

6/2(04)

44

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

ANALISIS VITAMINICO
DE LA PAPILLA REAL DE
LA ABEJA MELIFERA

TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER
EL TITULO DE QUIMICO POR
JOSE LUIS ESTEBANEZ GROBET

MEXICO, D. F.
1955



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ANALISIS VITAMINICO
DE LA PAPILLA REAL DE
LA ABEJA MELIFERA

612(04)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

ANALISIS VITAMINICO
DE LA PAPILLA REAL DE
LA ABEJA MELIFERA

TESIS

*PRESENTADA PARA OBTENER
EL TITULO DE QUIMICO POR
JOSE LUIS ESTEBANEZ GROBET*

MEXICO, D. F.
1955

*A mis Padres,
Abuelos
y Hermano*

SUMARIO:

DETERMINACIONES GENERALES.

GENERALIDADES.

- Humedad.
- Cenizas.
- Azúcares Totales.

METODO PARA LA DETERMINACION DE VITAMINAS.

- Vitamina A.
- Vitamina B. (Tiamina).
- Niacina.
- Colina.
- Vitamina C. (Acido Ascórbico).
- Vitamina E. (Alfalfa-Tocoferol).

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

- Resultados.

- Bibliografía.

GENERALIDADES

La abeja melífica se clasifica entre los insectos y dentro de la clasificación científica corresponde al tipo de los ARTROPODOS, clase INSECTA, subclase PTERYGOTA, orden HIMENOPTERA, suborden APOIDEA, familia APIDEA, género APIS, especie MELIFICA.

Entre ellas podemos distinguir dos tipos de individuos, los machos o zánganos y las hembras que se encuentran en dos tipos: las obreras que son estériles y las llamadas reinas que son fecundas y llevan en la colmena las funciones de la reproducción. Siendo el alimento que recibe la larva tanto en calidad como en cantidad el que origina esta diferencia entre reina y obreras. De cada larva las abejas pueden crear una obrera o una reina variando el tipo de alimentación suministrada y desarrollando en cada caso órganos diferentes, dando lugar así a una obrera o una reina. El desarrollo de los órganos sexuales de una reina se debe a que es alimentada con la llamada papilla real que es el único alimento recibido por ésta, a diferencia de la obrera que recibe como alimento polen y miel, desarrollándose en su caso, órganos útiles para el trabajo que desempeña. Estos órganos son: Las glándulas productoras de la cera; los llamados peines del polen, órganos dispuestos para la recolección del mismo, y las glándulas mamarias o de nutrición que segregan la papilla real, que mezclada con pequeñas cantidades de miel forman el alimento de la reina y de sus larvas. La diferencia entre reina y obrera no es sino consecuencia de la nutrición; no así el zángano que se desarrolla de un huevo sin fecundar, es decir, debido a una PARTENOGENESIS.

En la vida de la abeja obrera se distinguen tres períodos regidos por las glándulas. En los dos primeros la abeja trabaja en el interior de la colmena y en el último en el exterior.

En el primer período, comprendido desde el día de su nacimiento hasta el onceavo o doceavo de su vida, se dedica a la limpieza de la colmena y nutrición de las larvas, durante el cual se desarrollan unas glándulas situadas en la cabeza de la abeja, cerca de la faringe, llamadas glándulas mamarias o de alimentación, las que segregan la jalea o papilla real y que se atrofian después del onceavo o doceavo día.

En el segundo período del onceavo al veinteavo día se desarrollan las glándulas cereras.

En el tercer período, a partir del veinteavo día, las glándulas cereras se atrofian y la abeja se dedica al trabajo exterior, hasta su muerte.

Las glándulas que producen la papilla real están formadas por dos largas hileras de saquitos muy juntos que forman innumerables vueltas y ondulaciones a los lados de la cabeza y a los lados de la boca se abren, separadamente, los conductos centrales.

La papilla real, cuando fresca, es una sustancia de color blanco lechoso y consistencia cremosa, pero cuando se seca se convierte en una pasta gomosa de ligero color amarillento. Su sabor es acre y característico. En condiciones favorables las abejas nodrizas dan a las larvas tal cantidad de alimento que éste se encuentra frecuentemente en las celdas recién abandonadas.

La papilla es un compuesto rico en azúcares y ciertas vitaminas, además de sustancias de tipo hormonal que posiblemente influyen en el desarrollo del sistema generativo de la abeja.

VITAMINAS

Se conocen como vitaminas algunas sustancias que el organismo necesita en pequeñas cantidades y que junto con los azúcares, grasas, proteínas y sales minerales, son necesarias para el desarrollo normal del individuo. La carencia de alguna de estas vitaminas lleva al desarrollo de fenómenos conocidos con el nombre general de avitaminosis.

Aunque existen muchas sustancias que son necesarias en pequeñas cantidades, como el iodo, se ha reservado el nombre de vitamina para sustancias orgánicas de origen complejo y compo-

ción complicada, generalmente vegetal, que los animales, en la mayoría de los casos no son capaces de sintetizar a partir de compuestos sencillos. El conocimiento de las vitaminas es relativamente reciente (Lunin, 1881). En 1906 se lograron separar los factores complementarios de la leche: el factor A Liposoluble y el factor B Hidrosoluble. Funk propuso en 1911 el nombre de vitamina por creer el factor B una amina esencial para la vida. Más tarde se encontraron en los factores iniciales, otras sustancias también necesarias para el desarrollo normal y a los cuales se les asignaron diversas letras para distinguirlos. En 1920 se inició un período caracterizado por el conocimiento de algunos factores, basado en dietas en animales experimentales. En este mismo período algunos laboratorios lograron el aislamiento e identificación de diversos factores. El primero en ser aislado, el Acido Nicotínico, no fué reconocido como tal.

Los primeros métodos para la determinación de las vitaminas estuvieron basados en la producción de deficiencias y posterior comparación con animales sanos guardados como testigos; teniendo estos métodos la desventaja de ser sumamente tardados y costosos, además de existir la desventaja de no poder establecer en los animales dietas adecuadas.

Para evitar estas dificultades se han desarrollado los métodos microbiológicos que son conocidos desde hace bastante tiempo, pues en 1919 E. J. Williams sugirió que el crecimiento de las levaduras podía ser usado en la determinación de las vitaminas, pero hasta hace pocos años el conocimiento de las necesidades nutritivas de los micro-organismos ha permitido poner en práctica métodos para el ensayo de las vitaminas.

Los métodos microbiológicos en comparación con los biológicos que usan en el laboratorio animales o seres humanos, poseen la ventaja de su rapidez, poco trabajo y material; además de ser específicos biológicamente. Muchas veces los métodos microbiológicos son preferidos por razones de conveniencia y economía a los métodos químicos y físicos aunque éstos sean eficaces.

DETERMINACIONES
GENERALES

Determinación de Humedad.—Método de Destilación.

Este método se basa en la destilación de un solvente inmiscible con el agua y el arrastre de ésta por el solvente. La muestra puede ser o no soluble en el solvente. El aparato usado generalmente es el de Dean-Stark para la determinación de humedad y los solventes usados son muy variados según la clase de material por ensayar, aunque los más comunes son el toluol y el xilol, siendo aconsejable el uso del Toluol sobre el Xilol por ser el punto de ebullición del primero (111°) menos que el del segundo (140°), y aparentemente debido a su menor punto de ebullición elimina la descomposición de algunos materiales en investigación.

El procedimiento consiste en poner una suficiente cantidad de muestra en un matraz, cubriéndolo con aproximadamente 75 ml. de xilol conectando la trampa y llenando ésta con xilol por la parte superior del condensador. Se calienta el aparato haciendo circular el agua en el condensador, destilando con una velocidad de dos gotas por segundo y continuando así hasta la destilación completa del agua, después de lo cual se aumenta la velocidad a cuatro gotas por segundo. Se detiene la destilación y se lava el condensador con xilol para arrastrar el agua pegada en las paredes, destilando algún tiempo más. Se lava nuevamente el condensador, dejando romper la emulsión se lleva la trampa a temperatura constante con un baño de agua, se mide y multiplica por la densidad para tener el resultado en gramos.

El xilol usado deberá estar saturado de agua, para lo cual se refluja con una porción de agua durante 10 minutos separando después las dos capas en un embudo de separación.

Determinación de Azúcares Totales.

Los carbohidratos se encuentran entre los constituyentes más abundantes de plantas y animales, que los utilizan en muchas de sus funciones, principalmente como una fuente de energía, tomando en muchas plantas parte en la formación de sus tejidos estructurales de la misma manera que los animales utilizan las proteínas.

El nombre de los carbohidratos se deriva de su fórmula empírica $C_n H_{2n} O$, clasificándose sistemáticamente como mono, di, tri, tetra y polisacáridos. Los monosacáridos están formados por la unión de 5 ó 6 átomos de carbono y sus homólogos superiores por la unión de dos o más moléculas de monosacáridos que por hidrólisis son liberados. Algunas vitaminas están relacionadas con la estructura de los carbohidratos; las principales son la vitamina C y el inositol.

Para la determinación de los carbohidratos existen reacciones específicas en las que modificando las condiciones de la reacción sirven para la determinación de los azúcares totales.

Determinación con Acido 2,4 dinitrosalicílico.—Preparación de la muestra.

Se ponen en un mortero 1-2 g. de la muestra, se añade agua para tener aproximadamente 100 gramos. Emulsione y filtre. La solución se satura con solución de acetato básico de plomo para clarificar. Filtre y elimine el exceso de plomo añadiendo ligero exceso de solución de Fosfato Disódico. Filtre y diluya a 100 ml.

Determine la cantidad de ácido acético, 1N necesaria para neutralizar 50 ml. de la muestra usando rojo de metilo como indicador. Añádala a 50 ml. de la muestra clarificada. Añada 2-4 gotas de solución de Invertasa de Wallestein al 1% y déjela reposar a temperatura ambiente durante la noche. Diluya a 100 ml.

Determinación.

Como reactivo se usa una solución de 255 g. de sal de Rochelle, 8.8 g. de Acido 2,4 Dinitrosalicílico, 25 g. de Hidróxido de So

do, 7 g. de Fenol y 7 g. de Metabisulfito de Sodio en dos litros de agua.

Método.

A 10 ml. de reactivo añada 0.1 ml. de la muestra, agite y caliente en un baño de agua durante tres minutos. Enfríe a temperatura ambiente y lea a 540 $m\mu$ contra un blanco de reactivo. Reste un blanco de reactivo. El resultado se obtiene extrapolando en una curva de calibración.

Curva de Calibración.

Se emplea una solución standard de glucosa para hacer la curva. Las soluciones se tratan de la misma manera que la muestra y se grafica transmitancia contra mg. de glucosa.

El resultado se reporta en azúcares totales como glucosa.

DETERMINACION DE CENIZAS

Se da el nombre de cenizas al residuo que queda de la combustión de una substancia cuando ésta es combustible. Las cenizas están constituidas por materia inorgánica de muy diversa índole dependiendo del producto de donde provienen.

Los procesos usados no varían mucho para los diferentes casos, sin embargo, hay ciertas diferencias entre los distintos métodos.

Determinación por el Método de Calcinación Sencilla con Aceite de Oliva.

Se toman 1-2 g. de la muestra y se colocan en un crisol de níquel o platino, sometiéndolo a un calentamiento de 100° C. para eliminar el agua. Se agregan unas gotas de aceite de oliva puro y se calienta suavemente hasta que cese el desprendimiento de gases. Se calcina después en la mulla al rojo cereza hasta obtener cenizas completamente blancas. El residuo se trata con solución de Carbonato de Amonio, se evapora y seca de nuevo, sometiéndolo a calcinación hasta peso constante.

DETERMINACION DE LAS VITAMINAS

MÉTODOS PARA LA DETERMINACION DE VITAMINAS

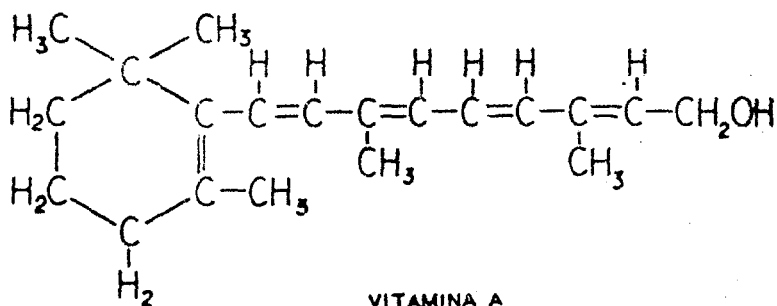
Vitamina A.

La vitamina A es una de las más complejas y sus métodos de determinación se basan más en su insaturación que en la reacción de un grupo específico, complicándose este problema por la existencia de isómeros y precursores.

La existencia de esta vitamina fué reconocida por los trabajos de Mc Collum y Davis y de Osborne y Mendel al observar que un factor existente en ciertas grasas era necesario para el crecimiento de las ratas.

Se ha demostrado que todos los animales necesitan la vitamina A, su deficiencia se demuestra por ceguera nocturna, atrofia de los tejidos epiteliales y del ojo.

La vitamina A se encuentra natural únicamente en los animales y se puede separar de la fracción insaponificable de sus grasas. Su constitución química fué establecida por los trabajos de Karrer y sus colaboradores siendo confirmados después.



Entre sus propiedades encontramos las siguientes:

Fórmula empírica	$C_{20}H_{30}O$.
Peso molecular	286.
Forma cristalina	Agujas amarillo pálidas.
Punto de ebullición	120-125° C. a 5×10^{-3} mm.
Punto de fusión	63-64° C.
Solubilidad	Soluble en casi todos los solventes orgánicos, insoluble en agua.
Actividad óptica	Ninguna.
Fluorescencia	Verde característico en el ultravioleta.

La vitamina A se destruye fácilmente con la luz ultravioleta y es oxidada fácilmente por el aire, pero estable al calentar en atmósfera inerte. Una característica importante es la facilidad que tiene para formar una reacción transitoria de color azul con el tricloruro de antimonio que tiene su absorción máxima a $620 \text{ m}\mu$.

En 1934 se definió la unidad internacional de vitamina A como la actividad biológica de 0.6 mcg. de β -caroteno.

Determinación por el Método Colorimétrico Utilizando la Reacción de Carr-Princo.

Este método está basado en la medición del color azul formado por la reacción entre la vitamina A y el tricloruro de Antimonio. La intensidad se mide a $620 \text{ m}\mu$, siendo la absorbencia una función de la concentración. Para evitar la destrucción de la vitamina por la luz, todas las operaciones se hacen en material ámbar o bajo luz tenue.

Reactivos.

Todos deben ser de especificaciones A. C. S. o tipo reactivo.

- 1.—**Solución de Hidróxido de Potasio.**—Se disuelven 50 g. de hidróxido de potasio en 50 ml. de agua.

- 2.—**Eter Dietílico.**—Se recomienda el U. S. P. o mejor. Deberá ser de destilación reciente.
- 3.—**Etanol.**—U. S. P. o S. D. 3-A.
- 4.—**Sulfato de Sodio granular anhidro.**—No debe retener la vitamina A. Para hacer la determinación de la retención de la vitamina, se agitan unos gramos del sulfato con 50-100 ml. de éter que contienen 100 unidades de vitamina A. Decante el éter y lave el Na₂SO₄ varias veces con éter. Los lavados no deberán volverse azules al ser tratados con 2-3 ml. de solución reactivo de tricloruro de antimonio. En caso contrario el sulfato debe ser descartado.
- 5.—**Fenoltaleína.**—Solución al 1% en etanol.
- 6.—**Cloroformo.**—Debe estar libre de humedad y fósgeno. El cloroformo se lava con agua varias veces, se decanta el agua y se seca sobre sulfato de sodio, se destila y guarda sobre sulfato de sodio o cloruro de calcio anhidros en botella ámbar.
- 7.—**Reactivo de Tricloruro de Antimonio.**—El tricloruro de antimonio se descompone fácilmente con la humedad, por lo que para preparar el reactivo todo el material deberá estar completamente seco y el peso del tricloruro de antimonio se obtiene pesando el pomo lleno, vaciando el contenido en un frasco de boca ancha, pesando nuevamente el frasco para obtener el peso del reactivo por diferencia disolviendo en cloroformo de manera de tener 100 ml. de solución por cada 25 g. de reactivo. Disuelva calentando o agitando. Filtre por sulfato de sodio anhidro a una botella ámbar. Se debe guardar en la obscuridad cuando no se use. El material debe lavarse con cloroformo antes de hacerlo con agua pues el SbOCl formado es insoluble en agua.
- 8.—**Standard de Referencia de Vitamina A. U. S. P.**—Se usa una solución en aceite de algodón de cristales del acetato de

la vitamina purificada. Cada gramo contiene 344 mg. de acetato ó 3 ma. de Vitamina A.

Procedimiento.—Se pesa una muestra representativa en el matraz de saponificación y simultáneamente se lleva una serie standard usando 0.5 g. de vitamina A standard. La muestra usada no deberá ser menor de 100 ma. ni mayor de un gramo.

Saponificación.—Añada al matraz de saponificación 30 ml. de etanol y 3 ml. de potasa. Caliente a reflujo durante 30 minutos o hasta que la saponificación sea completa. Para probar la completa saponificación se añade un poco de agua y se agita, no deberá aparecer enturbiamiento, en caso contrario la saponificación no ha sido completa y se deberá continuar el reflujo.

Extracción.—Lave el condensador con 10 ml. de agua, deje enfriar la mezcla y añada 30 ml. de agua pasando todo a un embudo de separación. Lave con agua el matraz y agréguela al embudo. Lave ahora con 30 ml. de éter y añádala al embudo de separación. Agite la mezcla, deje separar las dos fases. Si la mezcla se emulsiona se añaden algunos centímetros cúbicos de alcohol para romperla.

Vacío la parte acuosa en un segundo embudo, dejando el éter en el primero. Lave nuevamente el matraz con 30-50 ml. de éter, añadiéndolos al segundo embudo. Agite, deje separar y decante a un tercer embudo. Repita la operación. Añada todos los lavados etéreos al primer embudo y descarte la fase acuosa. Añada 50-100 ml. de Hidróxido de Potasio al extracto etéreo para eliminar los jabones ácidos, solubles en éter. Agite y elimine la fase acuosa. Lave con porciones de 50 ml. de agua hasta que los lavados sean neutros a la fenoltaleína. Después del último lavado se deja reposar durante 10 minutos y se elimina toda el agua separada.

Eliminación del solvente.—Filtre el extracto etéreo en un matraz a través de Sulfato de Sodio, distribuido en papel filtro o placa de vidrio porosa. Lave el embudo con dos porciones de éter de

25 ml. añadiendo los lavados al matraz donde está el filtrado. Evapore el extracto o una alícuota de éste a sequedad en baño maría ayudado del vacío y evaporando los últimos mililitros a la temperatura ambiente y bajo corriente de nitrógeno. Recupere inmediatamente el residuo en cloroformo diluyendo a 10 ml.

Medición de la absorbencia.—En un tubo del colorímetro ponga 2 ml. de cloroformo, colóquelo en el instrumento y añada con una pipeta de vaciado rápido 10 ml. de solución de Tricloruro de Antimonio y ponga el instrumento a su máxima deflexión (100% transmisión) Usando el filtro de 520 m μ .

En un segundo tubo se ponen 1 ml. de cloroformo, 1 ml. del problema, colocando el tubo en el instrumento, se añade una gota de anhídrido acético para eliminar toda humedad posible. Se añaden con la pipeta de vaciado rápido 10 ml. de solución de tricloruro de antimonio. Se lee inmediatamente en el punto de deflexión mínima del galvanómetro y dentro de los tres primeros segundos, obteniéndose el porcentaje de transmitancia.

En un tercer tubo se pone 1 ml. del problema y se agrega 1 ml. del standard de referencia. Póngalo en el colorímetro y haga la lectura de la misma manera que se hizo antes.

Convierta todas las transmitancias en absorbencias (2-log G_{110}) donde G_{110} es la lectura del galvanómetro a 620 m μ .

Para corregir para caroteno lea después de dos horas, calcule la absorbencia y réstela de la obtenida para las vitaminas.

Preparación de la curva Standard de Calibración.—Pese exactamente en un matraz de saponificación alrededor de 0.5 g. del standard de referencia y proceda como para la muestra. La solución de cloroformo contendrá alrededor de 25 unidades U. S. P. de vitamina por ml.

Prepare diluciones para tener de 5 a 25 unidades U. S. P. de vitamina por ml. Ponga el instrumento a su máxima deflexión con cloroformo y el reactivo.

A una serie de tubos añada 1 ml. de cada una de las diluciones y 1 ml. de cloroformo y mida el color exactamente de la misma manera que se hizo con el problema.

Convierta las transmitancias a absorbencias y grafique en papel rectangular las absorbencias contra unidades de vitamina. Dibuje una curva lo más uniforme posible pasando por el origen.

Esta curva deberá checarsé cuando se renueven los reactivos.

Cálculo de los resultados.—Usando la curva de calibración convierta las absorbencias en unidades U. S. P. de vitamina.

Repita para el problema más incremento y calcule el contenido de vitamina con la siguiente fórmula:

$$\text{UNIDADES U. S. P. por g.} = \frac{U \times R}{(T-U) \times W}$$

Siendo:

U = unidades de Vitamina A por ml.

T = unidades de vitamina A más standard de referencia.

R = unidades de vitamina A en el standard (calculadas).

W = peso de la muestra representada en U.

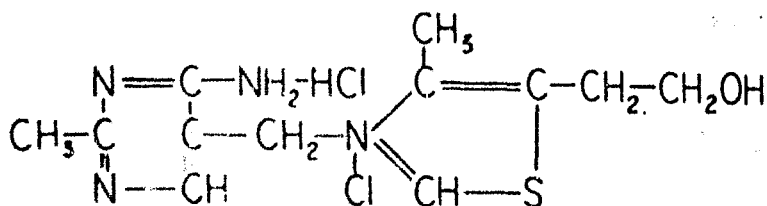
(peso de la muestra dividido por la dilución para tener el peso de la muestra por ml.)

En el caso de no usar el standard de referencia, los resultados son calculados directamente en unidades U. S. P. usando la curva de calibración.

Vitamina B₁ (Tiamina)

La vitamina B₁, o aneurina, es un factor alimenticio hidrosoluble que se logró aislar por cristalización en 1926 (Jansen y Donath). Su composición fué determinada en 1935 por Williams y Sindaus, siendo sintetizada en 1936 por Grewe.

La tiamina es una amina y representa la combinación de un anillo pirimidínico con otro tiazólico. Se encuentra en alimentos naturales y otros productos biológicos, ya sea en forma libre o combinada como un complejo protéico, y tiene la siguiente fórmula estructural:



VITAMINA B₁

Soluble en agua y alcohol al 70%. En su forma pura es polvo cristalino con olor a levadura y salado al gusto. Cristaliza de sus soluciones alcohólico-acuosas como agujas monoclinicas incoloras, sus cristales son higroscópicos absorbiendo una molécula de agua. Sus propiedades físicas son:

Fórmula empírica	C ₁₂ H ₁₇ ON.SCl ₂ .
Peso molecular	337.36.
Punto de fusión	246-250° C. (descomponiendo).
Rotación óptica	Ninguna.

En soluciones neutras o alcalinas, la tiamina se destruye rápidamente. Sin embargo, en soluciones ácidas (pH - 3.5) la vitamina se puede esterilizar a 120° C durante media hora sin descomposición aparente. En forma cristalina es muy estable y no es sensible a la oxidación atmosférica, sin embargo, en solución, la tiamina es bastante sensible a la oxidación y reducción. Su actividad se expresa en términos de U. I. establecida arbitrariamente como la actividad de 10 mg del producto de la absorción de un extracto de cáscara de arroz. La tiamina valorable muestra que 3 mcg. son equivalentes a 10 mg del extracto. De acuerdo con lo anterior la U. I. se definió como la actividad de 3 mcg. de tiamina Q. P. y por lo tanto 1 gr. contiene 333.0000 U. I.

Método de Determinación Colorimétrico de Melnick-Field-Emmett.

Este método se basa en la absorción de la tiamina en una solución acuosa de Super-Filtrol a un PH:4. En este estado se le tra-

ta con el reactivo para formar un compuesto rojo púrpura insoluble en agua. El compuesto se disuelve en alcohol al 95% y se compara con una serie standard tratada de la misma manera.

Reactivos.—1.—Superfiltrol (Filtrol Corp. Los Angeles, Cal.).

2.—Fenol solución al 0.5% en etanol de 95%.

3.—Azul de Timol (indicador).

4.—Hidróxido de Sodio. Solución 0.1 N.

5.—Reactivo de Prebenda - Mc Collum.

Solución A.—3.18 g. de p-aminoacetofenona se disuelven en 5 ml. de ácido clorhídrico conc. (37%) diluyendo a 500 ml. Esta solución debe guardarse en el refrigerador cuando no se use. Su duración es de 6 meses.

Solución B.—Solución de nitrito de sodio al 4.5%.

Solución C.—Se disuelven 20 g. de hidróxido de sodio y 28.8 de bicarbonato de sodio en agua y se diluye a un litro.

Diazotación.—La diazotación se hace sobre un baño de hielo usando 5 ml. de las soluciones A y B. Se mezclan las dos soluciones y se agita 10 minutos con un agitador eléctrico para que la reacción sea completa. Al final de ese tiempo se agregan 20 ml. de la solución B a la mezcla. La solución se agita manteniendo la temperatura entre 5° y 1° C. durante 20 min. Esta solución dura en estado satisfactorio 12 horas.

Preparación del reactivo.—Se prepara añadiendo 4 ml. de la para-aminoacetofenona diazotada a un matraz con 55 ml. de la solución C. Al mezclar estos reactivos aparece un color rojo púrpura que desaparece al agitar. La solución de vitamina se deberá ajustar a pH 5.0 a 6.0 inmediatamente antes de añadir el reactivo.

6.—Solución standard de tiamina.—Solución que contiene 50 mcg. de vitamina por ml.

7.—Takadiatzata.

8.—Papaina.

Procedimiento.—Tome 2-3 g. de la muestra en un Erlenmeyer de 250 ml. y añádale 100 ml. de una suspensión que contiene 0.1 g. de Takadiatzata y 0.1 g. de Papaina e incube a 37° C. durante 2 horas con agitación frecuente. Ajuste el pH a 4.5-5.0 y filtre. Tome alícuotas de 1.0, 2.5 y 5 ml. del filtrado y absorba en el superfiltrol.

Absorción.—Transfiera en tubos para centrifuga alícuotas de 1.0, 2.5 y 5 ml. del filtrado del problema y alícuotas de 0.5 a 5 ml. de la solución standard de tiamina. Diluya el problema y serie de standards a 5 ml. con agua destilada ajustando el pH a 4.0-5.0 con HCl si es necesario. Añada 0.1 g. de superfiltrol a cada uno de los tubos y mezcle perfectamente. Después de dejar reposar una hora con agitación frecuente, centrifugue y decante el líquido sobrenadante.

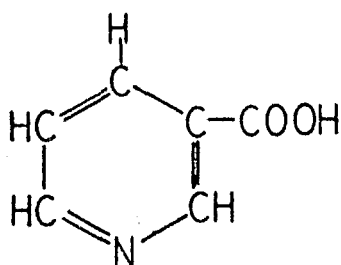
Desarrollo del color.—A cada tubo agregue 3 ml. de agua y 3 ml. de fenol y una gota de timol. Ajuste el pH a 7-8 con NaOH dil. Añada 6 ml. de reactivo final, mezcle y deje reposar 2 horas a temperatura ambiente. Filtre por un filtro Hirsch. Lave con 5 ml. de agua. Pase el papel filtro con el superfiltrol a un tubo de centrifuga de 15 ml., añada 4 ml. de etanol al 95%, agite para disolver el pigmento y separe por centrifugación y compare los colores de las soluciones usando el problema de color más cercano a la serie standard y calculando de acuerdo que la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de tiamina.

Niacina.

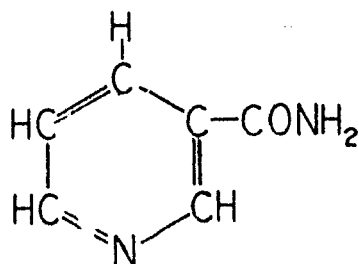
La niacina o ácido nicotínico es una de las vitaminas más importantes del complejo B. Sus propiedades físicas y químicas se conocen desde 1867, aunque como vitamina su conocimiento es relativamente reciente. Constituye parte de dos coenzimas: la co-dehidraza I y la co-dehidraza II que son esenciales para el metabolismo de los carbohidratos, por lo que se cree que todos los tejidos necesitan niacina para su metabolismo normal. La amida del ácido nicotínico (nicotinamida) es también biológicamente activa y es la forma principal en que se encuentra en los tejidos animales.

Su deficiencia determina la lengua negra de los animales y la pelagra en los humanos; muchos animales, tales como las ratas y pollos son capaces de sintetizarla por lo que parecen no necesitarla.

Químicamente la niacina corresponde al ácido 3-Piridincarbóxico y tiene la siguiente fórmula estructural:



NIACINA

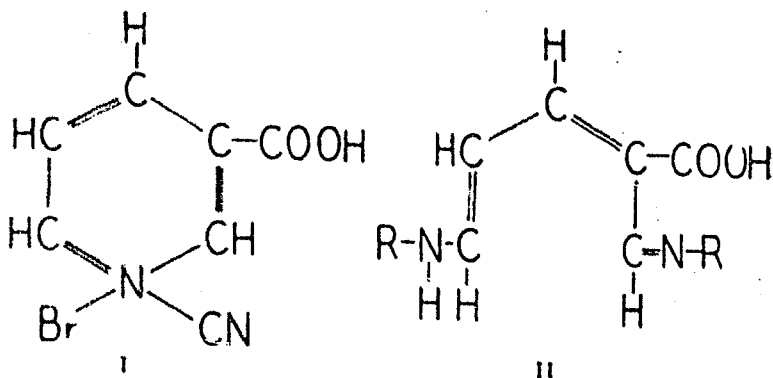


NIACINAMIDA

Entre sus propiedades físicas y químicas encontramos respectivamente para sus dos formas principales:

	Niacina	Niacinamida
Fórmula empírica	$C_6H_5O_2N$	$C_6H_7ON_2$
Peso molecular	123.11	122.12
Punto de fusión	235.5-236.5 °C.	128-131° C.
Punto de ebullición	Sublima	150-160° C. a 5×10^{-4} mm.
Absorción máxima	385 m μ .	212 m μ .
Forma cristalina	Agujas incoloras	Agujas incoloras.

Es soluble en agua y alcohol tanto el ácido como su amida, ambas formas son estables en forma seca y en solución acuosa no es afectada por la luz o el pH; es relativamente estable a los agentes oxidantes fuertes, reacciona con el bromuro de cianógeno para dar un compuesto pirimidínico (I) que reacciona con las aminas aromáticas para dar compuestos coloreados (II), los métodos químicos para su determinación están basados en esta propiedad y según las siguientes reacciones:



Determinación por el método del bromuro de cianógeno.

El método más usado para la determinación del ácido nicotínico se basa en la reacción de éste y el bromuro de cianógeno para dar un compuesto pirimidínico que unido a aminas aromáticas da compuestos coloreados. Las aminas usadas son muy variadas y se encuentran entre las siguientes: Anilina, β -Naftilamina, p-Aminofenol, Amoníaco, p-Aminofenilsulfonamida, etc. El color producido, controlando las condiciones de reacción, es proporcional a la cantidad de niacina presente y se puede medir con un fotocolorímetro. La determinación se verifica en condiciones tales que la niacina esté completamente hidrolizada, de ahí que la determinación incluya todas las formas de ácido nicotínico.

REACTIVOS.—1.—**Bromuro de cianógeno.**—Se satura agua con bromo a 5-10° C. y a la solución se agrega solución de cianuro de potasio al 10% hasta decoloración completa. Esta solución debe guardarse en el refrigerador.

2.—**Etanol Absoluto.**

3.—**Solución de Anilina.**—Se disuelven 4 g. de Anilina redestilada en 100 ml. de etanol.

4.—**Solución Standard de Acido Nicotínico.**—Solución con 100 mcg. por ml. en etanol.

5.—**Carbón vegetal (Darco).**

6.—**Hidróxido de Sodio. - Solución 18 N.**

7.—**Hidróxido de Sodio. - Solución 1 N.**

8.—**Buffer de Fosfato (Alcohólico).**—Disuelva 10 ml. de ácido fosfórico al 85% en 1960 ml. de agua, añada 30 ml. de NaOH al 15% y 333 ml. de etanol absoluto.

Procedimiento.—En un tubo se pone 1 g. de la muestra, se añaden 5 ml. de ácido clorhídrico conc. (1.18) y agua para tener un volumen de 15 ml. Se pone a baño maría durante 30-40 min. con agitación frecuente. Se enfría a temperatura ambiente y se diluye nuevamente a 15 ml. Añada 10 ml. de etanol y transfiera la mezcla a un Erlenmeyer de 150 ml. Añada exactamente 200 mg. de carbón vegetal, agite y filtre por papel filtro a temperatura ambiente.

Transfiera 8.33 ml. del filtrado a un matraz volumétrico de 10 ml., añada una gota de feniltaleína y neutralice con NaOH, 18N primero, y finalmente con NaOH, 1N., diluya a 10 ml. con agua.

Medición del Color.—De la solución anterior mida una alícuota de 3 ml., añada 7 ml. del buffer y determine el valor del blanco poniendo el aparato a 100% de transmitancia con una mezcla de 2 ml. de agua, 1 ml. de etanol y 6 ml. de CNBr y 1 ml. de anilina. A 3 ml. de la muestra añada 6 ml. de CNBr, 1 ml. de anilina. Trate igualmente una muestra de 3 ml. del standard. Agite bien después de cada adición. Lea las intensidades 5 a 10 min., después de mezclar en el colorímetro usando el filtro de 420 m μ . Haga lo mismo con las pruebas en blanco y calcule los microgramos en 100 gr.

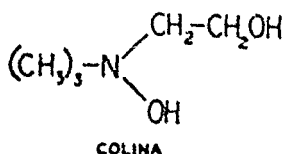
Cálculo de Resultados.—Haga los cálculos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Mcg. de niacina por g.} = \frac{25}{\text{dens. de color del standard}} \times \frac{\text{densidad de color corregida en la muestra}}{\text{peso de la muestra}} \times \text{factor de dilución.}$$

$$\text{factor de dilución} = \frac{\text{dil. inicial}}{\text{alícuota tomada}} \times \frac{\text{dil. alícuota}}{\text{alícuota tomada}} \text{ para la determinación.}$$

Colina.

La colina o hidróxido de trimetil-hidroxietyl amonio, es un líquido incoloro, higroscópico, viscoso y fuertemente alcalino. Se encuentra distribuido en la naturaleza, tanto en forma libre como combinada en plantas y animales. La tiamina, colina y vitaminas B₁ y B₂, están relacionadas básicamente con las necesidades y funciones de los aminoácidos. La colina y sus compuestos ejercen acción hipertensora de la presión sanguínea, además de provocar contracciones en la musculatura lisa, principalmente en la del intestino, por lo que está considerada como la hormona del peristaltismo intestinal. Tiene la siguiente fórmula estructural y sus constantes físicas son



Fórmula empírica	C ₄ H ₁₁ O ₂ N.
Peso molecular	121.13.
Forma	líquido viscoso.

Soluble en agua y alcohol e insoluble en éter. Inalterable a la ebullición en soluciones acuosas diluidas, descompone con los álcalis calientes formando trimetil amina. Sus sales son cristales blancos higroscópicos solubles en alcohol y agua, sus soluciones acuosas son prácticamente neutras siendo el cloruro de colina la sal más comúnmente usada para la preparación de standards, con un peso molecular de 139.57 (C₄H₁₀ONCl).

Determinación por el método colorimétrico Usando la Sal de Reinecke (Modificación del Método Engel).

Para la determinación de la colina en productos alimenticios y de origen biológico, se requiere extracción preliminar de los líquidos que la contienen; el metanol es el solvente más comúnmente usado. Para la determinación de la colina total, es indispensable la hidrólisis del residuo del extracto metanólico. Esta se efectúa con hidróxido de bario.

Entre los métodos de determinación los más usados y satisfactorios son el método químico basado en la precipitación de la colina con sal de Reinecke y su disolución en acetona para medir la intensidad del color rosa formado y el método microbiológico que utiliza la *Neurospora Crassa*.

El método químico que utiliza la sal de Reinecke no es específico por formarse precipitados con otros compuestos, sin embargo, si la precipitación se efectúa en medio alcalino, los compuestos con grupos carboxílicos quedan en solución, si la hidrólisis se efectúa con hidróxido de bario los compuestos que forman reineckatos precipitan como sales de bario y se eliminan en la filtración anterior a la adición del reactivo.

REACTIVOS: 1.—Metanol Puro.

2.—Solución Saturada de Hidróxido de Bario.

3.—Solución de Sal de Reinecke Amoniacal al 2%.
Disuelva el tetratiocianodiamino-cromito amoniacal (Sal de Reinecke) en metanol.

4.—Propanol.

5.—Acetona.

6.—Solución standard de Colina.—Disuelva 100 mg. de cloruro de colina pura en 100 ml. de agua. 1 ml. de solución contiene 0.001 g. de cloruro de colina ó 0.00087 g. de colina pura.

7.—Solución de Acido Acético al 20%.

Procedimiento.—Tome una muestra de 2 g. y póngalos en un extractor Soxhlet usando un dedal de porosidad media, extraiga 4

horas con 60 ml. de metanol. Separe el extracto y extraiga nuevamente con 30 ml. de metanol durante 4 horas. Junte los extractos y evapórelas a sequedad en baño de agua, conectando el vacío. Al residuo añada 30 ml. de solución de hidróxido de bario y caliente a reflujo durante 2 horas a 100° C. Se enfría, neutraliza con ácido acético usando fenolftaleína como indicador, se filtra con vacío por filtro de Gooch. Lave 6 veces con porciones de 5 ml. de agua destilada, enjuagando el matraz antes de agregar las porciones al filtro. Evapore los extractos alrededor de 35 ml. en baño de agua (abajo de 100° C). A la mezcla fría se añaden 6 ml. de solución de sal de Reinecke, poniendo la mezcla en el refrigerador durante cuatro horas para precipitación completa.

Medición del Color.—Filtre el reineckato de colina precipitado por asbesto en un crisol de Gooch, lavando 3 veces con porciones de 2.5 ml. de propanol a temperatura ambiente. (*)

Lea en el fotocolarímetro usando el filtro de 520 millimicrones y contra un blanco de acetona.

Curva de calibración.—Precipite de la misma manera la colina de la solución standard conteniendo de 0.2 a 5 mg. de cloruro de colina en el mismo volumen final usado para la precipitación del problema. Transforme los valores obtenidos para la serie de standards formada, conteniendo de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 hasta 5 mg. de colina por ml. de acetona. Estos pesos del clorhidrato de colina se toman por volumen (1 ml. contiene 1 mg. de colina). La transmitancia se transforma en absorción y se grafican contra mg. de colina para tener una curva standard.

El valor de la colina en la muestra se obtiene por interpolación de la curva standard.

Vitamina C (Ácido Ascórbico).

Entre las fuentes más importantes de la vitamina C encontramos a la papa, las frutas cítricas, el tomate, etc. Su actividad está relacionada con el contenido de ácido l-ascórbico.

(*) El reineckato de colina es parcialmente soluble en propanol, por lo que hay que controlar los lavados en tiempo y volumen.

Entre sus propiedades encontramos.

Fórmula empírica	C, H, O.
Peso molecular	176.0.
Punto de fusión	192° C.
Solubilidad	Soluble en agua y alcoholes metílico y etílico. Insoluble en solventes orgánicos éter, xilol, cloroformo.

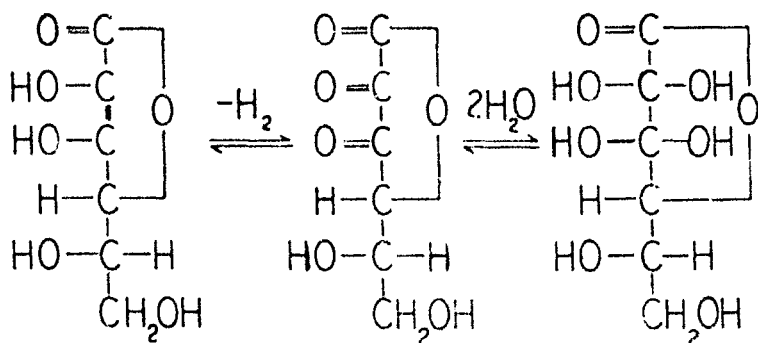
Absorción máxima en agua 265 m μ .

Potencial de oxidación—
reducción 0.166V a pH4 y 35° C.

Forma cristalina Polvo blanco cristalino.

El ácido ascórbico cristalino cuando está seco es estable por largos períodos de tiempo a la oxidación atmosférica y a la luz, a temperatura ambiente. En soluciones acuosas con pH inferior a 7.6 no es oxidado por el aire a menos de haber cobre presente o algún otro material que catalice la reacción. En presencia de aire y un catalizador se oxida a ácido dehidroascórbico, el cual es estable en pH inferior a pH4, pero sobre éste da rápidamente un compuesto irreversible biológicamente inactivo.

El ácido ascórbico tiene dos grupos enólicos, de ahí que cuando es oxidado mediante un oxidante apropiado pierde 2 átomos de hidrógeno dando ácido dehidroascórbico, siendo esta reacción reversible.



ACIDO ASCORBICO

ACIDO DEHIDROASCORBICO
FORMA CETONICA FORMA HIDRATADA

Tanto el ácido ascórbico como el dehidroascórbico poseen propiedades características a los azúcares como la formación de osazonas y conversión en furfural.

Determinación por el método fotométrico con 2-6 Diclorofenol-indofenol.

Los métodos para la determinación del ácido ascórbico se dividen en dos tipos el ensayo biológico y los métodos químicos, siendo preferidos los últimos por su mayor exactitud y rapidez.

La oxidación del ácido ascórbico con el 2-6 diclorofenol-indofenol es usada como base de técnicas para la determinación de ácido ascórbico. El método está basado en la medición de la decoloración del 2,6 diclorofenol-indofenol. La reducción del colorante por el ácido ascórbico es instantánea, a diferencia de las sustancias interferentes que lo reducen lentamente.

REACTIVOS: Todos deben ser de especificaciones A. C. S. o reactivo y el agua usada deberá estar libre de cobre.

1. **Solución de Acido Metafosfórico al 6%.--**Disuelva al calentar 60 g. de ácido metafosfórico en gránulos o barras, en 900 ml. de agua destilada en vidrio. Diluya a un litro y guarde la solución en el refrigerador cuando no se use.
2. **Solución de Acido Metafosfórico al 3%.--**Diluya 500 ml de la solución anterior a 1 litro.
3. **Buffer de Citrato de Sodio.--**Disuelva 29.4 g. de ácido cítrico en 140 ml. de solución 2N. de hidróxido de Sodio (libre de carbonato) y diluya a 250 ml. con agua destilada.
4. **Solución Standard de Acido Ascórbico.--**Disuelva 100 mg. de ácido ascórbico en ácido metafosfórico al 3% y diluya a 100 ml. con el mismo solvente. Esta solución contiene 1 mg. de ácido ascórbico por ml.
5. **Solución de 2-6 Diclorofenol-indofenol. Solución stock.--**Disuelva 200 mg. de la sal sódica en 150

ml. de agua caliente que contiene 42 mg. de bicarbonato de sodio, enríe y diluya a 200 ml. Guarde esta solución estable por 5 semanas, en el refrigerador.

Solución colorante.—Pipetee 4 ml. de la solución stock en un matraz volumétrico y diluya con agua bidestilada hasta el aforo. Esta solución es estable cinco días a 3° C.

Standardización del Acido Ascórbico por Titulación Iodométrica.

El ácido ascórbico tiene por lo general una pureza de 85 a 95% y las soluciones quedan débiles dando resultados erróneos, por lo que cuando se requiere un trabajo exacto el ácido ascórbico deberá standardizarse.

REACTIVOS:—Solución de Ioduro de Potasio al 10%.—Disuelva 10 g. de ioduro de potasio en 90 ml. de agua destilada.

2.—Acido Clorhídrico 1N.

3.—Solución de Almidón al 0.7%.

4.—Solución 1N de Biniodato de Potasio.—La sal se puede obtener fácilmente en forma pura y seca a 100-105° C sin descomposición, sus soluciones se guardan inalterables indefinidamente. Seque la sal durante una hora a 100-105° C, enríe en el desecador. Pese exactamente 3.2495 g. disuelva en agua bidestilada, pase a un matraz volumétrico de un litro y diluya a la marca.

Standardización.—Mida exactamente 1 ml. del biniodato standard en un Erlenmeyer de 125 ml. Añada 10 ml. de agua, 2 ml. de ioduro de potasio al 10% y 2 ml. de HCl 1N. Titule con la solución de ácido ascórbico por standardizar hasta ligero tono amarillo de iodo. Añada 1 ml. de almidón. Continúe hasta la desaparición del color azul. Calcule la pureza de acuerdo con que el ácido ascórbico 0.1% es $1/176 = 0.00568$ molar y teóricamente se deben usar 8.8 ml. en la titulación.

Procedimiento.—Tome 1-2 g. de la muestra y mézclelos en un mortero o con un agitador eléctrico, con 25 ml. de HPO, al 3%. Transfiera la mezcla a un tubo para centrífuga de 50-100 ml. y centrifugue. Pase el líquido sobrenadante a un matraz volumétrico de 50 ml. Lave el mortero con 10 ml. de HPO, al 3%, mézclelo en el tubo de centrífuga y separe como antes, mezcle los extractes y diluya a 50 ml., añada 7 ml. del buffer para pH 3.5-3.7.

Determinación fotométrica.—Ponga el colorímetro a 100% de transmitancia con el filtro de 520 m μ , usando agua destilada. Mida 5 ml. del extracto bufferizado en el tubo del colorímetro y midiendo el tiempo añada 5 ml. de la solución colorante de 2-6 diclorofenol-indofenol con una pipeta de vaciado rápido, colocando la pipeta bajo la superficie del líquido y contando el tiempo cuando las 3/4 partes del líquido hayan salido. Anote las lecturas a los 5 segundos (G_5) y 10 seg. (G_{10}). (*) Añada un cristal de ácido ascórbico y anote la lectura (G_1).

Prepare un tubo conteniendo 5 ml. de blanco del reactivo preparado mezclando 25 ml. de HPO, y la misma cantidad de buffer usado en el extracto. Agregue 5 ml. del colorante y un cristal de ácido ascórbico. Con esta mezcla ponga el colorímetro en la lectura obtenida para G_1 . Ponga otro tubo con la misma mezcla pero sin agregar ácido ascórbico. Anote la lectura G_2 .

Standarización con Acido Ascórbico Puro.—A 25 ml. de la solución standard de ácido ascórbico (10 mcg. por ml. de HPO, al 3%), añada 70 ml. del buffer de citrato. De esta solución bufferizada mida 5, 4, 3, 2, 1 ml. en tubos para colorímetro y añada respectivamente 0, 1, 2, 3, 4 ml. de la mezcla de fosfato-buffer citrato para hacer cantidades de 5 ml. exactamente. Usando estas soluciones, determine G_5 , G_{10} , y G_1 como se explicó para la muestra. Los microgramos en cada tubo son respectivamente: 39.1, 31.2, 23.4, 15.6 y 7.8.

(*) La lectura se puede hacer también a los 15 y 30 seg., pero las sustancias interferentes podrán actuar en un grado mayor que en el tiempo recomendado de 5 y 10 seg.

Determinación de la Constante del Instrumento.—(K).—Determine las constantes del instrumento para los valores obtenidos para la serie standard con la siguiente fórmula.

$$Ca = K (\log [G_{a_1} - (G_{a_2} - G_{a_1}) - \log G_b])$$

Ca = mcg. de ácido ascórbico por ml. de solución bufferizada.

K = constante del instrumento

G_{a₁} = lectura a 5 seg.

G_{a₂} = lectura a 10 seg.

G_b = lectura para el blanco.

Solamente se usa aquel rango de constante en el que K no varíe más de 5%.

Cálculo del Acido Ascórbico en la Muestra.—El cálculo del ácido ascórbico en la muestra se hace con la siguiente fórmula:

$$\text{mg. en 100 g.} = \frac{K(\log (G_s - (G_{10} - G_s)) - \log G_b) \times d. f.}{\text{g. de la muestra en la dil. final.}} \times 100$$

K = cte. del instrumento

G_s = lectura para la muestra a los 5 seg.

G₁₀ = lectura para la muestra a los 10 seg.

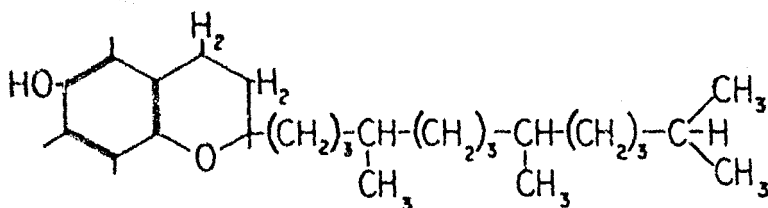
G_b = lectura para el blanco

d. f. = dilución final.

Vitamina E (Alfa-Tocoferol).

Hay cuatro formas de tocoferoles designadas como alfa, beta, gamma y delta tocoferoles usualmente no diferenciados. El alfa-tocoferol corresponde al (2, 5, 7, 8 tetrametil-2) -trimetiltridecil-6-cromanol. Los tocoferoles son aceites viscosos y éstos y algunos de sus ésteres se han obtenido en forma cristalina. El dl-d-tocoferol sintético es el standard de referencia para la unidad internacional que representa la potencia de la vitamina E y equivale a 1 mg. de dl-α-tocoferil-acetato.

El núcleo de tocol puede representarse en la siguiente forma:



VITAMINA E

Entre sus propiedades físicas encontramos:

Aceites viscosos amarillo claro.

Solubles en grasas y rápidamente solubles en la mayoría de los solventes orgánicos.

Estable al calor y álcalis en ausencia de aire.

Se oxida rápidamente con el aire en presencia de álcali.

Estable a los ácidos. Estable a la luz visible pero descompone rápidamente a la ultravioleta. Por su fácil oxidación son antioxidantes efectivos por el hidróxilo fenólico, forma ésteres y éteres en el hidróxilo fenólico. Se oxida con el cloruro férrico o cloruro áurico a la p-quinona y el ácido nítrico y nitrato de plata la oxidan a la o-quinona.

Sus constantes físicas son:

	Fórmula Empírica	Peso Molecular	Absorción Máx.
α -tocopherol	$C_{55} H_{100} O_2$	430	292
β -tocopherol	$C_{51} H_{94} O_2$	400	297
γ -tocopherol	$C_{51} H_{94} O_2$	416	298
δ -tocopherol	$C_{57} H_{104} O_2$	402	298

La función fisiológica de la vitamina E no está bien definida y ha sido reportada como el factor antiestéril. La vitamina E no es tóxica y se desconoce la hipervitaminosis E.

Determinación con 2,2' Bipyridina.

Generalmente todos los métodos para la determinación de la vitamina E la reportan como tocoferoles totales. El mayor problema

presentado en la determinación es la eliminación de los interferentes y se ha tratado de efectuar en muchas formas, siendo la más efectiva la saponificación, aunque con el inconveniente de tenerse que efectuar en una atmósfera inerte por oxidarse los tocoferoles en presencia de aire.

Los métodos de determinación están basados en reacciones de oxidación-reducción y la intensidad y cantidad de color desarrollados varían con el solvente usado.

REACTIVOS:—1.—Metanol.

2.—Etanol Absoluto.

3.—Solución de Hidróxido de Potasio al 11.2%.

4.—Eter Dietílico.

5.—Solución de Hidróxido de Potasio al 1%.

6.—Bióxido de Carbono.

7.—Solución de Cloruro Férrico al 0.1%.—Disuelva 1 g. de cloruro férrico hexahidratado en 100 ml. de etanol absoluto.

8.—Solución de 2, 2' Bpiridina al 0.25%.—Disuelva 0.25 g. de 2,2'-bipiridina en 100 ml. de etanol absoluto redestilado sobre permanganato de potasio.

9.—Hexano Redestilado.

10.—Solución Standard de Tocoferol.—Disuelva 100 mg. de dl- α -tocoferol en etanol absoluto. 1 ml. contiene 1 mg. de α -tocoferol.

Procedimiento - Saponificación.—Refluje una muestra de 5 g. bajo atmósfera de nitrógeno durante 10 min. usando 10 ml. de KOH al 11.2% en metanol, enfríe, añada 15 ml. de metanol y 40 ml. de agua. Extraiga con porciones de éter de 50 ml., libre de peróxido. Lave sucesivamente los extractos etéreos combinados, con 50 ml. de agua, 50 ml. de KOH al 1% y dos veces con 50 ml. de agua, seque sobre cloruro de calcio y evapore a sequedad con vacío y atmósfera de bióxido de carbono. Disuelva con etanol absoluto redestilado y diluya a 10 ml.

Determinación.—Tome 1 ml. de la dilución anterior. Añada 1 ml. del reactivo de 2, 2'-bipiridina y 1 ml. de cloruro férrico. Añada 22 ml. de etanol absoluto, sin mezclar. Tome el tiempo y mezcle y lea exactamente 25 min. después, usando un filtro de 520 $m\mu$, contra un blanco de reactivo.

Curva de Calibración.—Se prepara la curva usando la solución standard de tocoferol. Se toman alícuotas de 0,5, 1,0, 2, 3, 4, 5 ml., se evaporan y se desarrolla el color. Se determina un blanco en el cloruro férrico y 2, 2'-bipiridina al mismo tiempo que se hace la determinación. Se grafican miligramos de tocoferol contra densidad óptica.

Cálculo del Resultado.—El resultado se obtiene por interpolación con la curva standard.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS
OBTENIDOS

Aspecto de las muestras.—La jalea real es una pasta de olor y sabor acres característicos, de color blanco amarillento opalescente. Expuesta al aire se transforma rápidamente en una pasta gomosa de color amarillo a consecuencia de la pérdida de humedad por evaporación. Guardada en la obscuridad y en envases cerrados se conserva inalterable durante largos períodos de tiempo.

Es parcialmente soluble en agua y éter, el alcohol la disuelve parcialmente y coagula otra parte debido al contenido en proteínas coaguladas por el alcohol.

La papilla real tiene un pH entre 3.5 y 4.5. Descompone al calentar carbonizando parcialmente.

Determinación de Humedad.—En la determinación de humedad se ensayaron los métodos comunes de determinación por pérdida de peso y extracción con xilol. En el primer método se encontró que la papilla descomponía quedando un residuo de color café debido a la carbonización parcial del producto. En el método de extracción con xilol en pruebas efectuadas por cuadruplicado se encontraron los siguientes resultados

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	0.8317 g.
Extracto a 22.5° C.	0.50 cm ³ .
Densidad del agua a 22.5° C	0.997684.
Peso del agua	0.498842 g.
Porcentaje de humedad	59.97 %.

Muestra Núm. 2.

Peso de la muestra	1.2493 g.
Extracto a 22.0° C.	0.78 cm ³ .
Densidad del agua a 22° C.	0.99779.
Peso del agua	0.779813 g.
Por ciento de humedad	62.42%.

Muestra Núm. 3.

Peso de la muestra	0.9742 g.
Extracto a 23° C.	0.60 cm ³ .
Densidad del agua a 23° C.	0.99756.
Peso del agua	0.61569 g.
Por ciento de humedad	63.20%.

Muestra Núm. 4.

Peso de la muestra	1.1837 g.
Extracto a 23° C.	0.76 cm ³ .
Densidad del agua a 23° C.	0.97756.
Peso del agua	0.745849 g.
Por ciento de humedad	63.01%.

Determinación de azúcares totales.—En esta determinación se utilizó el método descrito para los azúcares totales usando invertasa de Wallestein para invertir los azúcares; desarrollando el color con ácido 2-4 dimercaptofenolico, hacer la comparación contra una solución standard de glucosa. Los resultados obtenidos por interpolación en pruebas efectuadas por cuadruplicado fueron los siguientes:

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	0.9512 g.
Azúcares totales en 0.1 ml de la muestra	116 mcg.
Azúcares totales en la muestra	1.160 g.
Por ciento de azúcares totales	12.2%.

Muestra Núm. 2.

Peso de la muestra	1.3259 g.
Azúcares totales en 0.1 ml. de la muestra	158 mcg.
Azúcares totales en la muestra	.158 g.
Porcentaje de azúcares totales	11.98%.

Muestra Núm. 3.

Peso de la muestra	1.1216 g.
Azúcares totales en 0.1 ml. de la muestra	133 mcg.
Azúcares totales en la muestra	.133 g.
Porcentaje de azúcares totales	11.86%.

Muestra Núm. 4.

Peso de la muestra	0.9886 g.
Azúcares totales en 0.1 ml. de la muestra	158 mcg.
Azúcares totales en la muestra	0.158 g.
Porcentaje de azúcares totales	12.04%.

Determinación de cenizas.

Utilizando el método descrito de calcinación sencilla y en pruebas por cuadruplicado, calcinando a 700° C. durante 2 horas se obtuvieron los siguientes resultados.

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	0.0274 g.
Residuos por calcinación	0.0007 g.
Porcentaje de cenizas	2.55%.

Muestra Núm. 2.

Peso de la muestra	0.7527 g.
Residuo por calcinación	0.0188 g.
Porcentaje de cenizas	2.53%.

Muestra Núm. 3.

Peso de la muestra	1.0049 g.
Residuo por calcinación	0.0224 g.
Por ciento de cenizas	2.53%.

Muestra Núm. 4.

Peso de la muestra	0.9337 g.
Residuo por calcinación	0.0237 g.
Por ciento de cenizas	2.54%.

Determinación de Vitamina A.

Según el método descrito de Carr-Prince, empleando el tricloruro de antimonio para desarrollar el color azul transitorio y en determinaciones efectuadas por triplicado y sin usar el standard de referencia, se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	0.9342 g.
Valor corregido para la absorbencia	0.0000.
Por ciento de vitamina A en la muestra	0.00%.

Muestra Núm. 2.

Peso de la muestra	0.8726 g.
Valor corregido para la absorbencia	0.0000.
Por ciento de vitamina A en la muestra	0.00%.

Muestra Núm. 3.

Peso de la muestra	1.2683 g.
Valor corregido para la absorbencia	0.0000.
Por ciento de vitamina A en la muestra	0.00%.

Determinación de la Vitamina B₁.

Se determinó la vitamina B₁ según el método colorimétrico de Melnick-Field-Emmett de titulación visual en pruebas por cuadruplicado, encontrándose:

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	2.5923 g.
Mcg. de Vitamina B ₁ en la muestra	8.29 mcg.
Mcg. de Vitamina B ₁ en 1 g. de muestra	3.2 mcg.

Muestra Núm. 2.

Peso de la muestra	3.8424 g.
Mcg. de Vitamina B ₁ en la muestra	21.51 mcg.
Mcg. de Vitamina B ₁ en 1 g. de muestra	5.6 mcg.

Muestra Núm. 3.

Peso de la muestra	1.4712 g.
Mcg. de Vitamina B ₁ en la muestra	5.88 mcg.
Mcg. de Vitamina B ₁ en 1 g. de muestra	4.0 mcg.

Muestra Núm. 4.

Peso de la muestra	1.3845 g.
Mcg. de Vitamina B ₁ en la muestra	6.5 mcg.
Mcg. de Vitamina B ₁ en 1 g. de muestra	3.9 mcg.

Determinación de Niacina.

Utilizando el método del bromuro de cianógeno descrito en el presente trabajo se encontró en pruebas por triplicado:

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra 1.1873 g.

La muestra se diluyó a 25 ml. después de la hidrólisis, se tomó una alícuota de 8.33 ml. y se diluyó a 10 ml. utilizándose una alícuota de 3 ml. para la determinación, el factor de dilución es por lo tanto:

$$f.dil = \frac{25}{8.33} \times \frac{10}{3} = \frac{250}{24.99} = 10.00$$

densidad del color del standard 0.7823

densidad del color corregido 0.3163

$$\text{mcg. de niacina} = \frac{25}{0.7823} \times \frac{0.3163}{1.11873} \times 10 =$$

Mcg. de niacina en un gramo de la muestra = 85 mcg.

Muestra Núm. 2.

Peso de la muestra 1.3793 g.

Factor de dilución 10.00.

Densidad del color del standard 0.7823.

Densidad del color corregido 0.4044.

$$\text{Mcg. de niacina por g.} = \frac{25}{0.7823} \times \frac{0.4044}{1.3793} \times 10 =$$

Mcg. de niacina por g. de muestra 93.5.

Muestra No. 3

Peso de la muestra	1.7915 g.
Factor de dilución	10.00.
Densidad del color del standard	0.7823.
Densidad del color corregido	0.5282.

$$\text{Mcg. de niacina} = \frac{25}{0.7823} \times \frac{0.5282}{1.7915} \times 10.00$$

Mcg. de niacina en un gramo de la muestra = 85 mcg.

Determinación de Colina.

Se determinó por el método colorimétrico de la sal de Reincke en pruebas por cuadruplicado obteniéndose:

Muestra No. 1

Peso de la muestra	1.8227 g.
Mcg. de colina en la muestra	9.11 mcg.
Mcg. de colina en 1 g. de la muestra	5.1 mcg.

Muestra Núm. 2

Peso de la muestra	1.7443 g.
Mcg. de colina en la muestra	21.80 mcg.
Mcg. de colina en 1 g. de la muestra	12.5 mcg.

Muestra No. 3

Peso de la muestra	0.9831 g.
Mcg. de colina en la muestra	10.51 mcg.
Mcg. de colina en 1 g. de la muestra	10.69 mcg.

Muestra Núm. 4.

Peso de la muestra	2.3115 g.
Mcg. de colina en la muestra	21.17 mcg.
Mcg. de colina en 1 g. de la muestra	9.16 mcg.

Determinación de Acido Ascórbico.

En la determinación del ácido ascórbico se usó el método de determinación con 2-6 diclorofenol-indofenol, encontrándose una constante K para el instrumento de:

$$Ca = K(\log(G_{a1} - G_{a2})) - \log G_b).$$

Se usó para la determinación un standard que contenía 7.82 mcg. por ml.

$$Ca = 7.82 \text{ mcg/ml.}$$

$$G_{a1} = 72.3.$$

$$G_{a2} = 73.4.$$

$$G_b = 41.5.$$

$$7.82 = K(\log(72.3 - (73.4 - 72.3)) - \log 41.5).$$

$$K = 31.809 \text{ mcg. por ml.}$$

En las pruebas hechas por duplicado se obtuvieron resultados negativos para las dos muestras analizadas.

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	2.3016 g.
Constante del instrumento	31.809 mcg. por ml.
Dilución final	50 ml.
g. de muestra en la dilución	0.230 g.

$$G_s = 43.2.$$

$$G_{10} = 41.5.$$

$$G_n = 41.5.$$

$$\text{Mcg. por 1 g. de muestra} = \frac{0.0318 (\log(43.2 - (43.2 - 41.5)) - \log 41.5) \times 50}{0.230}$$

Mcg. de ácido ascórbico por 1 g. de muestra = 0.0 mg.

Muestra Núm. 2

Peso de la muestra	2.1903 g.
Constante del instrumento	0.0318 mg. por ml.
Dilución final	50 ml.
g. de muestra en la dilución	0.219 g.

$G_1 = 44.2$.

$G_{1s} = 41.5$.

$G_2 = 41.5$.

$$\text{Mcg. por 1 g. de muestra} = \frac{0.0318(\log(44.2-(44.2 - 41.5))-\log 41.5) \times 50}{0.219}$$

Mcg. de ácido ascórbico por 1 g. de muestra = 0.0 mg.

Determinación de Vitamina E.

Se efectuó la determinación según el método descrito desarrollando el color con cloruro férrico y 2,2'-bipiridina, obteniéndose para las determinaciones efectuadas por sextuplicado resultados negativos.

Muestra Núm. 1.

Peso de la muestra	4.9235 g.
Mcg. de tocoferoles en la muestra	0.00 mcg.

Muestra Núm. 2

Peso de la muestra	3.8318 g.
Mcg. de tocoferoles en la muestra	0.00 mcg.

Muestra Núm. 3.

Peso de la muestra	4.9592 g.
Mcg. de tocoferoles en la muestra	0.00 mcg.

Muestra Núm. 4.

Peso de la muestra	2.1297 g.
Mcg. de tocoferoles en la muestra	0.00 mcg.

Muestra Núm. 5.

Peso de la muestra	1.8736 g.
Mcg. de tocoferoles en la muestra	0.00 mcg.

Muestra Núm. 6.

Peso de la muestra	1.3692 g.
Mcg. de tocoferoles en la muestra	2.3 mcg.
Mcg. de tocoferoles en 1 g. de la muestra	1.6 mcg.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—A. B. C. & X. Y. Z of Bee Culture.—A. I. Root (1950).
- 2.—Apicultura Moderna.—Pablo Aragón Loyva. (1945).
- 3.—Colorimetric Methods of Analysis—III.—Snell & Snell.—3th. Ed. C. Van Nostrand Co. (1953)
- 4.—Handbook of Chemistry & Physics—Hodgman C. D.—30th. Ed. Chemical Rubber Publishing Co. (1948).
- 5.—Hellige Clinical Handbook—Hellige, Inc. (1953).
- 6.—La Conduite du Rucher—E. Bertrand—Imp. Réunios, S. A.—Laussanno, Suiza (1950)
- 7.—Methods of Vitamin Assay—2a Edición—Interscience Publishers, Inc. New York (1951)
- 8.—Methods of Vitamin Determination.—B. Connor Johnson.—Burgess Publ. Co. (1948)
- 9.—Organic Chemistry—Fieser & Fieser—D. C. Heath & Co. (1944).
- 10.—Organic Chemistry—Hill and Koley—B. Lankston Co. (1947).
- 11.—Paper Chromatography—R. J. Block Academic Press Inc. (1952).
- 12.—Practical Methods in Biochemistry—Koch and Hanke.—6a.—Ed. Williams and Wilkins (1953)
- 13.—Principles and Practice of Chromatography.—Zechmeister and Chohnoky.—John Wiley & Sons (1951).
- 14.—Queen Rearing—L. Snelgrove—Londres. (1946).
- 15.—Scott's Standard Methods of Analysis 5th. Edition.—D. Van Nostrand Co. Inc. (1952)
- 16.—The Hive and the Honey Bee—Ed. por Roy A. Grout. (1949).
- 17.—Tratado de Bioquímica—B. Harrow 2a Edición. Atlante, S. A. (1950). México
- 18.—Tratado de Química Orgánica—Dr. P. Karrer, México. (1946).
- 19.—Zoología—E. Perrier. Ed. Nacional (1944).