 50 mL. A parte se vertieron 5 mL de la solución B, 5 mL de la solución A y 40 mL de agua en un erlenmeyer de 250 mL, se dejó en ebullición y se mantuvo durante 2 minutos, se agregó 1 mL de azul de metileno (1% en agua) y se procedió a su titulación con la muestra hasta obtener una coloración de rojo ladrillo en la solución.

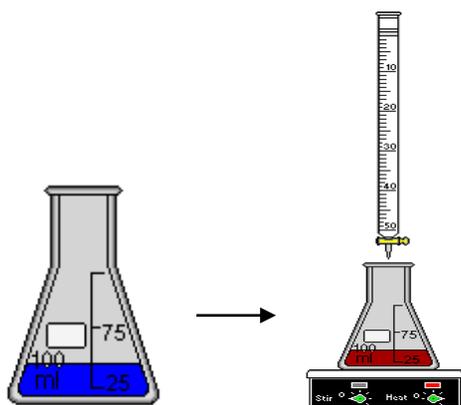


Figura 13 Determinación de azúcares reductores

$$\text{mg de patrón} = \frac{\text{mg sacarosa}}{\text{volumen titulación de muestra}} \times 250 \text{ mL}$$

$$\% \text{ azúcares} = \frac{\text{mg de patrón}}{\text{volumen titulación}} \times \frac{250}{\text{peso muestra}} \times 100$$

d. PRUEBA CUALITATIVA DE DIASTASAS

Se disolvió en un vaso de precipitado 5.00g de miel con una precisión de ± 0.01 en 10 mL de agua previamente hervida y enfriada, esta muestra se incubó con 1 mL de almidón (1% en agua) durante una hora a 45° en un erlenmeyer, se retiró el erlenmeyer y se dejó enfriar a temperatura ambiente en campana de extracción, se agregó 1mL de solución yodo/yoduro de potasio y se observó su coloración. Si no hay cambio de color hay presencia de diastasas.

e. PRUEBA CUALITATIVA DE HIDROXIMETILFURFURAL

Se empleó el ensayo de Fiehes que consiste en disolver 1.00g de miel en 5 mL de agua previamente hervida y enfriada y pasarla a un embudo de decantación, adicionar 15 mL de éter etílico al embudo con la muestra y agitar fuertemente. Luego dejar reposar hasta separación de fases, transferir la capa etérea a una cápsula de porcelana y colocar en campana de extracción para evaporar el éter a temperatura ambiente. Después de evaporado el éter, agregar 2 mL de resorcinol en la cápsula y observar coloración. Un color rojo intenso que perdure por lo menos durante una hora es prueba positiva de hidroximetilfurfural.

f. GRADOS BRIX

Se realizó la medición por refractometría con un refractómetro de Abbé. Para esto se determinó los grados BRIX de la muestra realizando el mismo procedimiento para medir humedad en la miel citado anteriormente.²²

g. CENIZAS

Se realizó el procedimiento citado en la sección 4.4.1 parte a, utilizando 1.5000g de muestra.

h. DENSIDAD

Se realizó el procedimiento citado en la sección 4.4.1 parte d.

EXTRACCIÓN DEL 1,8-CINEOL EN LA MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO

²² ING. AGR. OSCAR BARALDI, Agro noticias online, diciembre de 2002, alimentación de abejas, disponible en http://www.rosario.com.ar/agronoticias/archivos/dest_1.htm. (citado 14-NOV-2005)

Teniendo en cuenta que se identificó una muestra muy compleja, fue necesario realizar una previa extracción del terpeno 1,8-cineol. Este proceso se llevó a cabo por el método de ultrasonido a temperatura ambiente de la siguiente manera:

35.0000g de miel se disolvieron en 20 mL de agua y se agitó durante un tiempo (5min) para homogenizar la muestra, se agregó 15 mL de una mezcla de solvente orgánico (hexano:dietileter 1:2) para llevar a sonicación durante 10 minutos, luego se llevó a un embudo de decantación donde se adicionaron 20 mL de una solución saturada de NaCl con agitación, se llevó a reposo a temperatura ambiente. Se colectó la capa orgánica volviendo a hacer la extracción con otros 15 mL del solvente y se llevó a centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se filtró con sulfato de magnesio anhidro y finalmente se inyectó la muestra en el cromatógrafo de gases para cuantificar el terpeno. En algunos casos, fue necesario concentrar la solución de 10 a 5 mL para que el área del cineol entrara en la curva de trabajo.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA MIEL

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EUCALIPTOL (1,8-CINEOL) EN LA MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO

Se realizó la optimización de las condiciones adecuadas de identificación y cuantificación mencionadas por técnicas cromatográficas. En donde se establecieron:

a. Sensibilidad y linealidad

Con un patrón de 1,8-cineol (que se encuentra en mayor proporción en la hoja de eucalipto) se preparó una curva de calibración y se determinó la media, la

desviación estándar, la sensibilidad del método mediante el límite de detección y de cuantificación y la linealidad mediante el cálculo de los límites de confianza inferior y superior del total del gráfico, el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.

b. Determinación de la precisión

Un patrón de concentración correspondiente al punto medio de la porción lineal de la curva, se pasó por el equipo varias veces y se determinaron la media y los límites de confianza para los datos obtenidos de la medida del área. La precisión se expresó matemáticamente como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (RSD), evaluando la dispersión de datos obtenidos con el estándar en relación al valor medio.

INYECCIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES

Las muestras se inyectaron con el solvente utilizado en el proceso de extracción por ultrasonido. Las condiciones cromatográficas para la inyección de las muestras extraídas fueron: Se usó una columna capilar HP-5MS, He como gas portador con un flujo de 0.8mL/min, inyección modo split 100:1 y un detector de ionización de llama, aplicando una rampa de temperatura de 80°C retenidos durante 5 minutos, luego se aumentó la temperatura hasta 180°C a 10°C/min y se retuvo durante 5 minutos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se llevará a cabo la interpretación y el análisis de los datos registrados durante el desarrollo experimental.

4.1 TRABAJO DE CAMPO

El trabajo de campo se dividió en cinco etapas. La primera consistió en la preparación de las colmenas, luego se recolectaron las hojas de eucalipto y se prepararon los dos jarabes (hoja y esencia), y posteriormente se alimentaron las colmenas. Finalmente, se cosecharon las muestras de miel express obtenidas.

4.1.1 ELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS COLMENAS

Al realizar el suministro de los jarabes por medio de un alimentador presente en la parte superior de la colmena (figura 9), las abejas llegan por medio de unos canales (figura 10) encontrados en su estructura, toman el jarabe para luego almacenarlo y madurarlo en los panales. De esta manera, las abejas elaboran la miel en un menor tiempo que la miel producida por el néctar de las flores, puesto que el jarabe está presente y en gran cantidad en la misma colmena.



Figura 14 Colmena de abejas de miel express



Figura 15 Abejas tomando jarabe

4.1.2 RECOLECCIÓN DE LAS HOJAS DE EUCALIPTO

Al recolectar las hojas del mismo árbol para la elaboración de los jarabes y posteriores alimentaciones, se consigue evitar cambios en el tipo de relación de los compuestos volátiles que podrían ser incorporados en la miel express.



Figura 16 Apiario LOS ALPES PRONAR Ltda.

4.1.3 PREPARACIÓN DE LOS JARABES

En la preparación del jarabe de hoja de eucalipto, se mezclaron las hojas en el jarabe caliente con el fin de extraer rápidamente su aceite esencial y lograr una distribución homogénea del cineol en esta mezcla. La figura 17a muestra el jarabe de hoja de eucalipto y la figura 17b muestra el jarabe de esencia de eucalipto realizados y listos para ser tapados herméticamente.



Figura 17a. Jarabe de hojas de eucalipto



Figura 17b. Jarabe de esencia de eucalipto

4.1.4 ALIMENTACIÓN DE LAS COLMENAS

El seguimiento realizado durante nueve días a las colmenas durante la fabricación de la miel, determinó la viabilidad del suministro de los jarabes, encontrándose una alta actividad de las abejas en las colmenas.

4.1.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE MIEL

Después de una semana (como promedio) de cada alimentación, se encontró que las abejas consumieron todo el jarabe, originando la miel express.

La miel Express obtenida de hoja de eucalipto es de tonalidad oscura (figura18), probablemente debido al paso de compuestos presentes en la hoja hacia la miel, por medio de la abeja. En las dos clases de colmenas de miel express (alimentada con jarabe de hoja y alimentada con jarabe de esencia), se notó buena aceptación del jarabe por parte de las abejas. Esto se comprueba con el rápido consumo de los jarabes proporcionados.



Figura 18 Miel express de hoja de eucalipto en la colmena

Al suministrar los jarabes de eucalipto tanto de esencia como de hojas de eucalipto a las colmenas, se encontró que estas obtienen una mejor postura, es decir un mejor funcionamiento con respecto al trabajo realizado por las abejas

para su sostenimiento, lo que se observa por ejemplo, en una mayor recolección de polen, un mayor tamaño de las obreras y la rápida producción de huevos por la abeja reina, por lo tanto una mayor cantidad de abejas obreras (tabla 2).

Tabla 2. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en el estudio de las colmenas

Colmena	Alimentación	Jarabe suministrado	Miel recolectada (kg)	Postura	Cantidad de individuos	Cantidad de polen
1	1	Hoja	3.0	Buena	Aumenta	Aumenta
1	2	Hoja	2.8	Buena	Igual	Aumenta
2	1	Hoja	2.5	Buena	Aumenta	Aumenta
2	2	Hoja	3.0	Buena	Igual	Aumenta
3	1	Hoja	2.7	Buena	Aumenta	Aumenta
3	2	Hoja	2.7	Buena	Aumenta	Aumenta
1	1	Esencia	2.9	Buena	Aumenta	Aumenta
1	2	Esencia	2.8	Buena	Igual	Aumenta
2	1	Esencia	3.0	Buena	Aumenta	Aumenta
2	2	Esencia	2.6	Buena	Aumenta	Aumenta
3	1	Esencia	2.6	Buena	Aumenta	Aumenta
3	2	Esencia	2.5	Buena	Aumenta	Aumenta

En cuanto a la producción de la miel express de eucalipto, entre los dos tipos de jarabes suministrados (hojas y eucaliptol) se observó que ambas mieles fueron elaboradas por las abejas en un lapso de tiempo similar, estas muestran igual capacidad de trabajo, es decir, tardan un determinado periodo de días en consumir el jarabe (tabla 3).

Tabla 3. Cuadro comparativo del tiempo de producción de la miel express.

Colmena	Fecha de alimentación	Fechas de recolección	Miel de hoja	Miel de esencia	Clima	Tiempo de producción de la miel (días)
1	25/10/05	04/11/05	Primera cosecha	Primera cosecha	lluvioso	10
	05/11/05	14/11/05	Segunda cosecha	Segunda cosecha	lluvioso	9
2	30/11/05	8/12/05	Primera cosecha	Primera cosecha	lluvioso	8
	08/12/05	17/12/05	Segunda cosecha	Segunda cosecha	lluvioso	9
3	26/01/06	04/02/06	Primera cosecha	Primera cosecha	Medio soleado Pero con precipitaciones	9
	04/02/06	15/02/06	Segunda cosecha	Segunda cosecha	Medio soleado Pero con precipitaciones	11

El promedio en cantidad recolectada de miel fue de 2 a 2.5kg de miel.



Figura 19 Cantidad de miel obtenida en una alimentación de una colmena de miel express (2.5Kg de miel de esencia y 2.5Kg miel de hoja)

4.2 TRABAJO EN EL LABORATORIO

4.2.1 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

En ninguna de las condiciones a las cuales se almacenaron las muestras de miel express obtenida, se presentó cristalización durante los 8 meses de estudio (figura 20), indicando una relación óptima entre los azúcares presentes.



Figura 20 Miel express almacenada

Mediante el proceso de pasteurización, se garantiza la eliminación de levaduras que contribuyen a acidificar la muestra y producir una fermentación rápida.

4.2.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS JARABES

De los resultados obtenidos se observa que, tanto en el análisis de los jarabes de hoja como en los jarabes de esencia, hay similitud en los valores de las diferentes pruebas fisicoquímicas.

Tabla 4. Datos obtenidos en las muestras de jarabe de hoja de eucalipto

COLMENA	MUESTRA	DENSIDAD (g/mL)	HUMEDAD (%)	ACIDEZ (meq/100g)	CENIZAS (%)
COLMENA 1	PRIMERA	1.3000	39.4920	0.4480	0.1380
	ALIMENTACIÓN SEGUNDA	1.3010	39.4991	0.7050	0.1470
COLMENA 2	PRIMERA	1.2923	39.5111	0.5150	0.1150

	ALIMENTACIÓN				
	SEGUNDA	1.2920	39.3736	0.6180	0.1380
	ALIMENTACIÓN				
COLMENA 3	PRIMERA	1.2883	39.5704	0.5150	0.0940
	ALIMENTACIÓN				
	SEGUNDA	1.3002	39.4940	0.4570	0.0998
	ALIMENTACIÓN				

Se observa en la tabla 4 que el porcentaje de cenizas guarda la misma relación con los valores de la densidad y con la humedad de la muestra, es decir, donde hay menor densidad, se observa menor porcentaje de cenizas y una mayor humedad, pero los valores no son muy diferentes entre ellos. Los valores de densidad encontrados son los que causan una mayor apetencia por parte de las abejas para ingerirlo, lo que se comprueba en la rapidez y total consumo del jarabe suministrado. La acidez en la muestra de este jarabe de hoja, es un poco variable, esto depende de la proporción de los ácidos orgánicos y compuestos fenólicos presentes en las hojas, puesto que fueron recolectadas en diferentes épocas y con diferentes temperaturas climáticas. Depende también del tiempo de realización del análisis, ya que a mayor tiempo de almacenamiento habrá una mayor acidez producida por las enzimas presentes en las hojas.

Tabla 5. Datos obtenidos en las muestras de jarabe de esencia de eucalipto

COLMENA	MUESTRA	DENSIDAD (g/mL)	HUMEDAD (%)	ACIDEZ (meq/100g)	CENIZAS (%)
COLMENA 1	PRIMERA	1.3210	39.7920	0.2050	0.1280
	ALIMENTACIÓN				
	SEGUNDA	1.3309	39.4736	0.2250	0.1000
	ALIMENTACIÓN				
COLMENA 2	PRIMERA	1.3044	39.5409	0.1890	0.0841
	ALIMENTACIÓN				
	SEGUNDA	1.3021	39.4644	0.1580	0.1250
	ALIMENTACIÓN				
COLMENA 3	PRIMERA	1.2924	39.6105	0.1980	0.0950

ALIMENTACIÓN				
SEGUNDA	1.2954	39.4521	0.1960	0.0985
ALIMENTACIÓN				

Comparando entre los jarabes elaborados con hoja y los jarabes elaborados con esencia de eucalipto se observa similitud en los datos, sobretodo en la densidad y en la humedad, dado que la cantidad de azúcar (sacarosa) utilizada en la preparación de los mismos es semejante y junto con el agua son los responsables de la densidad, que por lo tanto causan porcentajes de humedad muy similares. Alguna diferencia muy pequeña en el porcentaje de cenizas del jarabe de hoja, que puede ser debido a los compuestos inorgánicos que brinda la hoja al jarabe. Los porcentajes de acidez son menores puesto que los compuestos que podrían aportar a ella son únicamente el agua y los azúcares, mientras que en el jarabe de hoja de eucalipto contribuirían gran variedad de moléculas.

No se llevó a cabo un estudio de proteína puesto que obviamente ninguna de las materias primas aportaría significativamente al contenido de nitrógeno.

4.3 ANÁLISIS FISICOQUIMICO DE LAS MUESTRAS DE MIEL EXPRESS COSECHADAS

Se notó que las muestras de miel express de hoja de eucalipto adquieren un color oscuro verdoso, olor y sabor característico de la planta que la hace llamativa a la vista (tabla 6).

Tabla 6. Características organolépticas de las muestras de miel express de hoja de eucalipto.

COLMENA	COLOR	OLOR	SABOR	CRISTALIZACIÓN
---------	-------	------	-------	----------------

COLMENA 1	Verdosa	Característico	Dulce	NO
PRIMERA	oscura	del	Con	
COSECHA		eucalipto	eucalipto	
COLMENA 1	Verde	Característico	Dulce	NO
SEGUNDA	amarillenta	del	Con	
COSECHA		eucalipto	eucalipto	
COLMENA 2	Verdosa	Característico	Dulce	NO
PRIMERA	clara	del	Con	
COSECHA		eucalipto	eucalipto	
COLMENA 2	Verde clara	Característico	Dulce	NO
SEGUNDA		del	Con	
COSECHA		eucalipto	eucalipto	
COLMENA 3	Verdosa	Característico	Dulce	NO
PRIMERA	Amarillenta	del	Con	
COSECHA		eucalipto	eucalipto	
COLMENA 3	Verde	Característico	Dulce	NO
SEGUNDA	amarillenta	del	Con	
COSECHA		eucalipto	eucalipto	

La miel express de esencia de eucalipto es de tonalidad amarillenta brillante (tabla 7) ya que la fuente de alimento es agua, sacarosa y el principio activo, por lo tanto, la abeja no toma los compuestos de ninguna planta cercana teniendo el alimento en su propia colmena; mientras que la miel express de hoja toma esa tonalidad verdosa debido a que en las hojas existen pigmentos y otros compuestos que son tomados por las abejas en el proceso de la producción de la miel express. En general, no se encontró diferencia entre las muestras recolectadas de este tipo de miel express como en color, olor y sabor; por lo tanto se podría decir que no se produjo mezcla del jarabe suministrado en la colmena con los néctares de las flores de las plantas cercanas a esta, o que si se llegó a dar no fue significativa, por lo tanto no se aprecia a simple vista. Esto es muy probable ya que el alimento estaba presente en la propia colmena, además la condición atmosférica fue favorable en su mayoría de tiempo por la temporada de invierno.

Tabla 7. Características organolépticas de las muestras de miel express de esencia de eucalipto.

COLMENA	COLOR	OLOR	SABOR	CRISTALIZACIÓN
COLMENA 1 PRIMERA COSECHA	Amarillo Brillante	Leve olor a eucaliptol	Dulce	NO
COLMENA 1 SEGUNDA COSECHA	Amarillo Brillante	Leve olor a eucaliptol	Dulce	NO
COLMENA 2 PRIMERA COSECHA	Amarillo Brillante	Leve olor a eucaliptol	Dulce	NO
COLMENA 2 SEGUNDA COSECHA	Amarillo Brillante	Leve olor a eucaliptol	Dulce	NO
COLMENA 3 PRIMERA COSECHA	Amarillo Brillante	Leve olor a eucaliptol	Dulce	NO
COLMENA 3 SEGUNDA COSECHA	Amarillo Brillante	Leve olor a eucaliptol	Dulce	NO

Aunque la miel express no es considerada una miel de abejas natural, en la norma NTC 1273 se contempla una miel de frutas como un alimento para consumo humano. Con el fin de tener un punto de comparación de los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos en las muestras con los valores planteados por esta norma, se consideran los siguientes valores de calidad (tabla 8) para la miel tipo I (para consumo humano) citados en la norma.

Tabla 8. Requisitos fisicoquímicos para la miel de abejas tipos I y II según NTC 1273.

REQUISITOS	TIPO I	TIPO II
------------	--------	---------

	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Contenido aparente de azúcar reductor como azúcar invertido en %	65.0	-	60.0	-
Sacarosa aparente en %	-	5.0	-	7.0
Humedad a 20°C	-	20.0	-	21.0
Acidez total en miliequivalentes/100g	-	4.0	-	4.0
Índice de diastasa (Escala de Gothe)	8.3	-	8.0	-
Hidroximetilfurfural	Negativo	-	Negativo	-
Cenizas en %	-	0.20	-	0.25
Relación fructosa glucosa	1.0		1.0	
Rotación específica a 20°C	- 2.0	-	- 2.0	-

Los análisis realizados a las muestras de miel express obtenidas fueron: densidad, humedad, cenizas, proteína, acidez, prueba cualitativa de HMF y diastasas, azúcares reductores y azúcares totales, donde se encuentra cierta diferencia en las dos clases de miel (ver tabla 9).

4.3.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y DE CALIDAD EN LA MIEL DE ESENCIA DE EUCALIPTO.

Tabla 9. Datos obtenidos de las muestras de miel de esencia de eucalipto.

COLMENA	MUESTRA	DENSIDAD (g/mL)	HUMEDAD (%)	CENIZAS (%)	% PROTEÍNA	ACIDEZ (meq/100g)	AZUCARES REDUCTORES	AZUCARES TOTALES	HMF	DIASASAS
COLMENA 1	EPT ^o amb	1.439	19.9	0.026	0.0010	1.326	64.32	76.80	-	+
PRIMERA	EP4 ^o C		19.8			0.981	57.72	74.92	-	+
ALIMENTACIÓN	ESPT ^o amb		19.8			1.287	64.41	74.89	-	+
	ESP4 ^o C		19.2			1.017	55.94	76.70	-	+
COLMENA 1	EPT ^o amb	1.438	19.8	0.039	0.0010	1.456	70.23	82.21	-	+
SEGUNDA	EP4 ^o C		19.2			0.968	64.93	79.92	-	+
ALIMENTACIÓN	ESPT ^o amb		19.2			1.668	72.02	81.14	-	+
	ESP4 ^o C		19.4			0.910	67.60	82.21	-	+
COLMENA 2	EPT ^o amb	1.439	19.1	0.027	0.0008	1.027	66.75	82.38	-	+
PRIMERA	EP4 ^o C		19.0			1.133	60.80	77.62	-	+
ALIMENTACIÓN	ESPT ^o amb		18.9			1.130	66.50	76.26	-	+
	ESP4 ^o C		19.5			1.459	59.60	72.63	-	+
COLMENA 2	EPT ^o amb	1.420	20.5	0.057	0.0009	1.126	64.59	76.68	-	+
SEGUNDA	EP4 ^o C		19.2			0.922	55.30	74.37	-	+
ALIMENTACIÓN	ESPT ^o amb		20.5			1.122	62.09	78.49	-	+
	ESP4 ^o C		21.0			0.908	53.04	73.90	-	+
COLMENA 3	EPT ^o amb	1.426	21.2	0.033	0.0008	1.313	66.78	79.02	-	+
PRIMERA	EP4 ^o C		21.3			1.143	62.02	79.03	-	+
ALIMENTACIÓN	ESPT ^o amb		21.0			1.494	66.32	77.38	-	+
	ESP4 ^o C		21.0			1.038	61.95	80.02	-	+
COLMENA 3	EPT ^o amb	1.444	20.5	0.028	0.0006	0.817	63.02	82.91	-	+
SEGUNDA	EP4 ^o C		21.1			0.992	62.98	78.85	-	+
ALIMENTACIÓN	ESPT ^o amb		20.8			0.843	66.13	80.92	-	+
	ESP4 ^o C		20.3			0.998	62.05	80.26	-	+

EPT^oamb: miel de esencia de eucalipto pasteurizada almacenada a temperatura ambiente; EP4^oC: miel de esencia de eucalipto pasteurizada almacenada a 4°C; ESPT^oamb: miel de esencia de eucalipto sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; ESP4^oC: miel de esencia de eucalipto sin pasteurizar almacenada a 4°C.

a. Densidad.

La densidad en una miel natural aceptada por la norma, oscila entre 1.3966 y 1.4525 g/mL, por lo tanto se observa que esta miel tiene una densidad adecuada ya que en la tabla anterior se observa que la densidad de esta miel de esencia de eucalipto está entre 1.4209 y 1.4442²³. Esta densidad se tomó en el momento de cosechar la miel y depende de su madurez, es decir, el tiempo requerido para que la abeja realice el proceso de secado del néctar y este es el momento en que el apicultor decide desalojarlo de las colmenas. Por esto, es preciso decir que se realizó la recolección de muestra en un tiempo prudente.

b. Humedad.

Es bien sabido, tanto por parte de los apicultores como de los compradores, que el porcentaje de humedad varía mucho en la miel, pudiendo decir que en términos generales oscila entre 13 y 25%²⁴, donde la máxima cantidad permitida es de 20%, ya que por encima de ella se produce fermentación debido al alto contenido de humedad. Es cierto que el exceso de humedad en la miel tiene alguna relación con la alteración de la miel por fermentación, pero hay cierta relación combinada de la humedad y la temperatura de almacenamiento, una miel con bastante humedad no fermenta a temperaturas por debajo de 10°C y a temperaturas alrededor de 25°C fermenta muy poco o nada²⁵. Cuando hablamos del cambio de humedad por almacenamiento, nos damos cuenta que el mayor contenido de agua en las condiciones tomadas se observa en las mieles almacenadas a temperatura ambiente. Esto puede ser debido a la humedad tomada del medio ambiente por parte de las muestras de miel, ya que por ser un producto tan higroscópico, en una temperatura de 20°C (que es el promedio en el departamento), la miel tiende a absorber la humedad del aire. También se encuentra que las mieles almacenadas a 4°C tienen una menor cantidad de humedad ya que la baja temperatura va a

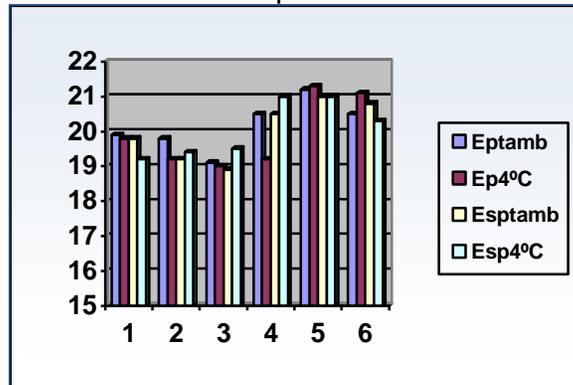
²³ Julio R. Tiscornia, ABCyXYZ de la Apicultura, Enciclopedia de la Cría Científica y Práctica de las Abejas. Editorial HACHETTE, Buenos Aires 1986. Pág 166.

²⁴ Ibid pág 167.

²⁵ Ibid pág 167

deshidratar las muestras en el momento de proceder al equilibrio de temperaturas, en la figura 21 se indica la comparación del porcentaje de agua en todas las colmenas en estudio.

Figura 21 Comparación de la humedad con respecto al almacenamiento en las colmenas de miel express de esencia de eucalipto.



esp4°C: esencia sin pasteurizar almacenada a 4°C; esptamb: esencia sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; ep4°C: esencia pasteurizada almacenada a 4°C; eptamb: esencia pasteurizada almacenada a temperatura ambiente. 1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; 2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; 3: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; 4: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; 5: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; 6: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3.

A pesar de encontrar diversidad en los porcentajes de humedad de las diferentes condiciones impuestas en las muestras de miel, en algunos casos sobrepasan del 20%. Esto puede ser debido al tiempo prematuro de recolección de la muestra por parte del apicultor (la recolección fue realizada al notar que los jarabes fueron totalmente consumidos por las abejas y no se notó percolación en las celdas de los panales de miel), por lo tanto se puede decir que es necesario dejar madurar un poco mas el producto en las colmenas.

c. Cenizas

El grado o porcentaje de cenizas normalmente en una natural para consumo humano, se permite en un máximo de 0.20%²⁶ y está representada por fosfatos de calcio y de hierro, cloro, sílice, manganeso, potasio, sodio, azufre y aluminio, dependiendo de su fuente floral. En el caso de la miel express de esencia de eucalipto, se nota una cantidad muy baja (desde 0.026 a 0.057%), probablemente porque las cenizas únicamente provienen del jarabe en donde están en una concentración.

d. Proteína

La cantidad tan baja de proteína en una miel express (0.0006-0.001), en comparación con los términos definidos en la norma NTC 1273 (04-0.133)²⁷, se debe a que en los jarabes no hay suministro de compuestos que contengan nitrógeno; pero su existencia en la miel, se debe a pequeñas cantidades de polen que llegan a la colmena entre las patas de las abejas cuando han hecho su recolección pero no alcanza a pasar todo, por lo tanto se debe encontrar cantidades mínimas de este compuesto.

e. Acidez.

La acidez es un importante criterio de calidad. La fermentación de la miel causa un incremento de acidez; por ello, si bien existe una considerable variación natural, resulta útil fijar un máximo de acidez como requisito (que es de 4.0 miliequivalentes/100g)²⁸. El porcentaje de acidez en estas muestras de miel varía desde 0.817 a 1.668, encontrando siempre una mayor acidez en las muestras almacenadas a temperatura ambiente (figura 22) que es más o menos entre 15 y

²⁶ NORMA DEL CODEX PARA LA MIEL, (citado 28-nov-2005) disponible en la página web: http://www.agrobit.com.ar/Info_tecnica/alternativos/apicultura/AL_000011ap.htm.

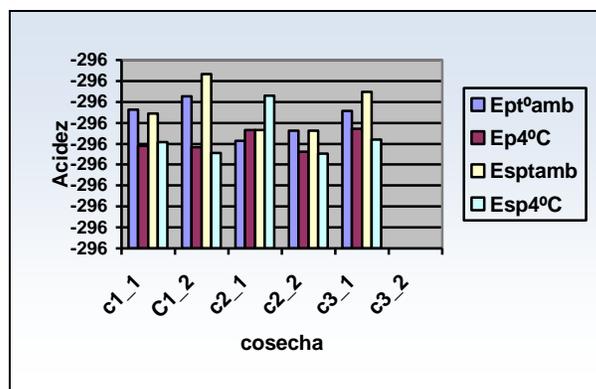
²⁷ Kirk, R.S., Sawyer, R. y Egan, H. 1996, Gran enciclopedia de la ciencia y de la tecnología

²⁸ NORMA DEL CODEX PARA LA MIEL, (citado 28-nov-2005) disponible en la página web: http://www.agrobit.com.ar/Info_tecnica/alternativos/apicultura/AL_000011ap.htm.

23°C. La temperatura a la cual hay mayor actividad enzimática en la miel, es a 15°C²⁹ ocasionando una mayor tendencia a su acidez. La temperatura de almacenamiento a la intemperie de las muestras fue muy variable ya que en las mañanas se podía tener entre 13 y 16°C y en las tardes se podía alcanzar hasta 24°C de temperatura ambiente, por lo tanto se podría decir que la acidez se produce mayor acidez en las mañanas. Estos cambios de temperatura promueven una mayor inestabilidad de la miel ante procesos fermentativos que aumentan el valor de la acidez. En las muestras almacenadas a 4°C, se observa menor contenido de acidez, esto dado por las razones dichas anteriormente sobre el nivel de temperatura en el almacenamiento.

Un factor en el aumento de acidez en las muestras de esta miel es el porcentaje de humedad que poseen (entre 19 y 21%), por tener este alto nivel de agua, se puede acelerar este proceso.

Figura 22 Comparación de la acidez en las muestras de miel de esencia de eucalipto



esp4°C: esencia sin pasteurizar almacenada a 4°C; esptamb: esencia sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; ep4°C: esencia pasteurizada almacenada a 4°C; eptamb: esencia pasteurizada almacenada a temperatura ambiente. c1_1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; C1_2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; C2_1: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; C2_2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; C3_1: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; C3_2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3.

²⁹ Julio R. Tiscornia, ABCyXYZ de la Apicultura, Enciclopedia de la Cría Científica y Práctica de las Abejas. Editorial HACHETTE, Buenos Aires 1986. Pág 168.

En cuanto a la condición de pasteurización, se observa mayor acidez en las muestras almacenadas sin pasteurizar, lo cual indica que los componentes que no fueron eliminados al no pasteurizar las muestras de miel, produjeron efecto catalítico en la velocidad de incremento de la acidez.

El porcentaje de acidez depende de la cantidad de ácido cítrico y ácido málico presente en la fuente y en lo que pueda pasar al ser metabolizado por la abeja, por lo tanto no se espera un gran porcentaje de acidez en las muestras de miel express en general porque en el caso del jarabe de esencia de eucalipto, la fuente es agua, azúcar y esencia, pero, las colmenas se encuentran en plantaciones de árboles de diferentes especies de cítricos como naranja, guayaba, níspero y otros, en donde las abejas pueden llegar y llevar parte de sus ácidos en época algo soleada que es cuando son capaces de salir al medio ambiente, pero no será significativa debido a que se tiene el alimento en la propia colmena.

f. Azúcares

La evaluación de azúcares reductores es un análisis de gran importancia para la determinación de anomalías en los procesos de adecuación y comercialización que incluyen la adulteración de la miel, afectando principalmente a los consumidores quienes en su mayoría buscan este producto por sus propiedades curativas y sus características naturales. Una miel de composición media contiene entre el 40 % de levulosa, 34% de glucosa y entre 1 y 2% de sacarosa³⁰. El azúcar utilizado en la elaboración de los jarabes, fue azúcar de mesa común también denominada sacarosa (figura 23a), que al ser tomado por las abejas y almacenado en las colmenas, donde está presente la invertasa que es una enzima que aparece probablemente en las glándulas de las abejas, actúa como agente catalítico transformando la sacarosa en productos hidrolizados que son la fructosa

³⁰ Julio R. Tiscornia, ABCyXYZ de la Apicultura, Enciclopedia de la Cría Científica y Práctica de las Abejas. Editorial HACHETTE, Buenos Aires 1986. Pág 390-391.

(figura 23c) y la glucosa (figura 23b). Estos azúcares son denominados azúcares reductores.

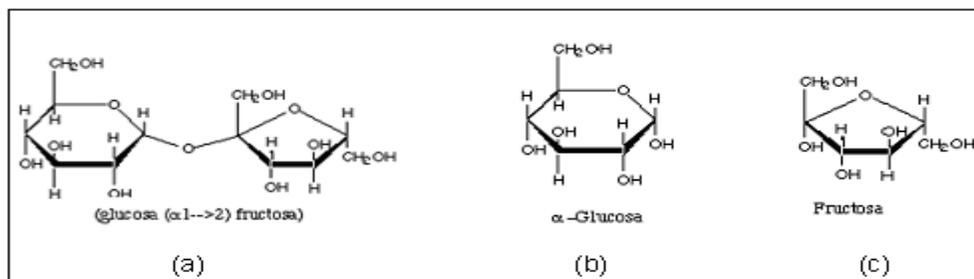
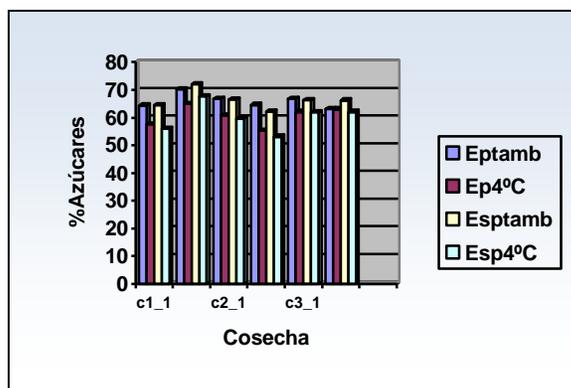


Figura 23 (a) Sacarosa; (b) Glucosa; (c) Fructosa

En el proceso de cuantificación de estas azúcares, se tituló una solución alcalina de sulfato de cobre de color azul intenso, que al hervir durante unos minutos con cualquiera de los monosacáridos, reducen la sal metálica en solución a una forma insoluble de color rojo ladrillo³¹.

Figura 24 Comparación de azúcares reductores con el almacenamiento.



esp4°C: esencia sin pasteurizar almacenada a 4°C; esptamb: esencia sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; ep4°C: esencia pasteurizada almacenada a 4°C; eptamb: esencia pasteurizada almacenada a temperatura ambiente. c1_1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; C1_2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; C2_1: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; C2_2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; C3_1: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; C3_2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3

³¹ ROOT, ABC Y XYZ DE LA APICULTURA, Enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas. Librería HACHETTE S.A., décima edición, Buenos Aires 1986. Pág. 391.

El promedio del contenido de azúcares reductores en la miel express de esencia de eucalipto es de 63.21%, y se observa una menor cantidad de estas en las muestras almacenadas a 4°C (figura 24), y mayor cantidad de las mismas en las muestras almacenadas a temperatura ambiente sin pasteurizar. Esto se explica porque la miel no ha sufrido calentamiento que inactive enzimas como la invertasa capaz de ocasionar la conversión de la sacarosa (dada en un medio ácido) que queda en la miel, por lo tanto durante el almacenamiento podría llevarse a cabo el aumento en azúcares reductores en esta muestra.

También se nota que la cantidad de azúcares reductores en esta clase de miel es inferior a la cantidad citada por la norma, que es un valor de 65%, pero hay que tener en cuenta que los jarabes se realizaron con sacarosa que es un azúcar no reductor, que no se alcanza a invertir en el proceso del metabolismo de la abeja y de la maduración del producto en los panales. Al observar los datos encontrados en la cantidad de azúcares totales en la miel express se nota que hay una oscilación entre 74.89 a 82.91%. Esto indica la presencia de una cantidad de sacarosa que no ha sido totalmente hidrolizada.

g. HIDROXIMETILFURFURAL.

Este factor de calidad es un indicador de la frescura y del sobrecalentamiento de la miel. Es considerado un factor muy determinante porque prácticamente no hay hidroximetilfurfural (HMF) en las mieles frescas; su formación ocurre durante el almacenamiento de la miel y aumenta según las condiciones de pH y temperatura de almacenamiento. 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 e azúcar más frágil, si se expone a temperaturas muy elevadas. Se realizó la prueba cualitativa de HMF en donde todas las muestras demostraron ausencia del compuesto ya que ninguna se tornó de color rojo ladrillo que es característico de su presencia frente a compuestos como resorcinol en ácido

clorhídrico concentrado y éter etílico. Estos resultados demostraron que la miel no se vio alterada en el almacenamiento y al ser calentada en el proceso de pasteurización.

h. Diastasas

La actividad de la diastasa en miel de abejas es un factor de calidad que puede ser alterado durante el procesamiento y el almacenamiento de la miel; por ello se utiliza como indicador de sobrecalentamiento y de frescura. Esta prueba también fue cualitativa donde no se observó cambio de color en las diferentes muestras estudiadas a las diversas condiciones, lo cual indica la presencia de diastasas en las muestras de miel, y que no fueron afectadas por el calentamiento en la pasteurización.

4.3.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y DE CALIDAD EN LA MIEL DE HOJA DE EUCALIPTO.

Las muestras de miel express de hoja de eucalipto fueron analizadas a la par con las muestras de miel express de esencia de eucalipto a medida que se iban recolectando.

Tabla 10. Datos obtenidos de las muestras de miel de hoja de eucalipto

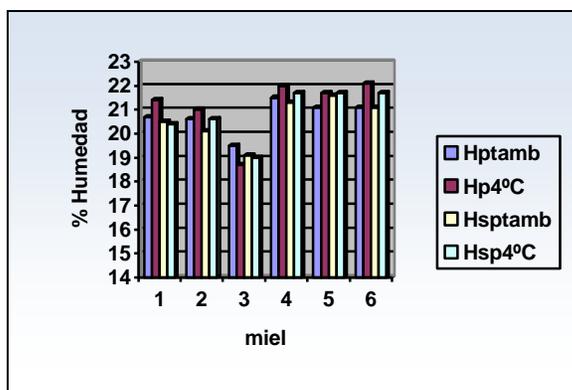
COLMENA	MUESTRA	DENSIDAD (g/mL)	HUMEDAD (%)	CENIZAS (%)	% PROTEÍNA	ACIDEZ (meq/100g)	AZUCARES REDUCTORES	AZUCARES TOTALES	HMF	DIASASAS
COLMENA 1	HPT ^o amb	1.4362	20.7	0.026	0.001	1.299	65.72	77.03	-	+
PRIMERA	HP4 ^o C		21.4			1.074	61.86	76.78	-	+
ALIMENTACIÓN	HSPT ^o amb		20.5			1.276	70.00	77.31	-	+
	HSP4 ^o C		20.4			0.992	61.20	75.69	-	+
COLMENA 1	HPT ^o amb	1.4360	20.6	0.039	0.001	1.447	72.02	80.17	-	+
SEGUNDA	HP4 ^o C		21.0			1.092	62.80	79.54	-	+
ALIMENTACIÓN	HSPT ^o amb		20.1			1.269	67.98	81.05	-	+
	HSP4 ^o C		20.6			1.043	56.97	81.14	-	+
COLMENA 2	HPT ^o amb	1.4358	19.5	0.043	0.0008	1.217	64.16	79.68	-	+
PRIMERA	HP4 ^o C		18.7			1.486	58.96	76.29	-	+
ALIMENTACIÓN	HSPT ^o amb		19.1			1.565	61.99	80.12	-	+
	HSP4 ^o C		19.0			1.518	58.23	74.06	-	+
COLMENA 2	HPT ^o amb	1.3887	21.5	0.063	0.0009	1.266	64.32	78.03	-	+
SEGUNDA	HP4 ^o C		22.0			1.717	60.33	76.29	-	+
ALIMENTACIÓN	HSPT ^o amb		21.3			1.588	64.96	78.00	-	+
	HSP4 ^o C		21.7			1.543	57.74	74.06	-	+
COLMENA 3	HPT ^o amb	1.4157	21.1	0.157	0.0018	1.921	64.47	76.21	-	+
PRIMERA	HP4 ^o C		21.7			1.752	60.25	77.59	-	+
ALIMENTACIÓN	HSPT ^o amb		21.6			2.241	63.71	79.78	-	+
	HSP4 ^o C		21.7			1.643	59.45	78.23	-	+
COLMENA 3	HPT ^o amb	1.4220	21.1	0.093	0.0013	1.988	64.46	75.61	-	+
SEGUNDA	HP4 ^o C		22.1			2.001	60.54	77.91	-	+
ALIMENTACIÓN	HSPT ^o amb		21.1			2.059	63.30	75.70	-	+
	HSP4 ^o C		21.7			1.818	59.68	76.76	-	+

HPT^oamb: miel de hoja de eucalipto pasteurizada almacenada a temperatura ambiente; HP4^oC; miel de hoja de eucalipto pasteurizada almacenada a 4^oC; HSPT^oamb: miel de hoja de eucalipto sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; HSP4^oC: miel de hoja de eucalipto sin pasteurizar almacenada a 4^oC.

a. Densidad

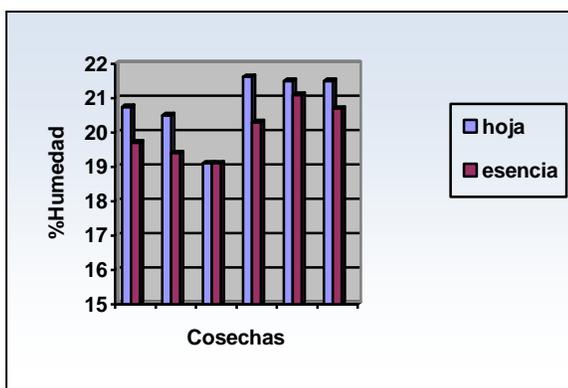
En la muestra de miel express de hoja de eucalipto, se encontró una menor densidad que en la muestra de miel express de esencia, y por lo tanto un mayor porcentaje de humedad que van desde 1.3887 a 1.4362 g/mL de densidad y entre 18 y 21% de humedad, en la figura 25 se muestra la comparación entre los porcentajes de humedad obtenidos en todas las muestras de miel express de hoja de eucalipto almacenadas. La figura 26 indica la diferencia entre los porcentajes de humedad en las muestras de miel express de hoja y los porcentajes de humedad en las muestras de miel express de esencia de eucalipto.

Figura 25 Porcentaje de humedad entre las diferentes condiciones de almacenamiento de la miel express de hoja de eucalipto.



1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; 2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; 3: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; 4: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; 5: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; 6: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3.

Figura 26 Comparación de la humedad entre los dos tipos de miel express.



1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; 2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; 3: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; 4: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; 5: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; 6: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3.

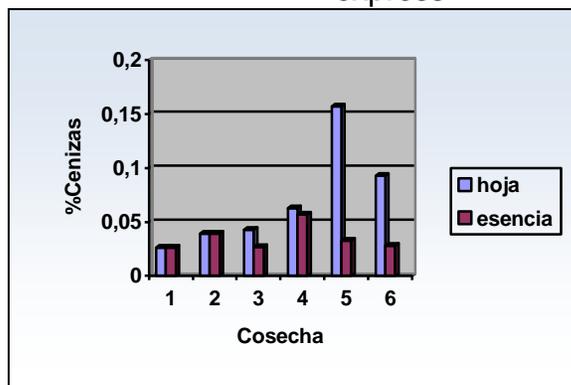
b. Humedad

Como se dijo anteriormente, el porcentaje de humedad es mayor en todas las muestras de miel de hoja de eucalipto con respecto a todas las muestras de miel de esencia de eucalipto. Esta diferencia constante puede ser debida al tiempo de cosecha de las muestras, es decir, como se dejan el mismo tiempo los jarabes en las colmenas hasta la recolección de la miel express, la miel express de esencia de eucalipto posiblemente es madurada en un menor tiempo que la miel express de hoja, y por esto su diferencia.

c. Cenizas

El porcentaje de cenizas de la miel express de hoja de eucalipto se encuentra en una mayor proporción que la de esencia ya que las hojas de la planta de eucalipto van a brindar mayor proporción de minerales (figura 27), pero, en comparación con el porcentaje de cenizas en una miel tipo I planteado por la norma NTC 1273, también es mucho menor esta cantidad puesto que se reportan porcentajes entre 0.2 como mínimo, y los porcentajes encontrados fueron entre 0.026 a 0.15%.

Figura 27 Comparación del porcentaje de cenizas entre los tipos de miel express



1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; 2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; 3: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; 4: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; 5: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; 6: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3.

d. Proteína

En cuanto al porcentaje de proteína también se observa muy poca cantidad incluso igual a la miel de esencia puesto que el jarabe utilizado como fuente tampoco presentó permanencia de nitrógeno en su análisis. Este porcentaje de proteína encontrado en esta miel, también es dado por la razón explicada en el apartado 5.4.1 parte d.

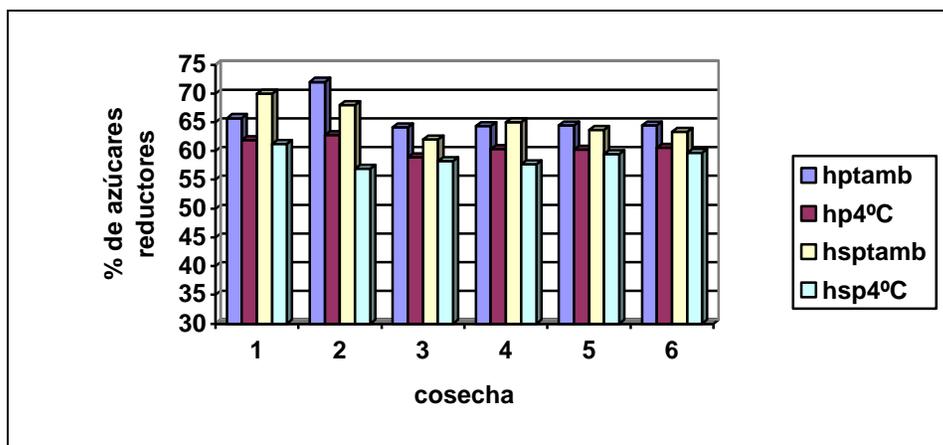
e. Acidez

La acidez encontrada en esta miel express está entre 0.992 y 2.059 notando en general una mayor cantidad en la miel de hoja sin pasteurizar a temperatura ambiente, pues las levaduras presentes no han sido eliminadas, por lo tanto se puede desarrollar fácilmente y más rápidamente esta acidez.

f. Azúcares

Los azúcares reductores en esta clase de miel están en un promedio de 62%, que es un promedio menor a las anteriores muestras de miel express discutidas. Se encuentra igual que en las muestras de miel express de esencia de eucalipto, una mayoría de este contenido de azúcares en las muestras almacenadas a temperatura ambiente, esto puede ser dado por la misma razón planteada en el punto 4.3.1 parte f. En la figura 28 se observa la comparación del porcentaje de azúcares reductores con respecto a sus condiciones de almacenamiento.

Figura 28 Comparación de azúcares reductores con la condición de almacenamiento



1: cosecha de primera alimentación de la colmena 1; 2: cosecha de segunda alimentación de la colmena 1; 3: cosecha de primera alimentación de la colmena 2; 4: cosecha de segunda alimentación de la colmena 2; 5: cosecha de primera alimentación de la colmena 3; 6: cosecha de segunda alimentación de la colmena 3. hsp4°C: hoja sin pasteurizar almacenada a 4°C; hsptamb: hoja sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; hp4°C: hoja pasteurizada almacenada a 4°C; hptamb: hoja pasteurizada almacenada a temperatura ambiente.

En cuanto a los azúcares totales, se encontró también valores entre 75 y 80% que indican la presencia de la sacarosa que aún no ha sido invertida por las enzimas presentes en la miel.

g. HIDROXIMETILFURFURAL

Al realizar la prueba cualitativa de HMF en esta muestra de miel, no se observó su presencia en ninguna de las mieles estudiadas. Por lo tanto se puede decir que está en buen estado todavía y que no se han visto afectadas por el almacenamiento, ni por su calentamiento en el momento de realizar su pasteurización en algunas muestras.

h. Diastasas

En cuanto a la presencia de diastasas en esta muestra de miel express, tampoco se observó cambio de color en la prueba cualitativa al agregar la solución de yodo/yoduro, por lo tanto se observa presencia de diastasas en las muestras.

En general, al comparar la miel de hoja de eucalipto con respecto a la miel de esencia, en los análisis fisicoquímicos se puede notificar que la muestra de miel de hoja es más rica en nutrientes como cantidad de minerales y ácidos orgánicos. Estas diferencias pueden ser debidas a la fuente de alimento en cada tipo de miel express.

Con respecto a los tratamientos y almacenamiento aplicado a las muestras de miel express, se puede concluir que la pasteurización no ha afectado su composición física.

4.4 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EUCALIPTOL (1,8-CINEOL) EN LA MIEL EXPRESS DE EUCALIPTO

4.4.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL EUCALIPTOL EN LA MIEL.

Mediante la estandarización de los diferentes métodos, se espera conocer los valores de parámetros que sirven como criterio de confianza como son: linealidad, sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación), precisión (repetitividad y reproducibilidad), exactitud y porcentaje de recuperación.

a. DETERMINACIÓN DEL FLUJO ÓPTIMO.

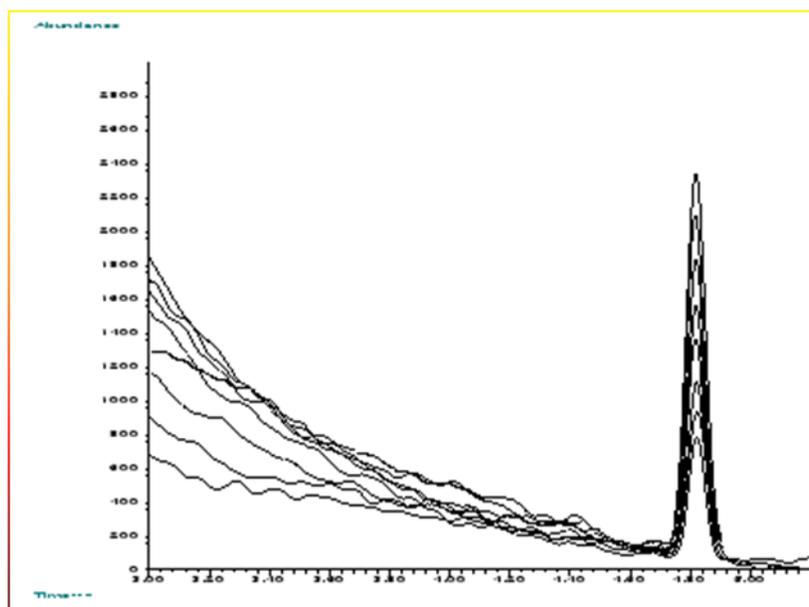
Se estableció el flujo óptimo del gas de arrastre para la columna HP-5MS, utilizando 1,8-cineol en hexano:éter (1:2) como referencia por medio de la curva de Van Deemter en un rango de 0.2 a 2.6 mL/min. De acuerdo a la curva realizada se encontró un flujo óptimo de 0.8 mL/min.

b. LINEALIDAD

Para poder determinar la linealidad (dentro de un rango específico), se elaboraron una serie de 8 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.

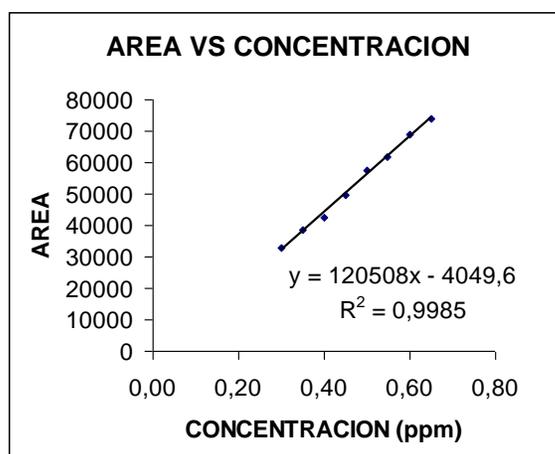
Como no se sabía a ciencia cierta la cantidad presente del terpeno en las muestras de miel express tanto de hoja como de esencia de eucalipto, se realizó una cuantificación por medio de una adición patrón. Se realizó la extracción por el método de ultrasonido, se inyectó la muestra, luego el patrón adicionado a la muestra y se determinó una cantidad de 0.35 ppm en una solución de extracción de la muestra de miel express de hoja de eucalipto y 0.42 ppm en la solución de extracción de muestra de miel express de esencia de eucalipto. Por esta razón, se preparó una curva de calibración a concentraciones de 0.30 a 0.65 ppm (figura 29), con un patrón de 1,8-cineol que se inyectó en el cromatógrafo de gases.

Figura 29 Curva de calibración del patrón de cineol (0.30 a 0.65 ppm)



Según la curva de calibración de trabajo se observó que las desviaciones estándar relativas entre las áreas en cada concentración del patrón fluctuaron entre 0.11 y 1.49. De acuerdo a esta curva y al coeficiente de correlación obtenido, se demuestra la respuesta lineal que presenta el detector (en este caso el FID) con respecto a la cantidad de analito inyectado.

Figura 30 Curva de calibración del patrón de cineol de 0.30ppm a 0.65 ppm.



La gráfica de la figura 30 muestra una $r = 0.9985$, indicando que hay linealidad en la respuesta del detector con respecto a las cantidades inyectadas del cineol.

Para la sensibilidad, se tomó como dato la pendiente de la curva de trabajo $b=120508$. Se realizó otra curva de calibración (ver tabla 20 y figura 43 en anexo 5.3 parte a), inyectando por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito (con un rango de concentración de 0.1 a 0.25 ppm) y se determinó la ecuación de esta nueva recta. Se extrapoló la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco $Y_{bl} = 24.01$.

Se determinó la desviación estándar relativa (RSD) correspondiente a cada concentración de la curva de menor rango. Se calculó la recta correspondiente a concentración vs RSD y se extrapoló como en el caso anterior, la desviación estándar relativa a concentración cero, obteniendo el estimado $S_{bl} = 0.1685$, correspondiente a la desviación estándar del blanco, los resultados encontrados de límite de detección y de cuantificación se encuentran en la tabla 11. Los datos encontrados en las determinaciones de la desviación estándar relativa en las curvas de calibración se encuentran en la tabla del anexo 5.3 con sus respectivas gráficas y cálculos.

Tabla 11. Límite de detección y límite de cuantificación.

Compuesto	RSD de la pendiente (S_{bl})	Valor corte ordenada (Y_{bl})	Valor de la pendiente (b)	Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
1,8-cineol	0.1685	124.01	120508	1.033×10^{-2}	1.043×10^{-2}

De la tabla anterior se encuentra que los límites de detección y de cuantificación son de una concentración mucho menor a las concentraciones estudiadas, por lo

tanto es posible realizar la cuantificación del cineol en la miel express mediante cromatografía de gases con el detector utilizado (FID).

c. PRECISION DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

En los datos encontrados en la precisión del método de cuantificación (anexo 5.3) se observa que el t calculado es menor que el t tabulado, por lo tanto no existe diferencia significativa con la concentración inyectada y la exactitud es apropiada, también se puede notar que el método es reproducible y repetitivo, por lo tanto se puede decir que este método es preciso.

d. ESTANDARIZACION DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO.

Antes de realizar el método de adición patrón para determinar el rango de concentraciones en el que se podría encontrar el cineol en las muestras de miel express, se realizó la extracción del compuesto utilizando dos tipos de solvente, uno de hexano:éter relación 1:2 y el segundo fue pentano:éter relación 1:2. Al realizar la inyección en el cromatógrafo de gases, se encontró que el pico del cineol en la extracción con hexano, ocasionó una medida de área mucho mayor que el área del pico del volátil extraído con pentano, (cabe resaltar que la extracción fue realizada con los dos solventes en los dos tipos de miel express) por lo tanto se tomó este solvente para realizar el proceso de extracción y cuantificación del terpeno.

Para reconocer cual fue el tiempo óptimo de extracción en el ultrasonido, se realizó un dopaje del blanco de muestra y se llevó a cabo el proceso de extracción por triplicado a 5, 10 y 15 minutos (ver tabla 12). Se determinó el porcentaje de recuperación en cada una de las extracciones. Se encontró un mayor porcentaje de recuperación en las muestras que fueron expuestas en el ultrasonido durante 10 minutos (92.60% como promedio). Esto se puede explicar porque a 5 minutos,

la extracción no es completa y a 15 minutos el ultrasonido ha calentado a más de 30°C lo que va a ocasionar pérdidas de los compuestos volátiles presentes incluyendo el terpeno en estudio, mientras que a los diez minutos, todavía hay una temperatura considerable que era entre 23-25°C. por lo tanto se escogió este tiempo de exposición de la muestra en el ultrasonido para realizar las posteriores extracciones en la muestra.

Tabla 12. Optimización del tiempo de extracción por ultrasonido.

Tiempo extracción por ultrasonido (minutos)	Concentración muestra (ppm)	Peso muestra (g)	Promedio de áreas	Concentración obtenida (ppm)	% de recuperación
5	0,5605	34,9841	59538	0,4525	80,73
		34,3532	54347	0,4232	75,50
		34,9723	59788	0,4544	81,07
		35,0183	69731	0,5245	93,58
10	0,5605	34,9520	69885	0,5266	93,95
		34,9254	69307	0,5229	93,29
		35,0786	53783	0,4104	74,27
		35,1025	54241	0,4134	74,81
15	0,5526	34,1254	51641	0,4063	73,52

e. REPETITIVIDAD

Se dopó un blanco con patrón de 1,8-cineol a un intervalo de concentraciones entre 0.2540 y 0.5859 ppm, se hizo la extracción por triplicado y la inyección de cada extracción también por triplicado. La tabla 13 indica que los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran entre 90.03 y 93.19%. De lo anterior se puede deducir que el método es repetitivo.

Tabla 13. Determinación de la repetitividad del método de extracción.

Concentración muestra dopada (ppm)	Peso muestra (g)	Promedio de áreas	Concentración obtenida (ppm)	% de recuperación
	34,9168	49679	0,38	92,09
0.4160	34,8076	49499	0,38	92,07
	34,8535	49536	0,38	91,99
	39,5401	48241	0,33	90,93
0.3620	39,9785	49894	0,34	92,79
	40,0338	50096	0,34	93,01
	35,1798	72261	0,54	92,17
0.5859	35,2886	73351	0,55	93,19
	35,4559	73486	0,54	92,92
	35,9077	63197	0,23	91,77
0.2540*	35,2902	62458	0,23	92,36
	35,6239	61394	0,23	90,03

* concentrada a 5 mL

f. REPRODUCIBILIDAD.

Para encontrar el grado de cercanía entre los resultados de recuperación obtenidos, se realiza nuevamente el dopaje de las muestras de miel a una concentración conocida y se procede a extraer el terpeno en un rango de uno a ocho días después de suministrado. Teniendo en cuenta que el compuesto analizado es un volátil, las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su proceso de extracción, para evitar pérdidas mayores en la intemperie debido a los cambios de temperatura producidos a diario. La tabla 14 indica que el método es repetitivo ya que se obtiene porcentajes de recuperación entre el 91.72% al 93.77% en el transcurso de los ocho días, además se puede notar que tanto en el primer día de extracción, como en el octavo día, se encuentran porcentajes de recuperación del 93.5%, indicando que el método es reproducible.

Tabla 14. Determinación de la reproducibilidad del método

Concentración muestra dopada (ppm)	Tiempo extracción después de dopada (días)	Concentración obtenida	% de recuperación
0.3916	1	0,3663	93,56
		0,3620	92,44
		0,3632	92,75
		0,4523	93,16
		0,4536	93,43
0.4855	2	0,4453	91,72
		0,5140	93,01
		0,5131	92,85
0.5526	4	0,5182	93,77
		0,5164	93,55
0.5520	8	0,5085	92,12
		0,5099	92,37

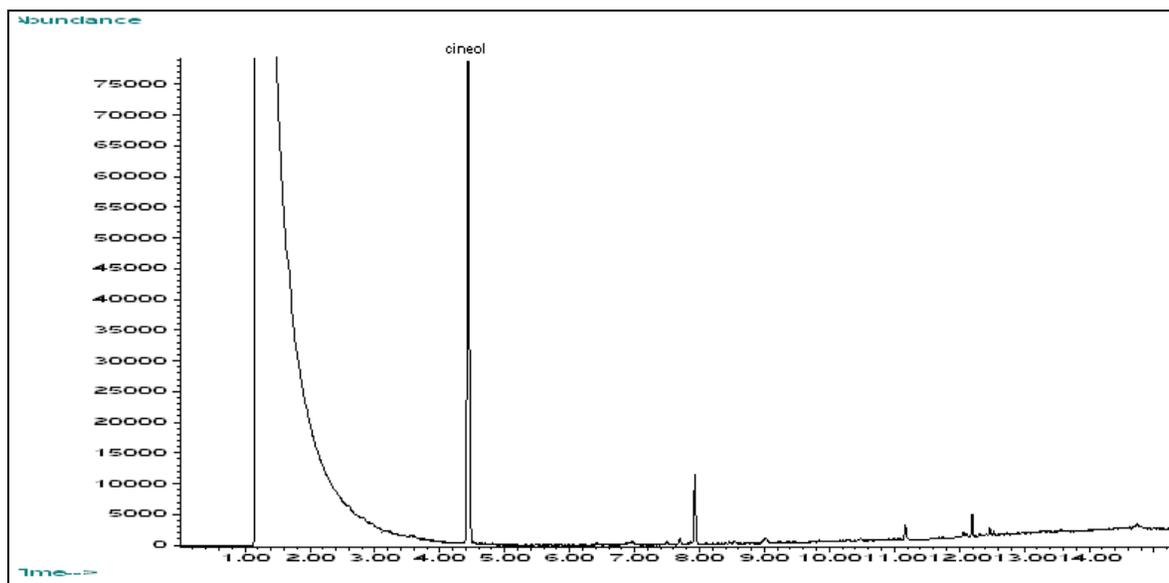
4.4.2 EXTRACCIÓN DEL CINEOL EN LAS MUESTRAS DE JARABE DE HOJA Y DE ESENCIA DE EUCALIPTO

Una vez estandarizado el método de extracción y cuantificación del 1,8-cineol en la miel, se procedió a realizar las extracciones del terpeno en las diferentes muestras de jarabe (hoja y esencia). En este caso fue necesario diluir la muestra obtenida puesto que se observó una concentración mayor que en las muestras de miel, por lo tanto la disolución realizada dependió del tamaño del área encontrado en cada extracción. El rango de diluciones fue entre 100 a 250 μ L en los jarabes de las dos especies.

Al inyectar las extracciones de las mieles de jarabes de hoja y de esencia, se observó un pico en el mismo tiempo de retención que el correspondiente del patrón. De esta manera se identificó el cineol en todas las muestras. La figura 31 presenta el cromatograma de una muestra de jarabe de hoja de eucalipto, donde

se observa el pico del cineol en una mayor concentración con respecto a los demás compuestos que son extraídos del jarabe, por medio de la mezcla de solventes.

Figura 31 Cromatograma de la extracción de la muestra de jarabe de hoja de eucalipto.



Los resultados de la concentración del cineol presente en los jarabes de hoja de eucalipto se muestran en la tabla 15, donde se observa un intervalo entre 11 ppm a 16 ppm. Esta es la cantidad de cineol que se transfiere de las hojas de eucalipto al jarabe y que estará disponible para ser tomada por las abejas e incorporada a la miel.

Tabla 15. Concentración del cineol en las muestras de jarabe de hoja de eucalipto

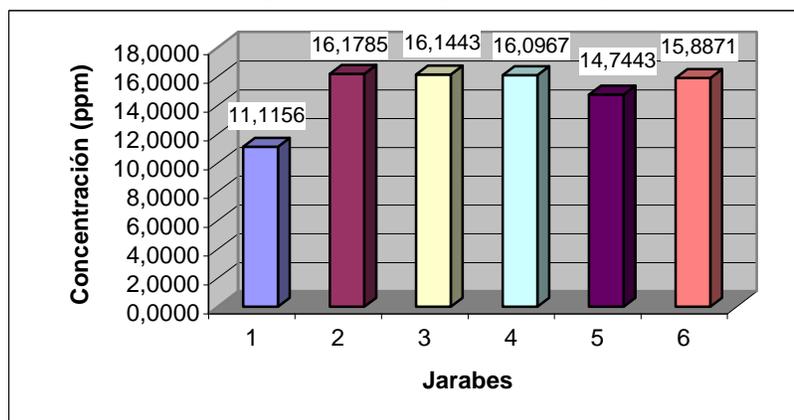
MUESTRA	PESO MUESTRA (g)	CONCENTRACIÓN (ppm)
jarabe 1	34,7106	11,1
jarabe 2	35,0873	16,1
jarabe 3	35,3496	16,1

jarabe 4	35,3245	16,1
jarabe 5	35,2976	14,7
jarabe 6	35,644	15,8

Jarabe 1: jarabe de primera alimentación de la colmena 1, Jarabe 2: jarabe de segunda alimentación de la colmena 1, Jarabe 3: jarabe de primera alimentación de la colmena 2, Jarabe 4: jarabe de segunda alimentación de la colmena 2, Jarabe 5: jarabe de primera alimentación de la colmena 3, Jarabe 6: jarabe de segunda alimentación de la colmena 3.

Según las concentraciones encontradas en las muestras del jarabe de hoja, se puede observar que hay un promedio de 16 ppm (figura 32), es decir, es el promedio de cantidad que queda en el jarabe al ser liberado por la hoja. Esto no quiere decir que es la cantidad que se deba encontrar presente en las muestras de miel express, puesto que el proceso tiene muchas variables como clima y tiempo de producción de la miel, además el metabolismo en el cuerpo de la abeja. Por lo tanto es posible encontrar cantidades no tan cercanas como las concentraciones del cineol en este jarabe de hoja ya que estos jarabes son almacenados a temperaturas bajas y herméticamente cerrados hasta análisis, mientras que las colmenas están en la intemperie y se ven afectadas por los factores nombrados anteriormente.

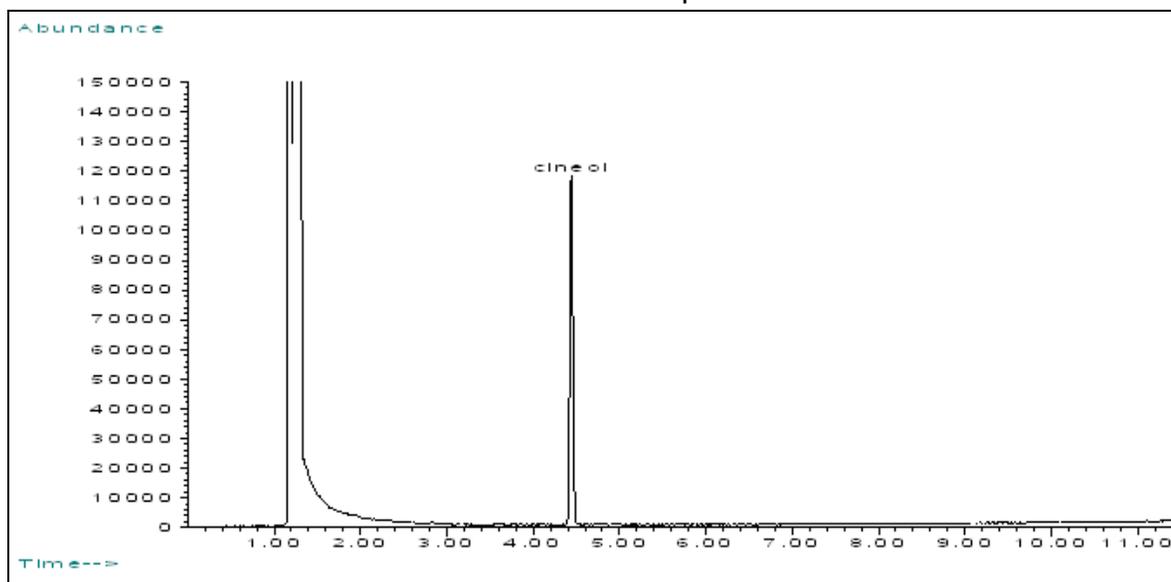
Figura 32 Comparación de las concentraciones del cineol en las muestras de jarabe de hoja de eucalipto



1: jarabe de primera alimentación de la colmena 1; 2: jarabe de segunda alimentación de la colmena 1; 3: jarabe de primera alimentación de la colmena 2; 4: jarabe de segunda alimentación de la colmena 2; 5: jarabe de primera alimentación de la colmena 3; 6: jarabe de segunda alimentación de la colmena 3.

En el cromatograma de la inyección de la muestra extraída del jarabe de esencia de eucalipto (figura33), se observa únicamente un pico que según su tiempo de retención corresponde al cineol. Esto es consistente con la composición del jarabe (agua, azúcar y terpeno) y el tipo de compuestos que pueden ser extraídos por el procedimiento aplicado, en el cual se espera disolver moléculas apolares, que en este caso corresponderían a los volátiles del jarabe.

Figura 33 Cromatograma de la extracción de la muestra de jarabe de esencia de eucalipto



Para la cuantificación del cineol en las muestras de jarabe de esencia de eucalipto, fue necesario realizar una dilución mayor ya que se encontró más cantidad del terpeno que en las muestras de jarabe de hoja de eucalipto. El rango de concentración del terpeno encontrado en este tipo de jarabe fue de 22.1 a 24.7 ppm (tabla 16).

Tabla 16. Concentración del cineol en las muestras de jarabe de esencia de eucalipto

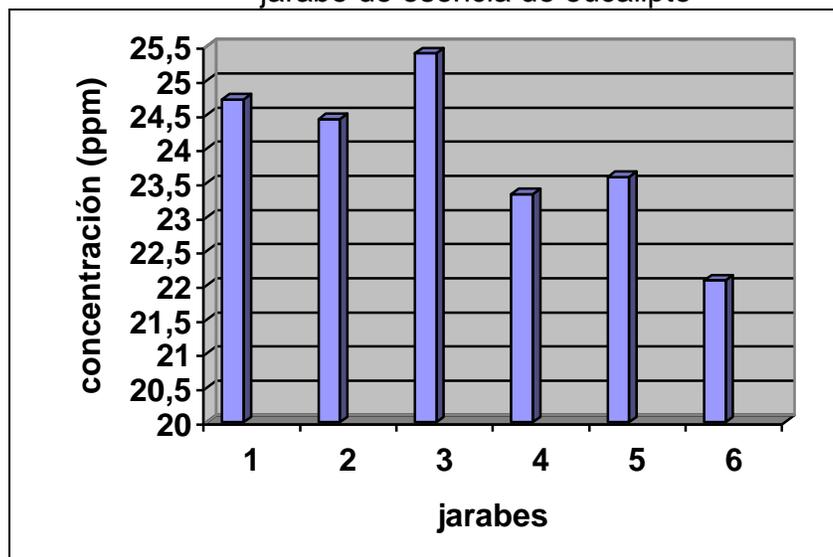
MUESTRA	PESO MUESTRA (g)	CONCENTRACIÓN (ppm)
jarabe 1	35,063	24,72
jarabe 2	35,1067	24,44

jarabe 3	35,1966	25,40
jarabe 4	34,1201	23,34
jarabe 5	35,2571	23,59
jarabe 6	35,1003	22,08

Jarabe 1: jarabe de primera alimentación de la colmena 1, Jarabe 2: jarabe de segunda alimentación de la colmena 1, Jarabe 3: jarabe de primera alimentación de la colmena 2, Jarabe 4: jarabe de segunda alimentación de la colmena 2, Jarabe 5: jarabe de primera alimentación de la colmena 3, Jarabe 6: jarabe de segunda alimentación de la colmena 3.

Hay mayor cercanía entre estos datos que es lo esperado porque se agregó una cantidad conocida de la esencia a la mezcla de agua con azúcar. También se tiene en cuenta que al preparar este jarabe se dejó enfriar a temperatura ambiente puesto que para la producción del jarabe es necesario calentar para que se produzca la total disolución del azúcar. Además, se almacenó también a una temperatura de 4°C que evitan la volatilización del cineol en la muestra.

Figura 35 Comparación de las concentraciones del cineol en las muestras de jarabe de esencia de eucalipto

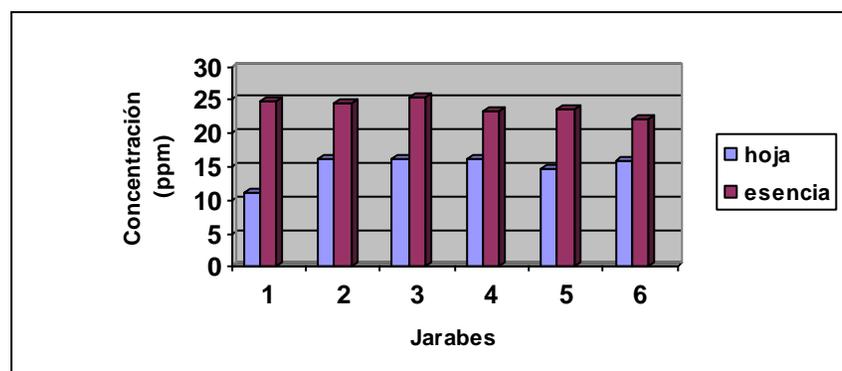


1: jarabe de primera alimentación de la colmena 1; 2: jarabe de segunda alimentación de la colmena 1; 3: jarabe de primera alimentación de la colmena 2; 4: jarabe de segunda alimentación de la colmena 2; 5: jarabe de primera alimentación de la colmena 3; 6: jarabe de segunda alimentación de la colmena 3.

La figura 34 muestra las diferentes cantidades del cineol en los jarabes suministrados a las tres colmenas con su primera y segunda alimentación.

Como se mencionó anteriormente, las cantidades de cineol encontradas entre los dos tipos de jarabe, son mayores siempre en el realizado con esencia de eucalipto, pues se debe a que es mucho más fácil la incorporación de este terpeno agregando el aceite esencial puro, que mediante las hojas, ya que en este caso es necesario añadir las hojas cuando el jarabe está caliente para que se agreguen los aceites esenciales a este. Pero, la desventaja en este caso es que se puede volatilizar mucho más rápido mientras que en el jarabe de hojas, esta esencia va a ser liberada constantemente a medida que permanecen las hojas en el jarabe durante la alimentación. En la figura 35 se observa la diferencia de cantidades encontradas del cineol en las muestras de los dos tipos de jarabe.

Figura 36 Comparación de la concentración del cineol en todas las muestras de los dos tipos de jarabe.



1: jarabe de primera alimentación de la colmena 1; 2: jarabe de segunda alimentación de la colmena 1; 3: jarabe de primera alimentación de la colmena 2; 4: jarabe de segunda alimentación de la colmena 2; 5: jarabe de primera alimentación de la colmena 3; 6: jarabe de segunda alimentación de la colmena 3.

4.4.3 EXTRACCIÓN DEL CINEOL EN LAS MUESTRAS DE MIEL DE HOJA Y DE ESENCIA DE EUCALIPTO

Al realizar la extracción en todas las muestras de miel express tanto de hoja como de esencia de eucalipto y su respectivo análisis por cromatografía de gases, se encontró la señal en igual tiempo de retención del patrón, lo que indica la presencia del eucaliptol en los dos tipos de miel express. La figura 36 muestra el cromatograma de la extracción del terpeno en la miel express de esencia de eucalipto, donde se observan nuevos picos que pueden ser característicos de los componentes del aroma de la miel de abejas, o que se pueden llegar formar en el almacenamiento de la miel.

Figura 37 Cromatograma de la extracción del cineol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto

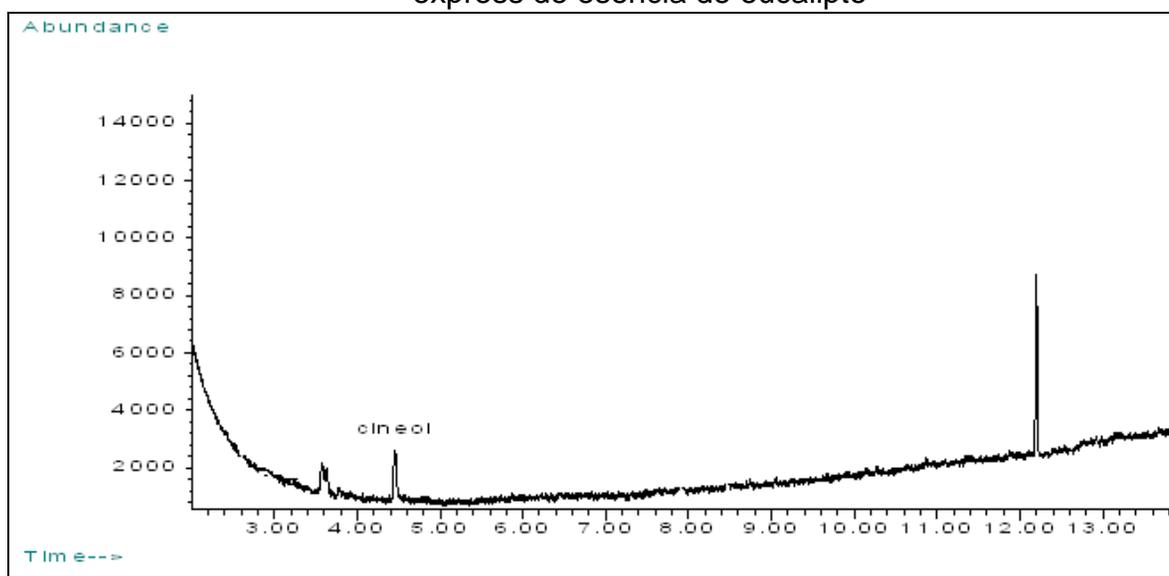
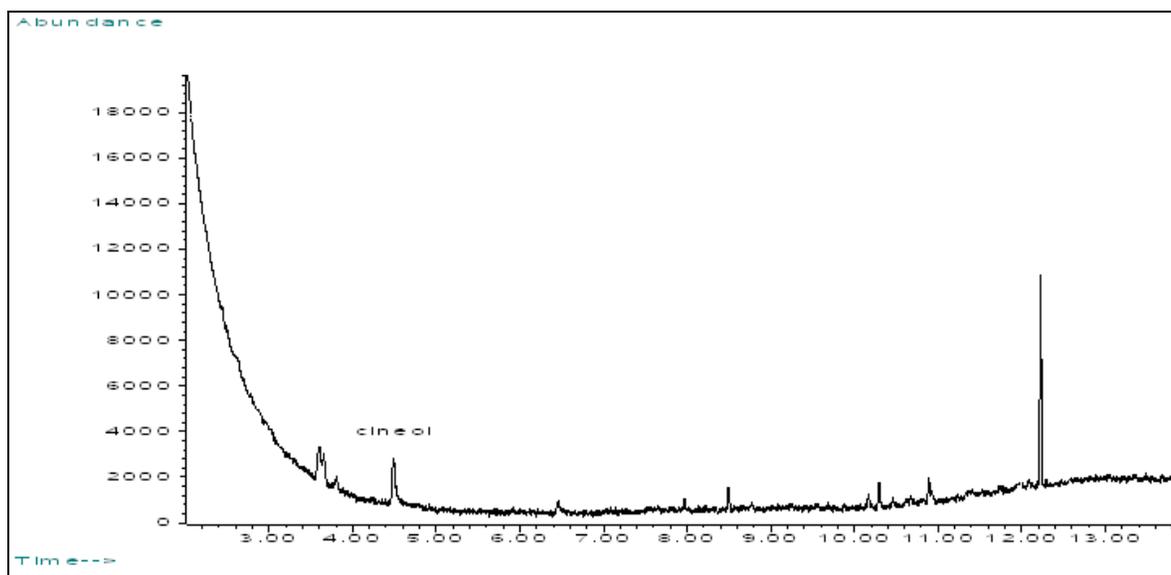


Figura 38 Cromatograma de la extracción del cineol en las muestras de miel express de hoja de eucalipto



En el cromatograma de la figura 37, correspondiente a la muestra de miel express de hoja de eucalipto, además de la señal del cineol se observan picos coincidentes con los que aparecen en el cromatograma de la muestra de miel express de esencia de eucalipto. Además, se presentan otros compuestos que pueden ser algunas sustancias transferidas desde la hoja de eucalipto y que pueden observarse en el cromatograma del jarabe correspondiente.

Con este método de suministro de jarabes en las colmenas, se logró incorporar el principio activo de la planta medicinal, enriqueciendo la miel y probablemente consiguiendo que el terpeno contribuya en la miel con las mismas propiedades que tiene en la planta.

Se llevó a cabo la extracción del cineol en todas las muestras de miel obtenidas tras la alimentación de las colmenas para obtener suficientes datos estadísticos. Uno de los aspectos más importantes que se tuvo en cuenta fue el seguimiento de la condición atmosférica en el tiempo de alimentación de las colmenas (ver tabla 3), que podría explicar la variación en la concentración del terpeno en la miel, cabe notar que las alimentaciones realizadas fueron siempre en tiempo lluvioso, pero,

unos días poco mas soleados que otros, además, el tiempo de almacenamiento también influye ya que las temperaturas en el almacenamiento al ambiente, varían durante el día.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CINEOL EN LAS MUESTRAS DE MIEL EXPRESS DE ESENCIA DE EUCALIPTO.

Tabla 17. Resultados obtenidos de la concentración del eucaliptol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto.

COLMENA	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
COLMENA 1 PRIMERA	EPT ^o amb	0,16
ALIMENTACION	ESPT ^o amb	0,17

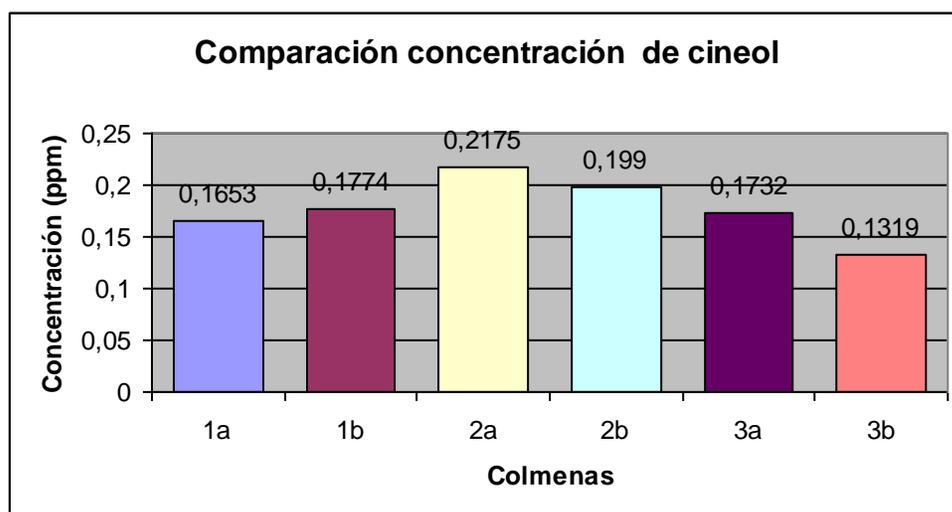
	EP4°C	0,22
	ESP4°C	0,26
COLMENA 1 SEGUNDA	EPT ⁰ amb	0,17
ALIMENTACION	ESPT ⁰ amb	0,18
	EP4°C	0,31
	ESP4°C*	0,35
COLMENA 2 PRIMERA	EPT ⁰ amb	0,21
ALIMENTACION	ESPT ⁰ amb	0,24
	EP4°C	0,29
	ESP4°C*	0,30
COLMENA 2 SEGUNDA	EPT ⁰ amb	0,19
ALIMENTACION	ESPT ⁰ amb	0,20
	EP4°C	0,25
	ESP4°C*	0,27
COLMENA 3 PRIMERA	EPT ⁰ amb	0,17
ALIMENTACION	ESPT ⁰ amb	0,18
	EP4°C	0,25
	ESP4°C*	0,28
COLMENA 3 SEGUNDA	EPT ⁰ amb	0,13
ALIMENTACION	ESPT ⁰ amb	0,16
	EP4°C	0,18
	ESP4°C	0,19

EPT⁰amb: miel de esencia pasteurizada almacenada a temperatura ambiente; ESPT⁰amb: miel de esencia sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; EP4°C: miel de esencia pasteurizada almacenada a 4°C; ESP4°C: miel de esencia sin pasteurizar almacenada a 4°C.

En la tabla 17 se observan los resultados obtenidos en el análisis de cuantificación del cineol en la muestra de miel express de esencia de eucalipto. Se observa que la concentración varía dependiendo de su tipo de almacenamiento, por ejemplo se presenta la menor concentración en todas las muestras de miel de esencia pasteurizada almacenada a temperatura ambiente, un rango entre 0.1319 a 0.2175, con una gran diferencia de concentración del terpeno en la segunda colmena con sus dos alimentaciones (la figura 38 indica la comparación entre las concentraciones de estas muestras), su época correspondiente fue en el mes de

noviembre, mes de época de mucha lluvia, lo que impide la posible salida de las abejas al medio, ocasionando su rápida obtención de la miel en esta colmena y la menor volatilización del cineol en el jarabe durante su tiempo de almacenamiento en la colmena. La miel que menor concentración presenta en este tipo de almacenamiento es la cosechada de la segunda alimentación de la tercera colmena, realizada en el mes de enero, época menos lluviosa que las anteriores.

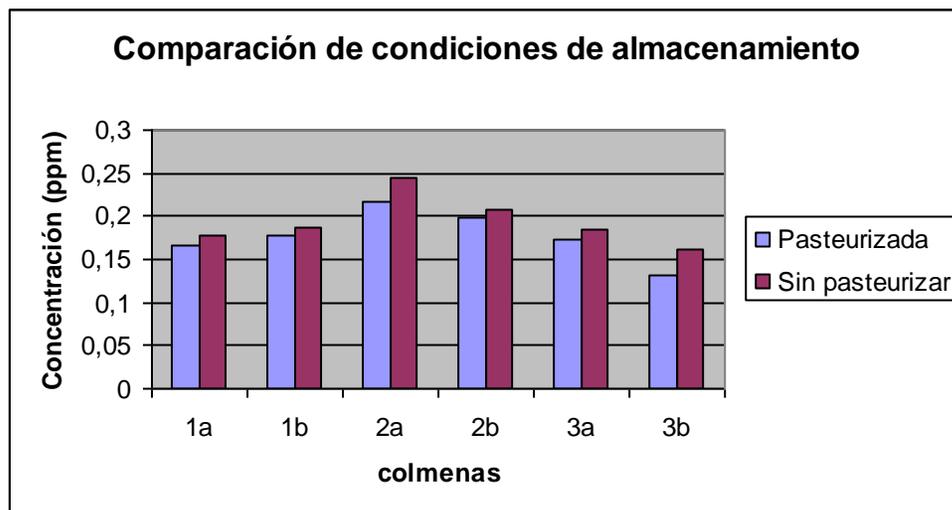
Figura 39 Concentración del cineol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto almacenadas a temperatura ambiente.



1,2 y 3 indica el número de colmena y a y b indica la primera y segunda alimentación respectivamente.

En las cantidades encontradas en ppm del cineol en la miel sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente, se encuentra un valor mayor de más o menos 0.0104 a 0.0307 ppm, comparado con las muestras pasteurizadas almacenadas a esta temperatura indicando una pérdida del volátil en el momento de calentarla en este proceso de pasteurización (figura 39).

Figura 40 Condiciones de concentración del cineol entre las muestras almacenadas a temperatura ambiente de la miel express de esencia de eucalipto.



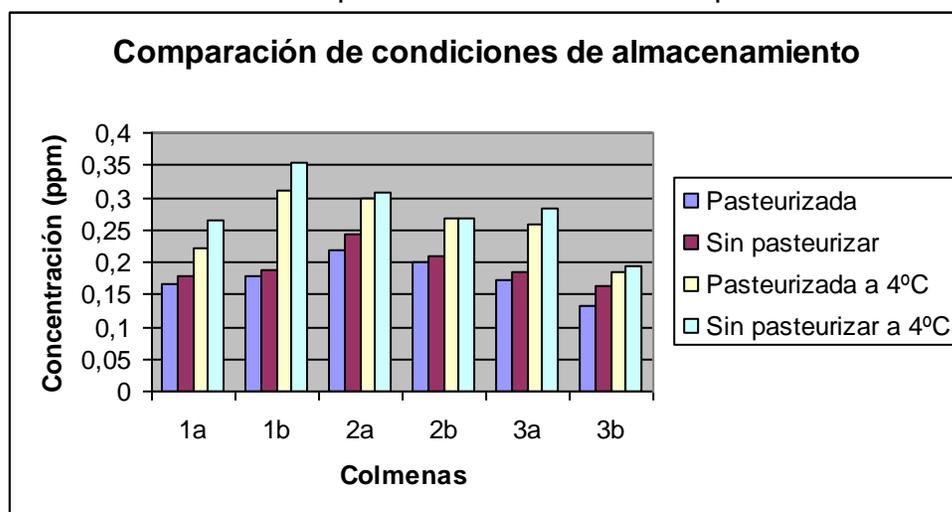
1,2 y 3 indica el número de colmena y a y b indica la primera y segunda alimentación respectivamente.

Las muestras de miel en estudio en la condición de almacenamiento pasteurizada a 4°C, presentan concentraciones mayores que las dos establecidas anteriormente, es decir, indica mayor conservación del volátil al acondicionarla a esta temperatura que al no pasteurizarla y exponerla al ambiente. La diferencia encontrada entre las concentraciones son: Entre la pasteurizada almacenada a 4°C y la muestra sin pasteurizar depositada a temperatura ambiente, hay una diferencia promedio de 0.06 ppm y entre las muestras pasteurizadas almacenadas a 4°C y temperatura ambiente, hay una diferencia promedio de 0.08 ppm que demuestra la conservación del terpeno al disminuir su temperatura evitando en parte la volatilización del cineol.

Cuando se habla de almacenar la muestra sin pasteurizar a 4°C se espera una mayor presencia del cineol que en todas las anteriores puesto que es un volátil que puede ser perdido fácilmente al ambiente y disminuyendo su temperatura, se

busca su conservación. Estos resultados se encontraron en todas las muestras de análisis con un rango entre 0.19 a 0.35 ppm dependiendo esta concentración de la condición atmosférica presentada en cada época de alimentación de las colmenas, que es uno de los factores mas predominantes en este caso porque influye de una manera muy consecuente en la volatilización del terpeno durante el almacenamiento. Se encontró un promedio de 0.2957 ppm en las muestras cosechadas durante las alimentaciones realizadas en los meses de octubre a diciembre que fueron hasta la primera alimentación de la tercera colmena, esta temporada fue época de lluvias, mientras que la última alimentación realizada a mediados del mes de enero no fue tiempo del todo aprovechable para la alimentación de la colmena debido a un periodo escaso de lluvias que permitía la fácil volatilización del terpeno en los jarabes antes de ser ingerido por las abejas, por esta razón se puede encontrar la baja concentración en la muestra obtenida en esta época (figura 40) con respecto a las anteriores.

Figura 41 Comparación de la concentración del cineol en las muestras de miel express de esencia de eucalipto.



1,2 y 3 indica el número de colmena y a y b indica la primera y segunda alimentación respectivamente

Con respecto a la cantidad del terpeno presente en el jarabe y la cantidad del mismo presente en la miel express de esencia de eucalipto, se puede decir que se transfiere un promedio en porcentaje de incorporación de 0.94% de este principio activo, desde el jarabe a la miel Express. Sin embargo hay que tener en cuenta las variables climáticas y que estos jarabes no se encuentran herméticamente sellados en las colmenas, por lo tanto ocurren pérdidas hacia el medio ambiente en todo momento; algunas veces mas que otras. También se debe tener muy en cuenta la cantidad que la abeja toma de este principio activo. Otra razón muy importante de este porcentaje promedio, es que en las colmenas la miel se encuentra caliente más o menos entre una temperatura de 28 a 32°C, que volatilizan el terpeno.

En general lo que se puede decir de la muestra de miel express de esencia de eucalipto en primer lugar, es que el principio activo suministrado si es asimilado por las abejas de la colmena permitiendo el enriquecimiento del néctar con el volátil al ser procesado. En segundo lugar, como se encontró que es favorable para evitar más la volatilización del terpeno en la miel, es preciso guardarla a bajas temperaturas para conservar este principio activo. Cabe resaltar que la alimentación de las colmenas por este método, es viable tanto para la obtención del producto natural como para el buen funcionamiento de las colmenas ya que las abejas producen efectividad de trabajo para el apicultor incrementando su producto en un menor tiempo.

a. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CINEOL EN LAS MUESTRAS DE MIEL EXPRESS DE HOJA DE EUCALIPTO

Tabla 18. Concentración obtenida del cineol en la miel express de hoja de eucalipto

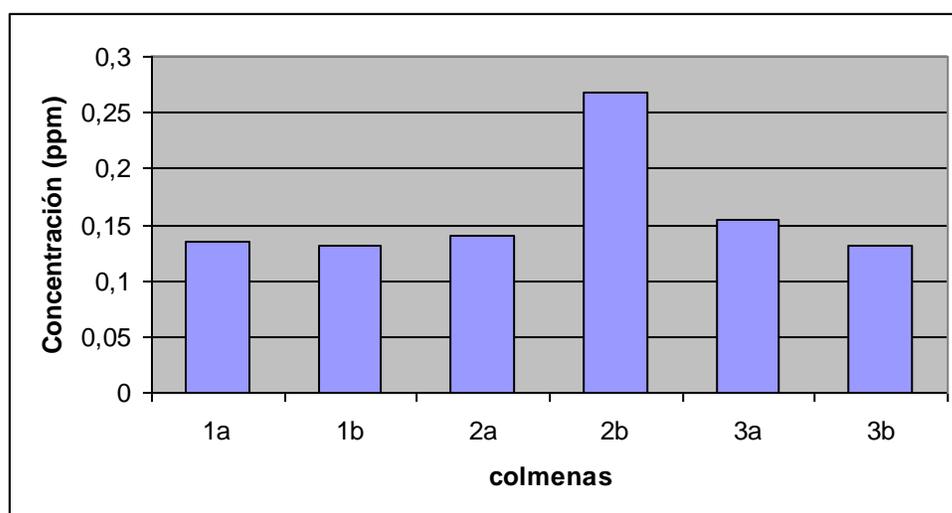
COLMENA	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)
COLMENA 1 PRIMERA ALIMENTACION	HPT ^o amb	0,13
	HSPT ^o amb	0,14
	HP4 ^o C	0,15
	HSP4 ^o C	0,15
COLMENA 1 SEGUNDA ALIMENTACION	HPT ^o amb	0,13
	HSPT ^o amb	0,17
	HP4 ^o C	0,19
	HSP4 ^o C	0,22
COLMENA 2 PRIMERA ALIMENTACION	HPT ^o amb	0,13
	HSPT ^o amb	0,17
	HP4 ^o C	0,28
	HSP4 ^o C	0,30
COLMENA 2 SEGUNDA ALIMENTACION	HPT ^o amb	0,26
	HSPT ^o amb	0,29
	HP4 ^o C	0,33
	HSP4 ^o C	0,34
COLMENA 3 PRIMERA ALIMENTACION	HPT ^o amb	0,15
	HSPT ^o amb	0,17
	HP4 ^o C	0,25
	HSP4 ^o C	0,27
COLMENA 3 SEGUNDA ALIMENTACION	HPT ^o amb	0,13
	HSPT ^o amb	0,16
	HP4 ^o C	0,16
	HSP4 ^o C	0,17

HPT^oamb: miel de esencia pasteurizada almacenada a temperatura ambiente; HSPT^oamb: miel de esencia sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente; HP4^oC: miel de esencia pasteurizada almacenada a 4°C; HSP4^oC: miel de esencia sin pasteurizar almacenada a 4°C.

En la tabla 18, se muestra las concentraciones obtenidas del cineol en la miel express de hoja de eucalipto, en ella se encuentra que las muestras pasteurizadas

almacenadas a temperatura ambiente, son las de más baja concentración en relación con las demás muestras. Estas concentraciones están entre 0.1317 a 0.1395 ppm y una muestra presenta una cantidad del doble de las demás, esta es la de la colmena 2 alimentada por segunda vez con la hoja de eucalipto, época de mucha lluvia, por lo tanto se demuestra que en el momento de la alimentación, el volátil se mantuvo por mas tiempo en el alimentador (la figura 41 muestra los resultados obtenidos en estas muestras).

Figura 42 Concentración del cineol en las muestras de miel express de hoja de eucalipto pasteurizada a temperatura ambiente

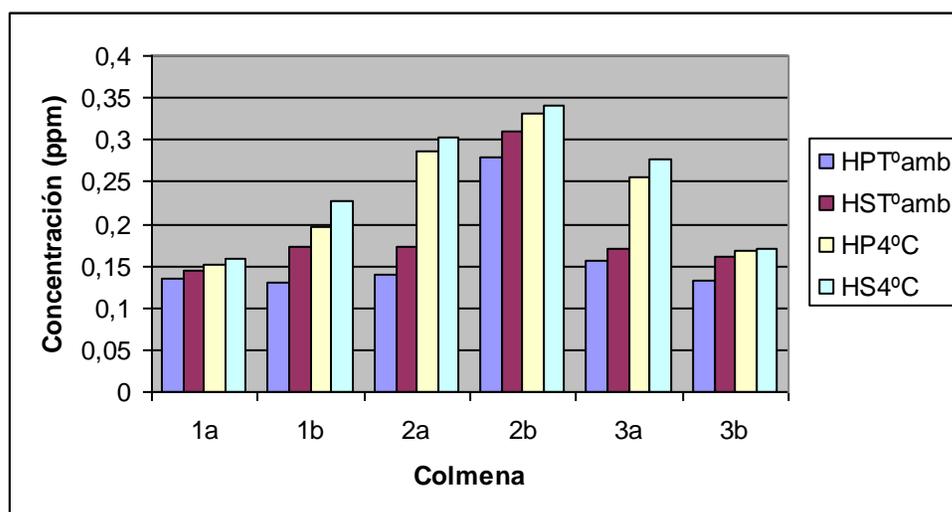


1,2 y 3 indica el número de colmena y a y b indica la primera y segunda alimentación respectivamente

La muestra de miel express de hoja de eucalipto sin pasteurizar almacenada a temperatura ambiente, presenta concentraciones mayores que la muestra discutida anteriormente, con un promedio de 0.16 ppm a excepción de la muestra de la segunda alimentación de la colmena dos que tiene un contenido mucho mayor por las razones comentadas.

Con la figura 42 se puede notar la diferencia marcada entre la concentración del cineol en las muestras almacenadas a 4°C con respecto a las almacenadas a temperatura ambiente, demostrando la conservación del volátil a bajas temperaturas. La última muestra por analizar (sin pasteurizar a 4°C), indica un contenido mucho mayor que todas las anteriores ya que es una muestra que no ha sufrido calentamiento alguno.

Figura 43 Comparación de la concentración del cineol entre las muestras almacenadas a temperatura ambiente y 4°C



1,2 y 3 indica el número de colmena y a y b indica la primera y segunda alimentación respectivamente.

Al comparar las concentraciones de los dos tipos de miel express de eucalipto, se detalla una cantidad superior en las muestras de miel express de esencia de eucalipto, dato esperado puesto que las hojas liberaron una menor cantidad del terpeno con respecto a la cantidad suministrada en el jarabe de esencia. Sin embargo con respecto al porcentaje de incorporación del cineol en la miel express de hoja de eucalipto, se encontró un valor promedio de 1.2%, exceptuando el encontrado en la muestra de la segunda alimentación de la colmena dos, que es de 2.1%. Estos porcentajes son mayores a los porcentajes encontrados en las

muestras de miel express de esencia de eucalipto (aprox. 0,94%), probablemente porque el terpeno está retenido por más tiempo en las hojas y va siendo liberado constantemente.

Otro aspecto tenido en cuenta fue que en los dos tipos de miel, se encuentra la menor concentración del cineol en las últimas muestras tomadas, debido esto a la época algo soleada durante este tiempo donde la volatilización del principio activo es mayor, además se observa que el cambio en la cantidad del terpeno en las diferentes condiciones no es muy notorio puesto que las muestras tuvieron un tiempo de almacenamiento menor que los anteriores porque fueron cosechadas en el mes de febrero entonces la volatilización del cineol es de más baja cantidad por esta razón. En la concentración del cineol en las muestras almacenadas a 4°C no se nota mucha diferencia, por lo tanto se puede decir que la pérdida del compuesto analizado se produce más en la condición de almacenamiento que en el momento de calentarla para ser pasteurizada.

En las muestras de miel express de eucalipto tanto de esencia como de hoja, se pudo observar que se logró enriquecerlas con el cineol a una escala de ppm. Esto es algo positivo puesto que hay reportes de concentraciones de estos volátiles en miel en concentraciones de ppb³², esto debido a que esta clase de compuestos son encontrados en muy bajas cantidades en el néctar de las flores.

³² Investigation of the aroma compounds from headspace and aqueous solution from the cambará (*Gochnatia Velutina*) honey.

CONCLUSIONES

La alimentación de colmenas por medio del suministro de jarabes realizados con plantas medicinales o principios activos, es un proceso viable tanto para las abejas como para el apicultor, puesto que se facilita a las obreras su ritmo de trabajo obteniendo la miel express en un lapso de tiempo reducido (nueve días como promedio).

Al suministrar este tipo de jarabes a las colmenas, se obtienen buenos resultados en relación con su postura, es decir, una mayor cantidad de abejas, mejor producción de huevos por parte de la abeja reina y mayor recolección de polen en las colmenas. Por lo tanto se encuentra mayor cantidad de miel producida en un menor tiempo.

El método de extracción del terpeno en la miel express de eucalipto utilizando el ultrasonido es viable, ya que se obtienen buenos porcentajes de recuperación al realizar la purga de la muestra y su respectiva extracción con ésta técnica.

Los solventes utilizados en la extracción del terpeno facilitan el paso de los compuestos volátiles de la miel a estos y evitan la extracción de las clases de azúcares de la mezcla compleja que es la miel de abejas.

Al identificar y cuantificar el 1,8-cineol en la miel express de eucalipto, se puede comprobar la existencia del volátil agregado por medio del suministro de los jarabes realizados con base en planta medicinal y en el extracto.

La cantidad de cineol encontrada en la miel express de eucalipto tanto de hoja como de esencia, es considerable con respecto a su concentración en los jarabes suministrados. Ya que aún existiendo tantas variables que pueden ocasionar pérdidas del volátil, se logra el enriquecimiento de la miel con este principio activo.

Se logró enriquecer la miel de abejas con el cineol, mediante la alimentación de las colmenas con los jarabes, obteniendo cantidades altas (con magnitudes de ppm) con respecto a las reportadas anteriormente en una miel multifloral (magnitudes de ppb). Por lo tanto, se puede decir que este principio activo es positivamente aceptado por las abejas.

La mejor forma de favorecer la permanencia del cineol en las muestras de miel express de eucalipto, es almacenándola bajo refrigeración y por obvias razones pasteurizándola, dado que se produce mayor pérdida al almacenarla a una temperatura variable que en el momento de pasteurizar.

Los porcentajes de incorporación en la miel express de hoja de eucalipto (1.2%, 2.1%) son mayores que los encontrados en la miel express de esencia de eucalipto (0.94% como promedio), indican que es mas factible la alimentación de las colmenas mediante el suministro de jarabe de hojas, porque hay liberación constante del volátil hacia el jarabe tomado por las abejas.

BIBLIOGRAFÍA

ADEFOR. 1995. Comportamiento de 25 procedencias de 3 especies forestales del género Eucalyptus (E. camaldulensis Dehn, E. maculata Hook. F. y E. tereticornis Sm.) en Chancay (Cajamarca, Perú). Informe de investigación N° 5. ADEFOR. 24 pp.

APIARIO los ALPES- Javier de Jesús Arroyave

BERNAL RAMIREZ, Inés. Análisis de alimentos. Santafé de Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1993, 84-85.

B.S. RADOVIC , M. CARERI , A. MANGIA , M. MUSCI, Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey, Food Chemistry 72 (2001) disponible en página web www.elsevier.com/locate/foodchem.

B.S. RADOVIC, Contribution of dynamic headspace CG-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey, Food Chemistry, ELSEVIER, 72:511-520 2001.

CODEX ALIMENTARIOUS DE LA MIEL (2001) <http://www.vfu.cz/acta-vet/vol74/74-147.pdf> (citado 28-NOV-2005)

CONSUMER.ES EROSKY, Fundación EROSKY boletines alimentación, la miel http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprendera_comer_bien/guia_alimentos/miscelanea/2001/04/10/35025.php,(citado 29-09-2005)

E. ALISSANDRAKIS, D. Daferera, P.A. Tarantilis, M. Polissiou, P.C. Harizanis, Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey, *Food Chemistry* 82 (2003) 575–582.

ELEFThERIOS ALISSANDRAKIS, PETROS A TARANTILIS, Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:91–97 (2005).

FITOMED II, Plantas Medicinales, La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1993, http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol21_3_02/ibi12302.html. (citado 10-octubre-2005)

HARRIS, D. Química Analítica Cuantitativa, 4ª edición 2000, Pág 47-55.

ING. AGR. OSCAR BARALDI, Agro noticias online, diciembre de 2002, alimentación de abejas, disponible en http://www.rosario.com.ar/agronoticias/archivos/dest_1.htm. (citado 14-NOV-2005)

JORGE A. PINO, *Flavour and Fragrance Journal*, Study of essential oils of *Eucalyptus resinifera* Smith, *E.tereticornis* Smith and *Corymbia maculata* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson, grown in Cuba, 25 May 2001; **17**: 1–4.

KIRK, R.S., SAWYER, R. y EGAN, H. Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson. 2 ed. México: Compañía Editorial Continental, 1996. p. 11-35, 319-323, 695-721.

LARA PIASENZOTTO, LUISA GRACCO AND LANFRANCO CONTE, Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:1037–1044 (online: 2003).

L. VORLOVÁ, O. ELECHOVSKÁ, Activity of Enzymes and Trace Element Content in Bee Honey, Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, ACTA VET. BRNO 2002, 71: 375–378, disponible en la página web <http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>. (citado 15-nov-2005)

MANGIERI, H. Y DIMITRI, M.J. Los eucaliptos en la silvicultura. Buenos Aires, ACME. 226 pp. 1998.

McGREGOR, S.E. La apicultura en los Estados Unidos. México: Editorial Limusa, 1985.

MARIE E. LUCCHESI, FARID CHEMAT, JACQUELINE SMADJA. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, ELSEVIER, Journal of Chromatography A, 1043 (2004) 323–327.

M. Valcarcel Gases. Técnicas Analíticas de separación, Editorial Reverté S.A. 1998, Barcelona, págs 615-617.

NORMA DEL CODEX PARA LA MIEL, disponible en la página web: http://www.agrobit.com.ar/Info_tecnica/alternativos/apicultura/AL_000011ap.htm. (citado 28-nov-2005)

PIASENZOTTO LARA, Solid Phase Microextraction (SPME) applied to honey quality control, Journal of Science and Agriculture, 83:1037-1044, 2003, Society of Chemical Industry.

PLANTAS MEDICINALES, FITOMED II P La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1993, http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol21_3_02/ibi12302.htm, (citado 23-OCT-2005)

R.A. PÉREZ, C. SANCHEZ-BRUNETE, R.M. CALVO, J.L. TADEO, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 2633–2637.

R. F. A. Moreira and C. A. B. De Maria, Investigation of the aroma compounds from headspace and aqueous solution from the cambará (*Gochnatia Velutina*) honey, FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL, 2005; 20: 13–17.

ROSA A. PEREZ, CONSUELO SANCHEZ-BRUNETE, Analysis of Volatiles from Spanish Honeys by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2633-2637.

STEFAN BOGDANOV, Kaspar Rufo, Livia Persano, Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review, Internacional Honey Comisión, 11 junio 2004.

WILLIAM HORWITZ, AOAC Oficial Methods Of Analysis (2000), the scientific of Analysis dedicated to Analytical excellence, Food composition; additives; natural contaminants, Sugar and sugar products, chapter 44, p 23, 17th edition, volumen II.

5. ANEXOS

5.1 tabla 19. Determinación del contenido de humedad*

Índice de Refracción 20°C	Contenido de Humedad (%)	Índice de Refracción 20°C	Contenido de Humedad (%)	Índice de Refracción 20°C	Contenido de Humedad (%)
1,5044	13.0	1,4940	17.0	1,4840	21.0
1,5038	13.2	1,4935	17.2	1,4835	21.2
1,5033	13.4	1,4930	17.4	1,4830	21.4
1,5028	13.6	1,4925	17.6	1,4825	21.6
1,5023	13.8	1,4920	17.8	1,4820	21.8
1,5018	14.0	1,4915	18.0	1,4815	22.0
1,5012	14.2	1,4910	18.2	1,4810	22.2
1,5007	14.4	1,4905	18.4	1,4805	22.4
1,5002	14.6	1,4900	18.6	1,4800	22.6
1,4997	14.8	1,4895	18.8	1,4795	22.8
1,4992	15.0	1,4890	19.0	1,4790	23.0
1,4987	15.2	1,4885	19.2	1,4785	23.2
1,4982	15.4	1,4880	19.4	1,4780	23.4
1,4976	15.6	1,4875	19.6	1,4775	23.6
1,4971	15.8	1,4870	19.8	1,4770	23.8
1,4966	16.0	1,4865	20.0	1,4765	24.0
1,4961	16.2	1,4860	20.2	1,4760	24.2
1,4956	16.4	1,4855	20.4	1,4755	24.4
1,4951	16.6	1,4850	20.6	1,4750	24.6
1,4946	16.8	1,4845	20.8	1,4745	24.8
				1,4740	25.0

*Según norma ICONTEC 1273

5.2 FORMULAS ESTADISTICAS

- a. MEDIA Y MEDIANA: la media, mediana y el promedio (\bar{X}) son sinónimos para el valor que se obtiene al dividir la suma de las mediciones repetidas entre el número de mediciones en la serie:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N x}{N}$$

Donde X_i representa los valores individuales de x que integran una serie de N mediciones repetidas.

La mediana es el valor alrededor del cual se distribuyen los demás datos por igual. La mitad de los datos son numéricamente mas pequeños que la mediana y la otra mitad son numéricamente mayores.

- b. METODO DE MINIMOS CUADRADOS: En este método se supone que los errores en los valores tomados como ordenadas (valores y) son sustancialmente mayores que los errores en los valores de las abscisas (valores x). Frecuentemente se cumple esta condición.

Ecuación de la recta: $y = mx + b$

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n \{(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})\}}{\{[\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2][\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2]\}}$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

- c. PRECISIÓN: la precisión esta relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente

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

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

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

$$s = \sqrt{\frac{1}{N - g} \sum_{j=1}^g \sum_{i=1}^n (X_i - X_j)}$$

5.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

Tabla 20. Curva de calibración de 0.10 a 0.25 ppm.

CONCENTRACION	AREAS OBTENIDAS	PROMEDIO DE AREAS	DESVIACION ESTANDAR RELATIVA
0,1024	11668	11551	0,87
	11495		
	11491		
0,1500	17145	17385	1,22
	17279		
	17562		
0,2012	21818	21563	1,83
	21764		
	21107		
0,2488	28624	28742	2,26
	28159		
	29444		

Figura 43 Curva de la desviación estándar versus concentración para hallar límites de cuantificación y detección.

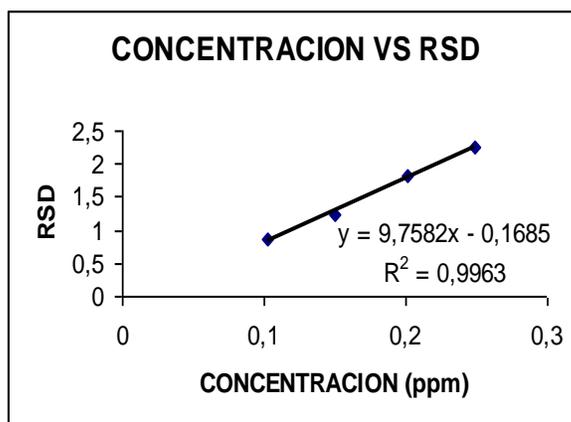
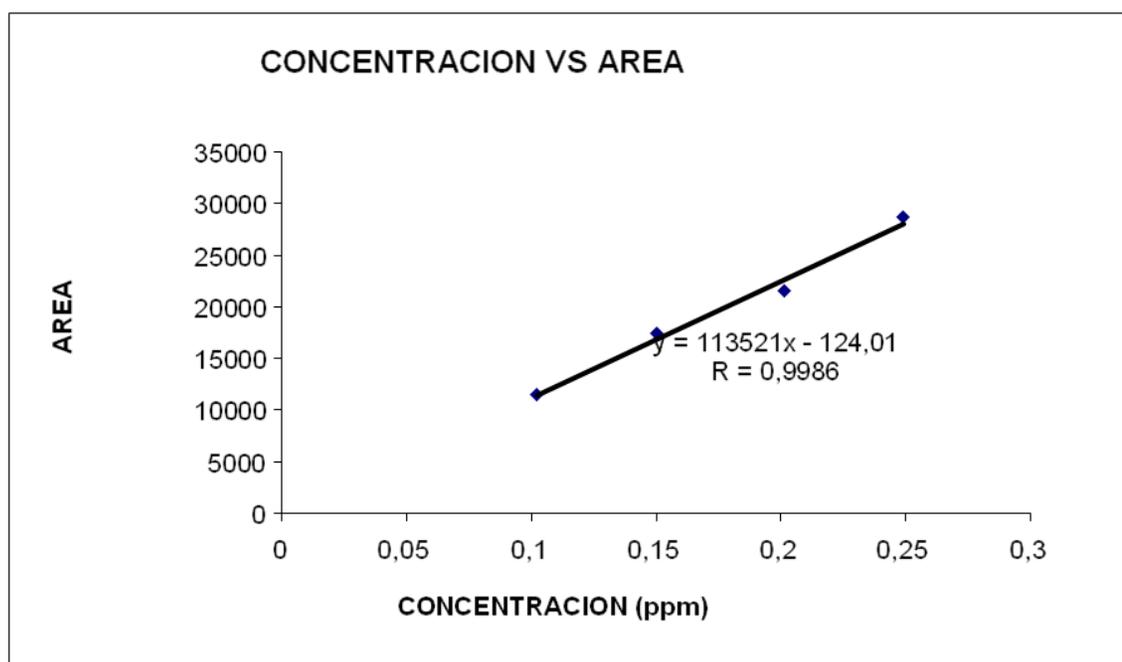


Figura 44 Curva de las áreas obtenidas versus concentración para hallar límites de cuantificación y detección.



Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse a partir de la curva de regresión, por extrapolación a concentración cero de la siguiente forma:

- Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: b.
- Se obtiene otra curva de calibración inyectando cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero: Y_{bl} .

- Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto anterior, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

$$\text{Limite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

PRECISIÓN

Para hallar la precisión se inyectó un patrón de cineol de 0.40 ppm y se mide la repetitividad y la reproducibilidad.

Tabla 21. Repetitividad de un patrón de 0.45 ppm de cineol en tres días consecutivos.

Día	Áreas			Promedio de áreas	Desviación estándar relativa
1	49475	49860	49097	49477	1.098
2	49424	49649	49454	49509	0.246
3	49024	49254	49321	49199	0.316

Tabla 22. Reproducibilidad del método de cuantificación para un patrón de 0.45 ppm de cineol cada 8 días durante un mes.

Día	Áreas			Promedio de áreas	Desviación estándar relativa
1	49475	49860	49097	49477	1.098
7	49021	49002	49035	49019	0.033
14	48984	48587	48962	48844	0.456
21	48125	48542	48654	48440	0.575
28	47998	48054	47864	47972	0.203

EXACTITUD

Para ello se halla el valor t, se inyecta una cantidad conocida de cineol, y se cuantifica en la curva de trabajo.

Tabla 23. Determinación de la concentración de una solución de 0.45 ppm de patrón de cineol.

REPLICAS	CONCENTRACION (ppm)			PROMEDIO	X media	s	RSD	t
1	0,446	0,442	0,445	0,444				0,022 para un intervalo de confianza de 95%
2	0,442	0,441	0,442	0,442				
3	0,435	0,440	0,439	0,438	0,444	0,004	0,908	
4	0,445	0,448	0,445	0,446				
5	0,448	0,447	0,449	0,448				

t calculado 0.022 < t tabla 2.776.

5.4 CÁLCULOS DE LA CUANTIFICACIÓN DEL CIENOL EN LAS MUESTRAS.

Se realizó la extracción en 30 mL del solvente. Los cálculos fueron los siguientes:

$$(ppm \text{ de cineol en la solución}) = \frac{\text{área} + 4049.6}{120508}$$

$$ppm \text{ de cineol en la muestra} = \frac{mg \text{ en s/n}}{1 L} \times \frac{0.03L}{1 Kg} \times \frac{1000g}{g \text{ muestra}}$$