

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



“PROPUESTA DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD  
DE LA JALEA REAL PRODUCIDA POR LA ABEJA (*Apis mellifera*) Y  
COMERCIALIZADA EN EL SALVADOR”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR  
RENÉ FRANCISCO RAMOS ALVARENGA  
SAÚL ERNESTO SORIANO RODRÍGUEZ

16 DE FEBRERO  
DE 1841  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA

FEBRERO DE 2004

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTORA**

DRA. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ

**SECRETARIA GENERAL**

LIC. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

**SECRETARIA**

MSc. MIRIAM DEL CARMEN RAMOS DE AGUILAR

## **COMITÉ DE PROCESOS DE GRADUACIÓN**

### **COORDINADORA GENERAL**

LIC. MARÍA CONCEPCIÓN ODETTE RAUDA ACEVEDO

### **COORDINADORA DEL AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS, COSMÉTICOS Y VETERINARIOS**

MSC. ROCÍO RUANO DE SANDOVAL

### **COORDINADORA DEL AREA DE TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA LEGAL**

LIC. MARÍA LUISA ORTIZ DE LÓPEZ

### **DOCENTE DIRECTOR**

LIC. ZOILA ISABEL SORTO DE ALARCÓN

### **DOCENTE DIRECTOR**

LIC. JOSÉ ERNESTO RODAS AYALA

## **DEDICATORIA**

**A DIOS TODOPODEROSO:** Por permitirme culminar esta etapa de mi carrera y sobre todo brindarme la vida.

**A MIS PADRES:** René Francisco Ramos Rodríguez y Edith Alvarenga de Ramos, por su apoyo constante, amor y comprensión en todo momento.

**A PAPÁ TITO:** Por su comprensión y cariño. Gracias.

**A MIS HERMANAS:** Flor de María, Guadalupe del Carmen y Evelyn Raquel, por su cariño, apoyo y comprensión.

**A MIS SOBRINOS:** Luis Alonso, Andrés Alberto, Fátima, Sofía, Nancy, Estefanía e Iván Vladimir, con mucho cariño.

**A LA FAMILIA VALLE:** Por su apoyo constante. Muchas Gracias.

**A MIS AMIGOS:** Beatriz Amaya, Eliseo Ayala, Amy Morán, Saúl Soriano, Idilia Navarrete. Por su apoyo. Gracias por todo.

René Francisco Ramos Alvarenga

## **DEDICATORIA**

**A DIOS TODOPODEROSO:** Por permitirme vivir y experimentar esta etapa muy importante de mi vida y por su infinito amor ya que todo esto es posible gracias a Él.

**A MIS PADRES:** Carmen Rodríguez Suárez de Soriano y Saúl Antonio Soriano Torres, por su amor incondicional que siempre han tenido hacia a mí.

**A MI MEJOR AMIGO:** Jesús, por su comprensión y cariño; por quererme tal como soy y ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida.

**A MIS AMIGOS:** Idilia Navarrete, Amy Morán, Karla Vanegas, Adriana Salazar, Rafael Chávez, René Ramos.

Saúl Ernesto Soriano Rodríguez

Saersoro

## **AGRADECIMIENTOS**

**A NUESTROS ASESORES:** Lic. Isabel Sorto de Alarcón, y Lic. José Ernesto Rodas Ayala, por darnos lineamientos y apoyo para la elaboración de nuestro trabajo de graduación.

**AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE QUÍMICA AGRÍCOLA (CENTA /MAG) :** Lic. Mirian Álvarez de Amaya, Ing. Margarita Rodríguez, Lic. Amanda Alvarenga, Lic. Luis Antonio Reyes y Sr. Ángel Castro, por su valiosa colaboración, apoyo y amistad. Gracias.

**A LAS LICENCIADAS:** Mercedes del Carmen Gómez de Díaz, María Elisa Vivar de Figueroa, María Luisa Ortiz de López, Dinorah de Laínez, por su apoyo y comprensión.

A todas las personas e instituciones que de una u otra forma han colaborado para la realización y culminación de nuestro trabajo de graduación.

René Francisco Ramos Alvarenga

Saúl Ernesto Soriano Rodríguez

## INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	xv
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1.0 OBJETIVOS</b>	
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2.0 MARCO TEÓRICO</b>	
2.1. Generalidades de las abejas	21
2.2. Alimentación de las abejas	22
2.3. Concepto de Jalea Real	23
2.4. Clasificación	24
2.5. Composición Química	25
2.6. Propiedades de la Jalea Real	28
2.7. Producción	31
2.8. Conservación	33
2.9. Control de Calidad de la Jalea Real	35
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>3.0 DISEÑO METODOLÓGICO</b>	42

## **CAPÍTULO IV**

### **4.0 FUNDAMENTOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **4.1. FUNDAMENTOS DE MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS**

4.1.1. Humedad y Materia Seca	49
4.1.2. Determinación de proteínas – Método microKjeldahl	
titulación directa	49
4.1.3. Índice de acidez	55
4.1.4. Determinación de lípidos ácidos expresados como	
ácido 10-Hidroxidecenóico	57
4.1.5. Determinación Potenciométrica del Valor de pH	59
4.1.6. Determinación de Cenizas	60
4.1.7. Determinación de metales pesados	61
4.1.8. Detección de tetraciclinas	64
4.1.9. Detección de almidón	65

#### **4.2. FUNDAMENTOS DE MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

4.2.1. Determinación de coliformes totales y fecales	67
4.2.2. Determinación de hongos y levaduras	70
4.2.3. Determinación de Salmonella spp – Shiguella	71

## **CAPÍTULO V**

### **5.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS**

5.1. Resultados de Análisis Físico-Químico de la Jalea Real	
Virgen y Liofilizada	76

5.2. Resultados del Análisis Microbiológico de la Jalea Real Virgen y Liofilizada	82
5.3. Resultados del Análisis de Humedad Efectuados a las Diversas Muestras de Jalea Real Virgen	85
5.4. Resultados del Análisis de Humedad Efectuados a las Muestras de Jalea Real Liofilizada	86
5.5. Resultados del Análisis de Proteínas Efectuados a las Diversas Muestras de Jalea Real Virgen	87
5.6. Resultados del Análisis de Proteínas Efectuados a las Muestras de Jalea Real Liofilizada	88
5.7. Resultados del Análisis de pH Efectuados a las Diversas Muestras de Jalea Real Virgen	89
5.8. Resultados del Análisis de pH Efectuados a las Muestras de Jalea Real Liofilizada	90
5.9. Resultados del Análisis de Índice de Acidez Efectuados a las Diversas Muestras de Jalea Real Virgen	91
5.10. Resultados del Análisis de Índice de Acidez Efectuados a las Muestras de Jalea Real Liofilizada	92
5.11. Resultados del Análisis de Cenizas Efectuados a las Diversas Muestras de Jalea Real Virgen	93
5.12. Resultados del Análisis de Cenizas Efectuados a las Muestras de Jalea Real Liofilizada	94
5.13. Resultados del Análisis de Metales Pesados (Plomo) Efectuados a las Muestras de Jalea Real Virgen y Liofilizada	95

5.14. Resultados del Análisis de Almidón Efectuados a las Muestras de Jalea Real Virgen y Liofilizada	95
5.15. Resultados del Análisis de Tetraciclinas Efectuados a las Muestras de Jalea Real Virgen y Liofilizada	95
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>6.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	98
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>7.0 CONCLUSIONES</b>	104
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>8.0 RECOMENDACIONES</b>	108
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>GLOSARIO</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## **ANEXOS**

### **ANEXOS**

1. Diferentes Clases de Individuos que Componen una Colonia de Abejas.
2. Anatomía de la Abeja *Apis mellífera*. Glándulas Mandibulares e Hipofaríngeas.
3. Diferencias Existentes entre los Productos Apícolas.
4. Producción de Jalea Real.
5. Métodos de Análisis Físico-Químicos y Microbiológicos para la Determinación de la Calidad de la Jalea Real Virgen y Liofilizada.
6. Material, Equipo y Reactivos.
7. Preparación de Reactivos.
8. Cálculos.
9. Espectros de Absorción Ultravioleta – Determinación de Tetraciclinas.
10. Certificados de Análisis de Muestras de Jalea Real Virgen y Liofilizada.
11. Tablas para Recolección de Datos Analíticos.

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADROS</b>	<b>PAGINA</b>
1. Composición Química de la Jalea Real	26
2. Contenido de Hormonas	28
3. Especificaciones de Calidad según Código Alimentario Argentino	36
4. Parámetros de Calidad de la Jalea Real para Consumo Humano (Cuba)	37
5. Especificaciones de Calidad según Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real ( Brasil)	38
6. Criterios Microbiológicos según Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real	39
7. Número y Tipo de Muestra para Análisis	45
8. Especificaciones de Calidad para la Evaluación Físicoquímica de la Jalea Real Virgen y Liofilizada	75
9. Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Virgen . Procedencia: China – A1	76
10.Resultados de Análisis físico-químico de Jalea Real Virgen . Procedencia: El Salvador – A2	76
11.Resultados de Análisis físico-químico de Jalea Real Virgen . Procedencia: El Salvador – B	77
12. Resultados de Análisis físico-químico de Jalea Real Virgen Procedencia: Cuba – C1	78

13. Resultados de Análisis físico-químico de Jalea Real Virgen	
Procedencia: China – C2	78
14. Resultados de Análisis físico-químico de Jalea Real Liofilizada	
Procedencia: México – C3	79
15. Resultados de Análisis físico-químico de Jalea Real Liofilizada	
Procedencia: EEUU – D	80
16. Características Organolépticas de la Jalea Real Virgen y Liofilizada en las diferentes muestras	81
17. Resultados de Análisis Microbiológico . Determinación de Coliformes Fecales en Jalea Real Virgen y Liofilizada	82
18. Resultados de Análisis Microbiológico . Determinación de Salmonella spp y Shigella en Jalea Real Virgen y Liofilizada	83
19. Resultados de Análisis Microbiológico . Determinación de Hongos y levaduras en Jalea Real Virgen y Liofilizada	84

## **INDICE DE GRÁFICOS**

### **GRÁFICOS**

1. Porcentaje de Humedad de Jalea Real virgen
2. Porcentaje de Humedad de Jalea Real Liofilizada
3. Porcentaje de Proteínas en Base Húmeda en jalea real virgen
4. Porcentaje de Proteínas en Base húmeda en Jalea Real Liofilizada
5. Valores de pH en Jalea Real Virgen
6. Valores de pH en Jalea Real Liofilizada
7. Índice de Acidez en Jalea Real Virgen
8. Índice de Acidez en Jalea Real Liofilizada
9. Porcentaje de Cenizas en base Húmeda en Jalea Real Virgen
10. Porcentaje de Cenizas en Base Húmeda en Jalea Real Liofilizada

## INTRODUCCIÓN

La abeja melífera o abeja de miel, es reconocida como el insecto más valioso desde el punto de vista económico. Esta reputación se debe en parte a que produce Miel, Polen, Cera, Jalea Real, Propóleo y Apitoxina o veneno de abejas (ver anexo 3). La abeja melífera es un insecto social que solo puede sobrevivir como miembro de una comunidad llamada colonia, nido o colmena. La comunidad de las abejas está compuesta de tres castas diferentes: La reina (hembra); el zángano (macho) y las obreras (hembras estériles). Estas castas están asociadas a diferentes funciones en la colonia; cada una posee sus propios instintos especiales respecto a las necesidades de su comunidad. (14)

La Reina, es la única hembra sexualmente productiva de la comunidad y, por lo tanto la madre de todos los zánganos, obreras y futuras reinas. Las abejas obreras jóvenes llamadas nodrizas segregan de sus glándulas Jalea Real que sirve para alimentar a las larvas en desarrollo y a la reina durante toda su vida. (14,30)

La Jalea Real, es el elemento de estudio de esta investigación, ya que ésta sustancia, que es una secreción interna de las abejas, posee propiedades terapéuticas y nutricionales; por su composición muy compleja que incluye azúcares, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y ácidos orgánicos (33).

En El Salvador, la Jalea Real constituye una materia prima poco utilizada por las Industria Farmacéutica, Alimentaria y Cosmética; debido a la poca difusión de la información que existe sobre esta materia prima y sus propiedades. También cabe destacar que no existen actualmente técnicas de análisis adaptadas las cuales sean aplicables para determinar la calidad, tanto fisicoquímica como microbiológica, de este producto apícola; para que de esa manera la industria nacional tenga la confianza de utilizar esta materia prima de origen animal en sus productos.

Basado en la normativa internacional existente sobre la calidad que debe poseer la Jalea Real, se tomó una serie de pruebas, fisicoquímicas y microbiológicas que son: Características Organolépticas, Humedad, pH, Contenido de Proteínas, Cenizas, Índice de Acidez, Metales Pesados, Detección de Tetraciclinas, Determinación de Almidón, Coliformes Fecales, Salmonella spp – Shiguella, Recuento de Hongos y Levaduras. Estas pruebas se aplicaron sobre muestras de Jalea Real, virgen y liofilizada, proporcionadas por Industrias nacionales que en la actualidad utilizan esta materia prima en sus productos. Con las muestras recolectadas se comenzó a aplicar las técnicas analíticas las cuales se encuentran inmersas en los métodos analíticos ya existentes. Después de pasado el período de evaluación se obtuvo una serie de resultados que posteriormente fueron comparados con normas internacionales, las cuales son: El Código Alimentario Argentino, Parámetros de Calidad de la Jalea Real para

Consumo Humano (Cuba) y Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real (Brasil).

Por último se presentan los resultados con sus respectivas interpretaciones; así como también las conclusiones y recomendaciones con las que se finaliza esta investigación que servirá como antecedente para el desarrollo de nuevas técnicas analíticas para cuantificar y evaluar otros componentes químicos de interés farmacéutico, cosmético y nutricional, como son las vitaminas, hormonas, micro elementos, así como también pruebas de efectividad antimicrobiana.

# **CAPÍTULO I**

## **OBJETIVOS**

## **1.0. OBJETIVOS**

### **1.1. Objetivo general.**

Proponer métodos de análisis para evaluar la calidad de la Jalea Real producida por la abeja *Apis mellífera* y comercializada en El Salvador.

### **1.2. Objetivos específicos.**

- 1.2.1. Establecer métodos analíticos físico-químicos para evaluar la calidad de la jalea real virgen y liofilizada.
- 1.2.2. Determinar la calidad sanitaria de la jalea real virgen y liofilizada a partir de ensayos microbiológicos.
- 1.2.3. Comparar los resultados obtenidos en el análisis de la jalea real virgen y liofilizada con las especificaciones establecidas en el Código Alimentario Argentino, Parámetros de Calidad de la Jalea Real para Consumo Humano(Cuba), y el Reglamento Técnico para Determinar la Identidad y Calidad de la Jalea Real(Brasil).
- 1.2.4. Dar a conocer los resultados obtenidos de la calidad de la jalea real a la Industria Químico- Farmacéutica (INQUIFAR), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MISPAS) y Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO**

## 2.0. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades de las Abejas

Según la clasificación de Carlos Linneo, las abejas pertenecen al orden de los Himenópteros, a la súper familia de los Apoideos y a la familia de los Apidos. Estos, a su vez, se dividen en cuatro tribus, entre ellas la de los Apini, que incluye el género *Apis*, este último comprende varias especies, entre ellas la abeja doméstica, *Apis mellífera*. (33)

*Apis mellífera*, constituye la raza o conjunto más apreciado en apicultura por ser más resistente a enfermedades, mejor productoras de miel, más prolíficas con menor tendencia a la enjambrazón y, más dócil, muy buena pecoreadora, forma colonias fuertes. Debido a estas cualidades, ésta abeja ha llegado a ser la principal del comercio mundial. (30)

La colmena es la casa de las abejas, comúnmente llamada panal, las cuales se construyen de cera con celdillas o alvéolos, y la colonia es el conjunto de habitantes de la colmena, dentro de la cual se distinguen tres clases de individuos: (ver anexo 1).

2.1.1 **Reina o Maestra (única):** es mayor que las obreras y más gruesa, puede vivir hasta los ocho años, pero al año, debe ser reemplazada. Su función es exclusivamente poner huevos. (14)

2.1.2 **Obreras:** son hembras imperfectas que no se han desarrollado para la reproducción, sus órganos sexuales están atrofiados y no pueden ser fecundados por los zánganos, porque no poseen espermateca, pero las obreras poseen otros órganos que no tiene la reina ni el zángano, como las glándulas lactíferas que producen “Jalea Real” para alimentar a la reina y larvas jóvenes, y además poseen glándulas salivares que producen enzimas para madurar la miel. (14)

2.1.3 **Zánganos o machos:** su única función es fecundar a la reina. Se alimenta de la miel de la reserva de las colonias. (14)

## 2.2. Alimentación de las Abejas

Durante los dos primeros días de vida, todas las larvas reciben Jalea Real, que es la secreción de las glándulas lactíferas de las abejas nodrizas. Las larvas de las celdillas reales, reciben la jalea real pura, sin polen, mientras que las larvas de obreras la reciben con granos de polen. A partir del tercer día, las larvas de obreras son alimentadas con una papilla de miel, polen y agua, mientras que la reina recibe Jalea Real durante toda su existencia y eso explica que las reinas tengan un tamaño mayor que las obreras, vivan de 10 a 12 veces más tiempo y sean fértiles. (14,33)

Existe además una diferencia de calidad en la jalea que recibe la obrera respecto a la de la reina. Esta diferencia esta dada por dos componentes fundamentales de la Jalea Real: La biopterina (24 mg/g) y la neopterina

(3mg/g). El alimento o jalea de la obrera contiene seis veces menos bipterina, diez veces menos neopterina y siete veces menos ácido pantoténico, que la Jalea Real, que reciben las abejas reinas. <sup>(14)</sup>

Las abejas emplean unos 250-300 g de Jalea Real en la alimentación de una reina y debido a esto la abeja madre es capaz de vivir seis años en promedio (las obreras de uno a tres meses), nace con órganos de reproducción y sexuales altamente desarrolladas, es de mayor tamaño que el resto de las abejas y procreará intensamente durante toda su vida más de 2000 a 3000 huevos diarios. <sup>(14)</sup>

Este fenómeno ha dado lugar a que muchos investigadores exploren tanto la composición química como los posibles usos terapéuticos de la jalea real, especialmente durante las últimas décadas. Así, se ha encontrado que ésta sustancia compleja es rica en aminoácidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales, ARN, ADN y muchos otros elementos de utilidad clínica. <sup>(19)</sup>

### **2.3. Concepto de Jalea Real.**

El nombre de Jalea Real fue dado por el suizo Francois Huber, en el siglo XVIII, y se define como “Un producto de la secreción interna de las abejas segregado por las glándulas hipofaríngeas (secreción clara), situadas simétricamente a la derecha e izquierda en la cabeza de las obreras, y por las glándulas mandibulares (secreción blanca) de las abejas obreras en el estadio temporal de nodriza (5-14 días de edad), cuando disponen de polen, agua, miel existente

en la colmena, así como también de la temperatura y la cantidad de crías”.

(42,47,48)

El Código Alimentario Argentino, en el capítulo X, artículo 784-(Res 3363, 30.10.79) establece: “Con la denominación de Jalea Real, Papilla Real o Leche de Abeja, se entiende como el alimento de larva de la abeja reina hasta el tercer o cuarto día de vida, constituido por la secreción de las glándulas de la cabeza de abejas jóvenes (5-15 días de vida). (42)

Es un producto que se presenta como una emulsión semifluida, más viscosa, de aspecto lechoso, cuando es segregada es fluida, opalescente, color amarillo pálido o blancuzco, de sabor ácido ligeramente picante, astringente, no-dulce, de olor fenólico y con reacción ligeramente ácida (pH 3.5-4.5). (47)

## 2.4. Clasificación:

2.4.1. La Jalea Real ,según el Código Alimentario Argentino(42), se clasifica en:

### 2.4.1.1. Jalea Real Virgen:

Es la que se recolecta directamente de la copa celda en su estado natural sin más procesamiento que la recolección, filtración, envasado o empacado.



**2.4.1.2. Jalea Real Liofilizada:**

Es aquella que ha sido sometida a un proceso de secado o evaporación en frío bajo condiciones controladas de presión y temperatura (liofilización) para mejorar la estabilidad de la misma.

2.4.2. La Jalea Real, según el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real <sup>(34)</sup>, se clasifica en :

**2.4.2.1. Jalea Real Fresca:**

Es el producto colectado por proceso mecánico a partir de la celda real, retirada la larva y filtrada.

**2.4.2.2. Jalea Real en Natural:**

Es el producto mantenido y comercializado directamente en la celda real después de la remoción de la larva.

**2.5. Composición Química:**

La Jalea Real presenta la siguiente composición química porcentual (Según el Código Alimentario Argentino) <sup>(42)</sup>:

CUADRO 1: COMPOSICIÓN QUÍMICA

COMPONENTE	PORCENTAJE
Agua	60 - 70
Azúcares	10 - 15
Proteínas	11 - 15
Lípidos	5 - 7
Cenizas	0.8 - 1

Dentro de los azúcares o glúcidos están principalmente glucosa, fructosa, junto a sacarosa y pequeñas cantidades de maltosa, enlosa, trevalosa y melibiosa.

(42)

Dentro de su composición protéica, contiene aminoácidos en estado libre y combinados tales como: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, cistina, glicocola, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, prolina, serina, taurina, treonina, tirosina, valina, arginina, histidina, triptófano, lisina, ácido amino-butírico y glicina. (42,49)

Dentro de los lípidos, se encuentra una composición de ácidos grasos dentro de los cuales podemos mencionar: 7-hidroxiocetánico, 3-hidroxidocetánico, 6-hidroxidecenónico, metiloctandiólico, 8-hidroxiocetánico, 9-hidroxinonánico, palmítico, dodecanónico, eicosanónico, y un ácido graso específico, al que se le atribuyen las propiedades antibióticas y antisépticas de la Jalea Real que se

conoce con el nombre de ácido 10-hidroxicenoténico, el cual se sintetiza en las glándulas hipofaríngeas (anexo 2), mientras que las mandibulares sintetizan una mezcla de ácidos grasos, siendo el componente principal el ácido 9-oxodecenóico, además de sintetizar ácido octanóico y otros ácidos volátiles. Diversos estudios actuales han demostrado que las glándulas mandibulares también sintetizan ácido 10-hidroxicenoténico, aunque en poca cantidad. (47,48)

La alimentación es uno de los factores más influyentes sobre la actividad de las glándulas, siendo el polen la fuente más importante para biosíntesis de estos ácidos orgánicos. Otra influencia sobre el desarrollo del funcionamiento de estas glándulas es la edad de la abeja. (42,49)

Además contiene los siguientes microelementos (1-3%): Hierro, oro, calcio, cobalto, silicio, magnesio, manganeso, níquel, plata, azufre, cromo, zinc, potasio y cobre. (42)

Dentro de las vitaminas que la Jalea Real posee están las hidrosolubles como: Tiamina (B1), Riboflavina (B2), ácido pantoténico (B5), Piridoxina (B6), Biotina (B8), Cianocobalamina (B12), ácido Nicotínico (PP), Inositol, ácido fólico y ácido ascórbico. También contiene vitaminas liposolubles como la vitamina A, D y E. Por último podemos encontrar en su composición hormonas en el siguiente porcentaje (42,45):

CUADRO 2: CONTENIDO DE HORMONAS

HORMONA	PORCENTAJE
Estradiol	416.7 ng/100g
Testosterona	140 ng/100g
Progesterona	108.2 ng/100g

### 2.6. Propiedades de la Jalea Real (43,44,45,46,47) :

Las principales propiedades de la Jalea Real son las siguientes:

- Estimula la circulación sanguínea.
- Ejerce acción tonificante sobre algunos centros del hipotálamo, como resultado de lo cual aumenta la secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la hipófisis.
- Normaliza la presión arterial.
- Potente estimulante en las impotencias y astenias sexuales.
- Posee acción vasodilatadora, mejorando el estado de las personas afectadas con trastornos cardíacos.
- Disminuye en un tercio, tres horas después de su ingestión, los niveles de azúcar en la sangre.
- Tiene poder bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y sobre el Bacilo de Koch; en concentraciones de 7.5 mg por litro actúa sobre *Escherichia coli*, *Megatherium* y *Proteus X19*.

- Contiene trazas de acetilcolina, por lo que se transforma en una alternativa para el mal de Alzheimer y esclerosis múltiple.
- Estimula el metabolismo celular y es excelente epitelizante y regenerador tisular.
- Retarda el proceso de envejecimiento de la piel y mejora su hidratación y elasticidad.
- Contiene gammaglobulina, componente que es capaz de frenar la senilidad y aumentar la resistencia, y que ejerce funciones antivirales, antimicrobianas y antitóxicas.
- Normaliza los procesos metabólicos; mejora el metabolismo basal.
- Provoca afluencia de fuerzas, aumenta la vitalidad, la longevidad y la resistencia al frío y a la fatiga.
- Eleva el contenido de hemoglobina en la sangre, así como también leucocitos, glucosa y glóbulos rojos.
- Da la sensación de euforia con recuperación de fuerzas y del apetito.
- Disminuye la emotividad.
- Tiene efectos señalados sobre la actividad de las glándulas suprarrenales.
- Aumenta el peso corporal y la tasa de desarrollo, mejora el crecimiento en el caso de subalimentación en niños de corta edad.
- Posee efectos enzimáticos por la colinesterasa y la fosfatasa.
- Mejora el desarrollo mental de los niños trisómicos.
- Tiene acción antitumoral.

- Se usa en el tratamiento de la arteriosclerosis, coronariocardiosclerosis, hipotonía y distonía vegetativa vascular, endarteritis espasmódica, rehabilitación después del infarto al miocardio, estados asténicos e impotencia sexual.
- Es particularmente activa en la incontinencia de orina, la convalecencia de gripe –que abrevia notablemente-, y en ciertas enfermedades de la piel. Se usa también en el tratamiento de las astenias, anorexia en niños, lactantes y de corta edad, alteraciones de la lactancia materna, seborrea facial, envejecimiento del organismo, neuritis del nervio auditivo y en las afecciones del tracto gastrointestinal, espasmos estomacales y en úlceras del duodeno, debido a su contenido de ácido pantoténico. (14,43,46).

Los estudios clínicos llevados a cabo durante las últimas décadas han apoyado alguna de éstas indicaciones, incluyendo la reducción de tumores en ratones, la disminución de las cifras de colesterol en seres humanos, la lucha contra infecciones microbianas y virales, y la reducción del temblor asociado a la enfermedad de Parkinson. (19)

Pero se debe tener en cuenta también lo siguiente(14,43,46) :

- La administración prolongada de la Jalea Real y en cantidades excesivas no es recomendable.

- Si se ingiere en gran cantidad, la Jalea Real, produce cefalea, aumento de la tensión arterial, aumento del ritmo cardíaco y náuseas.
- Debe tomarse moderadamente, en pequeñas cantidades, dosis mayores de 500 mg diarios pueden ser carcinógenas, pues afecta las células malignas y las normales.
- La Jalea Real está contraindicada en la enfermedad de Addison (insuficiencia crónica de las glándulas suprarrenales).
- Contraindicada en mujeres embarazadas, niños menores de un año de edad y personas alérgicas a la jalea real.
- Algunos investigadores han descrito casos de asma inducida por la jalea real (incluyendo un caso de muerte), y también se la ha acusado de producir gastroenteritis. Sin embargo se necesitan más estudios para determinar claramente la relación entre la jalea real y posibles reacciones alérgicas. (19)

## **2.7. Producción**

La Jalea Real debe extraerse en el período de mayor actividad de la colmena, es decir, cuando haya máxima floración. En pequeña escala se produce dejando huérfana a una colonia bien poblada que tenga huevos y larvas jóvenes de obreras, las mismas construyen celdas reales de emergencia, de las cuales se les extrae la Jalea Real. Este método provee poco rendimiento, no se emplea a escala comercial. (48)

Para la producción de mayor escala, se utiliza la técnica modificada estándar (Doolittle) de transferencia de larvas. Con esta técnica se utilizan colonias fuertes las cuales se horfanizan con lo que se estimula a las obreras nodrizas a preparar celdas reales de emergencia y a producir jalea real. Transcurridos cuatro días después del horfanizado, se preparan los cuadros con las copas celdas, se les agrega una gota de Jalea Real diluida y se transfieren las larvas jóvenes más pequeñas (no mayores de cuatro días). Los cuadros con las copas se colocan dentro de la colmena; se recomienda un máximo de 45 celdas por colonia y 15 celdas por cuadro. Posteriormente, a las 72 horas se abre la colmena para retirar los cuadros y extraer la jalea en el centro de procesamiento (anexo 4). (30,33)

Una vez en el centro de procesamiento o laboratorio, se retiran las celdas y se corta con un cuchillo afilado a la altura de las larvas, seguidamente se retira la larva con una pinza. La extracción de la Jalea Real, se realiza con una pequeña espátula (en el sistema de baja producción) y con una bomba de vacío cuando se trabaja en gran escala. La cantidad de Jalea Real producida está relacionada con la fortaleza de la colonia, época del año y alimentación estimulativa. La producción varía de 150 a 300 mg de Jalea Real por copa, requiriéndose cerca de 1000 celdas para producir 112 kilos de jalea. La Jalea Real debe colarse a través de una tela de nylon para eliminar restos de cera y pieles larvales. (30,33).

## **2.8. Conservación.**

A causa de su composición, la jalea real se conserva difícilmente. Se deteriora muy rápido por la luz solar, el oxígeno del aire, la humedad, y particularmente el calor, que favorecen el enranciamiento de sus materias grasas. A las dos horas posteriores a su extracción de la celdilla real o copa celda, la jalea comienza a cambiar sus propiedades. A 0 – 30 °C envejece a las 20 horas; a 35 °C pierde sus propiedades a las 12 – 14 horas. El plazo de almacenamiento a - 6 °C es de 1 – 2 días, y a 6 °C de un día, si se le pretende dar uso terapéutico. <sup>(1)</sup>

### 2.8.1. Aspectos importantes de conservación.

2.8.1.1. Pura debe de ser mantenida a una temperatura aproximadamente de 0 °C en recipientes opacos, preferentemente negros, bien llenos y cerrados herméticamente, con tapa de material plástico. <sup>(1)</sup>

2.8.1.2. Para mezclar la jalea real con miel, lo mejor es no sobrepasar los 30-40 gramos de jalea real por kilogramo de miel, para evitar fermentaciones, y lo óptimo es 10 gramos solamente. Se debe de utilizar miel con un bajo porcentaje de humedad, si es posible miel concentrada. La jalea real mezclada con miel debe de conservarse o envasarse en frascos opacos, o negros de plástico, porcelana o vidrio, con cierre hermético. Se prepara la mezcla batiendo de 2 – 2.5 gramos de jalea real con 100 gramos de miel cristalizada, fina y homogéneamente (18 % de humedad como máximo) durante ocho horas. El tiempo de conservación de la mezcla depende, de la humedad de la miel. <sup>(1)</sup>

2.8.1.3 La liofilización es la tecnología que aplica evaporación al vacío en estado de congelación. Se puede conservar a 6 °C en papel aluminio. (1)

2.8.1.4. El mejor secado se obtiene por liofilización. Si no puede liofilizar, conservar la jalea mezclando una parte de esta en un mortero de porcelana con cuatro partes de una mezcla de lactosa (97 – 98 %) y glucosa (2 – 3 %). Esta jalea real se puede conservar a 6 °C en frasco oscuro. En esta, se observan algunos procesos de fermentación ácido – láctica en los tres primeros meses de almacenamiento: aumento de 50 – 65 % de ácido láctico en la jalea real sin procesar y aumento de 13 – 50 % de ácido láctico en la jalea real liofilizada. (1)

Según el Código Alimentario Argentino, la Jalea Real se podrá comercializar en su estado natural, liofilizado o mezclas con miel, siempre que la proporción de Jalea no sea superior al 10 %. No podrá contener sustancias extrañas, excipientes, ni aditivos y se rotularan: Jalea Real, Papilla Real o Leche de Abeja o miel con X % de Jalea Real, según corresponda (X representa el porcentaje de Jalea Real presente en la mezcla), en una sola frase con caracteres de igual tamaño, realce y visibilidad. En lugar y con caracteres bien visibles deberá figurar: peso neto y fecha de elaboración (mes y año), así como el de vencimiento del producto (42).

Queda prohibido consignar en el rótulo expresiones tales como natural, genuina y otras similares. El rótulo de los envases de Jalea Real y sus mezclas con miel debe llevar la leyenda: **“Manténgase refrigerado”**. (42)

## **2.9. Control de Calidad de la Jalea Real.**

La Jalea Real constituye una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, por lo tanto es necesario llevar a cabo un control de calidad de este producto apícola.

El control de calidad se define como el conjunto de técnicas fundamentales que abarcan todos los niveles de responsabilidad de la empresa, los cuales permiten medir la calidad de un bien o un servicio; tomar las acciones necesarias para reducirlas, a un mínimo aceptable, las desviaciones y garantizar la aptitud para el uso y el consumo. (36).

En el laboratorio, se reduce a verificaciones más sencillas como las características organolépticas, la identificación y el análisis cuantitativo. Es decir, que la verificación de la calidad es la actividad mediante la cual una entidad ajena al ente productivo, establece si un producto dado, cumple o no con las especificaciones y demás exigencias contenidas en la norma de calidad específicas para tal producto. (31,32).

El Código Alimentario Argentino, Capítulo X, Artículo 784-(Res 3363,30.10.79) establece que “la Jalea real deberá responder a las siguientes características analíticas de composición”: (42).

CUADRO 3: ESPECIFICACIONES DE CALIDAD SEGÚN CÓDIGO

ALIMENTARIO ARGENTINO<sup>(42)</sup>

<b>CARACTERÍSTICAS DE COMPOSICIÓN</b>	<b>JALEA REAL VIRGEN</b>	<b>JALEA REAL LIOFILIZADA</b>
Humedad,secado a 70 °C por 12 horas.	60 – 70 %	5- 10 %
pH, solución al 5 % P / V a 20 °C	3.4 – 4.5	-----
Índice de Acidez (mg de KOH/g de muestra)	23 – 48	-----
Proteínas, N x 6.25	11 – 15 %	27 – 40 %
Relación azúcares reductores / Proteínas.	0.8 – 1.2	-----
Lípidos totales	5 – 7 %	10 – 35%
Lípidos Ácidos	4.3 – 5%	-----
Cenizas a 500 °C	0.8 – 1%	2 – 5 %
Fósforo, como P.	150 mg – 250 mg	1800 – 3500 mg
Azúcares reductores, como glucosa	10 – 15 %	11 – 26 %
Sacarosa, máximo	5%	10%

CUADRO 4: PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA JALEA REAL PARA CONSUMO HUMANO (CUBA) <sup>(1)</sup>.

<b>CARACTERÍSTICAS DE COMPOSICIÓN</b>	<b>JALEA REAL VIRGEN</b>	<b>JALEA REAL LIOFILIZADA</b>
Humedad, desecada con calor a baja presión.	62.5-68.5%	menos de 5.0 %
Proteína Bruta, por método Kjeldahl.	11.0-14.5%	30.0 – 41.0 %
Ácido 10-hidroxi-2-decenoico por cromatografía en fase gaseosa.	más de 1.4 %	más de 3.5 %
Acidez, por titulación alcalina	32-53 mEq de ácido /100g de jalea real	-----
pH	3.5 – 4.5	-----
Contenido de Nitrógeno, por método Kjeldahl.	1.9 - 2.5 %	-----
Contenido de azúcar	9.0 – 13.0 %	-----
Contenido de Cenizas	Menos de 1.5 %	-----
Contenido de extracto acuoso.	22.0 – 31.0 %	-----
Contenido de extracto alcohólico.	14.0 – 22.0 %	-----
Metales pesados.	Menos de 5.0 ppm	-----
Arsénico.	Menos de 1.0 ppm	-----
Tetraciclina	No debe ser detectada	-----

CUADRO 5: ESPECIFICACIONES DE CALIDAD SEGÚN REGLAMENTO TÉCNICO PARA LA DETERMINACIÓN DE IDENTIDAD Y CALIDAD DE LA JALEA REAL (BRASIL) <sup>(34)</sup>

<b>REQUISITOS FISICOQUÍMICOS</b>	<b>JALEA REAL VIRGEN</b>
Humedad	60 – 70 %
Cenizas	Máximo 1.5 %
Proteínas	Mínimo 10 %
Azúcares reductores	Mínimo 10 %
Almidón	Ausente
Lípidos totales	Mínimo 3.0 %
pH	3.4 – 4.5
Índice de Acidez	23 – 53 mg KOH/ g
Sacarosa	Máximo 5.0 %
10-HDA	mínimo 2.0 % p/p, base seca incluyendo: -ácido hidroxitransdecenóico: 0.5-1% -ácido hidroxitransdecendióico: 0.5-2% -ácido cetotransdecenóico: 1-2 %

Los requisitos establecidos en el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real, para las características organolépticas, son las siguientes <sup>(34)</sup> :

- Apariencia: sustancia cremosa y peculiar
- Color: varía de blanco a marfil
- Aroma: característico
- Sabor: ácido y picante.

CUADRO 6: CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS SEGÚN REGLAMENTO TÉCNICO PARA LA DETERMINACIÓN DE IDENTIDAD Y CALIDAD DE LA JALEA REAL (BRASIL) <sup>( 34)</sup>

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>CRITERIO DE ACEPTACIÓN</b>	<b>MÉTODO DE ANÁLISIS</b>
Coliformes a 45°C/ g	Ausencia	APHA 1992c.24 *
Salmonella spp – Shiguella/ 25g	Ausencia	FIL 93 1985 *
Hongos y levaduras UFC/g	Menos de 100 UFC/g	FIL 948 1990 *

\* Métodos de análisis a los que hace referencia el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real.

Uno de los componentes más importantes de la Jalea Real, con un claro efecto inmunomodulador es el ácido 10-hidroxicenoténico el cual es un lípido ácido (ácido graso libre), este se utiliza para el control de calidad de la Jalea Real. (1)

Otras fuentes específicas mencionan que el contenido porcentual del ácido 10-hidroxicenoténico debe estar en el rango de 2.5 al 6 %, y sobre la base de este contenido es el precio al cual se compra la Jalea real. (Ing. Mario Vides, Apifarma).

**CAPÍTULO II**  
**DISEÑO METODOLÓGICO**

### 3.0. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1. Tipo de investigación:

- Exploratorio:

Debido a que la jalea real es un producto apícola poco estudiado en El Salvador, y se realizó con el fin de obtener datos fieles y seguros para la sistematización de estudios posteriores.

- Experimental:

Debido a que, por medio de trabajo de laboratorio, se obtienen datos fidedignos de la calidad de la jalea real.

#### 3.2. Universo de estudio:

- Jalea real elaborada por la abeja *Apis mellífera* y comercializada en El Salvador.

#### 3.3. Muestra:

- Jalea real virgen y liofilizada comercializada por la Sociedad Cooperativa de Apicultores de El Salvador (SCAES), Industrias Apícolas Don Álvaro S.A, VAPE S.A de C.V, y Apiarios Vides Silva.

3.4- La muestra se seleccionó sobre la base de las siguientes características:

- Tipo de jalea.
- Cantidad.
- Fecha de obtención.
- Lugar de recolección.
- Procedencia

3.5- Diseño muestral:

- El diseño que se empleó es no probabilístico o determinístico. (4)

3.6- Tipo de muestreo:

- Dirigido o intencional, el cual consiste en seleccionar las unidades de estudio según el criterio de los investigadores, dado que las unidades seleccionadas gozan de representatividad. (4)

3.7. La metodología se desarrolló en tres etapas:

3.7.1. Investigación Bibliográfica.

3.7.2. Investigación de Campo.

3.7.3. Investigación Experimental.

### 3.7.1. Investigación Bibliográfica:

Se desarrolló a través de visitas a bibliotecas de las instituciones siguientes:

- Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, UES.
- Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, UES.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, CENTA.
- Escuela Nacional de Agricultura: “Roberto Quiñónez”, ENA.
- Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.
- Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social, FUSADES.
- Sociedad Cooperativa de Apicultores de El Salvador, de R.L. SCAES.
- Centro de Documentación de la Organización Panamericana de la Salud, OPS.
- Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”, UCA.

### 3.7.2. Investigación de campo:

Esta etapa consistió en la visita a las empresas apícolas que se dedican a la comercialización de la jalea real como materia prima y producto terminado, las cuales a su vez proporcionaron las muestras para el análisis; estas empresas fueron:

- SCAES de R.L.
- Don Álvaro S.A.
- VAPE S.A. de C.V.
- Apiarios Vides Silva.

CUADRO 7: NÚMERO Y TIPO DE MUESTRA PARA ANÁLISIS

PROVEEDOR	TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRA	PROCEDENCIA	CANTIDAD DE MUESTRA	FECHA DE RECOLECCION
A1.	Jalea real virgen	1	China	50 g	Noviembre/2002
A2.	Jalea real virgen	2	El Salvador	11g	Abril / 2003
B	Jalea real virgen	3	El Salvador	60 g	Agosto /2002
C1.	Jalea real Virgen	4	Cuba	36g	2001
C2.	Jalea real Virgen	5	China	36 g	2002
C3.	Jalea real Liofilizada	6	México	36 g.	Abril / 2003(*)
D	Jalea real liofilizada	7	EE UU	50 g.	Julio / 2003 (*)

(\*) Estas fechas corresponden al mes en el cual se recibieron las muestras.

Proveedor A: que proporcionó dos muestras identificadas como A1 y A2.

Proveedor B: que proporcionó una muestra identificada como B.

Proveedor C: que proporcionó tres muestras identificadas como C1, C2, y C3, respectivamente.

Proveedor D: que proporcionó una muestra identificada como D.

### 3.7.3. La Investigación de Laboratorio.

La fase experimental se efectuó en los laboratorios de las siguientes instituciones:

- Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador
- Centro de Investigación y Desarrollo en Salud , Universidad de El Salvador
- Laboratorio de Química Agrícola, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. CENTA.
- Laboratorios de Servicios Analíticos PROCAFÉ.
- Instituto de Investigación y Desarrollo Químico Biológico S. A. de C.V.

La fase experimental comprendió:

-Análisis físico-químico de la Jalea Real.

- Características Organolépticas. (Estado físico, color, olor, sabor).
- Humedad.
- pH (potenciométrico)
- Contenido de proteínas.
- Índice de Acidez.
- Contenido de Ácido 10- Hidroxidecenóico(\*)
- Contenido de Cenizas.
- Metales pesados.
- Determinación de almidón.
- Detección de tetraciclina.

\* La determinación del ácido 10-Hidroxidecenóico se realiza por cromatografía de gases, por lo cual solo se adjunta el método analítico y queda sujeto de comprobación experimental en investigaciones futuras.

- Análisis microbiológico de la Jalea Real.
  - Coliformes fecales.
  - Salmonella spp y Shigella.
  - Recuento de hongos y levaduras.

**CAPÍTULO IV**

**FUNDAMENTOS DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS**

## 4.0. FUNDAMENTOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.1. Fundamentos de Métodos de Análisis Físico - Químicos

#### 4.1.1. Determinación de humedad<sup>(16)</sup>:

Se entiende por humedad a la pérdida de masa durante el proceso de desecación; es decir, el agua de las muestras se pierde por volatilización a causa del calor. La cantidad de material residual después de eliminar la humedad, constituye la materia seca.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de humedad se expresan como “humedad”, “agua”, o “sólidos totales”. No hay reglas rígidas para cada caso particular, pero el estudio se puede guiar por lo siguiente:

- Humedad: se usa principalmente en polvos como harina, cacao molido y azúcar, cuyos contenidos son comparativamente pequeños.
- Agua: es más común cuando la cantidad presente es bastante más alta, como alimentos frescos, embutidos, queso.
- Sólidos totales: se utiliza más a menudo por los líquidos, como el vinagre, jugos, bebidas alcohólicas y leche.

#### 4.1.2. Determinación de Proteínas por el Método Micro-Kjeldahl. <sup>(11,16,20,38)</sup>

El método de Kjeldahl fue introducido en 1883 por Johan Kjeldahl. En este método, la muestra se descompone con ácido sulfúrico concentrado en caliente para convertir el nitrógeno combinado en ion amonio. La solución resultante se

enfría, se diluye y se alcaliniza. El amoníaco liberado se separa por destilación, se recoge en solución ácida, y por último se cuantifica por titulación. El método Kjeldahl puede ser dividido en tres pasos principales:

#### 4.1.2.1 Digestión:

Consiste en la descomposición de nitrógeno en muestras orgánicas utilizando soluciones de ácidos concentrados. La ecuación general para la digestión de una muestra orgánica es como sigue:



La etapa crucial es la descomposición de la muestra con ácido sulfúrico, el cual oxida al carbono e hidrógeno a dióxido de carbono y agua; entonces el nitrógeno inorgánico en forma de ion amonio( $\text{NH}_4$ ) es liberado. Durante la digestión, parte del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  es reducido a  $\text{SO}_2$  el cual a su vez reduce el material nitrogenado en amonio. Sin embargo, la transformación del nitrógeno depende del estado de combinación en la muestra original. El nitrógeno amínico y amídico se transforma cuantitativamente en ion amonio. Por el contrario, el nitrógeno en forma de grupos nitro, azo y azoxi pueden originar nitrógeno elemental o algunos óxidos de nitrógeno que se pierden en medio caliente.

$-\text{NO}_2$	$-\text{N}=\text{N}-$	$-\text{N}=\text{N}-$   O-
Nitro	grupo azo	grupo azoxi

Esta pérdida puede evitarse al tratar previamente la muestra con un agente reductor para formar productos que se comporten como el nitrógeno amínico o amídico. En uno de estos tratamientos de prerreducción se agregan ácido salicílico y tiosulfato de sodio a la mezcla de ácido sulfúrico concentrado con la muestra. Poco después se lleva a cabo la digestión de la misma manera.

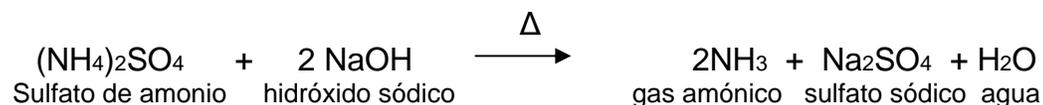
El problema de usar ácido sulfúrico solo para la digestión, es que el tiempo de digestión resulta demasiado largo, debido al lento tiempo de descomposición orgánica. La adición de una sal inorgánica al digerido eleva el punto de ebullición del  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La temperatura de la solución es de  $330^\circ\text{C}$ ; al adicionar una sal como el sulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) se puede elevar la temperatura de la mezcla de digestión a  $390^\circ\text{C}$  o más; esto decreta significativamente el tiempo de descomposición orgánica, disminuyendo el tiempo requerido para la digestión. Así también se hace uso de catalizadores; dentro de estos tenemos el óxido de mercurio que ha sido usado de forma efectiva; el mercurio forma un complejo con el ion amonio durante la digestión. La adición de tiosulfato o sulfuro de sodio después de la digestión y antes de la destilación puede romper el complejo y precipitar sulfuro de mercurio. Esto es importante desde un punto

de vista de seguridad ya que los vapores de mercurio pueden escapar a la atmósfera durante el proceso de destilación; pero debido a los problemas ambientales sobre la manipulación y disposición del mercurio, se emplean otros catalizadores; muchos métodos emplean sulfato de cobre, y se pueden preparar mezclas del sulfato de potasio y un catalizador ( por Ej.  $K_2SO_4 + CuSO_4$ ).

#### 4.1.2.2 Destilación:

Adicionando un exceso de base a la digestión ácida para convertir amonio ( $NH_4^+$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ), seguido por ebullición y condensación de gas amoníaco en una solución fijadora.

La mezcla de digestión ácida es diluida y se hace fuertemente alcalina con hidróxido de sodio, liberando amoníaco como sigue:



La mezcla de digestión ácida es usualmente enfriada y diluida con agua libre de amonio. Solución de NaOH concentrado (50% P/V) es adicionada suavemente por el cuello del frasco, para hacer al digerido fuertemente alcalino ( pH > 11).

La mayoría del amoníaco es destilado y atrapado en la solución fijadora en los primeros 5 o 10 minutos de ebullición; pero depende del volumen de la mezcla digerida; 15 a 150 ml de condensado puede ser colectado en el frasco receptor para asegurar la completa recolección de nitrógeno.

Soluciones fijadoras:

Si la solución fijadora es estandarizada ( HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), es deseable que tenga solo un ligero exceso después que el amoníaco es destilado y atrapado en la solución fijadora, para minimizar el volumen gastado en la retro-valoración.

Si el ácido bórico es usado, la concentración exacta no es necesaria debido a que la titulación directa mide la cantidad de amonio en el destilado por neutralización del complejo 1:1 formado por amoníaco y ácido bórico. Grandes cantidades de ácido bórico pueden ser adicionadas a la solución fijadora para asegurar que la absorción del amoníaco es completa en la solución.

#### 4.1.2.3 Titulación:

Para cuantificar la cantidad de amonio en la solución fijadora hay dos tipos de titulación: La retro-valoración y la titulación directa. Ambos métodos indican el amoníaco presente en el destilado con un cambio de color y seguido por el cálculo de concentraciones desconocidas.

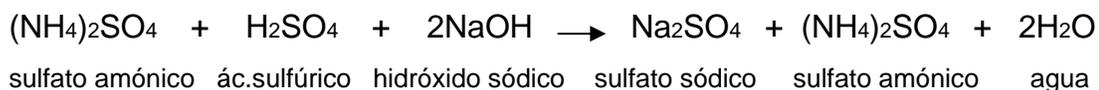
Retro-valoración:

El amoníaco es capturado por un exceso cuidadosamente medido de una solución de ácido estandarizada en el frasco recibidor. El exceso de ácido en la solución fijadora mantiene el pH bajo y el indicador no cambia.



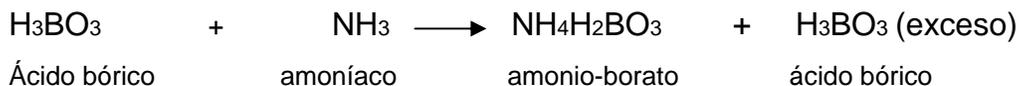
amoníaco      ácido sulfúrico                      sulfato de amonio      ácido sulfúrico (exceso)

La solución en exceso de ácido es neutralizada exactamente por una solución cuidadosamente medida de base estándar como hidróxido de sodio. Un cambio de color es producido al punto final de la titulación.

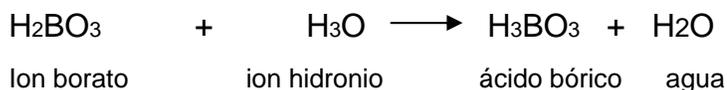


Titulación directa:

Una alternativa conveniente, la cual solo requiere una solución estándar (ventaja), comprende la recolección del amoníaco en un exceso no medido de ácido bórico, este captura el gas amoníaco formando un complejo amonio-borato:



El ion dihidrógeno-borato producido es una base razonablemente fuerte que se puede titular con una solución patrón de ácido sulfúrico o clorhídrico:



En el punto de equivalencia, la solución contiene ácido bórico y iones amonio, por tanto requiere un indicador con intervalo de transición ácido (por Ej. El verde de bromocresol).

Factor empírico (N) para proteínas:

El método Kjeldahl determina la proteína bruta o la materia nitrogenada total.

Esta se calcula multiplicando el nitrógeno total por un factor empírico, y el resultado se expresa como “proteína (N x 6.25)”, “proteína (N x 6.38)”, etc.

Estos factores se han calculado considerando los componentes básicos de un gran número de muestras del mismo alimento:

$$\text{Factor} = \frac{\text{media de la materia nitrogenada total por diferencia}}{\text{Media del nitrógeno total por Kjeldahl}} = \text{PN} / \text{NK}$$

Por ejemplo:

$$\text{PN} = 100 - (\% \text{agua} + \% \text{grasa} + \% \text{cenizas})$$

Con los otros alimentos se deben además restar los carbohidratos, fibra, etc.

El factor 6.25 es conocido como factor general.

#### **4.1.3. Determinación de Índice de Acidez.** (32,35)

El índice de acidez es la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio, necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres de un gramo de muestra.

El método se fundamenta en una retrovaloración ácido -base en el cual la base o álcali en exceso no reaccionante, se valora con un ácido fuerte, y por diferencia de volúmenes se obtiene la cantidad consumida por los ácidos grasos . El punto final de la valoración se determina por el viraje de color del indicador fenolftaleína de rosado a incoloro.

La reacción que se lleva a cabo entre el ácido orgánico y la base es la siguiente:



La reacción que se lleva a cabo en la retrovaloración es la siguiente:



El análisis se efectúa en medio éter etílico – etanol , en la cual se determinan moléculas orgánicas capaces de ceder un protón (que tengan un hidrógeno liberable), insolubles o poco solubles en agua, o de acidez muy débil para determinarse directamente en medio acuoso.

Reactivos titulantes:

Deben de ser bases muy fuertes. Hidróxidos alcalinos en solución en alcoholes alifáticos, como el hidróxido de potasio alcohólico, el cual debe conservarse en un recipiente de vidrio blanco. La alcalinidad del medio favorece la poli condensación de derivados del etanol. Los productos que se forman se destruyen por reacción fotoquímica. El hidróxido de potasio metanólico es análogo al anterior, pero no tiene las reacciones de degradación de la solución etanólica.

#### **4.1.4. Determinación de Lípidos ácidos expresados como:**

##### **Ácido 10-hidroxicenoténico (ácidos grasos de cadena corta) <sup>(25,37)</sup>**

La determinación se basa en la extracción de las grasas con un solvente adecuado y la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, mediante la reacción de esterificación de los ácidos con una solución de hidróxido potásico y metanol, y la posterior inyección directamente de la disolución de ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases.

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil que puede ser un gas, líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de forma tal, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Debido a que el método planteado para la determinación del 10-HDA es de cromatografía de gases, a continuación se presenta una breve descripción del fundamento de dicho método.

En cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas-sólido (CGS) y la cromatografía gas-líquido (CGL).

La CGS ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elusión con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación, excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular.

La CGL se emplea para el análisis de ácidos grasos como el 10-hidroxidecenóico, entre otras aplicaciones, y se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

#### 4.1.5. Determinación Potenciométrica del Valor de pH. (37,38)

La escala de pH es una serie de números que expresan el grado de acidez (o alcalinidad) de una solución, en comparación con la cantidad total de ácido o base de algún material previamente determinado, por medio de una titulación acidimétrica (o alcalimétrica).

Esta prueba se basa en la determinación de la actividad de iones hidrógeno, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para producir valores de pH de 0.05 unidades usando un electrodo indicador al ion hidrógeno como electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, tal como el de calomel o el de cloruro de plata-plata. El equipo debe de detectar el potencial en mV y en unidades de pH a través del par de electrodos.

El pH se define convencionalmente como el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Para las mediciones de pH, se utiliza ampliamente el electrodo de vidrio, porque da una respuesta inmediata a los cambios rápidos de las concentraciones de iones hidrógeno aún en soluciones poco reguladas. Como el mecanismo de este electrodo no implica un cambio de electrones, resulta ser el único electrodo sensible a los iones hidrógeno, al cual no perturban los agentes de oxidación o

reducción. Los valores de pH, de las soluciones o suspensiones que son solo parcialmente acuosas y que pueden considerarse solamente como “Valores aparentes de pH” pueden medirse con un electrodo adecuado y normalizado adecuadamente al medidor de pH.

El electrodo de vidrio es una herramienta muy versátil para la medida de pH en muy diversas condiciones. El electrodo se puede utilizar sin interferencias en disoluciones que contienen oxidantes fuertes, reductores, gases y proteínas (en presencia de proteínas se utiliza un electrodo de referencia de calomelanos en vez de un electrodo de plata / cloruro de plata, debido a que los iones plata reaccionan con las proteínas); se puede determinar el pH de fluidos viscosos e incluso semisólidos.

Como los valores de pH dependen de la temperatura, las mediciones se deben efectuar a determinadas temperaturas constantes. Las soluciones empleadas para determinar el pH se deben preparar con agua exenta de dióxido de carbono.

#### **4.1.6. Determinación de Cenizas.** (16,25)

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. Las cenizas, normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización por las interacciones químicas entre los constituyentes.

El valor principal de la determinación de cenizas (y también de las cenizas solubles en agua, la alcalinidad de las cenizas y las cenizas insolubles en ácido) es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos. Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación.

La determinación del contenido de cenizas se basa en que una muestra pesada inicialmente y sometida a un proceso de calcinación a 500 °C, pierde los materiales o componentes orgánicos, obteniéndose un residuo inorgánico al que se le denomina cenizas.

#### **4.1.7. Determinación de Metales Pesados. (Plomo). (2,3,5.)**

Los metales pesados son aquellos cuya densidad sobrepasa los 3 g/cm<sup>3</sup>. Dentro de estos se tienen el mercurio, cadmio, cromo, y el plomo, entre otros. Convencionalmente se expresa el contenido de metales pesados como partes por millón de plomo.

El plomo es uno de los contaminantes que se encuentran más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su elevada resistencia a la corrosión le ha hecho encontrar numerosas aplicaciones, entre las que destaca la fabricación de acumuladores eléctricos (baterías) y soldaduras. Los derivados tanto orgánicos como inorgánicos del plomo también encuentran aplicación en la industria del vidrio y la cerámica, la fabricación de pinturas y de aditivos para gasolinas.

El plomo es extremadamente tóxico; sus efectos en los humanos son acumulativos. Se introduce en el cuerpo ya sea como ión plomo ( $\text{Pb II}$ ) inorgánico o como tetraetilplomo. Inhalado o ingerido, el plomo se concentra en la sangre, en los tejidos y en los huesos. Se sabe que los iones de plomo inhiben las enzimas que catalizan las reacciones de biosíntesis de la hemoglobina. El tetraetilplomo se convierte en el hígado en el ión  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$ , este ión puede atravesar con más facilidad las capas de membranas que los iones plomo no complejados, y por lo tanto pueden atacar enzimas en diversas zonas, tales como el cerebro.

Químicamente los metales pesados precipitan a un pH de 3.5 en la forma de sulfuros coloreados por la acción de iones sulfuro o reactivos capaces de producirlos (tioacetamina hidrolizada en medio alcalino).

En estas condiciones precipitan plomo, cobre, plata, mercurio, cobalto, cadmio. El interés de la prueba es determinar impurezas minerales (contaminantes), tóxico para el organismo humano por su acumulación.

La determinación de metales pesados, convencionalmente se efectúa por la comparación con un testigo que tenga una cantidad conocida de plomo, realizándose la prueba en tubos de comparación. El contenido global de "metales pesados" se expresa en plomo, aunque los diferentes metales no se manifiestan en la reacción (precipitación de sulfuros) con la misma sensibilidad. Otro método para determinar plomo, es a través de espectrofotometría de absorción atómica.

La espectrofotometría de absorción atómica (AA) se basa en la medición de la cantidad de energía absorbida por los átomos de un elemento metálico al tratarse en condiciones determinadas.

La característica de interés en las medidas por AA, es el monto de luz, a la longitud de onda resonante que es absorbida, cuando la luz pasa a través de una nube atómica. Conforme el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad que de ésta será absorbida se incrementará en una forma predecible. Se puede efectuar una determinación cuantitativa del analito presente, midiendo la cantidad de luz absorbida.

La nube de átomos requerida para las mediciones en absorción atómica, es producida por la adición de suficiente energía térmica a la muestra para disociar los compuestos químicos en átomos libres. La aspiración de una solución de la muestra dentro de una llama alineada con el rayo de luz, sirve para este propósito. Bajo condiciones apropiadas de llama, muchos de los átomos permanecerán en la forma de su estado fundamental y ser capaces de absorber luz de longitud de onda apropiada proveniente de una fuente de luz.

La determinación de plomo en la jalea real virgen y liofilizada se basa en un tratamiento de la muestra por calcinación en mufla a 500 °C, con posterior tratamiento con ácido nítrico y ácido clorhídrico, obteniéndose la solución de prueba. Posteriormente se aspira la solución de muestra en el espectrofotómetro de absorción atómica, se elabora la curva de calibración con

soluciones estándar de concentración conocida de plomo y cuantificación posterior de plomo en la solución de prueba por interpolación en la curva de calibración.

#### **4.1.8. Determinación de Tetraciclina.** (6,8,10,35)

Las tetraciclinas son derivadas del químico policíclico naftacenocarboxamida obtenido del cultivo de microorganismos de *Streptomyces*. Ellos presentan un amplio rango de actividad contra bacterias gram (+) y gram (-) y otros microorganismos que no responden a otras drogas.

Las tetraciclinas son utilizadas en apicultura para el tratamiento de la loque americana y la loque europea que son producidas por las bacterias *Bacillus larvae* para la primera, y para la europea, las bacterias *Melissococcus plutón*, *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus*, *Achromobacter eurydice* y otros gérmenes.

Las dosis para la oxitetraciclina y clorhidrato de tetraciclina es de 1 gramo de sustancia activa por colonia de abejas tres veces en intervalos de 7 días, en el caso de la loque americana; y para la loque europea, la dosis es de 0.5 gramos de sustancia activa por colonia de abejas, tres veces en intervalos de 7 días.

Estos tratamientos deben de efectuarse en el período en el cual no hay cosecha, ya sea de miel o jalea real, cuya presencia en estos productos es un indicativo de su uso en épocas de cosecha o en cantidades elevadas.

La identificación de estas sustancias en la jalea real, se basa en la extracción de las tetraciclinas en medio ácido diluido, las cuales presentan absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético.

Las tetraciclinas, como la oxitetraciclina y la tetraciclina presentan absorción máxima en las siguientes longitudes de onda en medio ácido diluido:

- Oxitetraciclina: 268 y 352 nm.

- Tetraciclina: 270 y 356 nm.

Por tanto, obteniéndose los espectros ultravioleta de estándares de estas sustancias, en el rango de longitudes de onda de 230 a 360 nm, y comparándose con los espectros obtenidos de las muestras en el mismo rango de longitudes de onda, es posible determinar la presencia o ausencia de tetraciclinas en la jalea real.

#### **4.1.9. Determinación de Almidón.** (26,32,38)

El almidón es un polisacárido, compuesto constituido por muchas unidades de monosacáridos, moléculas, cientos e incluso miles de ellas; en el caso del almidón, está formado por unidades de D-(+)-glucosa que se mantienen unidas por enlaces glucosídicos.

El almidón contiene generalmente alrededor del 20 % de una fracción soluble en agua llamada amilosa, y el 80 % de una insoluble conocida como amilopectina.

La detección de almidón de la jalea real se basa en la adición de reactivo de yodo-yoduro (Iugol), a una suspensión acuosa de jalea real, que en presencia de almidón producirá un color azul intenso.

Esta reacción de coloración se debe a que cuando miles de moléculas de glucosa polimerizan, forman grandes moléculas de  $\beta$ -amilosa, las cuales tienden a adoptar una estructura helicoidal, y entonces la especie de yoduro  $I_2$  se incorpora o se adsorbe en el interior de la cadena helicoidal, componente macromolecular de muchos almidones. La  $\alpha$ -amilosa esta íntimamente relacionada, forma un aducto rojo con el yodo.

## **4.2. Fundamentos de Métodos de Análisis Microbiológicos**

### **4.2.1. Determinación de Coliformes totales y Coliformes fecales.**<sup>(17,18,23)</sup>

El grupo de microorganismos llamados coliformes totales pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se caracterizan porque son de forma bacilar, Gram negativos, aeróbicos y anaeróbicos facultativos, no forman esporas y fermentan el azúcar lactosa con producción de ácido y gas a 35°C dentro de 48 hrs. A este grupo pertenecen bacterias del género: *Escherichia*, *Enterobacter*; *Citrobacter* y *Klebsiella*. Estas bacterias se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos.

Dado a que el grupo coliformes totales incluye un amplio rango de bacterias cuya fuente primaria no necesariamente es el tracto intestinal, se utilizan como indicadores de contaminación fecal, bacterias pertenecientes al grupo de los coliformes fecales. Estas bacterias se definen como bacilos gram negativos, aeróbicos y anaeróbicos facultativos, que fermentan la lactosa formando ácido y gas a 44.5°C en 24 hrs. Estas bacterias se encuentran presentes en el intestino del hombre y de animales de sangre caliente e incluye bacterias pertenecientes, a lo menos, a los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*. Para la determinación de coliformes totales y fecales se usa el método del Número Más Probable.

#### **4.2.1.1. Número Más Probable (NMP)**

Es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en las muestras. Se puede hacer con 3 ó 5 tubos. En este método, varias porciones de muestra de jalea real son sembradas en varios caldos de cultivo apropiado, los que se conoce como “Técnica de Tubos Múltiples”.

Después de incubar y leer los resultados, el número de tubos positivos de cada dilución se consulta en cuadros de probabilidad que siguen una distribución de Poisson. Para obtener el número más probable, se utilizan en 10 tubos.

La prueba de los tubos múltiples se dividen en 3 etapas:

4.2.1.1.1 Prueba Presuntiva.

4.2.1.1.2 Prueba Confirmativa.

4.2.1.1.3 Prueba de Coliformes Fecales.

4.2.1.1.1 Prueba presuntiva:

Para la prueba presuntiva se inocula la muestra en tubos con caldo Lauril Triptosa con campanas de Durham para detectar la producción de gas. El caldo

lactosado puede usarse como alternativa, sin embargo, incrementa la frecuencia de resultados falso-positivo. El laurato del Caldo Lauril Triptosa disminuye la tensión superficial y tiene efecto adverso sobre un crecimiento de bacterias aeróbicas esporuladas. Los tubos inoculados a 35°C por 48 horas haciendo la lectura de la presencia de gas a las 24 y 48 horas. Si hay gas en alguno de los tubos se procede a continuar con el análisis, por que se considera prueba presuntiva positiva.

Una prueba presuntiva positiva no siempre significa que la muestra contenga coliformes. Los resultados falsos positivos pueden deberse a otros microorganismos capaces de fermentar la lactosa con producción de gas o a la acción sinérgica de varios microorganismos que individualmente no serian capaces de hacerlo.

#### 4.2.1.1.2 Prueba Confirmativa:

Si sometemos los tubos positivos de la prueba presuntiva a un proceso de confirmación, se eliminan los resultados falsos positivos. La prueba confirmativa consiste en inocular los tubos con Caldo Bilis Verde Brillante (CBVB), a partir del crecimiento microbiano obtenido en los tubos positivo de la prueba presuntiva. Los tubos con CBVB que presenta gas a las 24 horas a 35 °C, se consideran como positivos para la prueba confirmativa.

Es deseable que los tubos positivos de la prueba presuntiva se confirmen tan pronto presenten gas, aunque esto ocurra antes de las 24 horas de incubación

ya que con frecuencia el pH del medio disminuye tanto que puede alterar la viabilidad de los coliformes, conduciendo a pruebas confirmativas negativas falsas.

#### **4.2.1.1.3 Prueba de Coliformes Fecales:**

Esta prueba permite distinguir las bacterias coliformes fecales de los coliformes de otras fuentes y se usa en paralelo con la prueba confirmatoria. El fundamento de esta prueba es la temperatura de 44.5°C. A que pueden cultivarse los coliformes fecales, porque proviene del intestino, en tanto que los coliformes ambientales no pueden hacerlo a esa temperatura.

#### **4.2.2. Determinación de Hongos y Levaduras.<sup>(17,23)</sup>**

El crecimiento de Hongos y levaduras en la Jalea Real significa que esta ha sido almacenada por un largo período de tiempo y es indicio de contaminación ambiental. Ocasionalmente una materia prima parece libre de hongos y levaduras, pero un examen microbiológico determina que esta contaminado.

La contaminación de materias primas y productos terminados por hongos y levaduras resulta en pérdidas económicas para el productor, distribuidor y consumidor.

Muchos hongos y levaduras pueden ser capaces de producir enfermedades en humanos y animales a causa de su habilidad para producir metabolitos tóxicos

conocidos como micotoxinas. Ciertos hongos y levaduras pueden producir reacciones alérgicas o infecciones.

La determinación de hongos y levaduras se puede realizar directamente en la muestra de Jalea Real humedecido e incubado a 25°C o bien mediante diluciones sucesivas y siembra en placa en superficie. Es necesario añadir agentes antibacterianos como el ácido tartárico al medio de cultivo para evitar el crecimiento de las bacterias, que es más rápido que el de los mohos.

#### **4.2.3. Salmonella spp – Shiguella** (17,18,23)

Las especies de Salmonella y Shigella pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae, que son bacilos gram negativos. Estas bacterias son causantes de síndromes diarréicos y disentéricos acompañados por fiebre y septicemia en casos típicos de fiebre tifoidea.

La prueba de detección de Salmonella y Shigella en muestras de Jalea real se divide en tres partes:

4.2.3.1. Enriquecimiento no-selectivo.

4.2.3.2 Enriquecimiento selectivo.

4.2.3.3 Aislamiento selectivo.

#### 4.2.3.1 Enriquecimiento no-selectivo.

Para el enriquecimiento no-selectivo, a la muestra se le añade un volumen medido de medio fluido MOSSEL, que es un medio de enriquecimiento para todas las especies de enterobacterias. Este medio contiene verde brillante y sales biliares que inhiben completamente a las bacterias gram positivas acompañantes. La dextrosa favorece el crecimiento de todas las enterobacterias. La alta capacidad buferizante de este medio de cultivo previene la muerte de las bacterias por la formación de ácido debido a la fermentación del azúcar.

#### 4.2.3.2 Enriquecimiento selectivo.

Para el enriquecimiento selectivo la muestra previamente enriquecida se inocula en medio fluido para gram negativos (GN); que incrementa el crecimiento de ciertas especies bacterianas e inhibe el desarrollo de microorganismos no deseados. Este medio fluido contiene desoxicolato y citrato que son inhibidores de las bacterias gram positivas. Muchas cepas de *Shigella* crecen bien. La concentración de manitol, mayor que la glucosa, que posee el medio, limita el crecimiento de especies de *Proteus*, promoviendo el crecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella* capaces de fermentar manitol. Este medio se utiliza para recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* cuando se hallan en pocas cantidades en las muestras.

#### 4.2.3.3 Aislamiento Selectivo.

En el aislamiento selectivo, la muestra contenida en el medio fluido para gram negativos (GN); se siembra con hisopos estériles en forma de estrías, sobre placas con agar Salmonella-Shigella (agar SS). Se incuban las placas a 35-37°C durante 18-24 horas. El agar SS es un medio altamente selectivo formulado para inhibir el crecimiento de muchos microorganismos coliformes y permitir el crecimiento de especies de Salmonella y Shigella. Contiene verde brillante, sales biliares y altas concentraciones de tiosulfato de sodio y citrato de amonio férrico que inhibe a todas las bacterias gram positivas y muchos microorganismos gram negativos incluyendo las coliformes. Cualquier bacteria que produce Sulfuro de hidrógeno se detecta por el precipitado negro formado con citrato férrico. La lactosa es el único carbohidrato presente en este medio y el rojo neutro es el indicador para la detección de ácidos producidos por la fermentación.

**CAPÍTULO V**  
**ANÁLISIS DE RESULTADOS**

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con el objeto de realizar el análisis de los resultados , se presentan en el siguiente cuadro las especificaciones de calidad tomadas del Código Alimentario Argentino, Parámetros de Calidad de la Jalea Real para Consumo Humano (Cuba) y el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real (Brasil).

**CUADRO 8 . ESPECIFICACIONES DE CALIDAD PARA LA EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA JALEA REAL VIRGEN Y LIOFILIZADA (1,34,42)**

<b>CARACTERÍSTICAS DE COMPOSICIÓN</b>	<b>JALEA REAL VIRGEN</b>	<b>JALEA REAL LIOFILIZADA</b>
Humedad, secado a 70°C por 12 horas *	60 – 70 %	< 5.0 % **
pH, solución al 5.0 % p/v *	3.4 – 4.5	-----
Índice de Acidez (mg KOH / g de muestra)*	23 – 48	-----
% Nitrógeno	1.76 – 2.4 %	-----
Proteínas , N x 6.25 *	11 – 15 %	27 – 40 %
Cenizas, 500°C *	0.8 – 1.0 %	2 – 5 %
Metales Pesados (ppm Pb) **	< 5.0 ppm	-----
Tetraciclinas **	No debe ser detectada	-----
Almidón ***	Ausente	-----

\* Código Alimentario Argentino

\*\* Parámetros de calidad de la jalea real para consumo humano ( Cuba)

\*\*\* Reglamento técnico para la determinación de identidad y calidad de la jalea real(Brasil).

## 5.1. RESULTADOS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LA JALEA REAL VIRGEN Y LIOFILIZADA.

CUADRO 9: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Virgen .  
Procedencia: China – A1

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
% Humedad	60 –70 %	62.2
% Materia seca	30 – 40 %	37.8
% Nitrógeno	1.76 – 2.4 %	2.16
% Proteínas	11 – 15 %	13.52
pH	3.4 – 4.5	3.69
Índice de Acidez (mg KOH / g)	23 – 48	36.94
% Cenizas	0.8 – 1.0 %	0.91
Metales Pesados ( ppm Pb)	< 5 ppm	No detectado
Almidón	Ausencia	Ausencia
Tetraciclinas	No detectada	No detectada

En el cuadro 9 se presenta los resultados del análisis de la muestra de jalea Real Virgen procedente de China . Se observa que la muestra cumple con las especificaciones de calidad físico-química establecidas en el cuadro 8.

CUADRO 10: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Virgen .  
Procedencia: El Salvador – A2

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
% Humedad	60 –70 %	61.8
% Materia seca	30 – 40 %	38.2
% Nitrógeno	1.76 – 2.4 %	2.29
% Proteínas	11 – 15 %	14.35
pH	3.4 – 4.5	3.55
Índice de Acidez (mg KOH / g)	23 – 48	24.32
% Cenizas	0.8 – 1.0 %	1.03
Metales Pesados ( ppm Pb)	< 5 ppm	No detectado
Almidón	Ausencia	Ausencia
Tetraciclinas	No detectada	No detectada

En el cuadro 10 se presentan los resultados del análisis de la muestra de Jalea Real Virgen, procedente de El Salvador. Se determina a través de los mismos, que cumple con las especificaciones de calidad establecidas en el cuadro 8.

CUADRO 11: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Virgen .

Procedencia: El Salvador – B.

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>RESULTADO</b>
% Humedad	60 –70 %	64.2
% Materia seca	30 – 40 %	35.8
% Nitrógeno	1.76 – 2.4 %	2.14
% Proteínas	11 – 15 %	13.37
pH	3.4 – 4.5	3.69
Índice de Acidez (mg KOH / g)	23 – 48	24.78
% Cenizas	0.8 – 1.0 %	0.95
Metales Pesados ( ppm Pb)	< 5 ppm	No detectado
Almidón	Ausencia	Ausencia
Tetraciclinas	No detectada	No detectada

El cuadro 11 contiene los resultados del análisis fisicoquímico de la muestra procedente de El Salvador. A través de estos resultados, se establece que cumple con las especificaciones de calidad para la jalea real virgen.

CUADRO 12: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Virgen .

Procedencia: Cuba – C1

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>RESULTADO</b>
% Humedad	60 –70 %	49.01
% Materia seca	30 – 40 %	50.99
% Nitrógeno	1.76 – 2.4 %	1.54
% Proteínas	11 – 15 %	9.66
pH	3.4 – 4.5	3.37
Índice de Acidez (mg KOH / g)	23 – 48	31.99
% Cenizas	0.8 – 1.0 %	0.74
Metales Pesados ( ppm Pb)	< 5 ppm	No detectado
Almidón	Ausencia	Ausencia
Tetraciclinas	No detectada	No detectada

La información que proporciona el cuadro 12 establece que la muestra analizada, procedente de Cuba, no cumple con las especificaciones de calidad establecidas para la jalea real virgen; excepto el parámetro correspondiente al índice de acidez, metales pesados, almidón y tetraciclinas, con los cuales está dentro de especificación.

CUADRO 13: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Virgen .

Procedencia: China – C2

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>RESULTADO</b>
% Humedad	60 –70 %	63.34
% Materia seca	30 – 40 %	36.66
% Nitrógeno	1.76 – 2.4 %	2.13
% Proteínas	11 – 15 %	13.29
pH	3.4 – 4.5	3.72
Índice de Acidez (mg KOH / g)	23 – 48	26.44
% Cenizas	0.8 – 1.0 %	0.96
Metales Pesados ( ppm Pb)	< 5 ppm	No detectado
Almidón	Ausencia	Ausencia
Tetraciclinas	No detectada	No detectada

El cuadro 13 establece, a través de la información obtenida del análisis físico-químico, que la muestra procedente de China, cumple con las especificaciones de calidad establecidas para la Jalea Real Virgen.

CUADRO 14: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Liofilizada  
Procedencia: México – C3.

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>RESULTADO</b>
% Humedad	< 5.0 %	0.42
% Materia seca	-----	99.58
% Nitrógeno	----	5.88
% Proteínas	27 – 40 %	36.75
pH	----	3.86
Índice de Acidez (mg KOH / g)	----	73.32
% Cenizas	2 – 5.0 %	2.79
Metales Pesados ( ppm Pb)	----	No detectado
Almidón	----	Ausencia
Tetraciclinas	----	No detectada

En el cuadro 14 se presentan los resultados del análisis de la Jalea Real Liofilizada procedente de México, a través de los cuales se puede observar que cumple con las especificaciones de calidad establecidas para este tipo de producto.

Es necesario aclarar que se carecen de especificaciones, para la Jalea Real Liofilizada, con respecto a los parámetros de índice de acidez, pH, metales pesados, almidón y tetraciclinas.

CUADRO 15: Resultados de análisis físico-químico de Jalea Real Liofilizada

Procedencia: EEUU – D.

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>RESULTADO</b>
% Humedad	< 5.0 %	3.14
% Materia seca	-----	96.86
% Nitrógeno	----	5.86
% Proteínas	27 – 40 %	36.63
pH	----	3.88
Índice de Acidez (mg KOH / g)	----	70.09
% Cenizas	2 – 5.0 %	2.79
Metales Pesados ( ppm Pb)	----	No detectado
Almidón	----	Ausencia
Tetraciclinas	----	No detectada

La información que proporciona el cuadro 15 establece, a través de los resultados del análisis físicoquímico de la muestra procedente de Estados Unidos, cumple con las especificaciones de calidad para la Jalea Real Liofilizada.

No se cuenta con especificaciones que establezcan los parámetros de índice de acidez, pH, metales pesados, almidón y tetraciclinas.

CUADRO 16: Características Organolépticas de la Jalea Real Virgen y Liofilizada en las Diferentes Muestras.

No. Muestra	Identificación	Estado Físico	Color	Olor	Sabor
Requisito	-----	Cremoso	Blanco a marfil	Característico	Ácido y picante
1	A1	Semifluido	Blanco – amarillento	Característico	Ácido - astringente
2	A2	Semifluido	Blanco – amarillento	Característico	Ácido - astringente
3	B	Semifluido	Amarillo pálido	Característico	Ácido – astringente
4	C1	Semifluido	Blanco – amarillento	Característico	Ácido – astringente
5	C2	Semifluido	Amarillo pálido	Característico	Ácido – astringente
6	C3	Sólido/ gránulos finos	Blanco – amarillento	Característico	Ácido – astringente
7	D	Sólido/ gránulos finos	Amarillo pálido	Característico	Ácido - astringente

El cuadro 16 contiene los resultados de la evaluación de las propiedades o características organolépticas de las muestras de Jalea Real Virgen y Liofilizada.

El Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real presenta los requisitos para las características organolépticas, en base a la cual se realiza la comparación de resultados; de igual forma, la teoría aporta información sobre las propiedades o características organolépticas a las cuales responde la jalea real.

En base a lo especificado anteriormente, se determina que las muestras cumplen con las especificaciones.

## 5.2.RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA JALEA REAL VIRGEN Y LIOFILIZADA.

Los criterios de aceptación microbiológica son tomados del Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real ( Ver Cuadro 6).

CUADRO 17: Resultados de análisis microbiológico . Determinación de Coliformes Fecales en Jalea Real Virgen y Liofilizada .

No. Muestra	Identificación	Especificación Coliformes Fecales	Resultado
1	A1	Ausencia	Ausencia
2	A2	Ausencia	Ausencia
3	B	Ausencia	Ausencia
4	C1	Ausencia	Ausencia
5	C2	Ausencia	Ausencia
6	C3	Ausencia	Ausencia
7	D	Ausencia	Ausencia

Nota: Las muestras de la 1 – 5 corresponden a jalea real virgen. La muestra 6 y 7 corresponde a jalea real liofilizada.

El cuadro 17 establece los resultados del análisis microbiológico correspondiente a la determinación de coliformes fecales en Jalea Real Virgen y Liofilizada, a través de los cuales se observa que cumplen con los criterios de aceptación con respecto a coliformes fecales.

CUADRO 18: Resultados de análisis microbiológico . Determinación de Salmonella spp y Shigella en Jalea Real Virgen y Liofilizada

<b>No. Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>Especificación Salmonella spp y Shigella</b>	<b>Resultado</b>
1	A1	Ausencia	Ausencia
2	A2	Ausencia	Ausencia
3	B	Ausencia	Ausencia
4	C1	Ausencia	Ausencia
5	C2	Ausencia	Ausencia
6	C3	Ausencia	Ausencia
7	D	Ausencia	Ausencia

Nota: Las muestras de la 1 – 5 corresponden a jalea real virgen. La muestra 6 y 7 corresponde a jalea real liofilizada.

En el cuadro 18, se presentan los resultados correspondientes a la determinación de Salmonella spp – Shiguella en Jalea Real Virgen y Liofilizada, a través de los cuales se establece que cumplen el criterio de aceptación microbiológico .

CUADRO 19: Resultados de análisis microbiológico . Determinación de Hongos y Levaduras en Jalea Real Virgen y Liofilizada .

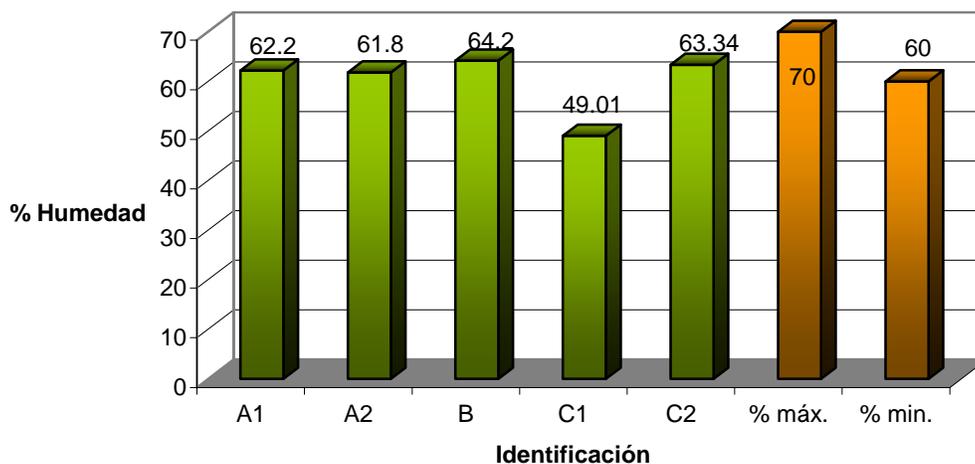
<b>No. Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>Especificación Hongos y Levaduras</b>	<b>Resultado</b>
1	A1	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g
2	A2	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g
3	B	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g
4	C1	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g
5	C2	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g
6	C3	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g
7	D	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g

Nota: Las muestras de la 1 – 5 corresponden a jalea real virgen. La muestra 6 y 7 corresponde a jalea real liofilizada.

El cuadro 19 presenta los resultados de la determinación de Hongos y Levaduras . Por medio de estos resultados se establece que cumplen con el criterio de aceptación establecido.

El Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real solo establece criterios de aceptación microbiológica para la Jalea Real Virgen.

### 5.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE HUMEDAD EFECTUADOS A LAS DIVERSAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN.



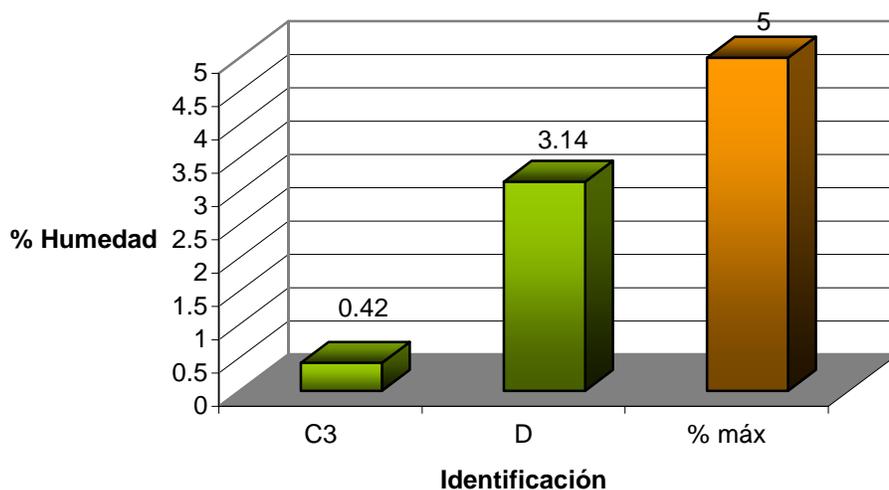
**Gráfico 1: Porcentaje de Humedad en Jalea Real virgen**

No Muestra	Identificación	% Humedad
1	A1	62.2
2	A2	61.8
3	B	64.2
4	C1	49.01
5	C2	63.34

En el gráfico 1 se presentan los porcentajes de Humedad obtenidos de las muestras analizadas de jalea real virgen. El porcentaje de humedad para las muestras identificadas como: A1, A2, B y C2 se encuentran en el rango de 60-65%. La que presenta mayor porcentaje corresponde a la muestra identificada como B, con un 64.2%. La que presentó un menor porcentaje (dentro del rango), es la identificada como A2, con un 61.8 %.

Caso contrario sucede con la muestra identificada como C1, con un porcentaje de 49.01% , estando fuera de especificación.

#### 5.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE HUMEDAD EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL LIOFILIZADA.



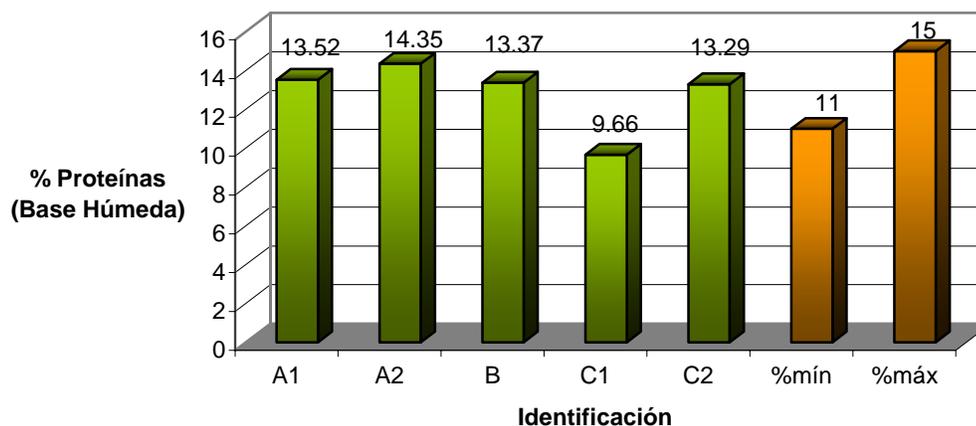
**Gráfico 2: Porcentaje de Humedad en Jalea Real Liofilizada**

No Muestra	Identificación	% Humedad
6	C3	0.42
7	D	3.14

En el gráfico 2 se presentan las humedades obtenidas de la jalea real liofilizada. Se puede observar una notable diferencia entre ambas muestras, la que presentó mayor contenido de humedad (3.14%) es la muestra identificada como D de origen estadounidense; en cambio la muestra C3, de México, presentó un menor porcentaje (0.42%).

Ambas cumplen con la especificación de calidad para contenido de humedad en jalea real liofilizada.

## 5.5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EFECTUADOS A LAS DIVERSAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN.

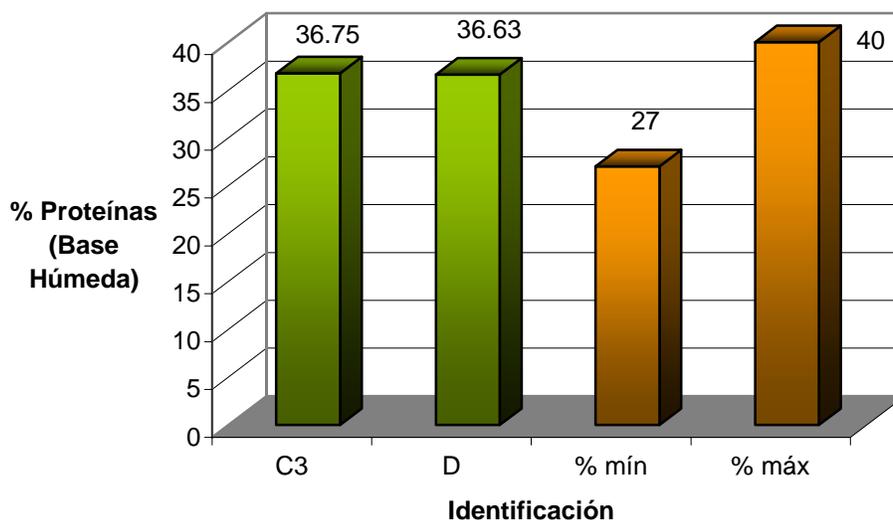


**Gráfico 3: Porcentaje de Proteínas en Base Húmeda en Jalea Real Virgen**

No Muestra	Identificación	% Proteínas
1	A1	13.52
2	A2	14.35
3	B	13.37
4	C1	9.66
5	C2	13.29

El gráfico 3 presenta los contenidos porcentuales de proteínas en jalea real virgen. Las muestras A1, A2, B y C2, poseen un porcentaje de proteínas en el rango del 13 – 15%, en base húmeda. La muestra que presentó un mayor porcentaje (14.35%) fue A2, procedente de El Salvador. La muestra que presentó menor contenido (13.29%) corresponde a C2, de origen chino. La muestra cubana (C1) mostró un bajo contenido de proteínas (9.66%), encontrándose fuera de especificación.

## 5.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL LIOFILIZADA.



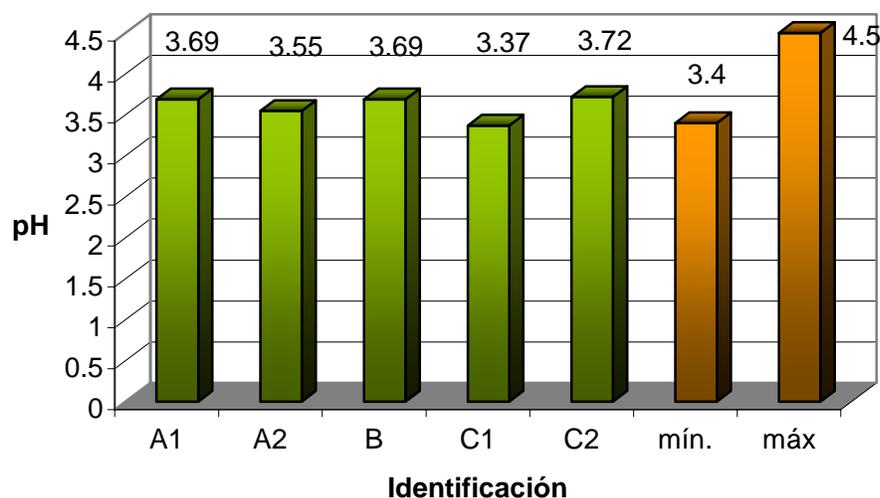
**Gráfico 4: Porcentaje de Proteínas en Base húmeda en Jalea Real Liofilizada**

No Muestra	Identificación	% Proteínas
6	C3	36.75
7	D	36.63

El gráfico 4 expresa los contenidos de proteínas en jalea real liofilizada. La muestra que mostró mayor porcentaje (36.75%) fue C3, de origen mexicano; y por consiguiente la que presentó relativamente un menor contenido protéico (36.63%) corresponde a la muestra D, procedente de Estados Unidos.

Ambas cumplen la especificación de calidad establecida para la jalea real liofilizada.

## 5.7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE pH EFECTUADOS A LAS DIVERSAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN.



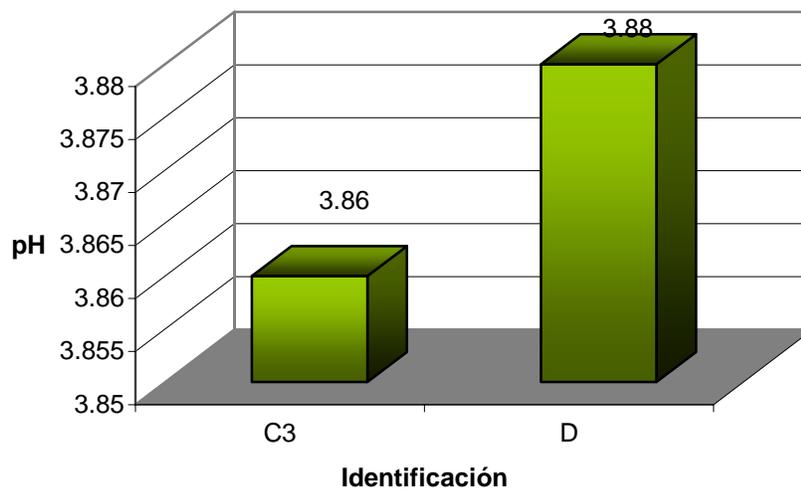
**Gráfico 5: Valores de pH en Jalea Real Virgen**

No Muestra	Identificación	pH
1	A1	3.69
2	A2	3.55
3	B	3.69
4	C1	3.37
5	C2	3.72

El gráfico 5 contiene los valores de pH obtenidos de las muestras de jalea real virgen. Todas las muestras, excepto C1, expresan un valor de pH que van de 3.55 a 3.72, cumpliendo con la especificación establecida.

La muestra C1, de origen cubano, presenta un pH de 3.37, encontrándose fuera de especificación.

## 5.8. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE pH EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL LIOFILIZADA.



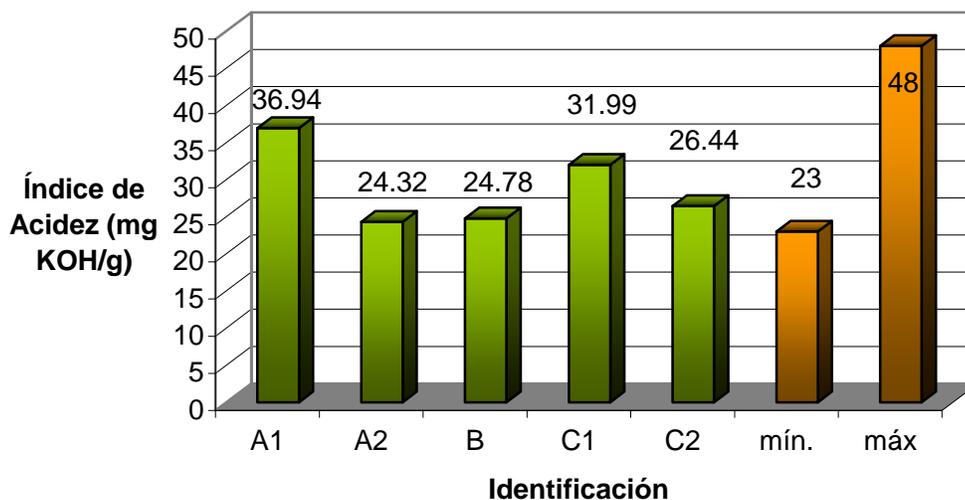
**Gráfico 6: Valores de pH en Jalea Real Liofilizada.**

No Muestra	Identificación	pH
6	C3	3.86
7	D	3.88

El gráfico 6 expresa el valor de pH de la jalea real liofilizada; ambas muestras presentan un valor semejante ( 3.86 y 3.88).

No se poseen especificaciones de calidad de pH para la jalea real liofilizada.

### 5.9. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ÍNDICE DE ACIDEZ EFECTUADOS A LAS DIVERSAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN.

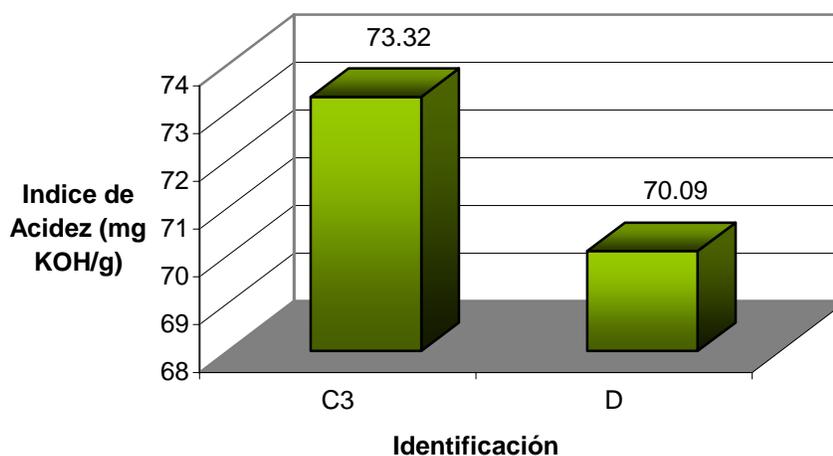


**Gráfico 7: Índice de Acidez en Jalea Real Virgen**

No Muestra	Identificación	Índice de Acidez (mg KOH/g)
1	A1	36.94
2	A2	24.32
3	B	24.78
4	C1	31.99
5	C2	26.44

El gráfico 7 presenta los valores de índice de acidez en jalea real virgen. Estos valores se encuentran dentro del rango de 24 a 37 mg de KOH por gramo de muestra. Se observa que la muestra A1 presenta el mayor índice de acidez (36.94) ; el que presenta menor valor corresponde a A2 (24.32). En este parámetro, todas las muestras cumplen con la especificación de calidad.

### 5.10.RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ÍNDICE DE ACIDEZ EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL LIOFILIZADA.

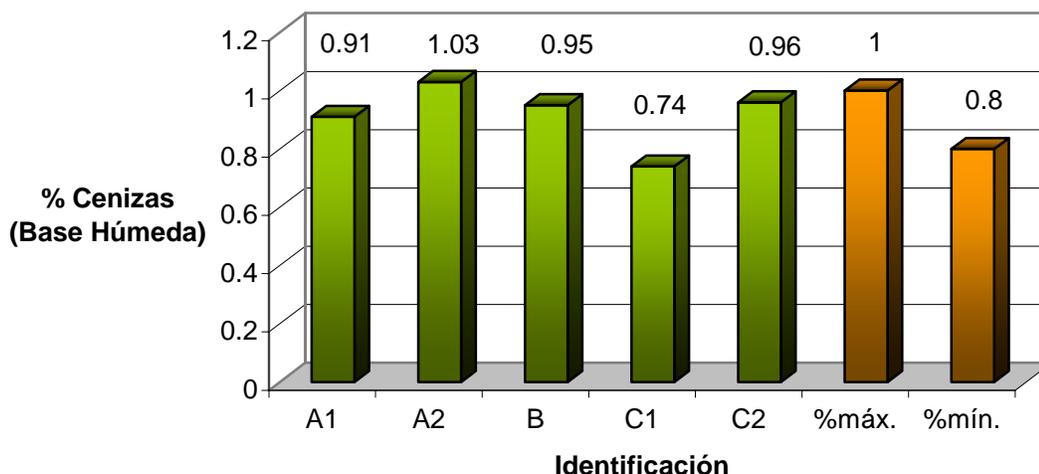


**Gráfico 8: Índice de Acidez en Jalea Real Liofilizada**

No Muestra	Identificación	Índice de Acidez (mg KOH/g)
6	C3	73.32
7	D	70.09

El gráfico 8 presenta los valores de índice de acidez en jalea real liofilizada. En este caso, la que presenta mayor valor de índice de acidez (73.32) corresponde a C3 de origen mexicano; y la de menor índice de acidez es la muestra D (70.09) , procedente de Estados Unidos. No se poseen especificaciones de calidad referentes al índice de acidez en jalea real liofilizada.

### 5.11. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CENIZAS EFECTUADOS A LAS DIVERSAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN.



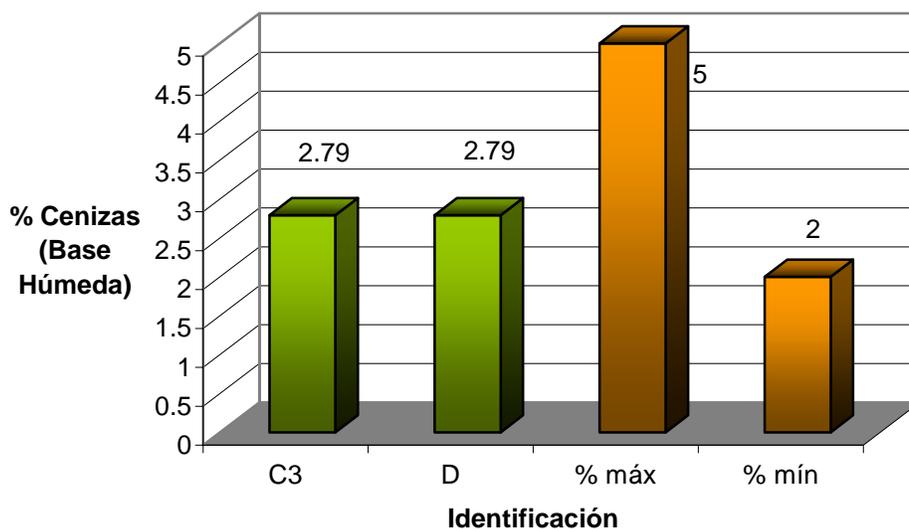
**Gráfico 9: Porcentaje de Cenizas en Base Húmeda en Jalea Real Virgen.**

No Muestra	Identificación	% Cenizas
1	A1	0.91
2	A2	1.03
3	B	0.95
4	C1	0.74
5	C2	0.96

En el gráfico 9 se presentan los contenidos de cenizas, base húmeda, de la jalea real virgen. Los resultados obtenidos, en su mayoría, se encuentran en el rango de 0.9 a 1.03 %, siendo la muestra salvadoreña (A2) la que posee el mayor porcentaje de cenizas (1.03%); y la muestra que presentó el menor contenido de cenizas fue A1 (0.91%) de origen chino. Todas las muestras que se encuentran en el rango antes mencionado cumplen con las especificaciones de calidad para el contenido de cenizas en jalea real virgen.

La muestra cubana (C1), contiene un menor porcentaje de cenizas (0.74%), encontrándose fuera de especificación.

### 5.12. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CENIZAS EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL LIOFILIZADA.



**Gráfico 10: Porcentaje de Cenizas en Base Húmeda en Jalea Real Liofilizada**

No Muestra	Identificación	% Cenizas
6	C3	2.79
7	D	2.79

El gráfico 10 expresa el contenido porcentual , en base húmeda, de cenizas en jalea real liofilizada.

Ambas presentan igual porcentaje de cenizas (2.79%), cumpliendo con la especificación de calidad para este parámetro en la jalea real liofilizada.

### **5.13. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE METALES PESADOS(Plomo) EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN Y LIOFILIZADA**

En lo que respecta al análisis de metales pesados , expresados como ppm de Pb, este no fue detectado en el análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica, en todas las muestras analizadas de jalea real , tanto virgen como liofilizada.

### **5.14. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ALMIDÓN EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN Y LIOFILIZADA.**

En relación a la determinación de almidón, expresados como ausencia o presencia, el análisis realizado a las muestras de jalea real virgen y liofilizada, determina ausencia de almidón en todos los casos.

### **5.15. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE TETRACICLINAS EFECTUADOS A LAS MUESTRAS DE JALEA REAL VIRGEN Y LIOFILIZADA.**

Con respecto a la detección de tetraciclina en Jalea Real Virgen y Liofilizada, el resultado obtenido a través del análisis por Espectrofotometría Ultravioleta, efectuándose por comparación de espectros de absorción, establece que los espectros de las muestras no coinciden con el espectro del estándar de clorhidrato de tetraciclina.

Este resultado se confirma por medio del empleo de cromatografía de capa fina, en el cual la única mancha que se desarrolla en la cromatoplaca vista

bajo lámpara de luz ultravioleta a longitud de onda larga, corresponde a la solución metanólica del estándar de clorhidrato de tetraciclina, siendo por tanto no detectadas las tetraciclinas en las muestras de jalea real virgen y liofilizada.

**CAPÍTULO VI**  
**DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## 6.0. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para el análisis de las características organolépticas, se evaluó olor, color, sabor y estado físico. Durante el desarrollo de la prueba se presentó el inconveniente de no poseer un estándar de comparación para evaluar las muestras. La norma empleada corresponde al Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real, para poder efectuar la comparación de las propiedades o características organolépticas ; también se empleó la información proporcionada en la teoría , en la que se establece que es un producto que se presenta como una emulsión semifluida, de aspecto lechoso, cuando es segregada es fluida, opalescente, color amarillo pálido o blancuzco, de sabor ácido ligeramente picante, astringente, no-dulce, de olor fenólico y con reacción ligeramente ácida (pH 3.5-4.5).

En el análisis de proteínas, inicialmente se probó la técnica empleando muestra húmeda, pero la formación de espuma era excesiva, llevando a la pérdida de muestra, por lo tanto se optó por realizar la digestión de las muestras a partir de muestra seca, y a la vez añadiendo dos mililitros de peróxido de hidrógeno al 30%, y con lo anteriormente descrito se disminuyó la formación de espuma y el tiempo de digestión.

Con respecto a la determinación de humedad, las muestras de jalea real virgen se procesan separadas de la jalea real liofilizada, ya que si se someten al proceso de secado al mismo tiempo en la misma estufa, el

liofilizado toma una parte del agua que pierde la jalea real virgen, lo cual se confirma al observar un aumento de peso en las muestras de jalea real liofilizada.

Con respecto al Índice de Acidez, al inicio de la investigación se empleó el método de titulación directa base fuerte-ácido débil obteniéndose resultados muy bajos de este parámetro para todas las muestras, estando fuera de especificación; esto posiblemente se debió a la reacción incompleta de los ácidos grasos libres presentes en la jalea real. Por tanto se optó por utilizar un método por retrovaloración ácido fuerte-base fuerte con reflujo ( 30 minutos ), a través del cual se extraen y reaccionan de forma completa los ácidos grasos libres hidro y liposolubles, obteniendo un punto final de la valoración más definido y resultados conformes a especificación.

En la Detección de Tetraciclinas, se utilizó un método espectrofotométrico de absorción ultravioleta, en la cual se obtuvo espectros de absorción UV tanto del estándar de clorhidrato de tetraciclina como de las muestras de jalea real virgen y liofilizada.(ver anexo 9)

Se observó que el espectro del estándar presentó dos bandas de absorción, a 268 nm y 358 nm respectivamente; y las muestras presentaron una sola banda de absorción en un rango de longitudes de onda de 250 nm y 260 nm, por lo que no se sabía con exactitud si los espectros de muestra y estándar correspondían.

Se procedió a contaminar intencionalmente una muestra de jalea real virgen con 40 mcg/ mL de Clorhidrato de Tetraciclina para observar la tendencia del espectro de una muestra contaminada, observándose las dos bandas de absorción características del estándar a las mismas longitudes de onda que no presentaron las muestras sin contaminar.

Para confirmar este resultado, se realizó una cromatografía de capa fina, en la cual se empleó una cámara de desarrollo conteniendo como eluyente metanol: amoníaco (100:1.5), un cromatofolio 20 x 20 cm de sílica gel F254, inyectándose 10 uL de solución metanólica de clorhidrato de tetraciclina y las respectivas soluciones metanólicas de las muestras, se dejó desarrollar el cromatograma y bajo luz UV se observó que el estándar fue el único que se desarrolló en la placa.

Con respecto al análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras de jalea real virgen y liofilizada, se puede establecer que, en general se encuentran dentro de los rangos establecidos en las especificaciones de calidad, las cuales son tomadas del Código Alimentario Argentino, Parámetros de Calidad de la Jalea real para Consumo Humano (Cuba), y el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real (Brasil).

En la determinación de Humedad, Contenido de Proteínas, Contenido de Cenizas, pH; la muestra identificada como C1 y que procede de Cuba,

presentó un resultado bajo en estos análisis, siendo las posibles causas de esto, las condiciones de almacenamiento y manipulación, desconocimiento de la fecha de fabricación; disminuyendo de esa manera su contenido químico, que se reflejan en los resultados obtenidos.

Para efectos de comparación de los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico de la jalea real virgen y liofilizada con las especificaciones de calidad, se elaboró un cuadro (Cuadro 8) el cual contiene los parámetros evaluados y los rangos o valores establecidos para la aceptación o rechazo del producto, los cuales son tomados del Código Alimentario Argentino, Parámetros de Calidad de la Jalea Real para Consumo Humano (Cuba), y el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real (Brasil). Es necesario hacer notar que para la jalea real liofilizada, se carece de especificaciones para el índice de acidez, pH, metales pesados, tetraciclinas y almidón. En el caso de metales pesados, pH, tetraciclinas y almidón, se toma lo establecido para la jalea real virgen, pero en el índice de acidez no se realiza comparación, ya que los valores son sumamente diferentes, por tanto solo quedan establecidos como datos de análisis que podrán servir como antecedentes para posteriores análisis de jalea real liofilizada.

Es necesario aclarar que la determinación del ácido 10-hidroxidecenóico no se realizó, ya que para llevar a cabo este análisis se requiere de un cromatógrafo de gases, por tanto , solo se describe el método analítico quedando sujeto a comprobación experimental.

Con respecto a la comparación de resultados del análisis sanitario, con las especificaciones de calidad, es necesario hacer notar que solo el Reglamento Técnico para la Determinación de Identidad y Calidad de la Jalea Real (Brasil) cuenta con criterios de aceptación microbiológica para la jalea real virgen, por tanto son comparados con la anteriormente citada; de igual forma, no especifica los criterios de aceptación para la jalea real liofilizada, pero son tomados para efectos de comparación, los criterios establecidos en este Reglamento.

**CAPÍTULO VII**  
**CONCLUSIONES**

## 7.0. CONCLUSIONES

- De acuerdo a las especificaciones de calidad contenidas en las diferentes normas empleadas, se realizaron pruebas analíticas físico – químicas para evaluar la calidad de la Jalea Real Virgen y Liofilizada; así como también en base a dichas normas, se elabora un cuadro de especificaciones de calidad con el objeto de efectuar las comparaciones correspondientes de los resultados del análisis físico – químico de las mismas.
- Los resultados de los análisis físico-químicos están sujetos a factores como la homogeneidad de la muestra, a la variabilidad de los procesos de producción de la jalea real, a la cantidad de nutrientes y componentes químicos presentes en las muestras, así como la manipulación y almacenamiento de las mismas.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en las características organolépticas, humedad, pH, contenido de proteínas, índice de acidez, contenido de cenizas, metales pesados, determinación de almidón y detección de tetraciclina, la mayoría de las muestras cumplen las especificaciones establecidas por las normas internacionales, excepto la jalea real virgen procedente de Cuba. Esto puede deberse a las condiciones de recolección, fecha de obtención,

condiciones de almacenamiento, manipulación del producto. También se hace necesario , para poder efectuar una evaluación de calidad de este tipo de materia prima, conocer la cadena de frío por la que pasa la muestra o el lote de donde se obtiene antes de ser llevada al laboratorio donde se efectúa la verificación de calidad.

- Con respecto a la jalea real liofilizada, en base a las pruebas físico – químicas y sus resultados, se establece que cumplen con las especificaciones que se encuentran en las normativas empleadas para este tipo de jalea, como son humedad, proteínas y cenizas; para las determinaciones restantes, no se cuenta con especificaciones de calidad establecidas en las normativas, por tanto no es posible su comparación, sin embargo, quedan establecidos los datos obtenidos con objeto de consulta en posteriores análisis que se efectúen a esta materia prima.
  
- La calidad sanitaria que presentaron las muestras de jalea real virgen y liofilizada se debe a la presencia de sustancias químicas con propiedades bactericidas y/o bacteriostáticas, como el ácido 10-hidroxidecenóico y otros ácidos orgánicos; adecuado almacenamiento y manipulación; por lo que , desde el punto de vista sanitario, es apta para el consumo humano.

- De acuerdo a los resultados obtenidos en la Determinación de Coliformes fecales, Salmonella spp - Shigella spp y Recuento de Hongos y Levaduras; todas las muestras analizadas cumplen los criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento Técnico para la determinación de la Identidad y calidad de la Jalea Real (Brasil).

**CAPÍTULO VIII**  
**RECOMENDACIONES**

## 8.0. RECOMENDACIONES

- Efectuar la determinación de pH e índice de acidez de forma inmediata después de la recepción de la muestra, con el objeto de evitar variaciones en los resultados por pérdidas de sustancias o ácidos volátiles; proseguir con el análisis de humedad y materia seca, proteínas, cenizas y metales pesados, ya que es necesario partir de muestra seca para disminuir el tiempo de digestión de las proteínas y de calcinación en el caso de las cenizas. Asimismo, realizar la detección de tetraciclinas y almidón con muestra húmeda.
  
- Con el objeto de conservar la jalea real en buen estado, se recomienda mantener adecuada cadena de frío (almacenamiento a temperatura de 0 °C o menor), en recipientes opacos, limpios, preferentemente negros, bien llenos y cerrados herméticamente, con tapa de material plástico, evitando la exposición al aire para evitar posibles oxidaciones.
  
- En base a las especificaciones empleadas en la presente investigación , se recomienda elaborar la Norma Salvadoreña para la determinación de calidad de la jalea real virgen y liofilizada, para que de esa manera la industria nacional cuente con especificaciones para la evaluación de este producto apícola.

- Desarrollar y establecer métodos de análisis para la identificación y cuantificación de principios activos de interés farmacéutico, nutricional y cosmético, como es el contenido de ácido 10 – hidroxidecenóico, hormonas, vitaminas hidro y liposolubles, y micro nutrientes, carbohidratos, lípidos, así como la determinación de contaminantes como arsénico, residuos de plaguicidas y aflatoxinas; así como efectuar estudios de efectividad antimicrobiana de la Jalea Real sobre bacterias gram positivas y gram negativas.
  
- Promover a nivel nacional el uso de la jalea real en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética para que de esa manera se emplee este producto apícola como materia prima; así también, que los mismos se aseguren de efectuar la evaluación de calidad físico-química y microbiológica de la jalea real antes de ser empleada en la elaboración de sus productos, para asegurar la calidad de la materia prima y del producto a elaborar.
  
- Realizar monitoreos en preparados que contengan Jalea Real para determinar si se mantiene la efectividad del principio activo.
  
- Establecer un sistema de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) en la industria apícola de El Salvador, con el objeto de asegurar al productor y al consumidor de estos productos ( miel, propóleo, polen, jalea real, etc.) la calidad, efectividad y eficacia de los mismos.

- Promover que las Universidades, Ministerio de Agricultura y Ganadería, incentiven y apoyen a los apicultores, para que estos se conviertan en productores a mayor escala de Jalea Real, y de esta forma facilitar que la empresa privada adquiera esta materia prima; así como también incentivar la exportación de este insumo como otro producto no tradicional.
  
- Dar a conocer la presente información a las instituciones y personas involucradas en la vigilancia sanitaria y alimentación; y en el desarrollo de normas, como son el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MISPAS), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), y el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); así como también al Colegio de Químicos y Farmacéuticos; para que a través de estos organismos se difunda la información proporcionada a las entidades dependientes de estas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Asís, M. 1996. Apiterapia para Todos. Como Usar los Siete Productos de la Colmena para Curar. 2ª Edición. La Habana, Cuba. Colección Beltique. Editorial Científico – Técnica. V.1. p.44 – 53.
2. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.1990. 15<sup>th</sup>. Edition, Edited by Sydney Williams, Published by The Association of Official Analytical Chemists, Inc. p.71-75,463.
3. Beaty, R. 1998. Conceptos, Instrumentación y Técnicas de Espectrofotometría por Absorción Atómica.,EEUU. Editado por Perkin Elmer Corporation. P. 51-53.
4. Bonilla, G. 2000. Cómo Hacer una Tesis de Graduación con Técnicas Estadísticas. El Salvador,4ª Edición, UCA Editores , p. 87-97.
5. Chang, R. 1992. Química. México, 4ª Edición, McGraw-Hill Interamericana de México, S.A. de C.V., p.847-848.
6. Clarke. The Pharmaceutical Society of Great Britain. 1986. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body fluids, and Post – Mortem Material. London, 2<sup>nd</sup> Edition, The Pharmaceutical Press, p. 463,846,847,1005.
7. Colombo, B. 1976. Control of Physical Properties in Pharmaceutical Forms. 1<sup>st</sup> Edition, Org.Ital. Medico-Farmacéutica. p. 73, Appendix.3, 6, 28, 33.

8. Convention Pharmacopeica. The United States Pharmacopoeia (USP 24). The National Formulary (NF19) United States Pharmacopeia Convention, Inc. 2000. p.1817-1818,1876,2057,2061,2241,2243,2244.
9. Cook, E. 1953. Farmacia Práctica de Rémington. México D.F. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, UTEHA. V.1 p. 129,193, 1040-1077.
10. Farmacopea Europea. Consejo de Europa. 2ª. Edición, Parte II, Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, Madrid-España, Volumen 3, pp. 199-3,211-3.
11. Fertilizer Development and Consultation Organization, 1999. Methods of Analysis of Soils, Plants, Waters and Fertilizer. India, Edited by HLS Tandom, New Delhi. P. 55-56.
12. Fuentes, A. 1980. Tesis. Análisis de Cremas Cosméticas, Limpiadoras y Humectantes de Mayor Consumo en el País. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, San Salvador, El Salvador, C.A. p.22.
13. Ganong, W. 2000. Fisiología Médica. México. 17ª Edición, Editorial El Manual Moderno. P. 104,272,309,393.
14. Handal, S. 2000. Apicultura. San Andrés, San Salvador. Impresos Urgentes. V1.P.124-140.
15. Harris, D. 1992. Análisis Químico Cuantitativo. 3ª. Edición. México D. F. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. VI. P.35-44, 47-63, 732-734.

16. Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, EE.UU. Compilación de Datos Analíticos y Biológicos en la Preparación de Cuadros de Composición de Alimentos para usos en los Trópicos de América Latina. Centro para la Agricultura Tropical, Departamento de Ciencia Animal. V.1. p. 1401, 1601, 1701-1702, 2101-2102.
17. Jawetz, E. 1990. Microbiología Médica. México DF. 13ª Edición. Editorial El Manual Moderno. S.A de C. V. P. 206 - 214
18. Koneman, E. 1997. Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas Color. 3ª. Edición. México, D.F. Editorial Médica Panamericana, S.A. V1.Pp.204-238.
19. Krapp, K. Enciclopedia de las Medicinas Alternativas. España, Editorial OCEÁNO. p. 508,869-870.
20. Labconco. A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination. Methods and Apparatus. Labconco An Industry Service Publication. P. 3-6.
21. Mejia, S. Guía para la Elaboración de Trabajos de Investigación Monográfica o Tesis. P. 1-70.
22. Menjivar, A. 1997. Apicultura para Pequeños Productores, Curso de Introducción. El Salvador. P. 7-8, 16-17.
23. Merck, 2000. Microbiology Manual. Frankfurt, Germany. P. 65,109,111,118,131,191,221.
24. Merck, Sharp & Dohme. Manual Merck de Información Médica para el Hogar. España, Editorial OCEÁNO. p. 133,342-343, 1131,1311.

25. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. 1994. Métodos Oficiales de Análisis. Madrid, España. Secretaria General de Alimentación. Dirección General de Política Alimentaria. Tomo IV, p.117-119, 149-150,173-181.
26. Morrison, R. 1996. Química Orgánica. 5ª. Edición. Estados Unidos Addison. Wesley Iberoamericana, S.A. V.1. p. 1243-1244,1308-1309.
27. Olascoaga, J. 1975. Bromatología de los Alimentos Industrializados. 2ª Edición. México D.F. p. 6-7
28. Ortez, E. 1999. Pasos para Hacer una Investigación. 2ª Edición. Santa Tecla El Salvador. Clásicos Roxil. S.A. de C.V. p. 53-105.
29. Osborne, D.R. 1986. Análisis de los Nutrientes de los Alimentos. España, Editorial ACRIBIA S.A, Zaragoza. P.111-112,118-121,170-172,173-174.
30. Philippe, J.M. 1990. Guía del Apicultor. España. Ediciones Mundi-Prensa. P. 25-26, 43-46, 54, 229-237, 239-241, 243, 245-250, 305-306.
31. Potter, N. 1973. La Ciencia de los Alimentos. Editorial HARLA de México. p 131,361-362.
32. Pradeau, D. 1998. Análisis Químico Farmacéuticos de Medicamentos. México D.F. Editorial Limusa, UTEHA, Noriega Editores. P. 290,767-770.
33. Prost, P.J. 1995. Apicultura. Conocimiento de la Abeja. Manejo de la Colmena. 3ª Edición. Versión Española. España. Ediciones Mundi-Prensa. P 41-99, 371-376, 549-561,683.

- 34.Regulamento Técnico para Fixacao de Identidade e Qualidade de Geléia Real. Pp.16-17.
- 35.Secretaria de Salud, México, 1998. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5ª. Edición. P.54,246,248,249,275,281,283,507,922.
- 36.Segura, V.M.1986.Evaluación de Métodos y Resultados Analíticos para Elaborar Normas de Calidad para Fertilizantes Químicos en El Salvador. Boletín técnico No 8 Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Centro de Tecnología Agrícola (CENTA).División de Investigación Agrícola. San Andrés, El Salvador. P 10-21.
- 37.Skoog,D. 1994. Análisis Instrumental. 4ª Edición. McGraw Hill Interamericana de España, S.A de C.V. p. 227-249,571-574,597-600.
- 38.Skoog, D 1997. Química Analítica. 6ª. Edición, Colombia. Mc Graw Hill Interamericana, S.A. de C.V. p. 219-220,308-309, 575-576.
- 39.Stedman, T. 1993. Diccionario de Ciencias Médicas. 25ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, S.A. p. 421,457,507,717.
- 40.Vander, A. 1998. Human Physiology . The Mechanisms of Body Function. 7<sup>th</sup> Edition, McGraw Hill, Boston, Masachussets. P. 200,745.
- 41.Villee, C . 1998. Biología . 7ª. Edición. McGraw Hill Interamericana de México, S.A de C.V. p. 126,372.
- 42.www.apicultura.entupc.com. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2002. Código Alimentario Argentino-Capítulo X. Jalea Real. Argentina. Consultada el 15 de Noviembre de 2002.

43. [www.aragonesasi.com/miel.htm](http://www.aragonesasi.com/miel.htm). La miel, Polen y Jalea Real en Aragón España. Aragonesasi. Consultado el 4 de Enero de 2003.
44. [www.ecampo.com/sections/news/print.php/uuid.A20ED0E4-BF64-477A-86556F240F850EOF/](http://www.ecampo.com/sections/news/print.php/uuid.A20ED0E4-BF64-477A-86556F240F850EOF/). Jalea Real . Colombia. Ecampo.com. Consultado el 15 de Noviembre de 2002.
45. [www.ecoaldea.com](http://www.ecoaldea.com). Apicultura, Jalea Real , 2000. Consultado el 11 de Diciembre de 2002.
46. [www.enbuenasmanos.com/ARTICULOS/muestra.asp?art=49&uni=l](http://www.enbuenasmanos.com/ARTICULOS/muestra.asp?art=49&uni=l). Jalea Real. Colombia. Revista En Buenas Manos. Consultado el 3 de Diciembre de 2002.
47. [www.idd02n82.eresmas.net/jaleareal.htm](http://www.idd02n82.eresmas.net/jaleareal.htm). Todo sobre la Jalea Real. Propiedades, Composición, Aplicaciones y Fabricación. Colombia. Canal ficción. Consultado el 3 de Diciembre de 2002.
48. [www.misionesalternativo.com.ar/jaleareal.htm](http://www.misionesalternativo.com.ar/jaleareal.htm). Jalea Real. Argentina. Cooperativa Apícola Ltda.. Las Misiones. Consultado el 4 de Febrero de 2003.
49. [www.ranhocortesano.com/jalea.htm](http://www.ranhocortesano.com/jalea.htm). Jalea Real, Rancho Cortesano. España, Rancho Cortesano. Consultado el 11 de Diciembre de 2002.

## GLOSARIO

**Acetilcolina:** es el éster acetilo de la colina. Existe en gran parte encerrada en pequeñas vesículas sinápticas, claras, en alta concentración en los botones terminales de las neuronas que liberan acetilcolina. Se distribuye en todo el sistema nervioso central, con grandes concentraciones en la corteza cerebral, tálamo y varios núcleos basales del prosencéfalo, a la vez se localizan en la unión mioneural, terminaciones autónomas y preganglionares, glándulas sudoríparas parasimpáticas posganglionar y terminaciones vasodilatadoras del músculo.(13,40)

**ACTH:** llamada también corticotropina u hormona adrenocorticotrópica; es una hormona secretada por la hipófisis anterior, la cual controla la secreción de glucocorticoides, mineralocorticoides (aldosterona), y las hormonas sexuales de la corteza suprarrenal.(13,40)

**Antiséptico:** agente químico aplicado a tejidos para prevenir infecciones, matando o inhibiendo el crecimiento de patógenos.(17)

**Apicultura:** cuidado de las colmenas de abejas melíferas para la polinización de las cosechas, y la obtención de miel y otros productos.(33)

**Apiterapia:** tratamiento alternativo basado en el empleo de la miel y otros productos de las abejas.(19)

**Arteriosclerosis:** es la pérdida de la elasticidad o el endurecimiento de las arterias por cualquier causa. Esta enfermedad predispone al infarto del miocardio, a la trombosis cerebral, a la gangrena isquémica de las extremidades, así como a otros padecimientos graves. Se caracteriza por la infiltración de colesterol y aparición de células espumosas en las lesiones de las paredes arteriales, seguida de cambios complejos que involucran a plaquetas, macrófagos, células del músculo liso y factores del crecimiento; se distorsiona a su vez el vaso sanguíneo y se rigidiza.<sup>(24,39)</sup>

**Astringente:** son sustancias capaces de contraer, estrechar y apretar los tejidos orgánicos, disminuyendo las secreciones. Esta acción es debida a una combinación entre el astringente y las proteínas celulares, que precipitan.<sup>(9)</sup>

**Bactericida:** agente con capacidad de matar microorganismos rápidamente.<sup>(17)</sup>

**Calidad:** es la medida en que las propiedades de un bien o servicio, satisfacen las exigencias de un usuario; la calidad depende de los constituyentes químicos presentes, envase, etiquetado, etc.<sup>(32)</sup>

**Calidad sanitaria:** es aquella que se mide generalmente mediante cálculos de la presencia de bacterias, levaduras, mohos y fragmentos de insectos, además de niveles de sedimento.<sup>(31)</sup>

**Complemento alimenticio:** son sustancias producidas por la industria y constituyen un grupo intermedio entre los medicamentos y los alimentos. Se parecen a los primeros por la técnica de elaboración, la dosificación, presentación, sitio de venta, precio elevado y uso frecuente en casos patológicos. Se confunden con los alimentos, porque actúan directamente sobre todos los tiempos de la nutrición: estimulan el apetito, la digestión, el tránsito intestinal, el metabolismo general y la excreción, y como están formados por azúcares, aminoácidos, grasa, sales minerales o vitaminas, se emplean para dar estos nutrientes a los organismos que están o que estuvieron sometidos, por un tiempo más o menos largo, a regímenes insuficientes en valor calórico, incompletos y disarmónicos en uno o varios principios nutritivos e inadecuados para promover la salud y el bienestar (27) .

**Copa celda:** celda artificial elaborada a partir de la cera de abeja o de caucho, con el fin de alojar las larvas para producir jalea real o criar reinas.(14)

**Distonía:** estado de tonicidad anormal (hipotonía o hipertonía) en cualquier tejido.(39)

**Emulsión:** sistema heterogéneo que consta de gotitas de un líquido dispersas en otro líquido. Al que se le halla desintegrado o en forma de glóbulos, se le da el nombre de fase interna, dispersa o discontinua, y al

líquido en cuyo seno se encuentran esparcidas las gotitas del primero, se le denomina fase externa, continúa o medio dispersante.<sup>(9)</sup>

**Endarteritis:** inflamación de la túnica íntima de una arteria.<sup>(39)</sup>

**Enfermedad de Alzheimer:** es la forma más común de demencia , una enfermedad neurológica caracterizada por una pérdida grave de la capacidad mental suficiente para interferir con las actividades normales de la vida diaria. La enfermedad suele presentarse en ancianos y se caracteriza por una disminución de las funciones cognitivas, como la memoria, planificación y el razonamiento. Afecta las células cerebrales, preferentemente las situadas en las regiones cerebrales responsables del aprendizaje, el razonamiento y la memoria.<sup>(24)</sup>

**Enfermedad de Parkinson:** es un trastorno cerebral, caracterizado por temblor y dificultad en la marcha, en la movilidad y en la coordinación. La enfermedad está asociada con el daño a una parte del cerebro que está relacionada con el movimiento. Esta enfermedad se presenta tanto en los hombres como en las mujeres y es uno de los trastornos neurológicos más comunes en las personas de edad avanzada. Es causado por el deterioro progresivo de las neuronas de la parte del cerebro que controla el movimiento muscular ( los ganglios basales y el área extrapiramidal ), área en la cual se produce normalmente la dopamina, una de las sustancias utilizadas por las células para transmitir impulsos. El deterioro de esta área

del cerebro reduce la cantidad de dopamina disponible para el organismo lo cual afecta el equilibrio entre ella y otros transmisores tales como la acetilcolina. En ausencia de dopamina, las células nerviosas no pueden transmitir mensajes en una forma adecuada, ocasionando la pérdida de la función muscular.<sup>(24)</sup>

**Enjambrazón:** es el modo natural de propagación de las abejas. Se produce normalmente después de una fuerte aportación de polen, que ha permitido una abundante cría de larvas y un aumento muy fuerte de la población. Es el acto durante el cual la reina y el 30 al 70 % de las obreras y de los machos abandonan la colmena en un enjambre primario.<sup>(30,33)</sup>

**Enjambre:** es una fracción de la colonia constituida por una reina, obreras y machos.<sup>(30)</sup>

**Esclerosis múltiple:** forma parte de las enfermedades desmielinizantes primarias, la cual es caracterizada por zonas aisladas de desmielinización en los nervios del ojo, el cerebro y la médula espinal. La causa se desconoce, pero se sospecha que un virus o un antígeno desconocido son los responsables que desencadenan, de alguna manera, una anomalía inmunológica, que suele aparecer a una edad temprana. Entonces el cuerpo, por algún motivo, produce anticuerpos contra su propia mielina, ello ocasiona la inflamación y el daño a la vaina de mielina.<sup>(24)</sup>

**Espasmo:** contracción muscular involuntaria. Aumento de tensión y disminución de longitud de un músculo que no puede liberarse voluntariamente y que impiden el alargamiento de los músculos afectados.<sup>(39)</sup>

**Excipiente:** sustancia inerte que se mezcla con los medicamentos para darles la forma o calidad convenientes para su uso.<sup>(9)</sup>

**Fermentación:** término empleado para describir el desdoblamiento enzimático de los carbohidratos y derivados, bajo condiciones anaeróbicas o aeróbicas.<sup>(41)</sup>

**Hipotonía:** trastorno en el cual existe disminución o pérdida del tono muscular, como consecuencia del cual los músculos pueden estirarse más allá de sus límites normales. Relajación de las arterias.<sup>(39)</sup>

**Horfanización:** procedimiento en apicultura, por medio del cual se elimina a una abeja reina de una colmena que ha alcanzado su mayor actividad, con el propósito de estimular a las obreras nodrizas para que produzcan jalea real.<sup>(14,30,33)</sup>

**Impotencia:** (Disfunción eréctil) es la incapacidad de iniciar y mantener una erección en al menos el cincuenta por ciento de los intentos durante la relación sexual, o bien la interrupción de los intentos durante la misma. La impotencia puede estar provocada por trastornos neurológicos, problemas

vasculares, ciertos fármacos, anomalías en el pene o problemas psicológicos que interfieren en la excitación sexual. Las causas físicas son más frecuentes en los hombres de mayor edad y los problemas psicológicos en los varones jóvenes. Como el pene necesita un flujo adecuado de sangre para alcanzar la posición erecta, los trastornos en los vasos sanguíneos, como la aterosclerosis, pueden causar impotencia.<sup>(24)</sup>

**Infarto del miocardio:** es una urgencia médica en la que parte del flujo sanguíneo que llega al corazón se ve reducido o interrumpido de manera brusca y grave y, en consecuencia se produce destrucción ( muerte ) del músculo cardíaco ( miocardio ) por falta de oxígeno. Se produce generalmente cuando la obstrucción de una arteria coronaria restringe gravemente o interrumpe el suministro de sangre a una región del corazón. Si el suministro es interrumpido o reducido significativamente durante más de unos pocos minutos, se destruye el tejido cardíaco. La causa más frecuente de obstrucción de una arteria coronaria es un coágulo sanguíneo.<sup>(24)</sup>

**Liofilización:** proceso de secamiento que consiste en que la solución que se va a deshidratar se congela rápidamente en capas relativamente delgada y después se elimina el agua al vacío, los cristales de hielo en la sustancia congelada pasan al estado de vapor sin fundirse.<sup>(9)</sup>

**Loque americana:** Esta enfermedad también conocida como peste maligna, pudrición de la cría, peste viscosa, cría putrefacta, etc., es una enfermedad bacteriana infecciosa y altamente contagiosa que afecta a las larvas de las abejas melíferas causadas por las esporas del *Bacillus larvae*, las cuales se ingieren por vía bucal a través del alimento. Es la enfermedad de las abejas que más pérdidas económicas ocasionan en todo el mundo.<sup>(30,33)</sup>

**Loque europea:** es una enfermedad infecciosa de las larvas de las abejas, también conocida como loque benigna, cría avinagrada, cría rancia, etc. Causada por un complejo número de bacterias entre las que destaca el *Mellisococcus plutón*, por ser el germen que inicia la infección. Esta enfermedad es menos grave y menos contagiosa que la loque americana. Sin embargo, está extendida por casi todos los países apícolas del mundo; a veces desaparece espontáneamente, pero lo más frecuente es que se mantenga en estado endémico, y reduce los rendimientos y desencadena algunas veces la muerte de las colonias.<sup>(30,33)</sup>

**Metabolismo basal:** es la cantidad de energía empleada por el organismo únicamente para mantener vivo (sin gasto adicional por la digestión ni por movimientos musculares). <sup>(41)</sup>

**Metabolismo celular:** término que se refiere a todas las transformaciones químicas y energéticas que tienen lugar en las células del cuerpo. Conlleva procesos de oxidación de carbohidratos, proteínas y grasas para producir CO<sub>2</sub>, agua y energía necesaria para el proceso de la vida, el cual se conoce como catabolismo, a su vez implica la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos complejos que involucran la captación de energía, proceso denominado anabolismo.<sup>(41)</sup>

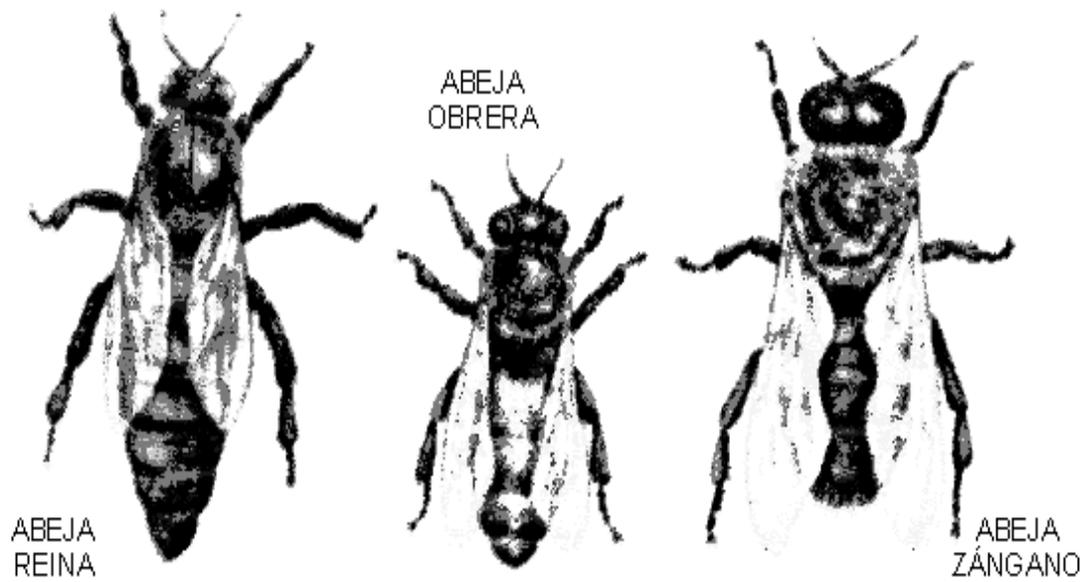
**Pecoreo:** actividad que realizan las abejas obreras de 21 días en adelante, que consiste en recolectar néctar, polen, propóleo, y agua.<sup>(14)</sup>

**Trisomía:** se denomina trisomía a la presencia de un cromosoma adicional que se añade a una pareja de cromosomas. La trisomía más frecuente es en un recién nacido la trisomía 21. Los niños con este síndrome tienden a ser tranquilos, rara vez lloran y tienen los músculos algo flojos ( laxos ); poseen la cabeza pequeña, la cara ancha y aplanada, los ojos sesgados y la nariz corta, la lengua grande y, por lo general , prominente.<sup>(24)</sup>

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

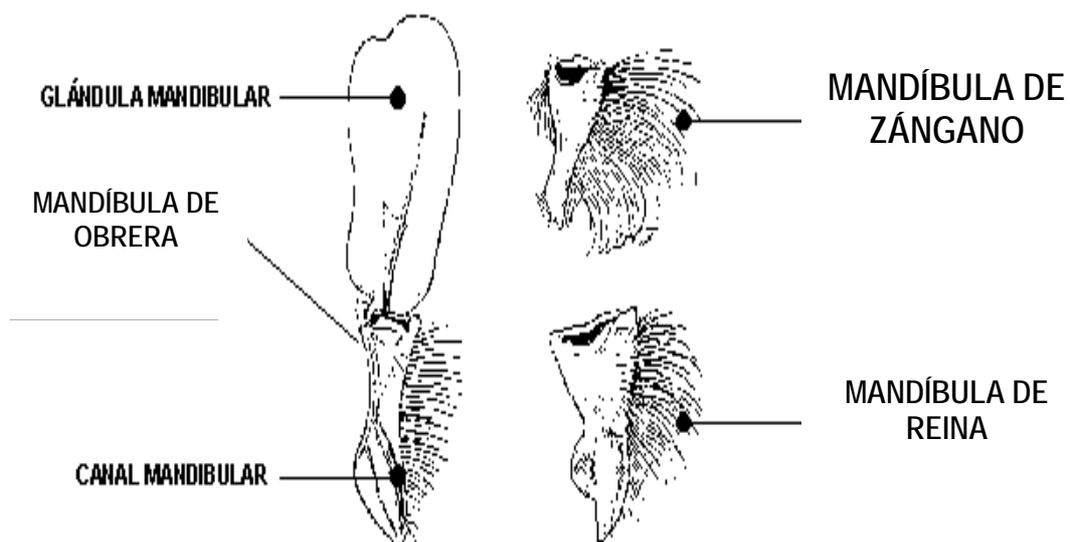
### DIFERENTES CLASES SE INDIVIDUOS QUE COMPONEN UNA COLONIA



## ANEXO 2

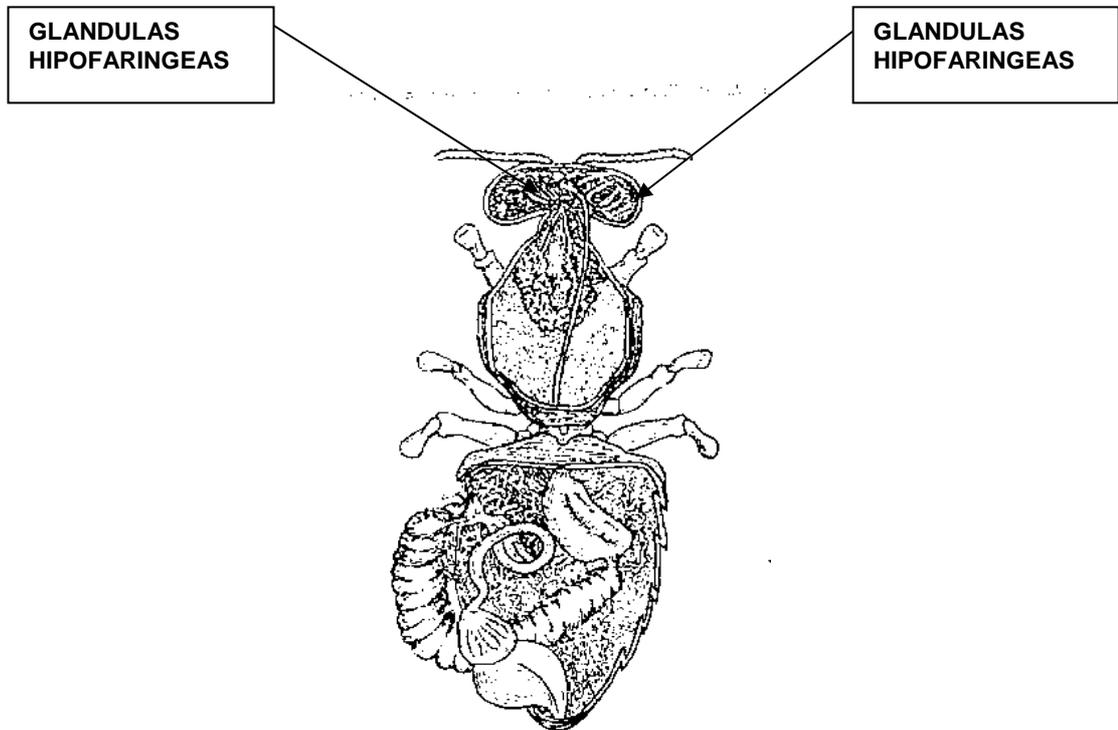
### ANATOMIA DE LA ABEJA *Apis mellífera* GLANDULAS MANDIBULARES

#### MANDÍBULA



**ANEXO 2** continuación

**ANATOMIA DE LA ABEJA *Apis mellifera***  
**GLANDULAS HIPOFARINGEAS**



*Sistema Digestivo  
de la obrera*

© 2000 Pearson Education, Inc. All rights reserved.

ANEXO 3  
DIFERENCIAS EXISTENTES ENTRE LOS PRODUCTOS APÍCOLAS

PRODUCTO	ORIGEN	DEFINICIÓN	COMPOSICIÓN QUIMICA
Jalea Real	Endógeno	Producto de la secreción de las glándulas hipofaríngeas y de las glándulas mandibulares, generalmente de abejas obreras de 5 – 14 días de edad cuando disponen de agua, miel y en la colmena, una temperatura conveniente.	Agua(60-79%), Ac. Pantoténico(185 ug/g), Azúcares (10-15%), Riboflavina(7ug/g), Proteínas (11-15%), Piridoxina (50ug/g), Lípidos(5-7%), Ac. Nicotínico (47-149 ug/g), Cenizas (0.8-1%), Biotina (1.6-3.7 ug/g), Minerales (3%), Inositol (78-150 ug/g), Ac. Fólico(16-22 ug/g), Vitamina E (17.3 ug/g), Vitaminas A y C(trazas), Vitamina D (0.069 ug/g), Vitamina B12 (0.52 ug/g), Ac. 10 hidroxidecenóico (2.5-6.0 %), Acetilcolina (1 parte por mil). Estradiol, Progesterona, Testosterona.
Miel	Exógeno	Es el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de la misma, que las abejas recogen, transforman, almacenan, y dejan madurar en los panales de la colmena.	Agua (17.2%), Azúcares superiores (1.5%) Azúcares totales (75.59%), Proteínas (0.26%) Levulosa (38.19%), Cenizas (0.17%), taninos Dextrosa (31.28%), alcoholes de azúcar, Ácidos totales(0.57%), flavonoides, queratina, Tiamina, riboflavina, Ac. Nicotínico, vitamina K, Ac. Fólico, Biotina, Piridoxina, Ac.Pantoténico, Ac. Ascórbico, lípidos (glicéridos, esteroides y fosfolípidos, sustancias coloidales (0.2-1%), Enzimas: invertasa, diastasa, catalasa, inulasa, Fosfatasa y Glucooxidasa, flavonoides, sustancias aromáticas, y Kampferol, resinas, terpenos, aldehídos, acetilcolina, inhibina (sustancia antibacteriana).

ANEXO 3 continuación  
DIFERENCIAS EXISTENTES ENTRE LOS PRODUCTOS APÍCOLAS

PRODUCTO	ORIGEN	DEFINICIÓN	COMPOSICIÓN QUIMICA
Polen	Exógeno	Es la célula macho de las flores, liberada tras la dehiscencia de las anteras. Constituye la principal fuente de alimento de la cría de las abejas desde el estado larvario hasta la de joven adulto.	Agua(5-6%), Proteínas(25%),azúcares(40%), Lípidos (4.5%), Cenizas (5%), Vitaminas(0.015%), Pigmentos(trazas), Enzimas: Fosfatasa, Invertasas, Amilasa, Rutina((0.017%), Flavonoides, Flavones, Diglicosidos, Esteroles Flavonoides, (naringenina, apigenina, y Kaempferol), reguladores del crecimiento,(auxinas,brasinás Giberalinas, Kininas), inhibidores del crecimiento, cuerpos indeterminados, (entre otras sustancias antibióticos activos menos del 20%)
Propóleo	Exógeno	Es el producto originado de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, colectadas por abejas melíferas, de brotes y exudaciones de corteza, hojas y otras partes de las plantas, a las cuales las abejas agregan secreciones salivales y cera para la elaboración final del Propóleo	Resinas y Bálsamos aromáticos (50-80%), aceites esenciales y otras sustancias volátiles (4.5-15%),Ceras(12-50%),Taninos (4-10.5%), Impurezas mecánicas(menos del 15%),polen respecto al peso de las impurezas mecánica(5- 11%).Componentes del Polen : pterostilbeno, xantorroeoal, sakuranetina y la pinostrobinas;flavonas,flavonoles, flavononas, dihidroflavononas, derivados del alcohol benzílico, benzaldehido y ácido benzóico, derivados del alcohol cinático, cumarinas, triglicéridos fenólicos, un monoterpene, un hexaterpene, triterpenos, esterole, ácidos grasos o alifáticos, carbohidratos, polisacáridos, vitaminas y otros compuestos, posee ácidos grasos poliinsaturados y el ácido linólico.

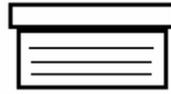
ANEXO 3 continuación  
DIFERENCIAS EXISTENTES ENTRE LOS PRODUCTOS APÍCOLAS

PRODUCTO	ORIGEN	DEFINICIÓN	COMPOSICIÓN QUIMICA
Cera	Endógeno	Es la sustancia segregada por las glándulas ceríferas de las obreras jóvenes, las escamas de cera salen de entre los anillos del abdomen. Recogidas y moldeadas por las mandíbulas de las obreras, después adicionadas de polen y propóleo, las laminillas se transforman en el panal.	Vitamina A (4.096UI/100g)), Cerina, Carbohidratos(16%), Alcoholes monohídricos de cadena simple (31%), ácidos hidróxidos (13%), otras sustancias (6%), Miricina (palmitato de miricilo y alcohol miricílico), ácido cerótico.
Apitoxina o veneno de Abejas	Endógeno	Es un líquido transparente, con olor a miel, acentuado por un sabor amargo, acre. Es producida por las glándulas situadas en la parte posterior del abdomen de las obreras y de la reina. Se acumula en el saco del veneno unido al aguijón.	Agua (88%), una histamina (militina que es una proteína relativamente simple), una lisolecitina (apanina 1-3%), Fosfolipasa A2(10-12%), Hialuronidasa(1-3%), Posee ácido fórmico, clorhídrico y ortofosforico, colina, triptófano, hierro, yodo, potasio, azufre, cloro, calcio, magnesio, manganeso, cobre, zinc, melitina(50%), secapina (0.5-2%), péptido DCM (1-2%), tertiapina (0.1%), procamina(1-2%), dopamina (0.2-1%), noradrenalina(0.1-0.5%), ácido aminobutírico, glucosa, fructosa, fosfolípidos (aminoácidos y feromonas), fosfato de magnesio (0.08%).

## ANEXO 4

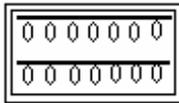
### PRODUCCION DE JALEA REAL

1- Hormanización  
(Día 1).



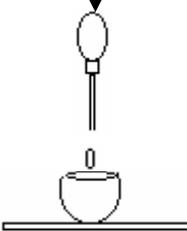
Colmena

2- Se preparan  
los cuadros con  
copas celdas.



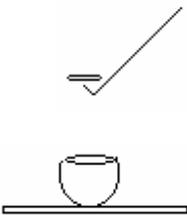
Cuadros con  
copa celda.

3- A las copas  
se les agrega  
1 gota de Jalea  
Real diluida  
(Día 4)



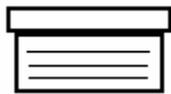
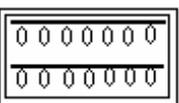
Copas celdas

4- Se transfieren  
larvas de no más  
de 4 días a las  
copas celdas.

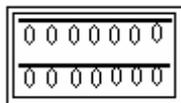


Se extraen larvas de  
la colmena

5- Los cuadros con  
las copas celdas se  
colocan dentro de la  
colmena



6- Los cuadros con las  
copas celdas se retiran  
de la colmena (Día 8).  
Se retira la larva y se  
extrae la Jalea Real.



**ANEXO 5**

**MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA JALEA REAL  
VIRGEN Y LIOFILIZADA**

**1. Características organolépticas (Estado físico, color, olor, sabor) <sup>(7,12)</sup> .**

**1.1 Procedimiento**

Tomar una cantidad de muestra (0.5g) de jalea real virgen y liofilizada en vidrios de reloj separados, y realizar las pruebas sensoriales siguientes:

**Estado físico:** se determina por observación directa de la muestra, la cual debe ser semifluida en el caso de la jalea real virgen, y sólida en el caso de la jalea real liofilizada.

**Color:** se observa cuidadosamente la muestra de jalea real sobre un fondo blanco y con luz blanca, y se registra el color observado.

**Sabor:** proceder a tomar una pequeña cantidad de muestra de jalea real con la ayuda de una espátula y a continuación se coloca en la lengua para percibir su sabor; se registra el sabor percibido.

**Olor:** se procede a percibir el olor de la muestra de jalea real acercando el vidrio de reloj que la contiene hacia el órgano olfativo (nariz), y registrar el olor percibido.

**2 Determinación de humedad. <sup>(16,25)</sup>**

**2.1 Procedimiento**

2.1.1 Limpiar adecuadamente con un pincel suave los recipientes de porcelana cada vez que se va a colocar una muestra. Si la muestra se

va a usar posteriormente para la determinación del extracto etéreo, enjuagar los recipientes con etanol al 95 %, y luego con éter etílico antes de colocarla. Permitir que se evapore el éter en una capilla y luego coloque los recipientes a secar en estufa a 105 °C por una hora como mínimo. Sacarlos de la estufa, trasladarlos a un desecador con sílica gel activada, se enfrían y se pesan.

2.1.2 Pesar por diferencia entre 2 y 4 g de muestra en cápsulas de porcelana y colocarlos en estufa a 70 °C por doce horas.

2.1.3 Sacar los recipientes con la muestra, y se transfieren a un desecador hasta enfriarlos. Sacar los recipientes del desecador y pesar rápidamente.

2.1.4 Las muestras se deben almacenar en un desecador mientras se le determina el extracto etéreo, si este fuera el caso.

## 2.2 Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

Donde:

$M_0$  = Masa, en gramos, de la cápsula sin muestra.

$M_1$  = Masa, en gramos, de la cápsula con la muestra antes del proceso de secado.

$M_2$  = Masa, en gramos, de la cápsula, y de la muestra final, tras la operación de secado.

$$\% \text{ Materia seca} = 100\% - \% \text{ humedad}$$

### **3.Determinación de Proteínas. Método Micro-Kjeldahl- titulación directa. (2,8)**

#### **3.1 Procedimiento**

- 3.1.1 Homogenizar la muestra. Pesar 0.1 g de muestra húmeda o seca utilizando un gotero de plástico o espátula, y transferir a un balón micro-Kjeldahl, adicionar 1g de mezcla catalítica.
- 3.1.2 Colocar el balón en baño de hielo adicionar por las paredes 2 mL de ácido sulfúrico concentrado; Luego adicionar 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30% (precaución: reactivo corrosivo).
- 3.1.3 Transferir el balón al digestor micro-Kjeldahl que se encuentra en cámara extractora de gases, y calentar cuidadosamente a ebullición. Después de la adición de  $H_2SO_4$ , el contenido del tubo se torna café oscuro o negro. Cuando se adiciona  $H_2O_2$ , el contenido del tubo se vuelve claro. Detener el calentamiento brevemente si la espuma se forma excesivamente. Una vez que la espuma cesa y el ácido está hirviendo, las muestras pueden dejarse sin atención. Continuar la digestión hasta que la solución se vuelve transparente (hay una coloración azul-verdosa) sin material orgánico.
- 3.1.4 Cuando la digestión se completa, detener el calentamiento y dejar los balones que se enfríen a temperatura ambiente, mover las matrices si el contenido da signos de solidificación. Cuidadosamente agregar 25 mL de agua destilada a cada balón y de nuevo dejar que la solución se enfríe a la temperatura ambiente.

**Destilación:**

3.1.5 Montar un aparato de destilación Kjeldahl.

3.4.6 Con una pipeta mohr de 10 mL tomar 8 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4 % y transferir a un erlenmeyer de 125 mL, limpio y seco (frasco receptor). Agregar 3 gotas de indicador mixto: Rojo de metilo-Azul de metileno. Conectar el erlenmeyer de modo que la punta del adaptador se extienda por debajo de la superficie del ácido bórico.

3.1.7 Transferir la solución del digerido o conectar el balón Kjeldahl al deflector o tubo para salpicaduras; adicionar 10 mL de NaOH 50% a través de una llave de paso líquido y cerrar rápidamente. Asegurarse que el sistema está bien cerrado.

3.1.8 Llevar la solución a ebullición y destilar a una velocidad uniforme hasta obtener un volumen de destilado de 50 a 75 mL. Controlar la velocidad de calentamiento para evitar que el líquido del erlenmeyer receptor sea aspirado.

3.1.9 Descontinuar el calentamiento, desconectar el aparato y enjuagar el interior del condensar con porciones pequeñas de agua destilada, recogiendo los lavados en el frasco receptor.

3.1.10 Retirar el frasco receptor ( la solución es de color verde). Titular la solución con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N hasta viraje del indicador a color rosado intenso.

3.1.11 Informe el porcentaje de nitrógeno y el porcentaje de proteína.

$$\% N = \frac{(\text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.02 N} - \text{mL de blanco}) \times N \text{ ácido} \times 1.4007}{\text{Peso de Mx (gramos)}}$$

Peso de Mx (gramos)

Donde:

N = Normalidad del ácido empleado en la titulación

1.4007= miliequivalente de nitrógeno multiplicado por 100 para obtener el porcentaje de nitrógeno.

$$\% \text{ Proteínas} = \%N \times 6.25$$

(en base seca)

Donde:

6.25 = factor empírico para proteínas.

$$\% \text{ de Proteínas} = \frac{\% \text{ Proteínas Base Seca} \times \% \text{Materia Seca}}{100 \%}$$

(en base húmeda)

100 %

#### **4. Determinación del Índice de Acidez. (35)**

##### **4.1 Procedimiento:**

4.1.1 Pesar 1 – 2 g de jalea real directamente en el balón de fondo plano esmerilado de 125 o 250 mL.

4.1.2 Adicionar 30 mL de mezcla etanol-éter etílico neutralizado a la fenolftaleína para disolver la muestra.

4.1.3. Agregar 10 mL exactos de Hidróxido de sodio 0.1 N etanólico.

4.1.4 Conectar el balón a un condensador para reflujo de juntas esmeriladas, calentar y reflujar suavemente por 30 minutos, agitando con frecuencia, hasta que la solución reaccionante sea clara.

4.1.5 Agregar 2 – 3 gotas de solución indicadora de fenolftaleína y valorar con solución de HCl 0.1 N, hasta que después de la adición, la solución permanezca incolora.

4.1.6 El volumen consumido por los ácidos grasos se obtiene por diferencia entre el volumen total adicionado de hidróxido de sodio menos el volumen gastado de ácido clorhídrico 0.1 N en la retrovaloración.

$$V \text{ mL consumidos de NaOH} = (V \text{ mL NaOH } 0.1 \text{ N} - V \text{ mL HCl } 0.1 \text{ N})$$

4.1.7 Calcular el índice de acidez por medio de la siguiente fórmula:

$$IA = 5.61 (V) / M$$

En donde:

IA = Es el Índice de acidez de la muestra.

V = Son los mililitros de solución de NaOH 0.1 N VS consumidos .

5.61 = Es el miliequivalente de la solución 0.1 N de KOH.

M = Es el peso en gramos de la muestra tomada.

## **5 . Determinación de Lípidos ácidos expresados como:**

### **Ácido 10-hidroxidecenóico.**<sup>(29)</sup>

5.1 Aplicación: el método es aplicable a todos los tipos de lípidos que contengan ácidos grasos dentro del rango de C<sub>10</sub> a C<sub>22</sub>.

#### 5.2 Reactivos:

- Mezcla de transmetilación: mezclar 150 mL de metanol y 70 mL de tolueno. Enfriar bajo chorro de agua corriente y añadir cuidadosamente, bajo agitación, 7.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (peso específico 1.84).
- Éter de petróleo con punto de ebullición dentro del rango 40 - 60°C.
- Sulfato sódico anhidro en gránulos.
- Columna rellena de adipato de polietilenglicol al 15% de AW Celita de 100 – 200 mesh.
- Estándares de los ésteres metílicos de los ácidos grasos 10-hidroxitransdecenóico, hidroxitransdecendióico y cetotransdecenóico.

#### 5.3 Aparatos:

- Cromatógrafo gas – líquido, Pye 104 de columna única con detector de ionización de llama es apropiado, ajustado a las siguientes condiciones de operación: 60 mL de Argón / min como gas portador, 50 mL de Hidrógeno / min , 400 mL de aire / min, temperatura del horno 300°C, velocidad de la carta de registro 120 mm / hora. Columna de vidrio de 215 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno.
- Microjeringa de 10 uL.

#### 5.4 Procedimiento:

5.4.1 Pesar de 0.3 –0.4 g de jalea real virgen o de 0.05 – 0.06 g de jalea real liofilizada si este es el caso.

5.4.2 Añadir 10 mL de mezcla de transmetilación.

5.4.3 Calentar sobre baño de vapor por 1 ½ hora bajo reflujo. Enfriar, añadir 10 mL de éter de petróleo y 10 mL de agua destilada.

5.4.4 Tapar el matraz y agitar bien.

5.4.5. Dejar separar las capas y eliminar la capa acuosa inferior con una pipeta pasteur.

5.4.6. Repetir el procedimiento de lavado con otros 10 mL de agua destilada.

5.4.7. Añadir suficiente sulfato sódico ( 2- 3 g ) para clarificar la solución de éter.

5.4.8. Decantar la capa de éter de petróleo clara hacia un tubo y evaporar a sequedad bajo nitrógeno.

5.4.9. Disolver el residuo en un pequeño volumen de éter de petróleo (0.3 mL).

5.4.10. Inyectar en la columna una alícuota de 10 uL de la solución de ésteres metílicos de ácidos grasos.

5.4.11. Aumentar la sensibilidad del amplificador tras la elusión del ácido linoléico ( C<sub>18</sub>) si se encuentran presentes ácidos grasos de cadena larga superior a C<sub>20</sub>.

5.4.12. Identificar los ésteres metílicos eluidos por referencia a ésteres conocidos determinando sus volúmenes de retención. (Estándares

de ácido 10-hidroxi-decenóico, ácido hidroxitrans-decenóico, ácido hidroxitrans-decendíico y ácido cetotrans-decenóico.).

## 5.5 Cálculos

Los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos grasos separados se obtienen con el registrador potenciométrico. Las áreas de los picos pueden medirse manualmente o utilizando un dispositivo integrador electrónico conectado a la salida del detector. La medida manual del área de los picos puede hacerse convenientemente a partir de la altura del pico y de su anchura a 0.607 de la altura del pico (Si el atenuador se ha cambiado durante el análisis hay que hacer las correcciones oportunas).

Suponer que la respuesta del detector de ionización de llama a los ésteres metílicos de los ácidos grasos sea constante; en tal caso el área del pico es proporcional al peso del ácido graso.

Sí: Área del pico de los ácidos grasos individuales (A, B, C, etc) = a, b, c,...

Entonces : Contenido del ácido graso A (%) =  $[ a/(a+b+c)] \times 100$

Similarmente para los ácidos grasos b y c.

La identificación de los ácidos grasos de C10 a C18 no suele presentar problemas.

## 6. Determinación Potenciométrica del Valor de pH. (8,35)

6.1 Preparación de la solución prueba:

- Pesar 1.25 g de muestra húmeda en un beaker de 30 mL, adicionar 10 mL de agua libre de CO<sub>2</sub> y agitar hasta disolución de la muestra, transferir a un

balón volumétrico de 25 mL; lavar el beaker adicionando 2 porciones de 5 mL y transferir al volumétrico. Llevar a volumen con agua destilada libre de CO<sub>2</sub> y homogenizar la solución.

## 6.2 Calibración del Potenciómetro Orion 310

### 6.2.1 Calibración Automática de Temperatura.

- Colocar el electrodo en buffer pH 7.0, presionar MODE –TEMP, aparece Log R.
- Con la tecla  $\uparrow\downarrow$  colocar ON, presionar YES , Presionar CAL, aparece 2P-7. presionar YES.
- Aparece CAL 1, esperar Ready y medir la temperatura ambiente con un termómetro. Con la tecla  $\uparrow\downarrow$  colocar la temperatura medida, presionar YES. Aparece CAL 2.
- Colocar el electrodo en buffer pH 4.01, el cual debe estar a una temperatura al menos 5°C menos que el buffer pH 7.0; colocar un termómetro en el buffer pH 4.01 y medir su temperatura.
- Cuando aparece Ready, bajar la temperatura con la tecla  $\uparrow\downarrow$  hasta la temperatura leída con el termómetro. Presionar YES.
- Aparece C. Con este paso finaliza la calibración de temperatura.

### 6.2.2. Calibración con Soluciones Buffer.

- Colocar el electrodo en buffer pH 7.0. Esperar a que llegue a la temperatura ambiente medida inicialmente.

- Presionar MODE-CAL, aparece SLP-100, 7-4. Presionar YES . El equipo pide pH 7.0. Aparece Ready, presionar YES.
- El equipo pide buffer pH 4.01, introducir el electrodo en buffer pH 4.01, y cuando aparece Ready presionar YES. Aparece dato SLP.
- El equipo está calibrado.

### 6.3. Determinación de pH :

- Realizar las lecturas de pH de las soluciones de las muestras a 20 °C introduciendo el electrodo de Ag/AgCl en la solución de jalea real al 5% p/v. Tomar el dato de lectura directa de pH.

## **7. Determinación de Cenizas.** (2,16)

### 7.1. Procedimiento.

7.1.1 Tara de crisoles: colocar él o los crisoles a emplear en una estufa a una temperatura de 100-110 °C por una hora. Sacar los crisoles con ayuda de pinzas y colocarlos en un desecador con sílica gel activada por 30 minutos. Proceder a pesar rápidamente en balanza analítica cada uno de los crisoles a utilizar, y anotar el peso. (Peso de crisol vacío).

7.1.2 Pesada de muestra: al crisol pesado, adicionar  $\pm 2.0$  gramos de jalea real; anotar el peso obtenido ( peso de crisol + muestra).

7.1.3 Utilizando pinzas, colocar los crisoles en la mufla y proceder a la incineración a 500 °C por 12-16 horas.

7.1.4 Sacar los crisoles de la mufla (utilizar guantes de asbesto y pinzas), y colocarlos en un desecador por ½ -1 hora, hasta que los crisoles estén fríos.

7.1.5 Pesar los crisoles en balanza analítica (Peso de crisol más cenizas). Utilizar pinzas para la manipulación de los crisoles.

7.1.6 Calcular el porcentaje de cenizas por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{cenizas}) - (\text{Peso crisol vacío})}{\text{Base seca}} \times 100$$

$$\text{Base seca} = (\text{Peso crisol} + \text{muestra}) - (\text{Peso crisol vacío})$$

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\% \text{ Cenizas Base Seca} \times \% \text{ materia seca}}{\text{Base húmeda}}$$

$$\text{Base húmeda} = \% 100$$

## **8. Determinación de metales pesados (plomo). (2)**

### **8.1 Determinación de Plomo:**

#### **8.1.1. Preparación de Solución Stock de Plomo.**

Disolver 1.5985 g de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , previamente secado a 105 °C por dos horas, en 500 mL  $\text{HNO}_3$  1N, y llevar a volumen en un balón volumétrico de 1000 mL, empleando  $\text{HNO}_3$  1N.

#### **8.1.2. Preparación de la Solución de Trabajo de Plomo.**

Pipetear 10 mL de la solución stock de plomo, e introducirlo en un balón volumétrico de 1000 mL, añadir 82 mL de HCl concentrado y diluir a volumen de 1000 mL con agua destilada.

### 8.1.3. Preparación de Reactivo Blanco.

Antes de proceder con el análisis, hay que probar la pureza de los reactivos de la siguiente manera: evaporar 4 mL de  $\text{HNO}_3$  en un crisol de porcelana, secándolo sobre un hot plate o baño de vapor. Disolver el residuo en HCl 1N, transferir a un balón volumétrico de 25 mL. Calentar el residuo sucesivamente con dos porciones de 5 mL de HCl 1N, y adicionándolo al balón volumétrico. Enfriar el contenido del frasco y diluir a volumen con HCl 1N y homogenizar. Proceder con la determinación total de reactivo blanco que debe de ser menor o igual a 10 mcg de Plomo (equivalentes a 0.4 ppm en muestra), para determinaciones de niveles mayores o iguales a 1 ppm.

### 8.1.4. Preparación de la Muestra.

8.1.4.1. Tomar el residuo obtenido en la determinación de cenizas, y cuidadosamente adicionar 2 mL de  $\text{HNO}_3$ , y agitar. Evaporar cuidadosamente a sequedad en Hot plate o baño de vapor.

8.1.4.2. Transferir a una mufla, y calentar a 500 °C por una hora. Remover de la mufla y enfriar a temperatura ambiente.

8.1.4.3. Cuidadosamente añadir 2 mL de  $\text{HNO}_3$  hasta obtener un líquido claro o una solución limpia, libre de carbono.

8.1.4.4. Añadir 10 mL de HCl 1N y disolver manteniendo un calentamiento cuidadoso sobre un hot plate.

8.1.4.5. Transferir a un balón de 25 mL, y nuevamente calentar el residuo sucesivamente con dos porciones de 5 mL de HCl 1N y añadiéndolo al frasco volumétrico.

8.1.4.6. Enfriar y diluir a volumen con HCl 1N, y homogenizar.

8.1.5. Preparación de la Curva Estándar.

8.1.5.1. Transferir 0, 1,3,5,15,25, y 50 mL de la solución de trabajo de plomo, por separado, a un balón volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con HCl 1N. (0.0, 0.2, 0.6, 1.0, 3.0, 5.0, y 10 mcg Pb / mL, respectivamente).

8.1.5.2. Previamente ajustado el espectrofotómetro y establecido las condiciones optimas para una señal máxima de 283.3 nm, usando la velocidad de flujo de aire-acetileno recomendada por el fabricante para las condiciones estándares para plomo. Calibrar el espectrofotómetro con soluciones conteniendo 0.2 y 10.0 mcg de Pb / mL. Grabar las concentraciones obtenidas directamente después de la calibración del instrumento. Realizar las lecturas de los estándares y preparar la curva estándar de Absorbancia frente a la concentración expresada en mcg de Pb / mL.

8.1.6. Determinación.

8.1.6.1. Usar una alícuota de la solución de prueba preparada anteriormente en 8.7. y determinar la absorbancia (A) de la muestra a la longitud de onda establecida en 8.8.2.

8.1.6.2. Determinar la absorbancia del reactivo blanco y restar el valor obtenido de las absorbancias de las muestras.

8.1.6.3. Interpolar el valor de A en la curva de calibración y obtener los mcg de Pb / mL en la solución muestra.

8.1.6.4. Calcular las ppm de Pb por la siguiente formula:

$$\text{ppm Pb} = [ (\text{mcg Pb} / \text{mL solución muestra}) \times 25 ] / \text{g de muestra.}$$

Donde:

25 = Factor de dilución

mcg Pb/ mL = lectura de plomo obtenida del espectrofotómetro de absorción atómica.

## **9. Determinación de Tetraciclina. (6,8,10,35)**

9.1 Procedimiento:

9.1.1 Preparación de estándar: pesar exactamente en balanza analítica

10 mg de estándar de Tetraciclina clorhidrato.

9.1.2 Disolver la cantidad pesada en 5 mL de HCl 0.1 N y transferir la solución a un balón volumétrico de 10 mL; lavar con 2 mL de HCl 0.1N el beaker que contenía la disolución de tetraciclina y transferir al balón volumétrico de 10 mL. Aforar la solución con HCl 0.1 N a un volumen de 10 mL, y homogenizar. Esta solución contiene 1000 mcg/ mL de Tetraciclina clorhidrato (Solución A).

9.1.3 Tomar con pipeta volumétrica 1 mL de la solución A, y transferir a balón volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con HCl 0.1N y homogenizar. Esta solución contiene 20 mcg / mL de tetraciclina clorhidrato (Solución B).

9.1.4 Preparación de la muestra: pesar en beaker de 50 mL, 0.5 g de jalea real virgen y liofilizada, adicionar 25 mL de HCl 0.1N y agitar por 10 minutos.

9.1.5 Filtrar la solución obtenida y recibir el filtrado en balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con HCl 0.1N y homogenizar.

9.1.6 En espectrofotómetro ultravioleta, hacer un barrido del estándar de tetraciclina clorhidrato en un rango de longitudes de onda de 230 a 360 nm, y obtener el espectro de absorción UV, en el cual la tetraciclina presenta su absorción máxima a 270 y 356 nm.

9.1.7 Realizar el barrido de las soluciones de las muestras en el mismo rango espectral de longitudes de onda y obtener el espectro de absorción de las muestras.

9.1.8 Comparar el espectro de absorción de las muestras con el espectro del estándar. Si estos coinciden, se interpreta como presencia de tetraciclinas en la jalea real.

## **9.2 Identificación de Tetraciclinas por cromatografía de Capa Fina (6,8,35)**

### **Sistema cromatográfico:**

- Placa: sílica gel de 250 micras de espesor, esprayado con hidróxido de potasio 0.1M en metanol.
- Fase móvil: metanol : amoníaco (100:1.5) (Preparar al momento de uso).
- Solución de referencia: preparar una solución de clorhidrato de Tetraciclina en metanol conteniendo 1 mg por mL ( 1000 ug / mL). Pesar 10 mg (0.01g) de estándar de clorhidrato de Tetraciclina , disolver con 5 mL de metanol, transferir esta solución a un balón volumétrico de 10 mL y llevar a volumen de 10 mL con metanol.

- Solución prueba: preparar en metanol las soluciones de la muestra a una concentración porcentual P / V al 0.5%. Pesar 0.125 g de muestra de jalea real virgen o liofilizada, adicionar 10 mL de metanol, agitar , filtrar y recibir en balón volumétrico de 25 mL. Llevar a volumen de 25 mL con metanol.

### **9.3 Procedimiento: Desarrollo del cromatograma**

9.3.1. Aplicar a la cromatoplaça , por separado, 10 uL de cada una de las soluciones de las muestras y de la solución de referencia.

9.3.2. Colocar la placa dentro de la cámara de cromatografía y desarrollar el cromatograma en la fase móvil hasta que ésta ha avanzado 15 cm arriba de la línea de aplicación.

9.3.3. Retirar la cromatoplaça de la cámara de desarrollo y secar con ayuda de corriente de aire caliente.

9.3.4. Examinar bajo lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga.

9.3.5. Calcular los R<sub>f</sub> de la solución estándar y de las soluciones de las muestras. Si están presentes las tetraciclinas en las muestras, su valor de R<sub>f</sub> debe corresponder al valor de R<sub>f</sub> del estándar.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra (o estándar)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Valor de R<sub>f</sub> teórico de la Tetraciclina. 05

Nota: La Tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina, presentan el mismo sistema cromatográfico y el mismo valor de R<sub>f</sub> en este sistema.

## **10 .Determinación de Almidón. (35)**

### 10.1 Procedimiento.

- 10.1.1 Preparación de patrón de comparación: pesar 0.5 g de almidón soluble. Mezclar con suficiente agua fría para hacer una pasta fina. Adicionar 100 mL de agua destilada hirviendo, y ebulir por un minuto con agitación continua. Enfriar y usar sólo la solución clara.
- 10.1.2 Preparación de la muestra: pesar 0.25 g de jalea real virgen y liofilizada en beaker de 25 mL, adicionar 5 ml de agua destilada y agitar por 5 minutos.
- 10.1.3 Transferir la solución obtenida a un tubo de ensayo; Lavar el beaker con 2 mL de agua destilada y transferir al tubo de ensayo, adicionar 3 mL de agua y agitar.
- 10.1.4 Para el patrón de comparación, medir 10 mL de solución de almidón TS y transferir a un tubo de ensayo.
- 10.1.5 Adicionar a las soluciones de las muestras y al patrón de comparación de almidón, 3 gotas de reactivo yodo-yoduro de potasio TS.
- 10.1.6 La solución de almidón TS tomará una coloración azul intenso; si las muestras adquieren esa coloración azul, se interpreta como presencia de almidón en las muestras de jalea real.

**MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA JALEA REAL  
VIRGEN Y LIOFILIZADA**

**1. Determinación de Coliformes totales y fecales. (8)**

**1.1 Tratamiento de la muestra:**

Obtener la muestra de Jalea real y mantener la cadena de frío antes de su análisis. Tomar la muestra de Jalea Real asépticamente y homogenizar su contenido.

**1.2 Procedimiento de preparación de diluciones de la muestra.**

1.2.1 Preparar los medios, caldos y agares respectivos para esta determinación y esterilizarlos en autoclave a 121°C y 15 atmósferas de presión.

1.2.2 Medir asépticamente en flujo laminar 9 mL de agua peptonada estéril y verterlos en los respectivos frascos de dilución (3).

1.2.3 Realizar una serie de diluciones de la muestra de la siguiente manera:

- Dilución 10:1 En un frasco de dilución, con 90 mL de agua peptonada estéril, se pesa asépticamente alrededor de  $10 \pm 0.1$  g de Jalea Real, se agita 25 veces.
- Dilución 10:2 Se toma una porción de 10 mL de la dilución 10-1 con una pipeta estéril y se transfiere a un frasco de dilución que contiene 90 ml de agua peptonada estéril. Se debe de tener el cuidado de evitar el contacto entre pipeta y el diluyente. Agitar.

- Dilución 10:3 Partiendo de la dilución anterior se toma 10 mL con una pipeta estéril y se transfiere a un frasco de dilución con 90 mL de agua peptonada estéril. Agitar.

1.2.3 Luego de preparadas las respectivas diluciones se mezclan los líquidos cuidadosamente, agitando 25 veces cada dilución, en un arco de 30 cm. Durante 7 segundos. No se deja transcurrir mas de 15 minutos entre la dilución de la muestra y su inoculación en las placas.

### **1.3 Procedimiento para el Recuento de Coliformes totales y detección *Escherichia coli*.**

#### **- Ensayo Presuntivo para coliformes totales.**

1.3.1 Inocular 10 mL de la muestra diluida a 10<sup>-1</sup> en tres tubos que contienen 10 mL de Caldo lauril sulfato Triptosa; inocular 10 mL de la muestra diluida a 10<sup>-2</sup> en tres tubos que contienen 10 mL de Caldo lauril sulfato Triptosa. Repetir el mismo procedimiento para la dilución de 10<sup>-3</sup>.

1.3.2 Se incuban los tubos a 35 °C y se examinan después de transcurridas 24 ± 2 horas para detectar la posible formación de gas la cual se evidencia por formación de gas en la campana de Durhan. Los tubos negativos se incuban un día adicional para detectar la formación de gas.

1.3.3 Se someten a análisis confirmativo todos los tubos (+), es decir los que presentan formación de gas.

- **Ensayo confirmativo para coliformes totales:**

1.3.4 Se agitan suavemente cada uno de los tubos Caldo Lauril Sulfato Triptosa con formación de gas, y con el asa se transfiere una porción de la suspensión a un tubo con caldo verde brillante lactosa bilis.

1.3.5 Se incuban los tubos a 35 °C durante 48 ± 2 horas pero examinándolas a las 24 y 48 horas, y se registran los tubos que evidencian la formación de gas, los cuales servirá para calcular el NMP de bacterias coliformes de la muestra.

- **Ensayo confirmativo para coliformes fecales:**

1.3.6 Se agita suavemente cada uno de los tubos de lauril sulfato Triptosa con formación de gas, y con el asa se transfiere una porción de la suspensión a un tubo que contenga caldo verde brillante lactosa, se incuban los tubos en baño de agua a 45.5 ± 0.5 °C, examinándolos después de transcurridas 24 ± 2 horas para detectar la formación de gas, y si el análisis es negativo, se continúa el período de incubación por 48 ± 2 horas y se registran los tubos que evidencian la formación de gas, los cuales servirá para calcular el NMP de bacterias coliformes fecales de la muestra.

**- Análisis confirmativo para Escherichia coli**

1.3.7 De cada tubo positivo de caldo verde brillante lactosa se extrae una porción con el asa circular y se siembra en estrías sobre la superficie de placa de Agar Eosina azul de metileno (EMB).

1.3.8 Se incuban las placas a 35 °C durante 18 a 24 horas y luego se examina para detectar las colonias sospechosas de Escherichia coli caracterizado por un centro oscuro con o sin brillo metálico.

**CONTEO TOTAL MÁS PROBABLE POR METODO DE TUBOS**

**MÚLTIPLES (USP 24)**

<b>COMBINACIONES OBSERVADAS DEL NUMERO DE TUBOS QUE PRESENTAN CRECIMIENTO EN CADA SET.</b>			<b>Número Más Probable (NMP) de Microorganismos por gramo o mililitro</b>
<b>NUMERO DE mg ( ó mL) DEL ESPÉCIMEN POR TUBO</b>			
<b>100 (100 uL)</b>	<b>10 (10 uL)</b>	<b>1 (1uL)</b>	
3	3	3	➤ 1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

## **2. Recuento De Hongos y Levaduras. (2,8,25)**

### **2.1 Procedimiento**

#### **- Inoculación**

2.1.1 Con una pipeta estéril, se transfiere 1 mL de cada una de las diluciones a cajas de petri estériles vacías e inoculando de menor a mayor dilución. (Hacerlo por duplicado).

2.1.2 Luego se vierte a cada placa de 15 a 20 mL de medio de cultivo agar papa dextrosa acidificado pH de 3.5 con ácido tartárico estéril al 10 %.

2.1.3 Seguidamente se mezcla el contenido de las placas con movimiento rotatorio, solidificando posteriormente el medio de cultivo.

2.1.4 Luego se incuban las placas a 25 °C por 5 - 7 días en posición invertida.

#### **- Interpretación de los resultados:**

2.1.5 Para el recuento de colonias se cuentan cada una de las placas que presentan entre 30 y 300 colonias.

2.1.6 Empleando un contador de colonias, se calcula el número promedio de colonias a partir de los recuentos hechos de las placas seleccionadas.

2.1.7. Se reporta como el número de microorganismos – gramo multiplicando el número obtenido por el inverso del valor de cada dilución 10:1, 10:2, 10:3 y se expresa el resultado como el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de Jalea Real.

2.1.8 Si no hay formación de colonias en la superficie de las placas de todas las diluciones se reporta como menos de 10 UFC/g.

### **3. Detección de Salmonella spp – Shiguella (23)**

#### **3.1 Procedimiento para Determinar Salmonella spp – Shigella**

##### **- Enriquecimiento no selectivo**

3.1.1 Preparar los medios, caldos y agares respectivos para esta determinación y esterilizarlos en autoclave a 121°C y 15 atmósferas de presión.

3.1.2 Pesar asépticamente en un frasco adecuado 1 g  $\pm$  0.1 de jalea real previamente homogenizada, en balanza granataria.

3.1.3 Añadir un volumen de medio fluido MOSSEL para hacer 100 mL e incubar a 35 –37 °C durante 24 horas.

3.1.4 Examinar el medio, si hubiera crecimiento presente (turbidez), mezclar por agitación suave.

##### **- Enriquecimiento selectivo**

3.1.5 Pipetear porciones de 1.0 mL a frascos conteniendo respectivamente 10.0 mL de medio fluido para gram negativos (GN); incubar de 35-37°C por 4 a 6 horas.

##### **- Aislamiento selectivo**

3.1.6 A partir del medio fluido para gram negativos (GN); sembrar con hisopos estériles en forma de estrías, sobre placas con agar Salmonella-Shiguella (agar SS). Incubar las placas a 35-37 °C durante 18-24 horas.

3.1.7 Observar las colonias sospechosas e interpretar los resultados sobre la base del siguiente cuadro:

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS PARA EL AGAR S.S.

Salmonella – Shigella.

<b>APARIENCIA DE LAS COLONIAS</b>	<b>MICROORGANISMO</b>
<b>Colonias traslúcidas o incoloras</b>	<b>Shigella y algunas especies de Salmonella</b>
<b>Traslúcidas con centro negro</b>	<b>Proteus y muchas especies de Salmonella</b>
<b>Rosado a Rojo</b>	<b>Escherichia coli</b>
<b>Colonias de color rosa o crema opaco, mucoide</b>	<b>Enterobacter aerogenes</b>

## ANEXO 6

### MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

#### 1. Material

- Agitadores de vidrio.
- Asas.
- Espátulas.
- Balones microKjeldahl de 30 mL.
- Balones de fondo plano esmerilados de 125 o 250 mL.
- Balones volumétricos de 10, 25, 50, 100, 250 y 1000 mL.
- Baño de maría.
- Baño de maría automatizado, temperatura de 44.5 °C
- Beakers de 25, 50 ,100 y 150 mL.
- Buretas de 50 y 25 mL
- Cámaras cromatográficas.
- Campanas de Durham.
- Cápsulas de porcelana.
- Condensadores de reflujo.
- Crisoles de porcelana de 50 mL.
- Cromatoplácas de 20 x 20 cm.
- Embudos de vidrio.
- Erlenmeyers de 125 mL.
- Frascos de dilución.
- Guantes.

- Hisopos estériles.
- Magnetos.
- Mallas de asbesto.
- Mascarillas.
- Matraces de 50 mL de fondo redondo.
- Mechero Bunsen.
- Microjeringas de 10 uL.
- Papel filtro.
- Placas de petri.
- Pinzas para bureta.
- Pipetas mohr de 1, 2 y 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5, 10, 15, 25 y 50 mL.
- Pipetas pasteur.
- Probetas de 10 ,25, 50 y 100 mL.
- Soporte metálico.
- Tubos de ensayo.
- Tubos de fermentación.
- Vidrios de reloj.

## **2. Equipos**

- Aparato de digestión microkeldahl (Labconco).
- Aparato de destilación microkeldahl (sin especificaciones).
- Estufas (marca Precisión Thelcon, Modelo, rango de temperatura de 0-150°C).

- Agitador magnético.
- Autoclave.
- Balanzas analíticas.
- Balanza granataria.
- Cámara extractora de gases (Labconco).
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara de luz U.V. (longitud de onda de 254 y 366 nm).
- Contador de colonias.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica (Perkin Elmer, Modelo 3110).
- Espectrofotómetro de absorción U.V./Vis. (Perkin Elmer, Lambda 12).
- Hot plate.
- Incubadora de 35°C-37°C.
- Incubadora de 23°C-25°C.
- Lámpara de Plomo de cátodo hueco
- Mufla (Termolyne)
- pHmetro (Orion modelo 310).

### **3. Reactivos.**

- Ácido Sulfúrico concentrado.
- Ácido Sulfúrico 0.02 N V.S.
- Ácido Bórico 4% P/V.
- Agua destilada libre de amoníaco y CO<sub>2</sub>.
- Ácido clorhídrico 0.1N V.S.

- Ácido clorhídrico 1 N.
- Ácido nítrico 1 N.
- Ácido nítrico concentrado.
- Amoníaco concentrado.
- Agar Eosina Azul de Metileno.
- Agar Papa Dextrosa.
- Agua Peptonada.
- Agar Salmonella-Shigella (SS).
- Biftalato de Potasio estándar primario.(KHP).
- Buffer pH 7 y pH 4 para calibración de pHmetro.
- Carbonato de Sodio anhidro estándar primario.
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa.
- Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis al 2 %.
- Estándar de tetraciclina clorhidrato USP.
- Fenolftaleína 1% en etanol.
- Hidróxido de sodio al 50 % P/V.
- Hidróxido de sodio etanólico 0.1 N V.S.
- Hidróxido de Potasio metanólico 0.1 N.
- Indicador mixto rojo de metilo-azul de metileno.
- Mezcla catalítica Sulfato de Potasio-Sulfato de Cobre Pentahidratado (15:0.6).
- Mezcla etanol-éter etílico (1:1).
- Metanol absoluto.
- Medio Fluido Mossel.

- Medio Fluido para Gran Negativos (GN).
- Nitrato de Plomo sólido.
- Peróxido de Hidrógeno al 30 %.
- Solución Stock de plomo (1 mg de plomo por mL en HNO<sub>3</sub> 1 N).
- Solución de trabajo de Plomo ( 10 mcg Pb / mL).
- Solución de almidon T.S.
- Solución de Yodo - Yoduro de potasio TS.

## ANEXO 7

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### 1. Hidróxido de Sodio etanólico 0.10 N VS. (8,38)

##### 1.1 Cálculos:

$$\begin{array}{r} 40.0\text{g} \text{-----} 1\text{N} \text{-----} 1000 \text{ mL} \\ x \text{-----} 0.10 \text{ N} \text{-----} 1000 \text{ mL} \\ x = 4.0 \text{ g de NaOH} \end{array}$$

##### 1.2 Procedimiento.

- 1.2.1 Pesar en balanza granataria y en beaker de 150 mL, 4.0 g de Hidróxido de Sodio.
- 1.2.2 Adicionar al beaker que contiene NaOH, 4 mL de agua destilada decarbonatada y fría, agitar hasta disolución completa del NaOH.
- 1.2.3 Transferir la solución a un balón volumétrico de 1000 mL con ayuda de un agitador de vidrio y un embudo.
- 1.2.4 Adicionar etanol para hacer 1000 mL en balón volumétrico.
- 1.2.5 Dejar la solución reposar en frasco cerrado por 24 horas. Luego rápidamente decantar el sobrenadante claro en un contenedor adecuado.
- 1.2.6 Envasar y etiquetar.

1.2.7 Estandarización: Pesar cuidadosamente 2.042 g de Biftalato de potasio (KHP) estándar primario, previamente desecado a 110°C por dos horas, transferir a balón volumétrico de 100 mL y disolver con agua destilada libre de dióxido de carbono, aforar con el mismo solvente y homogenizar. La solución posee una concentración de 0.1 N de KHP. Tomar alícuotas de 10 mL de esta solución y transferirlas a erlenmeyers de 125 mL, adicionar indicador fenolftaleína al 1% y titular con la solución etanólica de Hidróxido de Sodio 0.1N hasta vire del indicador de incolora a rosado tenue.

1.2.8 Calcular la normalidad por la siguiente fórmula:

$$\text{Normalidad(N)NaOH} = \frac{\text{gramos de KHP en la alícuota tomada}}{\text{Volumen gastado(NaOH)} \times 0.2042}$$

Donde:

0.2042 : miliequivalente de Biftalato de potasio en g/ mL.

## 2. Hidróxido de sodio 50 % P/V. (2)

2.1 Cálculos:

$$500 \text{ mL} \times \frac{50 \text{ g NaOH}}{100 \text{ mL}} = 250 \text{ g de NaOH}$$

## 2.2 Procedimiento:

- 2.2.1 Pesar en un beaker de 600 mL, 250 g de NaOH utilizando una balanza granataria.
- 2.2.2 Transferir a un beaker de 1000 mL. Conteniendo 400 mL de agua destilada descarbonatada, tapar con un vidrio de reloj. Agitar por medio de un agitador magnético hasta que este completamente disuelto en NaOH.
- 2.2.3 Enfriar la solución hasta temperatura ambiente y transferir a un balón volumétrico de 500 mL. Lavar el beaker con agua destilada libre de CO<sub>2</sub> y transferir los lavados al balón volumétrico.
- 2.2.4 Llevar a volumen con agua descarbonatada y homogenizar la solución.
- 2.2.5 Envasar la solución en frascos de polietileno con tapón plástico.
- 2.2.6 Etiquetar.

NOTA: Trabajar en cámara extractora de gases.

## 3. Ácido Sulfúrico 0.02 N VS. (8,36)

### 3.1 Cálculos:

Densidad: 1.84 g / mL, Pureza: 96 % p/p, PM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 98.08 g / mol

Si: 49.04 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -----1000 mL----- 1N

X g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-----1000 mL-----0.02N      X = 0.9808 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Entonces para 500 mL de ácido sulfúrico 0.02 N:

$$0.9808 \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{-----} 1000 \text{ mL-----} 0.02\text{N}$$

$$X \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{-----} 500\text{mL-----} 0.02\text{N}$$

$$X = 0.4904 \text{ g H}_2\text{SO}_4$$

Empleando el porcentaje de pureza:

$$100 \text{ g reactivo -----} 96 \text{ g de H}_2\text{SO}_4$$

$$X \text{ g reactivo-----} 0.4904 \text{ g H}_2\text{SO}_4$$

$$X = 0.51083 \text{ g reactivo}$$

Empleando la fórmula de densidad:

$$\text{Si densidad} = 1.84 \text{ g / mL}$$

$$\text{Entonces : } V \text{ (mL)} = \text{g reactivo} / \text{densidad}$$

$$\text{Sustituyendo: } V \text{ (mL)} = 0.51083 \text{ g} / 1.84 \text{ g/mL}$$

$$V \text{ (mL)} = 0.277 \text{ mL de ácido sulfúrico concentrado (96 \% p/p)}$$

### 3.2. Procedimiento.

3.2.1 Medir 0.3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado ( densidad = 1.84, 96 % p/p) con pipeta mohr de 1 mL y transferir a un balón volumétrico de 500 mL.

3.2.2 Adicionar agua destilada a un balón volumétrico y llevar a volumen de 500 mL. Homogenizar la solución.

3.2.3 Envasar y etiquetar.

### 3.3 Estandarización.

3.3.1 Secar una cantidad de carbonato de sodio anhidro estándar primario durante 1 hora en estufa a 260-270 °C, dejar enfriar en un desecador.

3.3.2 Pesar en balanza analítica 0.0106 g de carbonato de sodio anhidro y transferir al erlenmeyer de 125 mL; Adicionarle 25 mL de agua destilada y agitar hasta completa disolución del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

3.3.3 Adicionar 3 gotas de indicador verde de bromocresol TS y agitar

3.3.4 Titular la solución con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N hasta que el indicador vire de azul a verde.

3.3.5 Hervir la solución durante 2 a 3 minutos enfriar a temperatura ambiente y completar la titulación.

NOTA: el indicador debe cambiar del verde al azul al eliminarse el  $\text{CO}_2$  durante el calentamiento. Si no hay ningún cambio de color, originalmente se adiciono un exceso de ácido, por tanto hay que desechar el valor de la titulación. Realizar 3 titulaciones.

3.3.6 Calcular la normalidad como sigue:

$$\text{NH}_2\text{SO}_4 = \frac{\text{g de Na}_2\text{CO}_3 \text{ titulados}}{\text{V mL gastados} \times \text{Meq Na}_2\text{CO}_3} \quad \text{Meq} = 0.05299 \text{ g/mL}$$

Equivalencia:

1mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N equivale a 52,99 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro.

0.02 N x 52.99 mg = 1.0598 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

1 N

1mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N equivale a 1.0598 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

#### **4. Ácido Bórico 4 % P/ V.(2)**

##### 4.1 Cálculos.

Para 500 mL de solución:

$$500 \text{ mL} \times \frac{4 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 20 \text{ g.}$$

##### 4.2 Procedimiento.

- 4.2.1 Pesar en un beaker de 600 mL, 20 g de ácido bórico, utilizando balanza analítica.
- 4.2.2 Adicionarle agua destilada caliente, tapar con vidrio reloj, agitar haciendo uso de agitador magnético hasta completa disolución del ácido bórico.
- 4.2.3 Enfriar la solución a temperatura ambiente y transferir a balón volumétrico de 500 mL, lavar el beaker con agua destilada y agregar el lavado al balón.
- 4.2.4 Llevar a volumen con agua destilada y homogenizar la solución.
- 4.2.5 Envasar y etiquetar.

#### **5. Fenolftaleína al 1 % P/V. (8)**

##### 5.1 Procedimiento.

- 5.1.1 Pesar en un beaker de 50 mL, 1 g de fenolftaleína, empleando balanza granataria.

- 5.1.2 Agregar 25 mL de etanol y agitar hasta disolver completamente.  
Transferir a balón volumétrico de 100 mL.
- 5.1.3 Lavar el beaker con etanol y transferir al balón volumétrico. Aforar a 100 mL con etanol y homogenizar la solución.
- 5.1.4 Envasar en frasco ámbar, bien cerrado.
- 5.1.5 Etiquetar.

## **6. Verde de Bromocresol TS (0.05%)** <sup>(35)</sup>

### 6.1 Procedimiento.

- 6.1.1 Pesar en un beaker de 50 mL y en balanza analítica 0.05 g de verde de Bromocresol.
- 6.1.2 Agregar 25 mL de etanol, agitar hasta disolución y transferir a un balón volumétrico de 100 mL. Aforar utilizando etanol y homogenizar la solución.
- 6.1.3 Envasar en frasco ámbar bien cerrado, etiquetar.

## **7. Indicador Mixto: Rojo de metilo-Azul de metileno.** <sup>(35)</sup>

### 7.1 Procedimiento.

- 7.1.1 Pesar en un beaker de 100 mL y en balanza analítica, 0.1 g de rojo de metilo y 0.05 g de azul de metileno.

7.1.2 Adicionar 40 mL de etanol y agitar hasta completa disolución.

Transferir la solución a un balón volumétrico de 100 mL. Hacer lavados al beaker con etanol y transferir el balón.

7.1.3 Llevar a volumen de 100 mL con etanol y homogenizar la solución.

7.1.4 Envasar en frasco ámbar bien cerrado, etiquetar.

## 8. Mezcla catalítica $K_2SO_4 - CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (15:0.6). (2)

### 8.1 Cálculos.

Para Sulfato de Potasio:

15.6 g de mezcla-----15.0 g de Sulfato de potasio

50.0 g de mezcla-----X

X = 48.07 g de Sulfato de Potasio.

Para Sulfato de Cobre Pentahidratado:

15.6 g de mezcla-----0.6 g de Sulfato de Cobre pentahidratado

50.0 g de mezcla-----X

X = 1.93 g de Sulfato de cobre pentahidratado.

### 8.2 Procedimiento.

8.2.1 Pesar 48.07 g de Sulfato de Potasio en balanza granataria; separadamente pesar 1.93 g de Sulfato de cobre Pentahidratado en balanza granataria.

8.2.2 Pulverizar separadamente empleando mortero, adicionando poco a poco el sulfato de potasio al sulfato de cobre, mezclar con el pistilo hasta obtener una mezcla homogénea de los dos sólidos.

## **9. Mezcla Etanol-Éter Etilico (1:1).[500mL] <sup>(35)</sup>**

### 9.1 Procedimiento.

9.1.1 Medir en probeta, 250 mL de etanol y transferir a probeta de 500 mL.

9.1.2 Medir en probeta, 250 mL de éter etílico y transferir a la probeta que contiene el etanol.

9.1.3 Transferir a frasco ámbar, agitar suavemente y tapar, guardar en lugar fresco.

## **11. Almidón TS. <sup>(8)</sup>**

### 11.1. Procedimiento:

11.1.1. Pesar 1 g de almidón soluble en balanza granataria y mezclarla con suficiente agua destilada fría para hacer una pasta fina.

11.1.2. Adicionar 200 mL de agua destilada hirviendo, y ebulir por un minuto con agitación continua.

11.1.3. Enfriar y usar sólo la solución clara.

Nota: reactivo de preparación reciente.

## 12. Solución Yodo-Yoduro de potasio TS. (8)

### 12.1 Procedimiento:

12.1.1. Pesar exactamente en balanza analítica 500 mg de yodo y 1.5 g de yoduro de potasio, separadamente en beakers.

12.1.2. Al beaker conteniendo el yoduro de potasio, adicionar 20 mL de agua destilada y agitar; agregar a ésta solución el yodo y agitar hasta completa disolución. Adicionar los 5 mL restantes de agua destilada y agitar.

12.1.3. Filtrar la solución y envasar en frasco ámbar.

## 13. Ácido Clorhídrico 0.1 N (8,35)

### 13.1. Cálculos:

Densidad : 1.18 g / mL      Peso molecular (PM): 36.46 g / mol

% pureza: 37 % p/p

En este caso, la Molaridad (M) es igual a la Normalidad (N).

Normalidad:

$$N = \text{No. Eq} / \text{Lt.} \rightarrow N = g / \text{P}_{\text{eq}} \times \text{Lt} \quad \text{P}_{\text{eq}} : \text{Peso equivalente}$$

Si  $\text{P}_{\text{eq}} = \text{PM}$       PM: Peso molecular

Entonces:  $N = g / \text{PM} \times \text{Lt}$       No.Eq: Número de equivalentes

No.Moles: Número de moles

Molaridad:

$$M = \text{No.Moles} / \text{Lt} \quad ; \quad \text{Si } \text{No.Moles} = g / \text{PM}$$

Entonces en el caso del ácido clorhídrico  $M = N$

Fórmula:  $M = g \text{ HCL} / [\text{PM HCl} \times V \text{ (Lts)}]$

Despejando:

$$g \text{ HCl} = M \times \text{PM} \times V \text{ (Lts)}$$

$$g \text{ HCl} = 0.1 \text{ mol/Lt} \times 36.46 \text{ g/mol} \times 1 \text{ Lt}$$

$$g \text{ HCl} = 3.65 \text{ g de HCL}$$

Según porcentaje de pureza:

$$\begin{array}{l} 37 \text{ g HCl} \text{-----} 100 \text{ g de Reactivo} \\ 3.65 \text{ g HCl} \text{-----} X \end{array}$$

$$X = 9.86 \text{ g de Reactivo}$$

Sustituyendo en fórmula de densidad despejada en volumen:

$$\text{Volumen} = \text{Masa} / \text{Densidad}$$

$$\text{Volumen de HCl Concentrado} = 9.86 \text{ g de reactivo} / 1.18 \text{ g/ mL}$$

$$\text{Volumen de HCl Concentrado} = 8.36 \text{ mL (para 1000 mL de solución).}$$

13.2. Procedimiento:

13.2.1. Medir con una pipeta mohr 8.4 mL de HCl concentrado (37 %p/p).

13.2.2. Transferir el HCl a un balón volumétrico de 1000 mL, el cual se encuentra en baño de hielo, dentro de una cámara de extracción. Llevar a volumen de 1000 mL con agua destilada. Homogenizar la solución.

13.2.3. Envasar y etiquetar.

**14. Ácido Clorhídrico 1 N** (8,35).

Material, equipo y reactivos, son los mismos que se emplean en el apartado 13.

Tomando en cuenta que se necesitan 8.4 mL de HCl concentrado para preparar 1000 mL de solución de HCl 0.1 N:

$$\begin{array}{r} 8.4 \text{ mL HCl concentrado} \text{-----} \text{HCl 0.1 N} \\ X \text{ -----HCl 1 N} \end{array}$$

$$X = 84.0 \text{ mL de HCl concentrado para } 1000 \text{ mL de HCl 1 N.}$$

**14.1. Procedimiento:**

14.1.1. Medir con una probeta de 100 mL, 84 mL de HCl concentrado (37 %p/p).

14.1.2. Transferir el HCl a un balón volumétrico de 1000 mL, el cual se encuentra en baño de hielo, dentro de una cámara de extracción. Llevar a volumen de 1000 mL con agua destilada. Homogenizar la solución.

14.1.3. Envasar y etiquetar.

**15. Caldo lauril sulfato triptosa.** (23)

15.1 Composición típica (g/L).

Triptosa 20.0; Lactosa 5.0; Cloruro de sodio 5.0; Lauril sulfato de sodio 0.1; Dihidrógeno fosfato de potasio 2.75; Hidrógeno fosfato dipotásico 2.75.

### 15.2 Preparación:

Suspender 35.5 g por litro o más, dispensar en tubos que serán utilizados en la prueba con campanas Durham, autoclavar 15 minutos a 121 °C, pH:  $6.8 \pm 0.2$  a 25 °C. El caldo preparado es claro color amarillento –café.

## **16. Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis al 2 %. (23)**

### 16.1 Composición típica (g/L).

Peptona 10.0; lactosa 10.0; Bilis deshidratada 20.0; Verde brillante 0.0133.

### 16.2 Preparación:

Suspender 40 g por litro, adicionar a los tubos que se utilizaran para la prueba con campanas Durham, autoclavar por 15 minutos a 121 °C, pH:  $7.2 \pm 0.2$  a 25 °C. El preparado es claro y verde.

## **17. Agar EMB ( Agar eosina azul de metileno lactosa sucrosa). (23)**

### 17.1 Composición típica (g/L).

Peptonas 10.0; Hidrógeno fosfato di potásico 2.0; lactosa 5.0; sucrosa 5.0; Eosina Y amarillenta 0.4; azul de metileno 0.07; agar-agar 13.5.

### 17.2 Preparación:

Suspender 36 g por litro autoclavar 15 minutos a 121 °C, verterlos en las placas que se utilizaran para la prueba. El pH  $7.1 \pm 0.2$  a 25 °C. Las placas son claras y de color café rojizo a café violeta.

## 18. Agar Papa Dextrosa . (23)

### 18.1 Composición Típica (g/L).

Infusión de papa 4.0 (infusión de 200 g de papa); D(+) glucosa 20. 0; agar-agar 15 .0.

### 18.2 Preparación:

Suspender 39 g por litro, autoclavar por 15 minutos a 121 °C. pH:  $5.6 \pm 0.2$  a 25 °C si el pH ha sido ajustado a 3.5 adicionar aproximadamente 14 mL de una solución estéril de ácido tartarico al 10 % por litro a una temperatura de 45-50 °C.

## 19. Medio Fluido MOSSEL. (23)

### 19.1 Composición típica (g/L).

Peptona 10.0; D(+) glucosa 5.0; Sales biliares 20.0; Verde brillante 0.015; hidrógeno fosfato di-sódico 8.0; Di-hidrogeno fosfato potasico 2.0

### 19.2 Preparación:

Suspender 45 g por litro, dispensar en los tubos de prueba y autoclavar por 5 minutos a 121°C. El pH final es de  $7.2 \pm 0.2$  a 25°C.

## 20. Medio Fluido para Gram Negativos (GN). <sup>(23)</sup>

### 20.1 Composición típica (g/L)

Triptosa 20.0; D (+) glucosa 1.0 ; D(-) Manitol 2.0; Hidrógeno fosfato di potásico 4.0; Dihidrógeno fosfato de potasio 1.5 ; Cloruro de sodio 5.0; citrato de sodio 5.0; Deoxicolato de sodio 0.5.

### 20.2 Preparación:

Suspender 39 g /L, dispensar en adecuados contenedores, autoclavar (15 min a 121°C).

pH:  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C.

## 21. Agar Salmonella-Shiguelia (SS) <sup>(23)</sup>

### 21.1 Composición típica (g/L):

Peptona 10.0; lactosa 10.0; sales biliares 8.5; citrato de sodio 10.0; tiosulfato de sodio 8.5; citrato de amonio ferrico 1.0; verde brillante 0.0003; rojo neutro 0.025; agar-agar 12.0.

## 21.2 Preparación:

Suspender completamente 60 g por litro. Verterlos en placas de petri estériles y resistentes No autoclavar, el pH final es de  $7.0 \pm 0.2$  a 25 °C.

## ANEXO 8

### CÁLCULOS

#### 1. Determinación de Humedad y Materia Seca. (16,25)

Por ejemplo:

Mo : Peso cápsula vacía: 31.5591 g

M1 : Peso cápsula + muestra húmeda: 36.0800 g

Peso muestra húmeda: 4.5209 g

M2 : Peso cápsula + muestra seca: 33.2753 g

Utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = ( M1 - M2 / M1 - Mo ) \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = (36.0800 \text{ g} - 33.2753 \text{ g} / 36.0800 \text{ g} - 31.5591 \text{ g} ) \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = \underline{62.03 \%}$$

$$\% \text{ Materia Seca} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

$$\% \text{ Materia seca} = 100 - 62.03\% = \underline{37.97 \%}.$$

#### 2. Determinación del Contenido de Nitrógeno y Proteínas. (16,20)

**Por ejemplo:**

Peso muestra seca : 0.1665 g

V (mL) gastados en muestra = 36.8 mL

V (mL) gastados en blanco = 0.1 mL

Normalidad del ácido : 0.02N

Empleando las siguientes fórmulas:

$$\% N = \frac{(\text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.02N} - \text{mL de Blanco}) \times N \text{ ácido} \times 1.4007}{\text{Peso de muestra ( gramos)}}$$

$$\% \text{ Proteínas (Base Seca) } = \% N \times 6.25$$

$$\% \text{ Proteínas (Base Húmeda) } = \frac{\% \text{ Proteínas Base Seca} \times \% \text{ Materia Seca}}{100 \%}$$

Porcentaje de Nitrógeno:

$$\% N = (36.8 \text{ mL} - 0.1 \text{ mL}) \times 0.02 \text{ N} \times 1.4007 / 0.1665 \text{ g}$$

$$\% N = \underline{6.1748 \%}$$

$$\% \text{ Proteína ( Base seca) } = 6.1748 \% \times 6.25 = \underline{38.5925 \%}.$$

$$\% \text{ Proteína (Base Húmeda) } = (38.5925 \% \times 37.97\%) / 100\% = \underline{14.6535 \%}.$$

### **3. Determinación del Índice de Acidez. (35)**

Por ejemplo:

Volumen adicionado de NaOH 0.1N : 10 mL

Volumen gastado de HCl 0.1N : 3.7 mL

Peso de muestra : 1.0045 g

Volumen consumido de NaOH 0.1 N = (10 – 3.7 ) mL = 6.3 mL

Empleando la fórmula:

$$\text{I. A. (índice de acidez) } = V(\text{mL}) \times 5.61 / \text{Peso de muestra (g)}$$

$$\text{I.A. } = (6.3 \text{ mL} \times 5.61) / 1.0045 \text{ g}$$

$$\text{I.A. } = \underline{35.1846 \text{ mg KOH / g}}$$

#### 4. Determinación del Contenido de Cenizas. (2,16)

Por ejemplo:

Peso de crisol vacío : 30.4775 g

Peso crisol + muestra : 31.6763 g

Peso de muestra seca : 1.1988 g

Peso crisol + cenizas : 30.5074 g

Empleando las fórmulas:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{cenizas}) - (\text{Peso crisol vacío}) \times 100}{(\text{Peso crisol} + \text{muestra seca}) - (\text{peso crisol vacío})}$$

$$\% \text{ Cenizas (Base Húmeda)} = \frac{\% \text{ Cenizas (Base seca)} \times \% \text{ Materia seca}}{100 \%}$$

Sustituyendo en fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(30.5074 \text{ g} - 30.4775 \text{ g}) \times 100}{31.6763 \text{ g} - 30.4775 \text{ g}}$$

$$\% \text{ Cenizas} = \underline{2.49 \%}.$$

$$\% \text{ Cenizas ( Base Húmeda)} = (2.49 \% \times 37.97\%) / 100\%$$

$$\% \text{ Cenizas (Base Húmeda)} = \underline{0.945 \%}.$$

#### 5. Determinación de Metales Pesados. (2)

En el caso de la presente investigación, el Plomo no fue detectado en las soluciones de las muestras de jalea real virgen y liofilizada, pero para efectos de ejemplificar la forma de realizar este cálculo si en posteriores

análisis se llegase a presentar lecturas detectables de plomo, a continuación se presenta la forma de realizar dicho cálculo.

Datos:

Peso de muestra : 1.0051 g

mcg Pb / mL leídos en curva (ppm) : 0.03

mcg Pb / mL leídos en curva del solución blanco (ppm) : 0.0

Factor de Dilución : 25

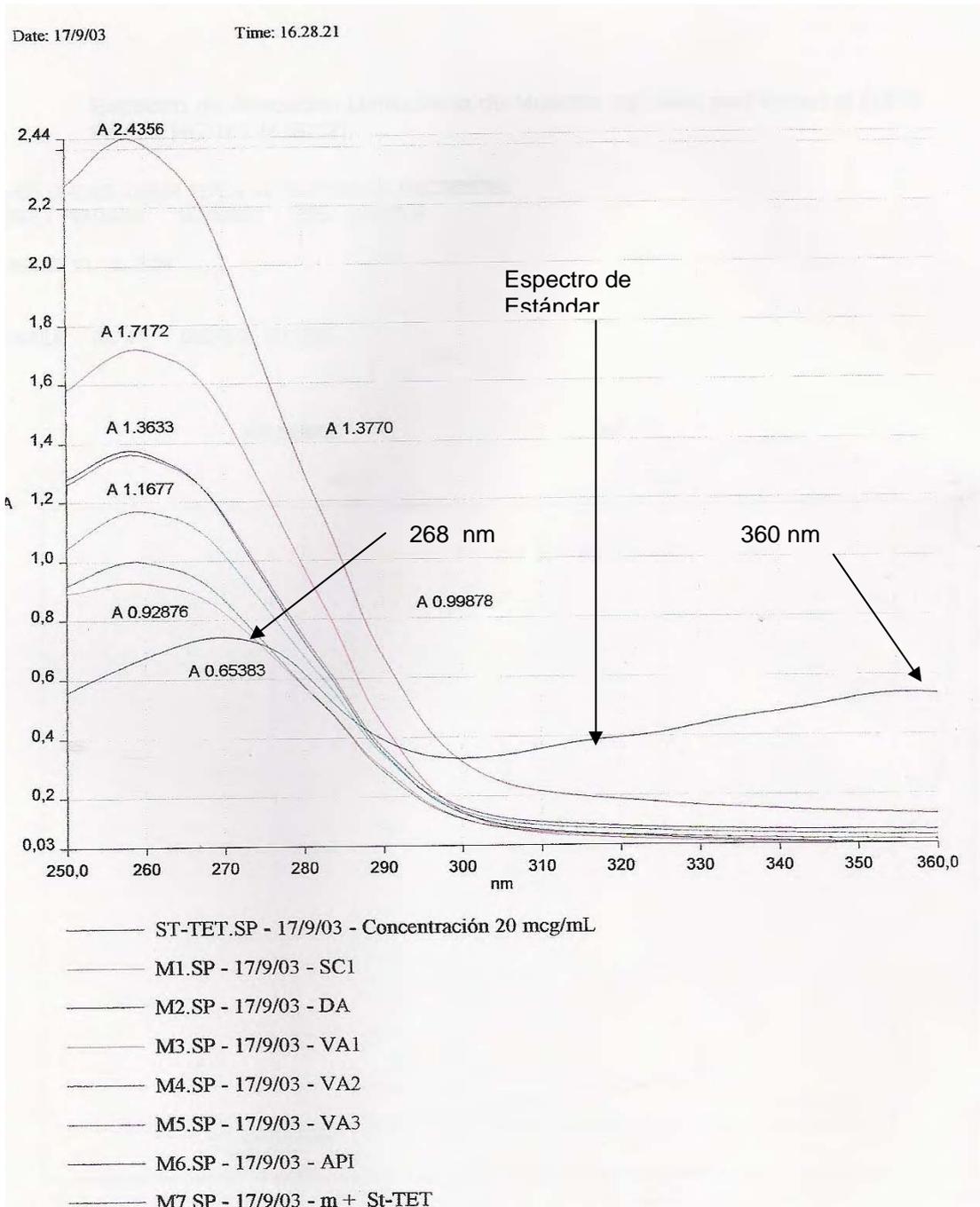
Fórmula:

$$\text{ppm Pb} = [(\text{mcg /mL muestra} - \text{mcg /mL blanco}) \times \text{FD}] / \text{Peso muestra}$$
$$\text{ppm Pb} = [ (0.03 - 0.0)\text{mcg / mL} \times 25 ] / 1.0051$$
$$\text{ppm Pb} = \underline{0.7461 \text{ ppm Pb.}}$$

Nota : los datos presentados se presentan solo como ejemplo.

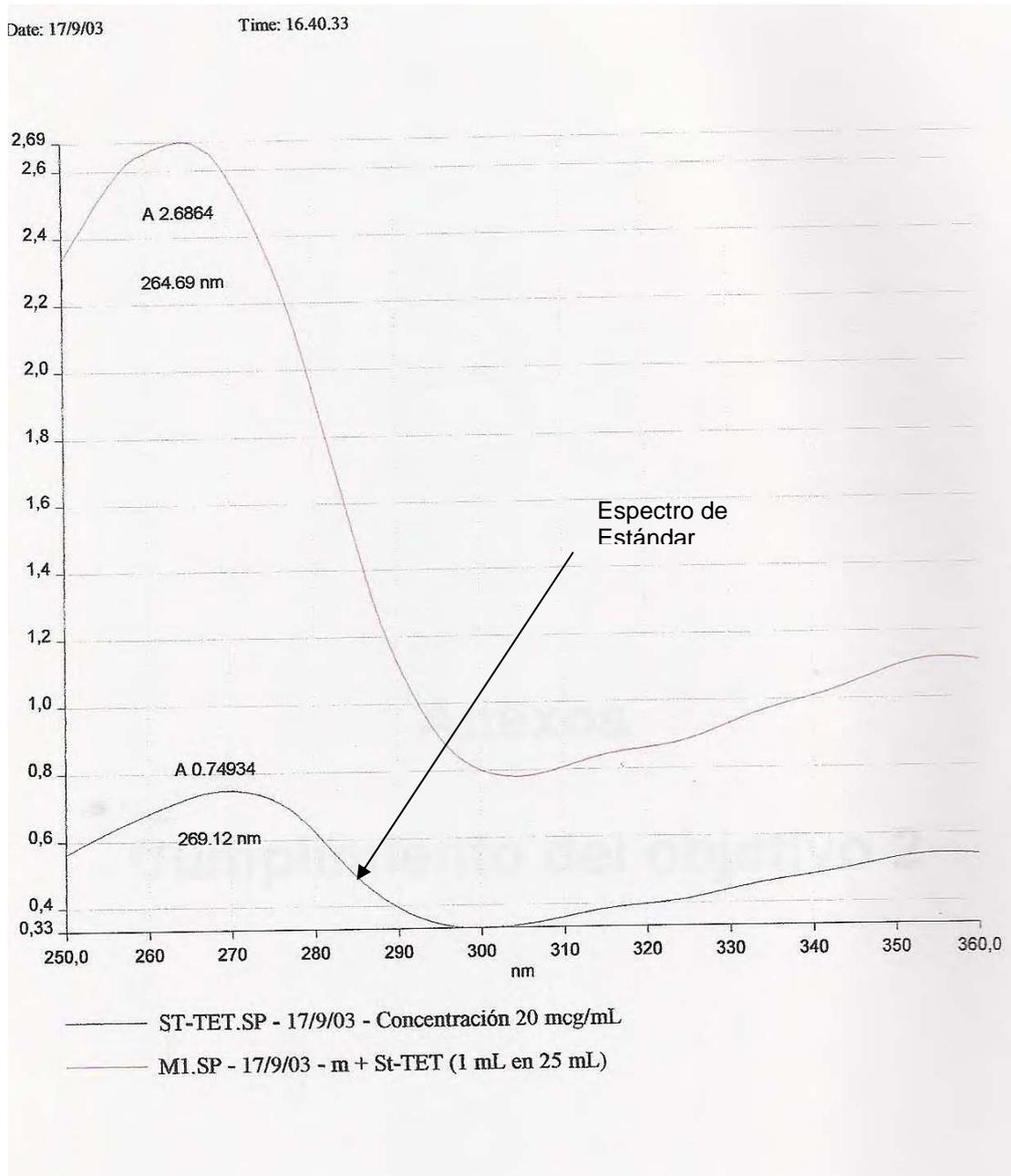
## ANEXO 9

### ESPECTROS DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA DEL ESTÁNDAR DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA Y LAS SOLUCIONES DE MUESTRAS DE JALEA REAL AL 0.5% P/V EN HCl 0.1 N.



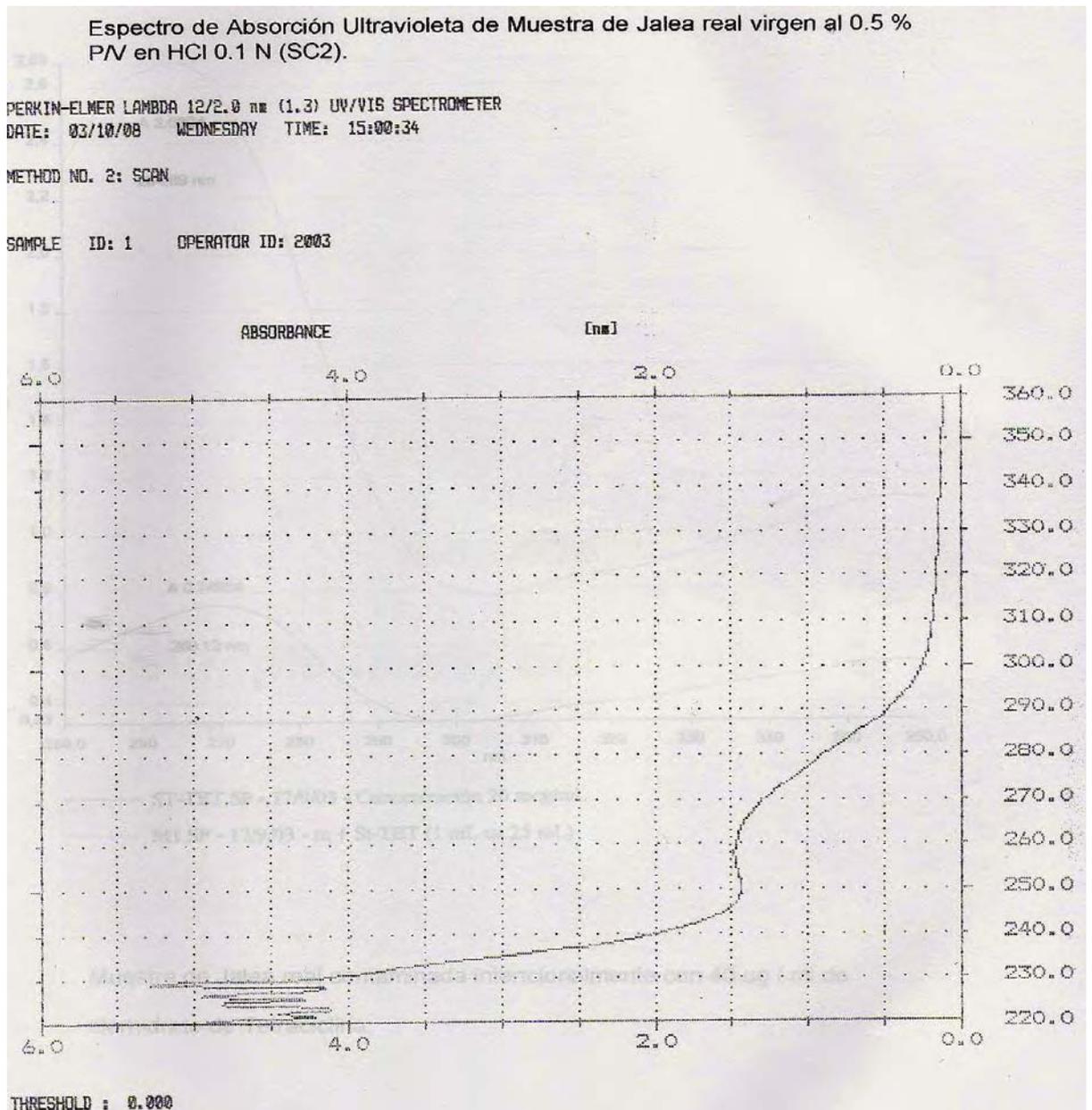
ANEXO 9 continuación

MUESTRA DE JALEA REAL CONTAMINADA INTENCIONALMENTE CON 40 mcg / mL DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA.



ANEXO 9 continuación

**ESPECTRO DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA DE MUESTRA DE JALEA REAL VIRGEN AL 0.5% P/V EN HCl 0.1N. (A2)**



Nota: Por motivos de cantidad de muestra, se obtuvo el espectro de esta muestra de jalea real virgen, identificada como A2, en el equipo Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 12, ya que fue el último análisis que se le realizó a la misma.



ANEXO 10



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Virgen

**Proveedor:** A

**Fecha de obtención:** Noviembre / 2002

**Fecha de análisis:** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** A1

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Semifluido.	Semifluido
Color	Amarillo pálido	Blanco-Amarillento
Sabor	Ácido, astringente, picante.	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico.	Característico
Humedad	60 – 70 % p/p	62.20%
pH	3.4 – 4.5	3.69
Índice de acidez	23 – 48 mg KOH/g	36.9432
Proteínas	11 – 15 % p/p	13.52%
Cenizas	0.8 - 1.0 % p/p	0.91 %
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

Observaciones: ND: No detectado

René F. Ramos . Analista

Revisado por: Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



ANEXO 10 continuación



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Virgen

**Proveedor:** A

**Fecha de :** Abril / 2003

**Fecha de :** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** A2

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Semifluido	Semifluido
Color	Amarillo pálido	Blanco-Amarillento
Sabor	Ácido, astringente, picante.	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico.	Característico
Humedad	60 – 70 % p/p	61.80 %
pH	3.4 – 4.5	3.55
Índice de acidez	23 – 48 mg KOH/g	24.3260
Proteínas	11 – 15 % p/p	14.35%
Cenizas	0.8 - 1.0 % p/p	1.03%
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

Observaciones: ND: No detectado

René F. Ramos. Analista

Revisado por: Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



ANEXO 10 continuación



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Virgen

**Proveedor:** B

**Fecha de obtención:** Agosto / 2002

**Fecha de análisis:** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** B

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Semifluido	Semifluido
Color	Amarillo pálido	Amarillo pálido
Sabor	Ácido, astringente, picante.	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico.	Característico
Humedad	60 – 70 % p/p	64.20%
pH	3.4 – 4.5	3.69
Índice de acidez	23 – 48 mg KOH/g	24.7855
Proteínas	11 – 15 % p/p	13.37%
Cenizas	0.8 - 1.0 % p/p	0.95%
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

Observaciones: ND: No detectado

René F. Ramos. Analista

Revisado por: Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



ANEXO 10 continuación



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Virgen

**Proveedor:** C

**Fecha de obtención:** 2001

**Fecha de análisis:** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** C1

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Semifluido	Semifluido
Color	Amarillo pálido	Blanco-Amarillento
Sabor	Ácido, astringente, picante.	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico.	Característico
Humedad	60 – 70 % p/p	49.01%
pH	3.4 – 4.5	3.37
Índice de acidez	23 – 48 mg KOH/g	31.9912
Proteínas	11 – 15 % p/p	9.66 %
Cenizas	0.8 - 1.0 % p/p	0.74%
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

Observaciones: ND: No detectado

René F. Ramos. Analista

Revisado por :Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



ANEXO 10 continuación



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Virgen

**Proveedor:** C

**Fecha de obtención:** 2002

**Fecha de análisis:** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** C2

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Semifluido	Semifluido
Color	Amarillo pálido	Blanco-Amarillento
Sabor	Ácido, astringente, picante.	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico.	Característico
Humedad	60 – 70 % p/p	63.34%
pH	3.4 – 4.5	3.72
Índice de acidez	23 – 48 mg KOH/g	26.4432
Proteínas	11 – 15 % p/p	13.29%
Cenizas	0.8 - 1.0 % p/p	0.967%
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

ND: No detectado

René F. Ramos. Analista

Revisado por: Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



ANEXO 10 continuación



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Liofilizada

**Proveedor:** C

**Fecha de obtención:** Abril / 2003

**Fecha de análisis:** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** C3

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Sólido, polvo o gránulos finos.	Sólido-gránulos finos
Color	Amarillo pálido	Blanco-Amarillento
Sabor	Ácido, astringente, picante	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico	Característico
Humedad	< 5.0 % p/p	0.42 %
pH	3.4 – 4.5	3.86
Índice de acidez	-----	73.3215 mg KOH / g
Proteínas	27 – 40 % p/p	36.75%
Cenizas	2 – 5 % p/p	2.79%
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

Observaciones: ND: No detectado

René F. Ramos. Analista

Revisado por: Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



ANEXO 10 continuación



## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

**Producto:** Jalea Real Virgen

**Proveedor:** D

**Fecha de obtención:** Julio / 2003

**Fecha de análisis:** Julio – Septiembre / 2003

**Identificación de laboratorio:** D

Análisis	Especificación	Resultados
Descripción	Sólido, polvo o gránulos finos.	Sólido-gránulos finos
Color	Amarillo pálido	Amarillo pálido
Sabor	Ácido, astringente, ligeramente picante.	Ácido-astringente
Olor	Fenólico característico	Característico
Humedad	< 5.0 % p/p	3.14 %
PH	3.4 – 4.5	3.88
Índice de acidez	-----	70.0968 mg KOH / g
Proteínas	27 – 40 % p/p	36.63 %
Cenizas	2 – 5 % p/p	2.79 %
Metales pesados	< 5 .0 ppm	ND
Tetraciclinas	No detectable	ND
Almidón	Ausencia	Ausencia
Coliformes fecales	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp- Shiguella	Ausencia	Ausencia
Hongos y levaduras	< 100 UFC / g	< 10 UFC / g

Observaciones: ND: No detectado

René F. Ramos. Analista

Revisado por: Lic. Isabel de Alarcón

Saúl E. Soriano. Analista



**ANEXO 11** continuación

<b>RECOLECCION DE DATOS ANALÍTICOS DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEINAS</b>
---

No Mx	Ident.	Peso Papel	Peso Papel + Mx. Seca	Peso Mx. Seca	V(ml) gastados en la titulación (H2SO4 0.02 N)	% N	% Proteínas Base Seca	% Proteínas Base Húmeda
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								

<b>RECOLECCION DE DATOS ANALÍTICOS DETERMINACIÓN POTENCIOMETRICA DEL VALOR DE pH</b>
--

No de Muestra	Identificación	Concentración de Solución	Valor de pH
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

**ANEXO 11** continuación

<b>RECOLECCION DE DATOS ANALÍTICOS DETERMINACIÓN DEL INDICE DE ACIDEZ</b>				
---	--	--	--	--

No de Muestra	Identificación	Peso Muestra	Volumen (ml) gastado de KOH 0.1 N	Índice de acidez ( mg de KOH/ g )
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

<b>RECOLECCION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE CENIZAS, METALES PESADOS</b>							
--	--	--	--	--	--	--	--

No de Muestra	Identificación.	Peso crisol vacío (g)	Peso crisol + Mx (g)	Peso crisol + cenizas (g)	Peso de cenizas (g)	% de Cenizas (P/P)	Metales pesados (ppm de Pb)
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							

**ANEXO 11** continuación

**RECOLECCION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN**

<b>No. De Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Conclusión</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

**RECOLECCION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS**

<b>No. De Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Conclusión</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

**ANEXO 11** continuación

**RECOLECCION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN EL RECUESTO DE COLIFORMES FECALES A 45 °C/g \***

<b>No de Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>UFC/g</b>	<b>Conclusión</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

**RECOLECCION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE Salmonella spp – Shiguella**

<b>No de Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>UFC/g</b>	<b>Conclusión</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

**ANEXO 11** continuación

**RECOLECCION DE RESULTADOS OBTENIDOS DEL RECUENTO TOTAL  
DE HONGOS Y LEVADURAS**

<b>No de Muestra</b>	<b>Identificación</b>	<b>UFC/g</b>	<b>Conclusión</b>
<b>1</b>			
<b>2</b>			
<b>3</b>			
<b>4</b>			
<b>5</b>			
<b>6</b>			
<b>7</b>			