

Parámetros fisicoquímicos de calidad de la jalea real elaborada por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), en Colombia

Physicochemical parameters of quality of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), in Colombia

^{1,2}Guillermo Salamanca Grosso, ¹Mónica Patricia Osorio Tangarife y ¹Laura María Reyes Méndez

¹Grupo de Investigaciones Mellitopalínológicas y Propiedades Fisicoquímicas de Alimentos. ²Universidad del Tolima Ibagué Tolima. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Colombia A.A 546. Correo electrónico: salamancagrosso@gmail.com

RESUMEN

La jalea real es un producto natural elaborado por las abejas nodrizas de *Apis mellifera* que marca la dinámica productiva al interior de la colmena. En este trabajo, se han estudiado los parámetros fisicoquímicos indicadores de calidad de la Jalea real (JR) elaborada por *Apis mellifera* L. en Colombia, generando directrices de calidad que contribuyan a los procesos de normalización de este importante producto de la colmena. Se evaluaron 13 muestras de (JR) de abejas con perfil africanizado (A) y europeo (E), sobre los parámetros fisicoquímicos de humedad, actividad de agua, lípidos, proteína, cenizas, sólidos totales y conductores disueltos, pH, acidez, conductividad eléctrica, glucosa, ácido 10-hidroxi-2-decenoico, densidad, actividad antirradicalaria, propiedades térmicas, caracterizaciones por electroforesis, infrarrojo y calorimetría diferencial de barrido, viscosidad, pruebas microbiológicas y sensoriales. La JR es ligeramente densa 1,112 a 1,114 g mL⁻¹, humedad entre 62,34 y 64,02 g/100g, presenta carácter ácido 3,40 a 3,60 meq/kg. El marcador característico es el ácido 10-hidroxi-2-decenoico, cuyos valores están entre 3,10 y 3,34 g/100 g, proteína de 12,7 a 13,8 g/100g. Capacidad calorífica (3,460±0,01 a 3,420±0,05) kJ/kg°K; conductividad térmica 0,490±0,02 y 0,482±0,06 W/m. El perfil de calorimetría diferencial, presenta dos endotermos uno a 37,54°C y 67,13°C propios de proteínas globulares simples, el análisis de electroforesis revela bandas 55,4 y 66,3 Kda. Las propiedades mecánicas de la JR, indican que el producto exhibe comportamiento de fluido pseudoplástico y tixotrópico. El trabajo realizado contribuye al establecimiento de valores guía a manera de estándares de calidad para el producto que se comercializa en Colombia.

Palabras clave: *Apis mellifera* L. Control de Calidad. Jalea real. Propiedades Fisicoquímicas.

Recibido: 23/12/13 Aprobado: 10/09/14

ABSTRACT

Royal jelly is one of the most important beehive products because of its pharmaceutical properties for humans. Royal jelly is a thick, milky substance secreted from the hypopharyngeal and mandibular glands of young worker honeybees of *Apis mellifera* L. and is used to feed the larvae. The aim of the present study has been the analysis, composition and identification of physicochemical properties of fresh royal jelly (RJ) elaborated by *Apis mellifera* L., as guidelines that contribute to quality control and standard of this bee hive product in Colombia. 13 samples of each of RJ were evaluated in African (A) and European (E) productive beekeeping system in Colombia. Moisture, water activity, lipids, protein, ash, total solids, acidity, pH, electrical conductivity, total dissolved solids, glucose, 10-Hydroxy-2-decenoic acid, density, DPPH scavenging activity, thermal properties and differential scanning calorimetry, infrared spectra and electrophoresis profile, microbiological and sensory analysis were made. Samples are slightly dense 1,112 to 1,114 g mL⁻¹, moisture 62,34 to 64,02 g/ 100g, JR presents acid nature 3,40 to 3,60 meq/kg. Molecular marker is 10-Hydroxy-2-decenoic acid whose values are 3,10 to 3,34 g/100 g, protein of 12,7 to 13,8 g/100g. Heat capacity 3,460±0,01 to 3,420±0,05, kJ/kg°K; thermal conductivity 0,490±0,02 and 0,482±0,06 W/m. Thermal analysis show characteristic signals in 37,5 and 67,1°C; electrophoresis with 55,4 y 66,3 Kda signals as a components globular proteins. JR exhibits pseudoplastic thixotropic behavior. This research is contributive to guidelines of commercial product in Colombia.

Key words: *Apis mellifera* L. Royal jelly. Physicochemical properties. Quality control.

INTRODUCCIÓN

La jalea real (JR), es un producto natural de origen endógeno secretado desde las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de abejas nodrizas de colonias de *Apis mellifera* L., entre 5 y 14 días de edad, que la elaboran para el sostenimiento de las larvas al interior de la colmena y principalmente en la alimentación selectiva de la reina, por trofalaxis, se distribuye entre los individuos de la colonia, (Oršolić, 2013; Ballesteros y Vásquez, 2007; López, 2004; Lercker, 2003; Araujo y Echazarreta, 2001).

La JR, exhibe propiedades terapéuticas, clínicas, biológicas y nutricionales que son excepcionales de las cuales deriva un atractivo comercial para la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, los cuales han propiciado el desarrollo de nuevos productos y con ello la importación a países donde la producción es insuficiente para satisfacer la demanda interna (Bloodworth, *et al.*, 1995). La JR se percibe como un producto de origen animal intermediario (PAI) y base para el desarrollo de nuevos productos, bien para su consumo en fresco o para su comercialización. Las principales formulaciones están orientadas al desarrollo de reformulaciones de uso tópico (JR/Aloe vera), incorporación en productos cosméticos (JR/geles de carbopol), Jabones y Shampoo (JR/Genapon/Texapon) o como suplemento nutricional (JR/Ginsen) entre otros. Diversos trabajos se han realizado para establecer la composición de la (JR), donde la humedad es el principal componente del producto, seguido de importantes aportes de proteínas (Loana *et al.*, 2011; Olimpia *et al.*, 2008; García-Amoedo y Almeida-Muradian, 2002; Lercker *et al.*, 1992; Howe *et al.*, 1985).

Se considera que es un alimento único elaborado por las abejas con notables propiedades farmacológicas, cosmetológicas y funcionales que promueven la salud. El mercado predominante de la JR, proviene de China, cuyo mercado condiciona el precio del producto a nivel mundial, pero la calidad independiente del origen no siempre está garantizada. El advenimiento de los métodos instrumentales de análisis, ha puesto de manifiesto nuevas posibilidades para el estudio de la JR (Balkanska *et al.*, 2012; Galhardo *et al.*, 2012; Sabatini *et al.*, 2009; Salazar, 2005).

En JR, la materia seca es principalmente nitrogenada, está constituida por enzimas, péptidos y aminoácidos, siendo la prolina la más representativa. Además contiene lisina, ácido glutámico, β -alanina, fenilalanina, serina y aspartato. La prolina como aminoácido libre, decrece si el producto ha excedido en el tratamiento térmico, (Sabatini *et al.*, 2009).

Se requiere que el producto se encuentre a temperaturas bajas para mantener los niveles de prolina y lisina estables. Por lo cual se sugiere unas condiciones favorables de temperatura, ya que la actividad enzimática proteolítica persiste con el tiempo (Bachanova *et al.*, 2002). Los minerales ocupan entre 0,80 y 3,0 g/100g de la base seca (Suzuki *et al.*, 2008; García y Almeida-Muradian, 2003). Las hipótesis acerca de la presencia cuantitativa de estos metales se debe a factores que se encuentran fuera de la colmena, tales como condiciones de medio ambiente, adquisición de alimento, periodo de producción y en cierto punto algunos factores internos de tipo biológico vinculados a la fisiología de las abejas. La fracción lipídica está presente en concentraciones variables (8%-19% de materia seca) pero sin duda alguna representa el más importante de los componentes de JR, (Olimpia *et al.*, 2008; Jamnik, *et al.*, 2007).

La porción de lípidos la componen los ácidos orgánicos libres (80%-90%) con una estructura poco común que rara vez se encuentra en la naturaleza. Estos ácidos grasos han atraído mucho la atención de los investigadores debido a sus características químicas de interés y actividad farmacológica; el 10-HDA (ácido 10-Hidroxi-2-decenoico) y sus análogos tienen efectos antitumorales, inhibidores de grasas en la síntesis de lípidos y estrogénicos, (Nozaki *et al.*, 2012; Suzuki, *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008). Los ácidos grasos que han sido identificados y relacionados con la calidad y autenticidad de la JR, corresponden al 3,10-Dihidroxidecanoico, 9-Hidroxi-2-decenoico, 11-Hidroxidocecanoico y 3,10-dihidroxidodecanoico, (Sabatini *et al.*, 2009; García-Amoedo y Almeida-Muradian, 2007; Pamplona, *et al.*, 2004; Koshio y Almeida-Muradian, 2003; Bloodworth, *et al.*, 1995). Este ácido orgánico (10-HDA), ha sido empleado como un parámetro que permite evaluar la calidad de la jalea real. Las propiedades nutricionales y actividad biológica de la JR, reside también en el

aporte de vitaminas A, C, D, E, K, el complejo B: Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Ácido pantoténico (B5), inositol, biotina y piridoxina (B6), pero también azúcares, (Sesta, 2006; Carboni, 2004; Bogdanov, 2004).

En el aseguramiento de la calidad de la jalea real, ha sido necesario generar procedimientos de extracción e implementar procedimientos analíticos de diagnóstico, teniendo en cuenta sus propiedades y el uso como alimento suplementario, al valorarse como sustancia saludable debido a sus componentes bioactivos que la han posicionado como activador fisiológico, inmunomodulador, supresor de reacciones alérgicas, hipotensor y estimulante de la proliferación celular. Los efectos farmacológicos de la JR, llegan a obtener una puntuación de alimento funcional que sobrepasa algunos valores biológicos de alimentos consumidos diariamente (Bogdanov, 2004).

Para el estudio de las propiedades térmicas de muchos componentes entre los que se tienen las macromoléculas, extractos biológicos se utiliza una técnica sensible identificada como calorimetría diferencial de barrido (DSC), aplicada en el campo alimentario y farmacéutico principalmente (Salamanca, 2012).

Estudios recientes enfocan especial interés en la proteómica de la jalea real de *Apis mellifera* y diversas especies de *Apis* asiáticas, como la gigante *A. dorsata* y la pequeña *A. cerana*. El rendimiento y la calidad está asociado a los sistemas de cría de reinas y a su vez está en función de la fortaleza de las colmenas establecidas en el sistema productivo (Salazar, 2005).

En Colombia el mercado de la jalea real, es un producto de gran demanda como suplemento nutricional, que suele adulterarse y suplantarse, sin que las autoridades puedan ejercer controles en razón a la falta de normatividad y de estándares de calidad que puedan ser usados en la identificación de autenticidad del producto, además no existe una norma estandarizada para la evaluación de su calidad. El presente trabajo es una contribución al estudio de la JR, elaborada por *A. mellifera* L. para el mercado, agroindustrialización y directrices en la proyección para el establecimiento de norma de calidad en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de producción

La técnica de referencia considerada en éste trabajo en el beneficio de JR, se fundamenta en la inducción de colonias de abejas para la producción de reinas, en proceso de horfanizado, siguiendo el método Doolite. Se realizaron operaciones de traslarve de huevos (usando translarvadores de pluma) de colonias previamente seleccionadas aplicando agua de coco a manera de dilución a fin de evitar la deshidratación de las larvas y facilitar la asimilación de los nutrientes, de abejas europeas (E) e híbridos africanizados (A), que se dispusieron en un sistema de copaceldas acoplados en bastidores, que posteriormente se introdujeron en la parte central de colonias de abejas receptoras, que fueron alimentadas con jarabe de azúcar, a razón de 2 kg/l de agua, asegurando la presencia de cuadros con polen alveolar.

Extracción y beneficio

Los bastidores que contienen las copaceldas, fueron removidos de las colonias de abejas receptoras a los tres días del traslarve, las cuales fueron dispuestas en nevera portátil, con mezcla frigorífica externa a manera de camisa en ambiente térmico hielo: sal: etanol (HSE) de -8°C. Los bastidores con las copaceldas con larvas y JR, se introdujeron en bolsas de polietileno facilitando su preservación para el transporte. La extracción de la JR, se realizó en el laboratorio, haciendo uso de un sistema de pipetas Pasteur, previamente esterilizadas y acopladas a bomba de vacío. El producto final se dispuso en recipientes herméticos twistoff de 25 ml, previamente esterilizados.

Muestras

Se colectó y dispuso un total de 30 g a 50 g de 13 muestras de JR de dos linajes de abejas Africanizadas (M1 A) y Europeas (M2 E), a partir de bastidores pre-elaborados en un sistema de copaceldas durante un programa de cría de reinas de abejas europeas y africanizadas, de un apiario dispuesto en la Vereda caños en zona rural de Duitama Boyacá (5°46'44"LN; 73°04'75"LO).

Análisis cromogénico

La calidad de las muestras de JR fueron evaluadas haciendo uso del test cromogénico de frescura. 1,5 ml de ácido clorhídrico del 37,5%, fueron adicionados a 0,50 g de JR, en tubos Eppendorff de 1,5 ml que se agitaron de manera vigorosa por 30 s y transferidos a placas blancas de cerámica de 3x4 usadas como piscinas de reacción (Hunan Fu Quiang, Ceramic Manufacturing™) para su análisis cualitativo.

Fraccionamiento

En un trabajo previo, 2,5 g de muestra de JR se sometieron a proceso de centrifugación a 245.000xg a 6°C por 5 h en una ultracentrífuga Sorvall Superspeed (DuPont Instrument, Newtown Connecticut, USA).

Parámetros fisicoquímicos

Las muestras de JR fueron evaluadas conforme a protocolos analíticos establecidos en el manual de análisis de jalea real Swiss Federal Office- (Bogdanov *et al.*, 2004) y el manual de métodos analíticos AOAC. Se implementaron protocolos para actividad de agua (a_w), fracción húmeda (X_w), sólidos totales (X_s), sólidos solubles totales (X_{ss}), Sólidos fijos (X_f), densidad, pH, acidez total, conductividad, TCD, tenor de glucosa (X_g), lípidos y proteínas.

Electroforesis (SDS-PAGE) e IR-FT

Los perfiles de proteínas se obtuvieron en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie, siguiendo directrices descritas en la literatura, (Yábar, 2003), con algunas modificaciones. Las propiedades espectroscópicas de la JR se evaluaron en una unidad FT-IR (Perkin-Elmer Precisely™), en el rango de 650 a 4.000 cm^{-1} .

Propiedades térmicas

El estudio de las propiedades termofísicas de la JR se realizó a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC), en la unidad TA DSC 2010, dispuesta con accesorios de enfriamiento TA 5.000 (TA Instruments, New Castle, USA). Las muestras se acondicionaron en celdas herméticas de aluminio, que se sometieron a barrido térmico entre 10 y 90°C, a 10°C/min en atmósfera inerte de nitrógeno (45mL/min).

En el análisis de los termogramas de JR, se determinaron las temperaturas de transición vítrea (T_g), fusión (T_m), entalpia (ΔH_m) de la transición sol-gel, usando el software universal Análisis V1-7F (TA Instruments). La capacidad calorífica (C_p) y conductividad térmica (k) se determinaron en la unidad KD2 pro (DecagonDevices Inc. W. USA), dispuesta con los sensores KS-1 y TR-1, que permite evaluaciones haciendo uso de un sistema de sensores y basado en un sistema trasciende de calor.

Actividad de agua

Las determinaciones se realizaron en la unidad psicrométrica termoeléctrica Decagon CX2M (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). La respuesta del instrumento se monitoreó usando solución saturada estándar de nitrato de magnesio (Novasina, Kontroll, Tablete BAG TNr 54703).

Marcador de calidad

La determinación del marcador de calidad 10-HDA, se realizó mediante técnicas de cromatografía líquida, considerando los trabajos de Pamplona *et al.*, 2004, Koshio y Almeida, 2003; García y Almeida-Muradian, 2003. Se usó una columna C_{18} -H (ShimadzuODS-H con unas dimensiones de 4,0 x 150 mm), en fase reversa y condiciones isocráticas, usando un detector de arreglo de diodos (ShimadzuSPD-MXA), a 225 nm, acoplado a la unidad Shimadzu LC9A. La fase móvil metanol/agua (45:55); el pH se ajustó a 2,5 con ácido fosfórico, se filtró a través de membrana de 0,45 μm (Millipore). La velocidad de flujo 0,5mL/min. El tiempo de ejecución para el análisis fue de 30 min.

Actividad antirradicalaria

La evaluación de ésta actividad se realizó en soluciones metanólicas de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Muestras metanólicas de JR en proporción 1:20, fueron homogenizadas y sometidas a ultrasonido para su disgregación. Diferentes alícuotas se añadieron a 3,9 ml de una solución $6,1 \times 10^{-5}$ del radical DPPH. El blanqueo se monitoreo a 515 nm durante 30 min. La actividad se determinó como IC_{50} en mg/ml.

Reología

Las propiedades mecánicas de la JR se evaluaron a tres temperaturas 25°C, 35°C y 45°C en el rango 0,01 a 120 s⁻¹, en rampas de ascenso y descenso, operando la unidad AR2000 (Advanced Rheometer, TA Instruments New Castle, USA), en una configuración de geometría placa/placa de 40 mm de diámetro y un espacio de placas de 700 μm (gap). La temperatura del sistema se controló usando sistema Peltier sobre las placa de trabajo.

Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico, se consideró el proceso de homogenización de materia prima transformada e involucró los parámetros de Coliformes totales estimando el NMP/g a 35°C por 48 h con diluciones decimales hasta 1/1000 inoculando alícuotas en tubos Durham con caldo LTS (Lauril sulfato) para identificar producción o ausencia de gas; para el aislamiento de *Salmonella*-*Shigella*, se enriqueció la muestra agar *Salmonella*-*Shigella* (SS) incubando por 18-24h a 35°C y para el cultivo, inoculación y enumeración de hongos y levaduras se usó agar Papa dextrosa (PDA) en incubación por 5 días a 28°C.

Evaluación y sensorial

En el análisis de JR, se aplicó la técnica de análisis descriptivo cuantitativo (QDA[®]) conocida como perfil sensorial, determinando la intensidad de los atributos a través de una escala de respuesta de 0 a 40, donde 0 representa la ausencia del atributo y 40 una percepción muy fuerte. Las muestras fueron presentadas de forma aleatoria a la temperatura de consumo, en placas de porcelana blancas estériles, acompañadas de agua como sustancia de enjuague y el formato de evaluación, sobre atributos de aroma (característico y fenólico), aspecto (granuloso, fluido y cremoso), color (blanquecino, pálido y pardo) y sabor (ácido, dulce y picoso). En el panel sensorial participaron nueve jueces entrenados.

Análisis estadístico

En los resultados de las evaluaciones analíticas de las muestras se consideraron dos grupos según el origen, correspondientes a JR de abejas Africanizadas (A) y Europeas (E). Los valores expresados corresponden a los promedios.

En todos los casos se realizaron análisis de varianza (95% de confianza), usando el software Statistica 8,0TM.

Plan HACCP

Considerando el diagrama de flujo de recorrido sencillo y los puntos críticos de control (PCC) obtenidos mediante el árbol de decisiones, se llevó a cabo la realización del plan HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point), en el cual se establecen los límites críticos de cada etapa del proceso considerada PCC, a su vez se fijan criterios de vigilancia y frecuencia, registros, verificación y las acciones correctivas en cada uno de ellos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema de beneficio de la JR es dependiente de un programa semi-intensivo de cría de reinas; el éxito del programa reside en la fortaleza de las colmenas donantes de larvas eclosionadas de 1 a 3 días y del traslarve a copa celdas y su posterior aceptación en las colonias receptoras (Figura 1).

Se han identificado siete puntos críticos propias del árbol de decisiones del sistema HACCP (Figura 2). En la selección y traslarve apropiado, se establece como límite crítico larvas de máximo 3 días (PC1), la disposición de celdas en los bastidores y el tiempo de reconocimiento por las abejas en las colonias de trabajo consolidan éxito del proceso de aceptación, o de rechazo en las receptoras (PC2), que demanda un periodo de acondicionamiento para el reconocimiento del material que habrá de ser introducido en éstas colonias, el límite crítico es de 12 horas previas al traslarve, una vez haya ocurrido el ensamble y las abejas sellen la copacelda, la disposición final debe ser en frascos esterilizados y a una temperatura de entre -4°C hasta -20°C, que contribuye al mantenimiento de la calidad del producto (PC6 y PC7).

En el proceso de fraccionamiento de la JR fresca, se logra la separación de tres fracciones bien definidas, una líquida de tonalidad amarillo pálido, correspondiente al 60,6±1,70% p/p de total; una segunda de ligera tonalidad pardo y de consistencia gelatinosa con 31,3±2,01% p/p y un sedimento blancuzco con 7,30±1,70% p/p.



Figura 1. Aspectos asociados a la producción de jalea real a partir de un proceso de selección traslarve inducción y producción.

La calidad global de la JR puede ser valorada mediante el test cromogénico, en piscinas de reacción a la gota, (Figura 3), frente al ácido clorhídrico adquieren tonalidad del amarillo, que con el tiempo de reacción van virando a rosa pálido y en un periodo prolongado superior a 1h, cambian a marrón pardo con formación de precipitado en algunos casos. Las tonalidades marrón observadas en el test cromogénico luego de 1 h de reacción, obedecen a la oxidación gradual del triptófano y reacción de grupos aromáticos en condiciones ácidas que van causando cambios de pH en la mezcla de la reacción ácida y pueden ser explicados si se considera que el triptófano, el ácido pirúvico en presencia de las proteínas e hidratos de carbono, que forman precipitados de esta tonalidad. La hidrólisis conduce a la formación de aminoácidos libres, que son estables en solución ácida.

En el proceso de fraccionamiento al adicionar solución de hidróxido de amonio (0,025N), se generan cambios en el pH de la matriz con agregación de las proteínas, comportamiento generado en la conformación globular, por desplazamiento de las moléculas como ocurre

en las proteínas globulares en el tratamiento con sales. Se destaca la presencia de glucosa aunque se presentan azúcares minoritarios como maltosa, gentiobiosa, isomaltosa, trehalosa que en este estudio no se reportan, han sido reportados en otros estudios (Daniele y Casabianca, 2012; Sesta, 2006).

En principio la industrialización de JR, se percibe como un producto de origen animal intermediario (PAI) y base para el desarrollo de nuevos productos, bien para su consumo en fresco o para su comercialización. La incorporación de matrices formuladas, presuponen estabilización con reducción de la actividad de agua mediante proceso de liofilizado, la reducción de pérdida del color por pardeamiento no enzimático en la reacción de Maillard y la formación de N6-(2-(2-furfuril-2-oxoetil))-L-lisina (Furosina). La calidad del producto es estable hasta en 12 meses en condiciones de refrigeración. Las propiedades termofísicas de capacidad calorífica, conductividad y difusividad térmica de JR, se hacen necesarias en estudios relacionados el diseño de equipos, en trabajos relacionados con el balance de masa y energía en procesos

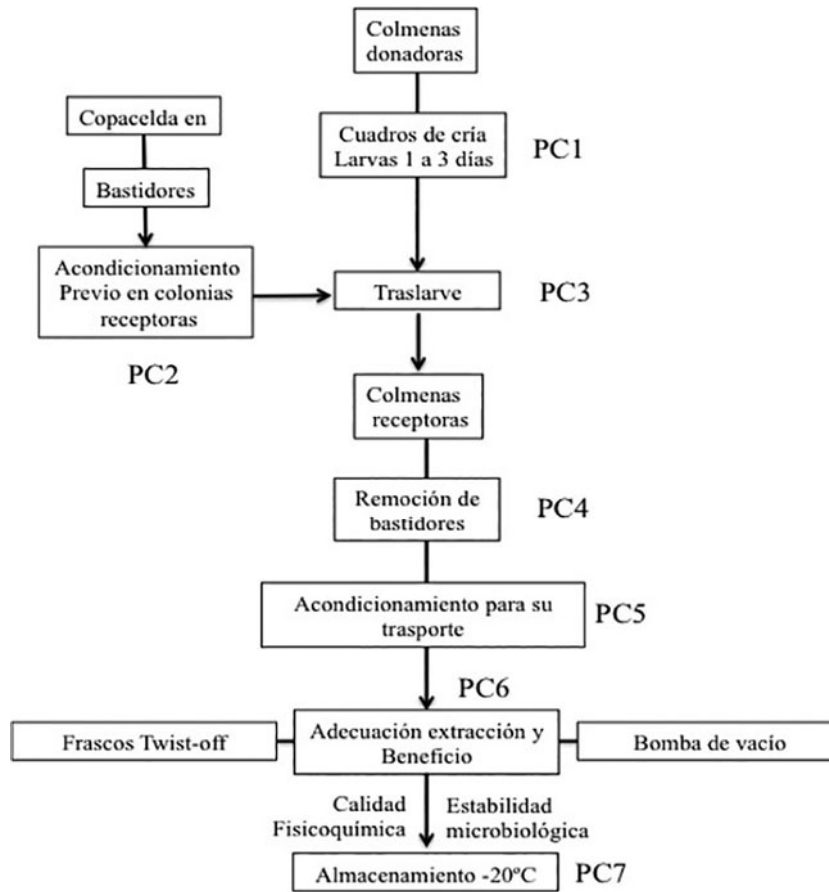


Figura 2. Diagrama de flujo del sistema de beneficio de Jalea Real.

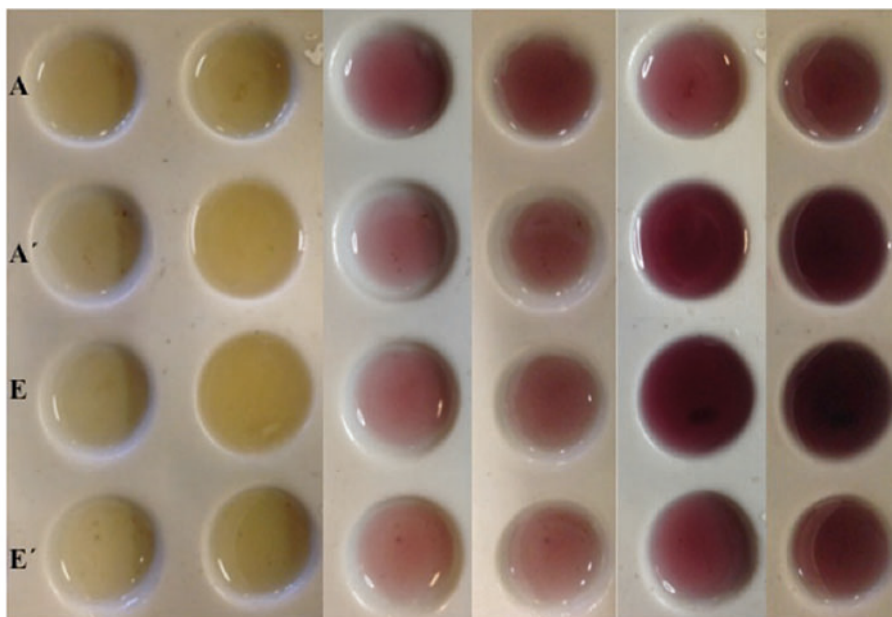


Figura 3. Secuencia de la evolución cromática de muestras de JR de *A. mellifera*, en el test de comportamiento cromogénico en piscinas de reacción. A y A': Africanizada. E y E': Europea.

de transferencia de calor. Estos parámetros en general no muestran diferencias importantes en relación a su origen biológico, la capacidad calorífica ($\text{kJ/kg}^\circ\text{K}$) es del orden de $3,460\pm 0,01$ a $3,420\pm 0,05$ y la conductividad térmica (W/m) de $0,490\pm 0,02$ a $0,482\pm 0,06$.

Respecto de los parámetros indicadores de calidad de la JR de las muestra de abejas (A) y (E), considerados en el estudio, se observa que los parámetros son relativamente constantes en las muestras de los dos linajes evaluados (Cuadro). La densidad es del orden de $1,112\pm 0,17$ (A) y $1,114\pm 0,22$ (E), la humedad es ligeramente mayor en la JR de abejas africanizadas, A: $64,02\pm 1,36$; E: $62,34\pm 1,30$ g/100 g. En la fracción lipídica se distingue el ácido 10-HDA (10-hidroxi-2-decenoico), que constituye en el componente más importante de la JR. En los dos linajes de abejas se observan diferencias importantes (A: $3,10\pm 0,22$; E: $3,34\pm 0,14$) g/100 g.

Los lípidos totales difieren significativamente ($P_v < 0,05$, A: $2,70\pm 0,50$; E: $4,10\pm 0,18$) g/100 g y representan cerca del 10% de la materia seca total. Las diferencias en el contenido de humedad, perfil proteico y lipídico en las muestras analizadas, pueden ser generadas en el metabolismo de las abejas, al tipo de alimentación que se les pueda suministrar a grupos de abejas durante la producción.

La fracción lipídica está presente entre el 7% y el 11% de la materia seca, los cuales difieren en promedio de manera significativa ($P_v < 0,05$) ésta fracción representa cerca del 10% de la materia seca total; la fracción protéica de la JR es menor en el producto de las abejas de linaje africanizado, esta diferencia puede ser explicada en virtud al metabolismo de las abejas y al tipo de alimentación que se les pueda suministrar a grupos de abejas durante la producción; en relación a los sólidos solubles, se advierte un mayor contenido en las muestras de linaje europeo ($37,8\pm 0,67$) que en las africanizadas ($35,6\pm 0,17$)g/100 g, estos valores corresponden al 30% de la materia seca La actividad de agua (a_w) de la JR de abejas africanizadas es de 0,935 ligeramente mayor que el de las europeas con 0,930, sin diferencias significativas entre las muestras ($P_v: 0,0715$). La conductividad se correlaciona con la acidez total y los sólidos iónicos solubles (TCD). Las cenizas en los dos

tipos de muestras es de 0,960 para A y 0,920 g/100g para E.

El uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, (DPPH), ha sido usado como método indirecto de la actividad antirradicalaria, en JR se ha observado una marcada dependencia de la ésta actividad en relación al tiempo de beneficio, (Buratti *et al.*, 2007). En muestras recién beneficiadas los valores medios observados para JR tipo A (M1: $3,210\pm 0,52$) y E (M2: $3,160\pm 0,76$) mg/ml, no presentan diferencias significativas ($P_v: 0,080$). El ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA), ha sido reconocido como parámetro de autenticidad, además de los ácidos 9-oxodecenoico y octadecenoico. En el trabajo realizado el 10-HDA no ha sido mayor a 3,40 g/100g.

La fracción proteica en JR de abejas africanizadas es de $12,7\pm 0,64$ menor que el de europeas con $13,8\pm 0,30$ g/100 g. JR, contiene además de aminoácidos libres, albúminas y γ -globulinas, las proteínas constituyen cerca del 30% de la materia seca, el 80% de ésta fracción corresponde a proteínas solubles. Entre los azúcares se destaca la presencia de glucosa con $2,31\pm 0,42$ g/100 g, igualmente la fructosa y la sacarosa (valores no reportados), que están presentes en un rango amplio que puede oscilar entre 3,10 y 8,20 g/100 g.

Los estudios mediante análisis calorimétrico y diferencial de barrido (DSC) de los alimentos, permiten evaluar el comportamiento de los componentes en función de las transiciones de fase, (Johnson, 2013). En muestras biológicas cuyos componentes mayoritarios son proteínas, es posible identificar las energías de transición y de plegamiento-desplegamiento que asumen cuando cambia la temperatura. En JR, los cambios observados mediante DSC, se presentan como transiciones de fase de primer orden y se relacionan con la desnaturalización de proteínas que conforman el producto. En los termogramas de las muestras de JR (Figura 4), se presentan dos endotermos uno a $37,54^\circ\text{C}$ y $67,13^\circ\text{C}$ del ecotipo africanizado (M1) y en $41,70^\circ\text{C}$ y $68,90^\circ\text{C}$ del europeo (M2). En muestras M1, la temperatura de transición vítrea (T_g) es de $34,99\pm 0,63^\circ\text{C}$, menor que en muestras tipo M2 (europeo) con $38,94\pm 0,22^\circ\text{C}$; la temperatura de fusión (T_m) de las proteínas constitutivas de JR ocurren a $67,03^\circ\text{C}\pm 0,15$ y $68,76^\circ\text{C}\pm 0,33$, el

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos de muestras de Jalea Real colombiana

Parámetros	Abejas		Referencias
	A (M1)	E (M2)	JR fresca
Actividad de agua	0,935±0,001	0,930±0,001	0,92 ^c
¹ Densidad	1,112±0,17	1,114±0,22	1,11 ^d
² Humedad	64,02±1,36	62,34±1,30	60 - 70 ^{bcf} 53,3 ^d
² Lípidos	2,700±0,50	4,100±0,18	2 - 8 ^{abc}
² Proteína	12,70±0,64	13,80±0,30	9 - 18 ^{abcf} 19,6 ^d
² Cenizas	0,960±0,17	0,920±0,21	0,8 - 3,0 ^{ab} 0,39 - 1,15 ^c
² S. solubles	35,60±0,17	37,80±0,67	34,8 - 38,3 ^f
² Glucosa	2,310±0,42	2,410±0,50	4 - 8 ^{ab} 2,00 - 3,07 ^f
³ DPPH	3,210±0,52	3,160±0,76	1,4 - 7,0 ^e
pH	3,400±0,10	3,600±0,17	3,4 - 4,5 ^{abcf}
⁴ Acidez	31,30±1,18	24,70±2,10	30 - 60 ^{abd} 19,8 - 21,7 ^c
⁵ C. Eléctrica	0,205±0,01	0,145±0,01	0,1896±0,04 ^f
⁶ TDS	0,095±0,02	0,070±0,03	-
² 10-HDA	3,100±0,22	3,340±0,14	>1,4 ^b 2,5 ^d
⁷ Temp. Tran. (Tg)	34,99±0,63	38,94±0,22	-
⁸ C. calorífica (Cp)	3,460±0,01	3,420±0,05	-
⁹ C. térmica (k)	0,490±0,02	0,482±0,06	-

¹g/cm³. ²g/100g. ³mg/ml. ⁴meq/kg. ⁵mS/cm. ⁶ppt. ⁷°C. ⁸kJ/kg°K. ⁹W/m.
^aSabatini, *et al.*, 2009. ^bOlimpia, *et al.*, 2008. ^cSereia y Arnaut, 2013. ^dZheng, *et al.*, 2011. ^eBuratti, *et al.*, 2007. ^fBalkanska, *et al.*, 2012.

diferencial para la capacidad calorífica (ΔC_p) es de 0,550±0,004 Jg⁻¹°C⁻¹ y 0,654±0,012 Jg⁻¹°C⁻¹ en su orden. El perfil de los termogramas, es típico de proteínas globulares y los endotermos observados son coincidentes con los reportes de Wen *et al.*, 2012. La composición de JR es relativamente constante, los parámetros de calidad pueden verse modificados según haya sido el método de extracción y forma de almacenamiento, aspecto ya discutido en la literatura (Pavel, *et al.*, 2011).

El perfil electroforético de JR es característico e independiente del origen biológico, éste presenta dos bandas marcadas de 55,4 y 66,3 KDa. Entre los aminoácidos reportados como componentes de la JR se destaca la prolina (Bogdanov, 2004), siendo éste el principal aminoácido libre, que decrece si el producto ha excedido en el tratamiento térmico. Las técnicas de análisis mediante espectroscopia de infrarrojo (IR-FT) para el caso de las proteínas posibilita su caracterización. Las señales típicas de JR corresponden se presentan a 1637, 1550

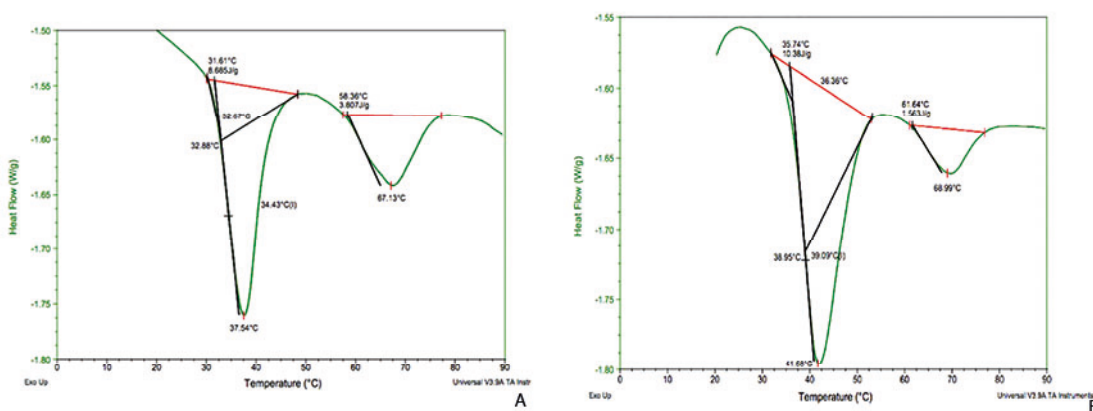


Figura 4. Termogramas de muestras de JR de abejas africanizadas(A; M1) y europeas (B; M2).

y entre 1400-1200 cm^{-1} . La primera pertenece al grupo amida I y es la de mayor contribución respecto de la estructura secundaria de las proteínas y surge del estiramiento de grupos C=O, de vibraciones de tensión del grupo C-N y la deformación C-C-N y N-H de todo el enlace peptídico (Figura 5). El modo de amida II es la combinación fuera de la fase de N-H en el plano de flexión y la vibración de estiramiento C-N con contribuciones más pequeñas de C=O en el plano de flexión y el C-C y N-C vibraciones de estiramiento que complementa señales del modo amida III.

Las propiedades mecánicas de la JR indican que el producto exhibe comportamiento de fluido pseudoplástico y tixotrópico, dependiente de la temperatura y que obedece a la naturaleza compleja de los constituyentes dispersos en la matriz que la compone, principalmente proteínas, azúcares y lípidos; al aplicar un esfuerzo de cizalla, se generan cambios, con pérdida de la estructura interna; la relación entre la velocidad de cizalla y el esfuerzo cortante (Figura 6A), se ajustan a la ley de la potencia ($\tau = K\dot{\gamma}^n$), donde K es el índice de consistencia y n el índice de flujo a 25, 35 y 40°C. El efecto tixotrópico se deduce de la diferencia en las curvas de velocidad de deformación ascendente y descendente, en relación al esfuerzo cortante (Figura 5B).

En el estudio microbiológico, el recuento de colonias aerobias mesófilas ($31 \pm 1^\circ\text{C}$), es inferior a 1×10^2 UFC/g, así como para las muestras de hongos y levaduras, ($< 1 \times 10^2$ UFC/g), además de

la ausencia de Salmonella, Shigella, coliformes totales y fecales. La preservación de las muestras demandan cadena de frío, preferiblemente en recipientes opacos, esterilizados, de color ámbar, para evitar compartimentos de aire, a fin de que no se genere deterioro y oxidación. La JR es sin embargo, susceptible de contaminación, cuando es almacenada de manera deficiente, sus propiedades biológicas se pierden si no son manejadas adecuadamente entre -4°C a -20°C .

En relación a la evaluación sensorial, las muestras de JR exhiben un aroma característico fenólico y picoso, de tenor alcalino e indistinguible propio de los fluidos biológicos; su consistencia es densa pero fluida, algunas veces pastosa en particular cuando ha perdido humedad; su coloración es blanquecina amarfilada a levemente amarilla o ligeramente parda, cuando se ha dejado expuesta al ambiente; es parcialmente soluble en agua; durante el almacenado de las muestras de JR, se forman gránulos proteicos. El perfil fenólico de las muestras de JR de abejas africanizadas, determina en los panelistas que es más acentuado en relación a las europeas. El análisis de varianza de la evaluación sensorial indica que no se presentan diferencias significativas entre las muestras según sea su origen biológico respecto al aroma característico de la JR (Pv 0,153), el tenor ácido (Pv 0,144) y ácido (0,271). Individualmente grupos de muestras de JR se perciben con diferencias. El tenor de fluidez, aspecto cremoso y color blanquecino es semejante entre los dos grupos de muestras estudiadas, (Figura 7).

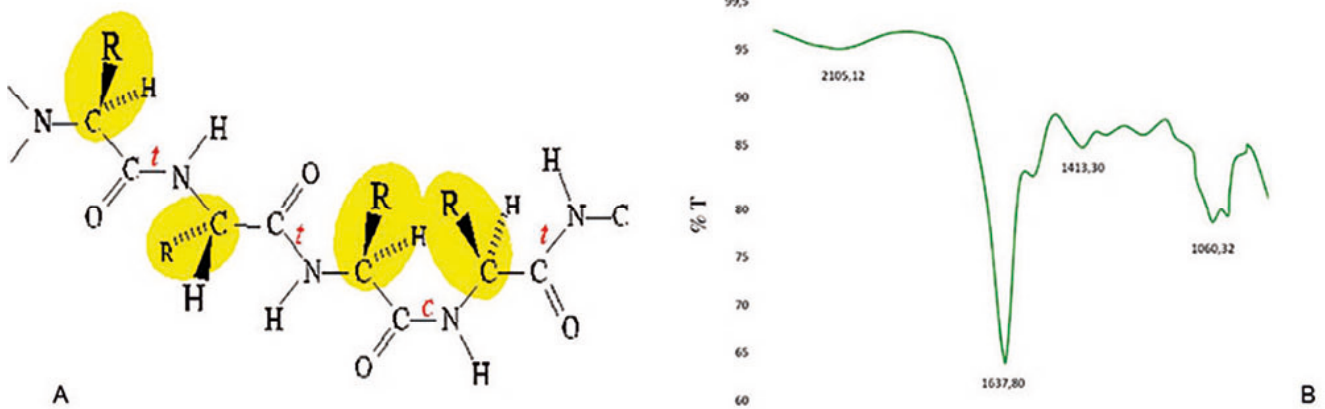


Figura 5. A. Representación del enlace peptídico de las proteínas. B. Sección del espectro IF-T de una muestra de JR entre 2400 y 1000 cm^{-1}

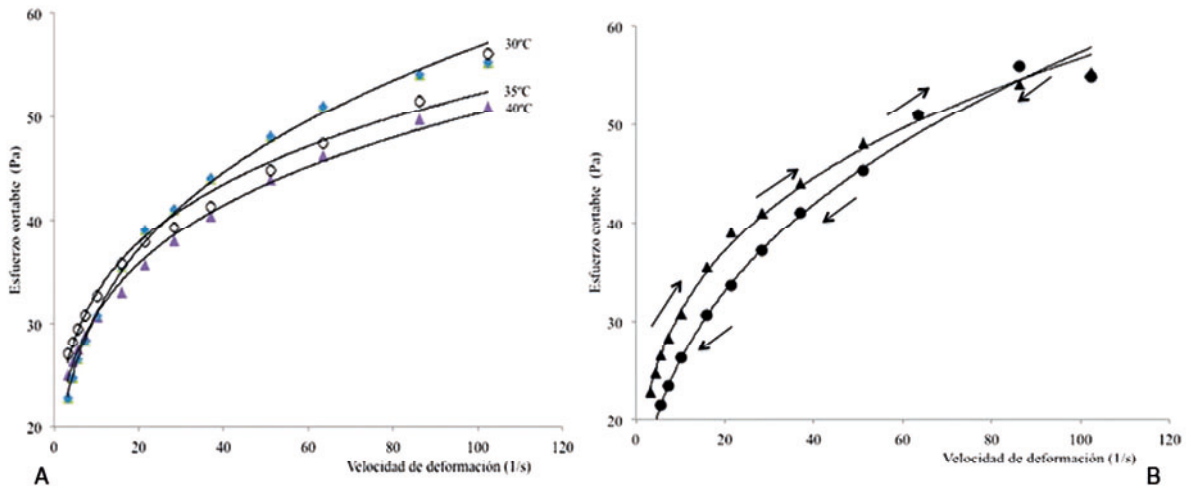


Figura 6A. Reograma tipo de una muestra de JR a para la velocidad de deformación y esfuerzo cortante a 30, 35 y 40°C. B. Efecto tixotrópico a 30°C.

CONCLUSIÓN

El estudio ha posibilitado la puesta en marcha de un sistema de producción de jalea real bajo condiciones estandarizadas siguiendo el método de traslarve a colonias de abejas africanizadas y europeas, bajo criterios de buenas prácticas y siguiendo metodologías para establecimiento de puntos y límites críticos para el proceso desde la producción al beneficio. Se han implementado además técnicas de análisis necesarias para la caracterización de Jalea real, sobre parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales. La implementación del sistema de producción

para JR bajo criterios de buenas prácticas de producción, ha permitido identificar siete puntos críticos, siendo la selección y traslarve un límite crítico, la disposición de celdas en los bastidores y el tiempo de reconocimiento por las abejas en las colonias de trabajo consolidan éxito del proceso de aceptación, so pena de rechazo en las receptoras.

La calidad de la JR, está en función de la forma de extracción y condiciones impuestas para su almacenamiento. No se observan diferencias importantes en los parámetros fisicoquímicos de la JR elaborada por los dos linajes. Este producto

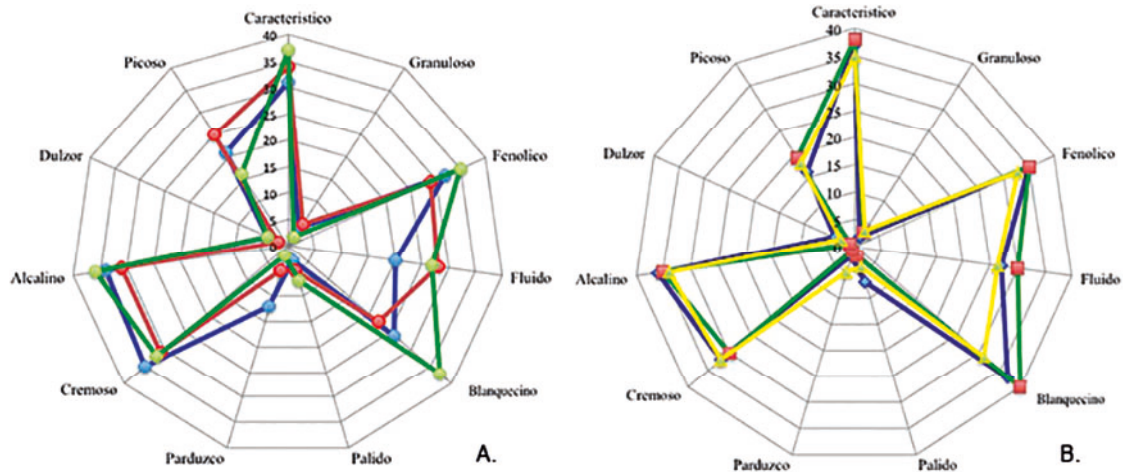


Figura 7. Perfil sensorial tipo de muestras frescas de Jalea Real A. Abejas africanizadas. B. Abejas europeas.

exhibe características ácidas, es ligeramente denso. La humedad de éste producto facilita el deterioro, condición que le imponen manejo especial para su conservación.

Las proteínas que conforman la JR, se caracterizan por las bandas de peso molecular bien definido. Las propiedades termofísicas derivadas del análisis mediante calorimetría diferencial de barrido, así como el uso de la espectroscopía de infrarrojo, contribuyen en la identificación de este tipo de matrices. La identificación de marcadores moleculares, como es el caso del ácido 10-hidroxidecenoico y su determinación cromatográfica consolidan la autenticidad. Las propiedades mecánicas de la JR, revelan propiedades intrínsecas del fluido que es propio de sistemas pseudoplásticos y tixotrópicos. El trabajo realizado contribuye al establecimiento de valores guía a manera de estándares de calidad para el producto que se comercializa en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a los apicultores colombianos que contribuyeron a la realización del trabajo, por la gestión, el apoyo y el acompañamiento durante el montaje del sistema de producción de Jalea real, planteado por el Grupo de Investigaciones Mellitopalínológicas y Propiedades Físicoquímicas de Alimentos de la Universidad del Tolima. Toda nuestra gratitud a Efraín Muñoz Castebancho, de la empresa

Apimundo SAS, por facilitar el proceso de montaje y valoración del sistema de cría de reinas paralelo al trabajo que se relaciona en éste trabajo. A la Universidad de São Paulo, por facilitar las condiciones de evaluación de las muestras. A los evaluadores del artículo y los colaboradores permanentes de la revista Zootecnia Tropical, por las observaciones, sugerencias y recomendaciones al documento final durante el proceso de arbitraje.

LITERATURA CITADA

- AOAC. Official methods of analysis. 2000. 17th edition. Association of official analytical chemists. Washington, D. C.
- Araujo, J. y C. Echazarreta. 2001. Un sistema sencillo de producción de jalea real con suplementación. VII Congreso internacional de actualización apícola. Puebla. México. pp. 68-73.
- Bachanova, K., J. Kludiny, J. Kopermichy and J. Šimuth. 2002. Identification of honeybee peptide active against paeny bacillus larvae through bacterial growth inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*, 33:259-269.
- Ballesteros, H. y R. Vásquez. 2007. Determinación de la producción de jalea real en colmenas de recría de diferentes dimensiones. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1): 75-81.

- Balkanska, R., I. Zhelyazkova and M. Ignatova. 2012. Physico-chemical quality characteristics of royal jelly from three regions of Bulgaria. *Agricultural Science and Technology*, (4):302-305.
- Bloodworth B., C. Harn, C. Hock and Y. Boon. 1995. Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly, *Journal A.O.A.C. Int.*, (78):1019-1023.
- Bogdanov, S. 2004. Quality and standard of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38:334-341.
- Bogdanov, S., K. Bieri, G. Gremaud, D. Iff, A. Känzig, K. Seiler, H. Stöckli and K. Zürcher. 2004. *Swiss Food Manual: Gelée Royale. Bienen produkte, BAG (Swiss Federal Office for Public Health); Berne.*
- Buratti, S., S. Benedetti and M. Cosio. 2007. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, 71:1387-1392.
- Caboni, M. F., A. G. Sabatini and G. Lercker. 2004. La gelatina reale: origine, proprietà e composizione/Royal and composition. *Apoidea*, 1:72-79.
- Daniele, T. and H. Casabianca. 2012. Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples. *Food Chemistry*, 134(2):1025-1029.
- García-Amoedo, L. H. and L. B. Almeida-Muradian. 2007. Physico chemical composition of pure and adulterated royal jelly, *Química Nova*, 30(2):257-259.
- García, L.E. and L. Almeida-Muradian. 2003. Determination of trans-10 hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in Royal jelly from São Paulo state, Brazil. *Cienc. Tecnol. Aliment, Campinas*, 23:62-65.
- García-Amoedo, L. H. e L. B. Almeida-Muradian. 2002. Comparação de metodologías para a determinação de umidade em geléia real. *Química Nova*, 25: 676-679.
- Galhardo, R., F. Duarte, M. Teles, E. Weinstein e A. Camargo. 2012. Avaliação do potencial antioxidante da geléia real ao logo do tempo de armazenamento. *Biotemas*, 25(3):257-263.
- Howe, S. R., P. S. Dimick and A. W. Benton. 1985. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. *Journal of Apicultural Research*, 24:52-61.
- Ioana, L., L. Mârghitas, D. Dezmirean, C. Mahai y O. Bobis. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly - Review. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2):67-72.
- Jamnik, P.; D. Goranovič and P. Rasport. 2007. Antioxidative action of royal jelly in they east cell. *Experimental Gerontology*, 42(7):594-600.
- Johnson, C. M. 2013. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Arch Biochem Biophys*, 531(1-2):100-109.
- Lercker, G. 2003. La gelatina reale: composizione, autenticità e adulterazione. In *Atti del Convegno "Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell' alveare"*. Università degli Studi del Molise; Campo basso, 67-81.
- Lercker G., M. F. Caboni, M. A. Vecchi, A. G. Sabatini and A. Nanetti. 1992. Caratterizzazione dei principali costituenti de lla gelatina reale, *Apicoltura*, 8:27-37.
- López, R.A. 2004. Composición, propiedades y usos de la jalea real. *Imagen Veterinaria*, 4(1): 45-48.
- Koshio, S. e L. Almeida. 2003. Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geléia real pura e adicionada ao mel brasileiro. *Química Nova*, 26(5):670-673.
- Nozaki, R., S. Tamura, A. Ito, T. Moriyama, K. Yamaguchi, T. Kono. 2012. A rapid method to isolate soluble royal jelly proteins. *Food Chemistry*, 134(4):2332-2337.
- Qu, N., J. Jiang, L. Sun, C. Lai, L. Sun and X. Wu. 2008. Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana*) and European (*Apis mellifera*) honeybees. *Biochemistry*, 73(6):841-847.

- Oršolić, N. 2013. Royal jelly: component efficiency, analysis, and standardization. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 64(3):445-461.
- Olimpia, P., L. Marghitas and D. Dezmirean. 2008. A study about physicochemical composition of fresh and lyophilized royal jelly. *Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, 41:328-332.
- Pamplona, L., R. Azedo, K. Oliviera, L. García and L. Almeida. 2004. Physico Chemicals analices indicated to the quality control of royal jelly with honey. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 24,608-612.
- Pavel, C., L. Mârghitas, D. Dezmirean, O. Bobis, L. Bârnuțiu, and A. Sapcaliu. 2011. Changes in royal jelly composition during storages and possible freshness parameters. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 68:1-2.
- Sabatini, A., G. Marcazzan, M. Caboni, S. Bogdanov and L. Almeida. 2009. Quality standarisation of royal jelly. *Journal of Apiproduction Api medical Science*, 1:1-6.
- Salamanca, 2012. Estudio de las propiedades térmicas y reológicas de mieles florales y monoflorales colombianas. Trabajo de Posdoctorado. Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Alimentos. Pirassununga. Brasil. 216 p.
- Salazar, L. and V. Paz. 2005. Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) Royal jelly. *Toxicol In vitro*, 19(5):645-651.
- Sesta, G. 2006. Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37:84-90.
- Salazar, L., Paz, V. 2005. Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Toxicology in vitro*, 19(5):645-651.
- Sereia, M. and V. Arnaur. 2013. Quality of royal jelly produced by Africanized honeybees fed a supplemented diet. *Food Science and Technology*, 33(2):304-309.
- Suzuki, K., Y. Isohama, H. Maruyama, Y. Yomada, Y. Narita, S. Ohta, Y. Araki, T. Miyata and S. Mishima. 2008. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3):295-302.
- Wen, J., K. Arthur, L. Chemmalil, S. Muzammil, J. Gabrielson, Y. Jiang. 2012. Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: Qualification of DSC. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(3):955-964.
- Yábar, C. 2003. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Perú Norma técnica, 38:59-60.
- Zheng, H., Hu, F., Dietemann, V. 2011. Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidology*, 42:39-47.