

Evaluación de la posible adulteración de mieles de abeja comerciales de origen costarricense al compararlas con mieles artesanales provenientes de apiarios específicos

Maurico Ureña Varela, Esteban Arrieta Bolaños, Eduardo Umaña, Luis Gabriel Zamora y María Laura Arias Echandi

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales y Facultad de Microbiología Universidad de Costa Rica.
Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Universidad Nacional. Costa Rica

RESUMEN. La miel es el principal producto de la apicultura, generado por la abeja *Apis mellifera*. Éste, como cualquier producto alimenticio, debe cumplir con ciertas normas de calidad, propiedades fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas. Entre estos parámetros se encuentran el contenido de hidroximetilfurfural (HMF), indicador de adulteración, sobrecalentamiento y envejecimiento de la miel, la actividad de la enzima diastasa, indicador de sobrecalentamiento, y la determinación de contenido de sacarosa y azúcares simples, indicadores de adulteración. En el presente estudio, se procedió a determinar los anteriores parámetros, además del contenido de glucosa, fructosa e índice fructosa/glucosa a 35 muestras de mieles artesanales obtenidas directamente del apicultor, previamente catalogado como productor con buenas prácticas y 25 de mieles distribuidas en expendios. A su vez, se compararon los resultados poblacionales obtenidos y se les interpretó, con el objetivo de determinar el tipo de alteración que presentara la miel. Se determinó que 89% de las mieles control cumplieron con los parámetros establecidos por el Codex Alimentarius para su contenido de HMF, actividad de diastasa, contenido de sacarosa y de fructosa y glucosa. Contrario, sólo el 20% (5) de las mieles comerciales logró cumplir los estándares internacionales y la normativa nacional. Se destaca que un 24% de las muestra comerciales presentan adición de sacarosa y glucosa, 32% sobrecalentamiento o adulteración con sirope de azúcar invertido, y 24% adición de jarabe de azúcar invertido.

Palabras clave: Miel, *Apis mellifera*, HMF, diastasa, adulteración, HPLC, azúcares.

SUMMARY. Evaluation of the potential adulteration of commercial honey distributed in Costa Rica compared with artisanian honey samples coming from specific apiaries. Honey is the principal apiculture product, produced by *Apis mellifera* bee. This, as any other food product, has to accomplish certain quality standards, including physicochemical, organoleptic and microbiological properties. Within these parameters, different measures are considered as adulteration indicators, including hydroxymethylfurfural and diastase enzyme activity which are associated to overheating, and the sucrose, glucose and fructose content. In this study, a determination of previous parameters, additional to glucose, fructose and fructose/glucose index was performed to 35 artisan samples, obtained directly from beekeeper, previously characterized as having good productive practices and 25 commercial samples. Same time, the results obtained were compared and interpreted, in order to determine the kind of adulteration present in the honey sample. The 89% of artesian samples accomplished the parameters established by the Codex Alimentarius for HMF content, diastase activity, sucrose and simple sugars content. Nevertheless, only 20% (5) of the commercial samples accomplished the international and national normative. 24% of these samples presented sucrose addition, 32% overheating or inverted sugar syrup addition, and 24% were adulterated with inverted sugar syrup.

Key words: Honey, *Apis mellifera*, HMF, diastase, adulteration, HPLC, sugars.

INTRODUCCION

La miel de abejas es el producto principal de la apicultura. Éste es generado por la abeja conocida como *Apis mellifera* a partir del néctar floral, de la secreción de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de partes vivas de plantas, los cuales las abejas colectan, transforman, combinan con sustancias específicas propias, almacenan y permiten que en el panal maduren. Este alimento no es completamente uniforme en cuanto a su composición, ya que varía según las abejas que se utilice, la forma de alimentarlas y el procedimiento de producción que se lleve a cabo (1,2). A pesar de esto, los componentes más comunes que se encuentran en

la miel son el agua (17,1%), azúcares (82,4%), proteínas (0,1%) y otros componentes que incluyen vitaminas, minerales, sustancias aromáticas y ácidos orgánicos, entre otros (0,4%). Además, se encuentra en ella cinco enzimas biológicamente activas: la invertasa, la diastasa, la glucosidasa, la catalasa y una fosfatasa ácida (3).

Los azúcares son los principales responsables de las características físicas y del comportamiento químico de la miel. La sacarosa puede encontrarse originalmente hasta en un 1,5%, teniendo en cuenta que este azúcar no debe superar el 5% de acuerdo con la normativa del Codex Alimentarius en mieles comerciales, aunque su cantidad puede disminuir con el tiempo (4).

La adulteración de mieles de abeja se da normalmente por varias razones, entre las que se incluyen la adición de sustitutos artificiales de menor valor como el jarabe de maíz, el “azúcar invertido” obtenido por hidrólisis química, y la sacarosa (azúcar de mesa) en forma de jarabe; la alimentación de colmenas durante el flujo de miel y la alimentación en exceso de las colmenas durante la mielada. (5).

Los métodos de detección de alteraciones en la miel más utilizados, incluyendo la presencia de azúcares extraños y el sobrecalentamiento del producto, incluyen la espectrofotometría de masas del isótopo de carbono (SCIRA) que detecta porcentajes de C13 y C12, relacionados a la producción de azúcares en plantas melíferas C3 y las plantas C4, tales como el maíz y la caña de azúcar, las pruebas de detección de actividad enzimática tales como la diastasa y la invertasa, la presencia del compuesto hidroximetilfurfural (producido por la deshidratación de fructosa y glucosa en medio ácido y con calor) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la de capa fina (TLC), para examinar perfiles de azúcares (6).

El presente trabajo pretende detectar la presencia de adulteración y las malas prácticas de procesamiento en muestras de mieles comerciales en Costa Rica, comparándolas con muestras procedentes de productores con prácticas artesanales conocidas por medio de la medición de parámetros bioquímicos y químicos en éstas y mediante la comparación de los resultados obtenidos con las diversas normativas existentes.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras de mieles analizadas en la presente investigación provinieron de dos poblaciones diferentes. En primer lugar se recolectaron 35 muestras de apiarios previamente clasificados como de buenas prácticas de apicultura, pertenecientes a 13 de las zonas apícolas más importantes de Costa Rica. (La selección de estos apiarios se basa en un seguimiento hecho por el Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales a través de años, en que controlan enfermedades, químicos utilizados y producción). Asimismo, el presente estudio comprendió también el análisis de 25 muestras de mieles disponibles a los consumidores en el comercio nacional. Las muestras de este tipo fueron recolectadas al azar previamente por Estrada H. (7) como parte de un estudio acerca de las propiedades antimicrobianas de las mieles costarricenses.

Prueba de cuantificación de HMF de White

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de tipo “para análisis”.
Solución Carrez I: (hexacianoferrato de potasio (II))
Solución Carrez II: se disolvió 30g de acetato de zinc en 100 mL agua destilada
Solución de bisulfito de sodio 0,20g/100 g.

Equipo

Espectrofotómetro ultravioleta-visible, marca Spectronic, modelo Genesis 5 (Thermo Scientific, US).

Procedimiento

Se siguió el método descrito por White en “Harmonized methods of the European Honey Commission” de la Comisión Internacional de la Miel (8).

Análisis cuantitativo de actividad de la enzima diastasa descrito por Schade

Reactivos

Solución de cloruro de sodio: (2,9 g de cloruro de sodio / 100mL de agua destilada).

Solución buffer de acetato (pH 5,3)

Solución de almidón (el equivalente a 2.0000 g de almidón anhidro en 100.00 mL de agua destilada. La disolución del almidón se prepara hirviendo durante 3 minutos la mezcla de almidón y agua destilada, enfriando hasta temperatura ambiente y luego llevando ésta a un balón aforado de 100.00 mL y completando el volumen con agua destilada).

Solución madre de yodo-yoduro (11 g de yodo doblemente sublimado y 22 g de yoduro de potasio se disuelven en agua destilada y se llevan hasta un volumen de 500 mL. Esta disolución se puede guardar durante 1 año en una botella oscura).
Solución de yodo diluido: se disolvió 20 g de yoduro de potasio en agua destilada. Se añadió 2 mL de la solución madre de yodo y se diluyó a 500 mL con agua destilada. Se preparó cada día de uso.

Equipo

Espectrofotómetro ultravioleta-visible, marca Spectronic, modelo Genesis 5 (Thermo Scientific, US).

Procedimiento

Se siguió el método descrito por Shade en “Harmonized Methods” de la Comisión Internacional de la Miel (8).

Detección del contenido de azúcares por medio de HPLC

Reactivos

Metanol para HPLC

Acetonitrilo para HPLC

Eluente para HPLC: se mezcló 80 volúmenes de acetonitrilo con 20 de agua destilada.

Estándares comerciales “para análisis” de: fructosa, glucosa, sacarosa.

Procedimiento

Se siguió el método descrito en en “Harmonized Methods” de la Comisión Internacional de la Miel (8).

La corrida del estándar y muestras se realizó en una columna analítica de acero inoxidable (marca Altech) conteniendo partículas de gel de sílica amino modificada (5 μ m de diámetro). Las dimensiones de la columna fueron 25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro interno. Las condiciones de la corrida fueron: flujo de 1,5 mL/min, fase móvil de acetonitrilo:agua (80:20), temperatura de columna de 30,0°C. La cantidad de estándar y muestra a inyectar fue de 20 μ L. Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) marca Shimadzu, modelo LC-10AT. Para la detección de azúcares se utilizó un detector de índice de refracción marca Shimadzu, modelo RID-6 (US).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los valores promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, valores máximo y mínimo para HMF, diastasa y azúcares encontrados en las muestras artesanales evaluadas, a partir de los cuales se procede a comparar las muestras comerciales con el fin de valorar su potencial adulteración.

TABLA 1
Parámetros estadísticos de las mediciones de contenido de HMF, actividad de diastasa y contenido azúcares de las muestras de mieles artesanales analizadas

	HMF (mg/kg)	DN (UGothe/g)	% fructosa	% glucosa	% sacarosa	Índice (fruct/gluc)	% Azúcares simples (fruct+gluc)
Promedio	24	15,5	37,6	32,0	0,2	1,200	69,5
Desviación estándar	15	4,7	0,9	2,0	0,4	0,066	2,6
CV (%)	60,24	30,25	2,39	6,32	237,90	5,57	3,79
máximo	68	23,7	40,3	36,2	1,7	1,385	75,6
mínimo	8	3,7	35,5	27,8	0,0	1,077	64,9

En las Figuras 1 y 2 se presenta el comportamiento del HMF y la diastasa, respectivamente. Para el HMF se utilizó el valor crítico de 60 mg/kg (y no los 40 mg/kg de la Norma Nacional actual) ya que el Codex Alimentarius lo considera más adecuado para miel de origen tropical y para la diastasa el valor de 8 UGothe/g.

FIGURA 1

Comportamiento de las muestras de mieles artesanales y comerciales según su contenido de HMF

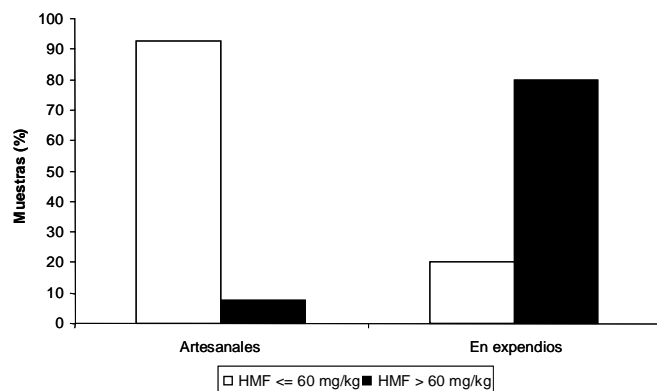
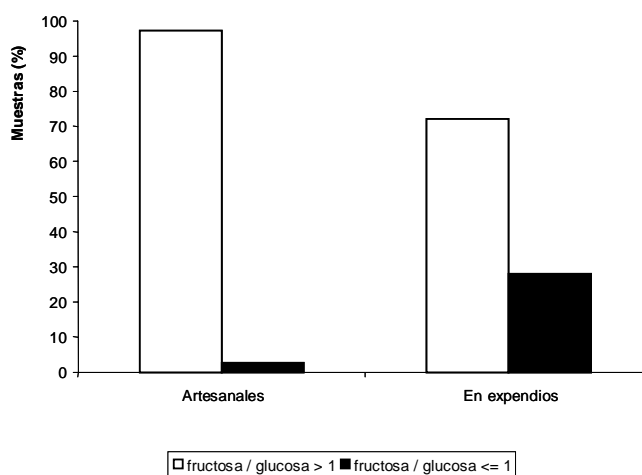


FIGURA 2

Comportamiento de las muestras de mieles artesanales y comerciales según su actividad de diastasa

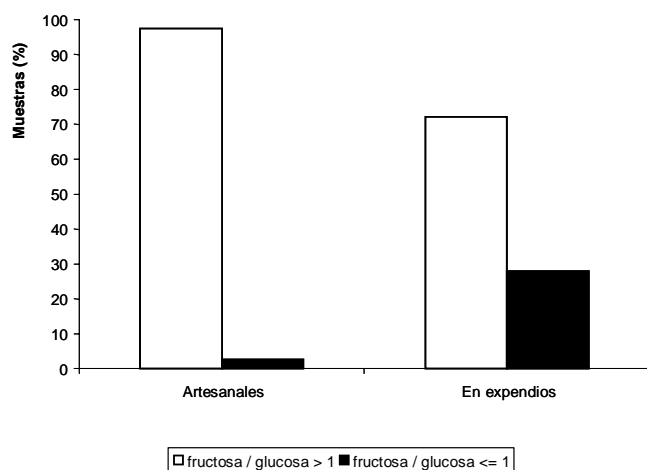


Según se observa en la Figura 1, la mayor parte de las muestras de origen artesanal (92,5%) muestra valores satisfactorios de contenido de HMF, contra tan solo un 20% de las muestras de establecimientos comerciales. La tendencia se mantiene para la prueba de diastasa en la Figura 2, donde el 92% de las muestras artesanales presenta una actividad mínima aceptable de esta enzima contra cerca de dos terceras partes (64%) de las muestras a disposición de los clientes que no cumplen con este parámetro.

En las Figuras 3 y 4 se detallan las distribuciones de las muestras según los parámetros de azúcares aceptados para las mieles de buena calidad. Como valor crítico para la relación fructosa/glucosa se utilizó el valor de <1 . El valor de >1 es una característica de la miel de abejas de origen monofloral, lo cual no corresponde a la realidad de las mieles producidas en Costa Rica (9). Para el contenido de sacarosa se utilizó el 5% recomendado por el Codex Alimentarius y no el 10% vigente en la Norma Nacional ya que este valor va a ser sustituido próximamente en esta Norma (1).

FIGURA 3

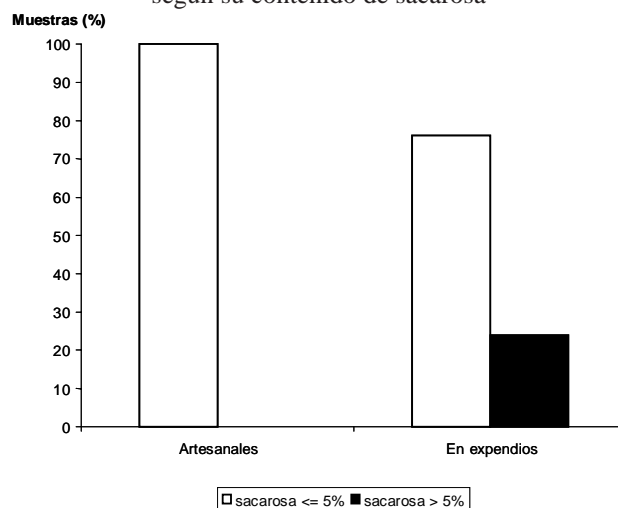
Comportamiento de las muestras artesanales y comerciales según su índice de contenidos de fructosa y glucosa



Al evaluar la proporción de muestras de miel para cada conjunto cuyos parámetros de contenido de HMF, actividad de diastasa y contenidos de azúcares poseen valores todos ellos aceptables y que cumplen con la normativa del Codex Alimentarius, se aprecia que, mientras que en las mieles obtenidas de apicultores artesanales poco más de un 89% de éstas cumple con todos los estándares para los parámetros evaluados en el estudio, solamente un 20% de las mieles a disposición del consumidor obtenidas en expendios logra satisfacer estas demandas de calidad.

FIGURA 4

Comportamiento de las muestras artesanales y comerciales según su contenido de sacarosa



DISCUSION

Los análisis llevados a cabo en ambos conjuntos de mieles mostraron en todos los casos tendencias distintas para las muestras artesanales y para las obtenidas en expendios. Las alteraciones en el contenido de HMF y la actividad de diastasa se presentan muy raramente en el conjunto de las mieles artesanales, tanto según la norma del Codex Alimentarius como la Norma Nacional. Esto es relevante ya que el HMF es considerado el criterio más confiable para evaluar el envejecimiento y sobrecalentamiento en miel pues éste no debe detectarse en miel fresca (10,11), lo que da una idea de buena calidad en las muestras artesanales.

Estos valores para contenido HMF y actividad de diastasa han resultado concordantes con estudios en otros países. En Pakistán, por ejemplo, se encontró valores menores a 40 mg/kg, así como en Yucatán, México (12,13). La actividad de diastasa, aunque como medida ha sido más cuestionada (14), también tiene valor como parámetro de calidad, y sus valores bajos reflejan, sobretudo, un sobrecalentamiento en la etapa de procesamiento de la miel (12).

Solamente una muestra artesanal mostró resultados que concuerdan con un sobrecalentamiento del producto (contenido de HMF muy alto y actividad de diastasa muy baja).

Los datos obtenidos para azúcares en las muestras de miel artesanal también mostraron coincidir con valores determinados en mieles de otros países como la URSS, Estados Unidos, Rumania y Australia (4,14,15).

La sacarosa siempre puede encontrarse en alguna proporción debido a la incapacidad de las abejas de convertirla completamente. Sin embargo, este valor es bajo, con un conteni-

do promedio de 2,3% (14). El valor promedio de sacarosa para muestras artesanales fue incluso más bajo, de 0,2%. Asimismo, la proporción de azúcares simples observada es superior al 60%, como está recomendado en la Norma Internacional del Codex Alimentarius. Aunque esta norma haya sido establecida en Europa, diversas publicaciones han encontrado resultados similares en otras partes del mundo, tales como Pakistán, México y Burkina Faso (12,13,16). Esto revela que, de acuerdo a las muestras estudiadas, los apicultores artesanales nacionales producen miel de acuerdo con las normas internacionales y nacionales.

Los datos de las muestras artesanales que presentaron un comportamiento aceptable al evaluar sus parámetros HMF, diastasa, y contenido de sacarosa, fueron utilizados para obtener valores indicativos típicos de las mieles en Costa Rica. Su comportamiento fue utilizado para realizar una comparación con las muestras comerciales.

Al analizar el HMF en las muestras comerciales, se encontró que ocho de estas presentaron valores superiores a 200 mg/kg y 12 estaban fuera de la Norma Internacional, superando los 60 mg/kg pero con un contenido menor a 200 mg/kg. Estas 20 muestras no serían aptas para los procesos de importación-exportación (8).

Con respecto a la diastasa, para este parámetro las discrepancias son menores (Figura 2) posiblemente debido a la variabilidad de los valores originales de diastasa en cada muestra (en algunas puede presentarse un contenido natural más alto que en otras mieles). En este hecho se basa el cuestionamiento que se ha realizado a la utilidad de la actividad de diastasa como parámetro de calidad. White (10) señala que para establecer un valor mínimo aceptable, de manera que la medición indique la historia de la miel, se requeriría conocer el valor original de la actividad de diastasa. Este es diferente para muchas mieles, con amplio rango de variación, por lo que no existiría un valor inicial correcto.

Lo anterior ha llevado a que varios países exportadores también hayan objetado los ensayos enzimáticos en general, como parámetro de calidad, debido a que diferentes mieles "frescas" de diferentes orígenes y recolectadas en diferentes condiciones, pueden diferir en gran medida en sus contenidos enzimáticos (14). Además, Karabournioti y Zervalati (11) indica que las dificultades para establecer un límite general para una enzima son enormes, ya que podría ser una norma muy severa para algunas mieles y demasiado permisiva para otras. Sin embargo, su uso en combinación con el HMF da una mayor confianza en los datos pues los valores enzimáticos en la mayor parte de los casos resultan concordantes.

Asimismo, aunque exista una amplia variación natural de la actividad de la enzima, el valor mínimo de 8 UGothe/g como estándar ha resultado de utilidad para evaluar la calidad de las mieles (17), ya que tanto la actividad de diastasa como el contenido de HMF pueden medir el sobrecalentamiento de

la miel, muchas veces éstos son utilizados en conjunto. Al ser la actividad de diastasa más susceptible, ésta reflejaría un ligero sobrecalentamiento, y el HMF un proceso más fuerte. También resulta importante tomar en cuenta que en algunas ocasiones la pérdida parcial o completa de actividad enzimática puede reflejar una falta de cuidado a lo largo del proceso de producción y de almacenamiento, tal como una exposición al sol, un mal almacenaje o un transporte deficiente, como sugiere un estudio en Yucatán, México (13), o bien, por el efecto de la dilución con algún agente adulterante.

Con respecto al análisis de azúcares, los contenidos en muestras artesanales denotan un cumplimiento de los requerimientos. De hecho, la sacarosa aparece en una cantidad muy baja en estas mieles, no siendo detectable en la mayoría de los casos. Por el contrario, éste azúcar aparece más comúnmente en las muestras comerciales lo cual sugiere una adulteración en este conjunto de muestras; 24% de estas muestras presentan valores altos de contenido de sacarosa.

Si bien puede ser que una alta cantidad de sacarosa se deba a la incapacidad de las abejas de convertir esta sustancia debido a una recolecta temprana de la miel o la alimentación de estas con sacarosa durante la concentración (15), valores tan altos como los obtenidos son una indicación fuerte de que estas mieles se encuentran adulteradas. La adulteración que se da es con la llamada azúcar de caña, que consiste en sacarosa, preparado generalmente al 66%.

Al comparar el resto de sus parámetros de azúcares con los obtenidos como referencia a partir de las muestras artesanales, se obtiene que este grupo representante del 24% de las muestras presentan, además de una elevada concentración de sacarosa (>5g/100 g de miel), una disminución en el contenido de fructosa (= 31.1%) y, en el índice de fructosa / glucosa (= 1), todo lo cual correlaciona bien con el supuesto de una adulteración por adición de sacarosa y glucosa. Además, todas estas muestras presentaron contenidos elevados de HMF (entre 91 y 864 mg/kg) y actividades de diastasa muy bajas (menores todas a 1 UGothe/g) lo que indica que también pudo haberse producido un sobrecalentamiento importante de estas mieles, quizás producto de la mezcla.

Por otra parte, 32% de las muestras comerciales fueron mieles en las cuales se encontraron elevaciones en el contenido de HMF (entre 68 y 494 mg/kg) junto con actividad de diastasa disminuida (de 7.2 hasta inclusive valores menores a 1 UGothe/g de miel) y un contenido de sacarosa menor al 5%. En estas muestras los indicadores de azúcares no muestran, en general, alteración con respecto a los promedios e intervalos obtenidos de las muestras artesanales, lo que favorece la suposición de sobrecalentamiento o adulteración con productos como azúcar (que incrementan la cantidad de HMF pero cuya composición en fructosa y glucosa es similar a la miel y por lo tanto no altera la composición de azúcares en la miel adulterada) y no con soluciones de sacarosa (10,14).

Un 24% de las muestras comerciales evaluadas presentaron valores moderadamente elevados de HMF (> 60 mg/kg pero < 150 mg/kg) con actividades de diastasa aceptables y valores de los indicadores de azúcares similares a los presentados por las muestras artesanales, incluyendo la no detección de sacarosa en las muestras. Este patrón concuerda con la adición de jarabe de azúcar invertido en una cantidad tal que la dilución causa que la actividad enzimática disminuya pero hasta valores que todavía cumplen con la norma del Codex.

Un 20% de las muestras presentaron valores satisfactorios de contenido de HMF, actividad de diastasa y contenido de azúcares por lo que se deduce que provienen posiblemente de mieles con buenas prácticas de producción y pureza.

En resumen, sólo el 20% (6) de las muestras comerciales logra cumplir los estándares internacionales, contrario a un 89% de las muestras provenientes directamente del apicultor nacional que sí se acoge a la normativa. No obstante, debe recordarse también, la importancia de guardar los cuidados en todas las etapas posteriores a su producción, especialmente la protección del sol y las altas temperaturas, dada la influencia de éstas en la calidad del producto final.

El presente trabajo resulta un importante llamado de atención a las autoridades pertinentes con el fin de que se de un mayor control a las mieles distribuidas en el comercio, ya que como se comprobó, existe un severo incumplimiento de las normas de calidad establecidas.

REFERENCIAS

1. Norma Oficial para Miel de Abejas. Decreto 13991-MEC, La Gaceta No 224, 22 de noviembre de 1982, Ministerio de Economía y Comercio, Costa Rica.
2. Barker R y Lehner Y. Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup honey, and sucrose syrups maintenance for caged honey bees, *Apidologie*. 1978; 1: 35-42.
3. Bogdanov S. Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products. *Apiacta* 2003; 38: 190-193
4. Ramírez Arias JF, Calderón Fallas RA, Ortiz Mora RA, Sanchez Chaves LA. Manual de Apicultura, tomo I, Heredia, Programa de publicaciones e impresiones de la Universidad Nacional. 2003.
5. García N. Contaminación de la miel con alimentos artificiales, Dirección nacional de Alimentos, Mercosur 2003
6. National Honey Board. Testing for Economic Adulteration: <http://www.nhb.org/>
7. Estrada Estrada H, Gamboa MM, Chaves C y Arias ML. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Arch Lat Nut*. 2005. 55: 167-171
8. Bogdanov S, Martin C, Lullmann C. Harmonized methods of the European Honey Commission. *International Honey Commission. Apidology*. 2002 Special Issue.
9. Grahnan J. The Hive and the Honey Bee. Dadant and Sons. 1992. pp 873-877.
10. White J. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. *Bee World* 1994; 75 (3): 104-117.
11. Karabournioti S y Zervoulaki P Effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta*, 2001; 36 (4): 177 – 181
12. Kamai, A; Raza, S; Rashid, N; Hammeed, T; y Nasim, K. Comparative Study of Honey Collected from Different Flora of Pakistan. *Online J B Sci*; 2002; 2: 626-627
13. Moguel Y, Echazarreta C y Mora R. Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. *Téc Peru Méx*. 2005; 43 (3): 323-334
14. Crane E. Bees and Beekeeping: Science, practice and world resources. Ed. Heinemann Newnes. Oxford. 1990.
15. Cismarik J, Hrobonova K, Lehotay J. Determination of monosaccharide and disaccharides in honey by ion exchange high performance chromatography. *Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comenianae Tomus LI* 2004.
16. Meda A, Lamien C, Millogo J, Romito M y Nacoulma O. Physicochemical analyses of Burkina Fasan honey. *ACTA VET BRNO* 2005; 74: 147-152.
17. Bogdanov S, Lullmann C. Honey Quality and International Regulatory Standards, Review by the International Honey Commission, Bee Department, Federal Dairy Research Institute, Suiza 1998.

Recibido: 01-03-2007

Aceptado: 03-04-2007