



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo y validación de un método analítico  
por cromatografía de líquidos de alta eficiencia  
para evaluar el contenido de acetina en propóleos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ELIZABETH HERNÁNDEZ FUENTES



MÉXICO, D.F.

2011



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.

## **JURADO ASIGANADO**

**Presidente:** Profesor: María Teresa Buentello Rodríguez

**Vocal:** Profesor: Rogelio Gregorio Pereda Miranda

**Secretario:** Profesor: Blanca Estela Rivero Cruz

**1er. suplente:** Profesor: Ricardo Rodríguez Sáenz

**2do. suplente:** Profesor: José Fausto Rivero Cruz

### **Sitio donde se desarrolló el proyecto:**

Laboratorio 111. Conjunto E

Facultad de Química UNAM

### **Asesor**

---

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

### **Supervisor Técnico**

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

### **Sustentante**

---

Elizabeth Hernández Fuentes

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo experimental fue realizado mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos ICYT DF PICSA 10-27 y PAPIIT IN223411.

A la DGAPA a través del proyecto PAPIIT IN223411 por la beca otorgada.

Al Dr. Fausto Rivero por su asesoría y colaboración durante el desarrollo del presente trabajo de tesis. También, por proporcionar el producto natural utilizado en el presente proyecto.

A los MVZ Ángel López Rodríguez y Adriana Correa Benítez por su asesoría y por proporcionar el propóleo necesario para realizar el presente trabajo experimental.

A los miembros del jurado María Teresa Buentello Rodríguez y Rogelio Gregorio Pereda Miranda por la revisión del manuscrito de tesis.

A la Dra. Blanca Rivero por su loable asesoría y colaboración para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

## **DEDICATORIAS.**

A mis padres: Angiee por tu gran esfuerzo, dedicación y apoyo que siempre nos has brindado, pero sobre todo por tu paciencia y amor. Gracias por guiarme al camino que hoy sigo. A ti papá por tu gran apoyo y por incitarme a no claudicar ante los obstáculos de la vida. A ambos gracias por su perseverancia.

A mis hermanos: Daniel y Patricia, por su apoyo y por los buenos momentos que pasamos juntos; a Fernando por ser como un hermano, gracias por los consejos. A mis sobrinos por que le dan un toque especial a mi vida.

A la Dra. Blanca por confiar en mí, por su paciencia y por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, gracias por todo el apoyo que me ha brindado.

A todos mis amigos con los que eh compartido buenos y malos momentos, sin ningún orden en particular a Oscar, Daniel, César, Heysol, Frank, Marco, Lupita, Jesús, Ivonne, Armando, Pablo, Liz, Carla, Héctor, Cristina, Adriana, Mónica, Esmeralda, Marisol, Gaby, Fabián, Blanquita, Rodrigo, George, Mary, Maru, Arturito, David, Félix, Francisco, Edgar, Ale, Janeth, a mis amigos del lab. 121 Jaquelin, Maru y Paco, de cada uno de ustedes me llevo muchas cosas buenas, porque compartí risas y lágrimas, gracias por formar parte de mi vida; a Jonathan por su amistad, consejos y compañía, aprendí la lección.

A la UNAM por abrirme sus puertas y permitirme crecer profesionalmente.

***¡MEXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!***



---

***Un logro momentáneo no satisface  
nuestras necesidades más profundas,  
hay una competencia que se llama “vida”  
y en ella es que debemos obtener el oro.***



## ÍNDICE

	Página
1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 GENERALIDADES DE LOS PROPOLEOS.....	3
2.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	8
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	12
3.1 PROPÓLEO .....	12
3.2 EXTRACTO DE PROPÓLEO.....	12
3.2.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	12
3.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE) .....	12
3.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE TRABAJO .....	13
3.5 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES.....	13
3.6 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	14
3.6.1 ESPECIFICIDAD/ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA .....	14
3.6.2 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.....	14
3.6.3 LINEALIDAD.....	14
3.6.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	14
3.6.3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	15
3.6.4 EXACTITUD.....	15
3.6.5 PRECISION.....	15
3.6.5.1 PRECISION DEL SISTEMA.....	15
3.6.5.2 PRECISION DEL MÉTODO (REPETIBILIDAD).....	16
3.6.5.3 PRECISION DEL MÉTODO (REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO).....	16
3.6.6 ROBUSTEZ DEL MÉTODO .....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	18
4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	18
4.1.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA .....	22
4.1.2 ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.....	23
4.1.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	26
4.1.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO Y EXACTITUD.....	29
4.1.5 PRECISIÓN.....	33
4.1.5.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	33
4.1.5.2 PRECISIÓN DEL METODO .....	34
4.1.5.3 PRECISIÓN INTERMEDIA .....	35
4.1.6 ROBUSTEZ.....	36
5. CONCLUSIONES .....	43
6. PERSPECTIVAS .....	44
7. BIBLIOGRAFÍA .....	45
8. ANEXOS .....	49
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	v



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
TLR	Toll-like Receptor
IL	Interleucina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
mg	Miligramo
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
CAPE	Éster fenil etílico del ácido cafeíco
NF-κB	Factor Nuclear kappaB
NFAT	Factor Nuclear Activado por células T
IFN- G2	Interferon-gamma GapII
M	Mitosis
ADN	Ácido desoxirribonucleico
kg	Kilogramo
G1	Gap I
p53	Proteína 53
P21/WAF1	Inhibidor de ciclina 1A dependiente de cinasa
HCC	Carcinoma Hepatocelular
FasL	Ligando Fas
NO	Óxido Nítrico
Km	Kilómetro
g	Gramo
L	Litro
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
UV	Ultravioleta
ABC	Área Bajo la Curva
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
μg	Microgramo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
TFA	Ácido trifluoroacético
MeOH	Metanol
°C	Grado Centígrado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
nm	Nanómetro
EtOH	Etanol
NaOH	Hidróxido de Sodio
HCl	Ácido clorhídrico
DER	Desviación Estándar Relativa
t <sub>R</sub>	Tiempo de Retención
S	Desviación Estándar
IC	Intervalo de confianza





## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Aspecto físico del propóleo .....	4
Figura 2. Regiones apícolas de México .....	19
Figura 3. Cromatograma obtenido con el extracto etanólico del propóleo.....	21
Figura 4. Cromatograma correspondiente a una solución de 500 µg/mL de acetina.....	22
Figura 5. Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) en condiciones normales.....	24
Figura 6. Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) después de someterse a un tratamiento con NaOH 1 M.....	24
Figura 7. Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) después de someterse a un tratamiento con HCl 1 M.....	24
Figura 8. Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) después de someterse a un tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%.....	25
Figura 9. Gráfica que ilustra la relación lineal entre las variables.....	27
Figura 10. Gráfica que ilustra la relación lineal entre las variables del método.....	31
Figura 11. Cromatograma de la solución estándar de acetina en condiciones normales de operación (Cuadro 4).....	38
Figura 12. Cromatograma de la solución estándar de acetina registrado a una longitud de onda de 315 nm.....	38
Figura 13. Cromatograma de la solución estándar de acetina registrado a una longitud de onda de 325 nm.....	38
Figura 14. Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando un volumen de inyección de 15 µL.....	39
Figura 15. Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando un volumen de inyección de 5 µL.....	39



---

Figura 16.	Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.....	39
Figura 17.	Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando una velocidad de flujo de 1.5 mL/min.....	40
Figura 18.	Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando como fase móvil MeOH:TFA 0.1% en proporción 60:40.....	40
Figura 19.	Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando como fase móvil MeOH:TFA 0.1% en proporción 50:50.....	40
Figura 20.	Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando 30°C de temperatura en la columna.....	41
Figura 21.	Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando 20°C de temperatura en la columna.....	41



## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Ejemplos de metabolitos secundarios encontrados en propóleos....	6
Cuadro 2. Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método	14
Cuadro 3. Condiciones modificadas de operación para evaluar la robustez del método.....	17
Cuadro 4. Condiciones de operación desarrolladas para realizar la validación del método.....	21
Cuadro 5. Resultados obtenidos durante la adecuabilidad del sistema.....	23
Cuadro 6. Resultados obtenidos para evaluar la especificidad del método.....	25
Cuadro 7. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema.....	27
Cuadro 8. Parámetros estadísticos calculados para el modelo.....	28
Cuadro 9. Análisis de varianza para el modelo de regresión ( $n=15$ , $\alpha= 0.05$ , $F_{0,05, 1,15}=4.54$ ).....	28
Cuadro 10. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método.....	30
Cuadro 11. Cantidad recuperada y cantidad adicionada de acetina (Linealidad del método).....	31
Cuadro 12. Parámetros estadísticos calculados para el modelo.....	32
Cuadro 13. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo ( $n=15$ , $\alpha= 0,05$ , $F_{0,05, 1,15}=4,54$ ).....	33
Cuadro 14. Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema .....	34
Cuadro 15. Datos experimentales para evaluar la precisión del método .....	35
Cuadro 16. Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia.....	35
Cuadro 17. Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método.....	37



---

Cuadro 18.	Diferencia absoluta entre los valores de condiciones de operación modificada y normal .....	37
Cuadro 19	Datos para determinar la concentración de la acetina en el extracto de propóleo.....	42



## 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El interés por el consumo de hierbas medicinales y productos derivados de ellas ha estimulado de manera considerable la investigación relacionada con el establecimiento de los métodos de análisis para determinar la identidad, la pureza, la calidad y la potencia de las materias primas y los productos derivados de éstas. El trabajo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para elaborar las normas modelo en este campo, ha sido útil para fortalecer el reconocimiento de la función de las plantas medicinales en la atención primaria de la salud (Springfield *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008).

De acuerdo con la OMS en los países en vías de desarrollo, grandes sectores de la población indígena o de bajos recursos dependen todavía de la medicina tradicional como única alternativa para la atención primaria de la salud. La falta de instituciones médicas y el incremento en los costos de la medicina alópata son factores que convierten a la medicina tradicional en una alternativa única y accesible para el cuidado de la salud.

El mismo organismo internacional plantea que el auge en el consumo de productos herbolarios, a nivel mundial, se debe a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos ortodoxos, a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades crónicas, como la artritis y el eczema, y a los elevados costos de los tratamientos. De manera general, los productos elaborados con las plantas medicinales tienen una amplia aceptación en los distintos sectores de la sociedad.

El incremento en el interés y el consumo de la medicina herbolaria no sólo se refleja en las altas ventas de estos productos también, en las múltiples



publicaciones de textos sobre farmacología, toxicología, botánica, química y algunos aspectos clínicos de plantas medicinales y productos derivados de ellas. Existe además un marcado interés por los organismos regulatorios de los países desarrollados para incluir formulaciones de medicina tradicional en sus programas de salud. En China, por ejemplo, el sistema de medicina tradicional desempeña una función importante en la atención primaria de la salud. Los estándares de calidad relacionados con los productos y el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura durante los procesos de producción han permitido desarrollar la confianza del público en el consumo de productos con licencia suministrados en las farmacias.

Por otra parte, la seguridad y la eficacia de los productos farmacéuticos dependen de la calidad de los insumos utilizados para su manufactura. Para productos ortodoxos los estándares de calidad aceptables son convencionalmente establecidos en las monografías farmacopéicas. Dichas monografías proporcionan un resumen con las especificaciones y los detalles de la metodología a utilizar para determinar la identidad, las impurezas y el contenido de principio activo necesario para lograr el efecto deseado. En contraste, para los productos herbolarios no se han desarrollado aún las especificaciones de calidad para el análisis de la mayoría de las especies medicinales vegetales. La carencia global de dichos estándares ha propiciado la amplia variabilidad en la "calidad" de los materiales utilizados para elaborar los productos herbolarios.

Con base en estas consideraciones el objetivo primordial de este trabajo reside en identificar y cuantificar uno de los marcadores químicos presentes en el propóleo de la región del altiplano en México que permita estandarizar los extractos y los preparados obtenidos a partir de este importante recurso natural. Para el cumplimiento de este objetivo se desarrollará y validará un método analítico, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, conducente a cuantificar el contenido de acacetina en un extracto etanólico de propóleo (Pietta, 2002).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES DEL PROPÓLEO.

La palabra 'propóleo' proviene de los vocablos griegos 'pro' (delante o en defensa) y 'polis' (ciudad) y significa por lo tanto, que en la colmena cumple funciones de defensa (Burdock, 1998). El propóleo en su estado natural (Figura 1) es una sustancia resinosa de color amarillo verdoso o pardo rojizo (según su origen) y es generado por las abejas a partir del polen que colectan de diferentes especies vegetales. Es utilizado con fines desinfectantes para sellar los agujeros; fijar los panales de miel; pulir las paredes interiores; proteger la entrada contra los intrusos y para recubrir (embalsamar) los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena evitando su descomposición. Esta propiedad también fue aprovechada por los egipcios y los sacerdotes para embalsamar a las momias. Históricamente, Aristóteles describe el uso de los propóleos para tratar las infecciones de la piel, llagas y supuraciones. Los incas, por su parte, lo utilizaban para curar cuadros de infecciones febriles y, los franceses en los siglos XIV-XVIII lo utilizaron para el tratamiento de las infecciones y como sustancia cicatrizante (Salatino, 2005).

Para que las abejas manufacturen esta sustancia colectan con sus mandíbulas el material secretado o exudado por plantas. Posteriormente, con la ayuda del primer par de patas y la secreción de enzimas salivales por las glándulas mandibulares ablandan el material para tritarlo y transportarlo a las cestillas (Bankova, 2005a). Para su comercialización el propóleo es recogido por los apicultores por medio de trampas o raspado, siendo el entrampado el método que ofrece la mejor calidad y la menor contaminación del producto. De manera general, la colecta se lleva a cabo durante el otoño cuando la propolización parece más activa. Por otro lado, el control de calidad de este recurso natural sigue las siguientes etapas:



Si el material es muy ceroso se somete a un lavado con agua fría para remover las ceras. El propóleo remanente se seca con aire en charolas de acero inoxidable. El segundo paso involucra la disolución del propóleo en etanol al 95%; las ceras restantes y las partes de las abejas son eliminadas. En último lugar, se filtra la solución para eliminar cualquier otro material ajeno al propóleo (Burdock, 1998).



**Figura 1.** Aspecto físico del propóleo.

Actualmente, el propóleo se comercializa en preparados para tratar la tos, el reumatismo y los esguinces. También, se utiliza para preparar productos higiénicos como la pasta dental y el enjuague bucal; ambos productos son de utilidad para el tratamiento contra la gingivitis y la estomatitis. Finalmente, en dermatología, se emplea para elaborar productos farmacéuticos y cosméticos como cremas faciales, ungüentos y lociones debido a sus propiedades para regenerar tejidos, tratar quemaduras y enfermedades de la piel (Burdock, 1998; Castaldo, 2002).

Los estudios químicos realizados con diferentes lotes de propóleos han permitido concluir que su composición química varía dependiendo de la flora local y del clima de la zona de colecta. Así, el propóleo europeo contiene compuestos fenólicos previamente reportados en los exudados de los árboles del poplar (principalmente *Populus nigra*). Estas especies crecen favorablemente en climas templados. En contraste, el propóleo recolectado en climas tropicales contiene





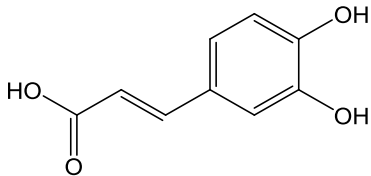
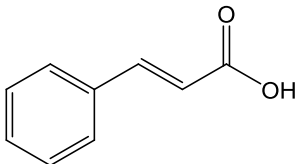
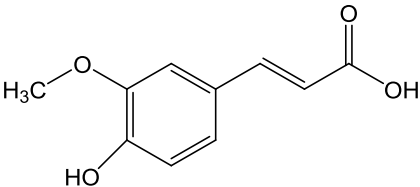
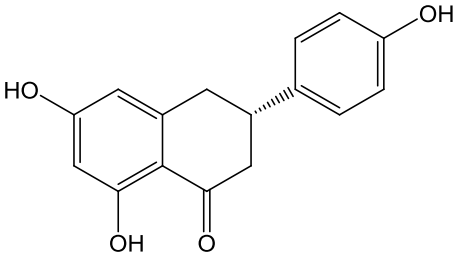
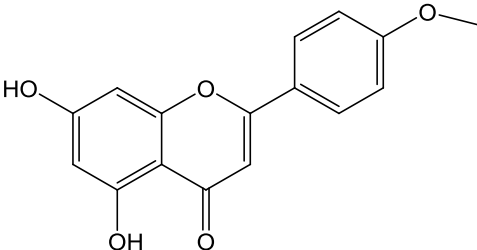
derivados del ácido *p*-cumárico, diterpenoides, lignanos y flavonoides diferentes a los identificados en el propóleo de tipo poplar. El propóleo brasileño es el mejor ejemplo de este tipo de material cuya composición química se encuentra relacionada con la resina de las hojas del género *Baccharis dracunculifolia* que utilizan las abejas para producir el propóleo. Por otra parte, el propóleo rojo de Cuba contiene como principales metabolitos secundarios a las benzofenonas poliisopreniladas provenientes de la resina de las flores de *Clusia rosea* (Bankova, 2005b; Salatino, 2005).

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas sobre propóleos colectados en diferentes países con climas templados y tropicales existe un número limitado de publicaciones sobre la composición química y la actividad biológica de propóleos provenientes de regiones áridas o semiáridas del continente americano. En este marco de referencia en el año 2007 Hernández y colaboradores estudiaron tres propóleos del estado de Sonora, México. En esta oportunidad, los investigadores concluyeron que la pinocembrina, la crisina y el 3-acetato de la pinobanksina representan los metabolitos secundarios mayoritarios de los propóleos estudiados. Los mismos investigadores describen la identificación de 11 flavonoides y del éster fenil etílico del ácido cafeico (CAPE) (Hernández, 2007).

De manera general, la literatura química señala que los propóleos están constituido en su mayor parte por bálsamos y resinas (50-55%), ceras (30-40%), aceites esenciales (5-10%), polen (5%) y minerales (5%). En el Cuadro 1 se ilustran algunos ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados y caracterizados a partir de diferentes tipos de propóleos (Pietta, 2002; Walker, 1987).

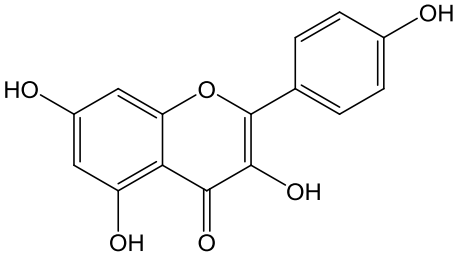
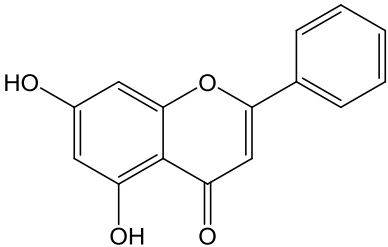
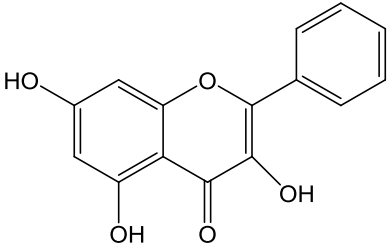
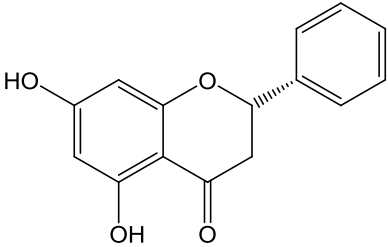
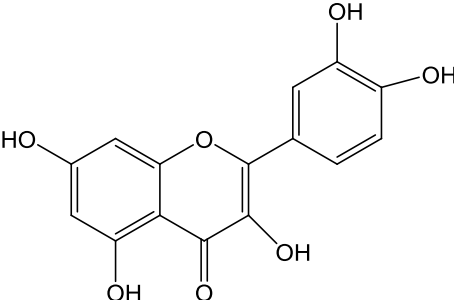


**Cuadro 1.** Ejemplos de metabolitos secundarios encontrados en propóleos.

Clasificación	Estructura química	Referencia
<b>Compuestos fenólicos</b>		
Ácido caféico		Uzel <i>et al.</i> , 2005 Gardana., <i>et al.</i> , 2005
Ácido cinámico		Gardana, <i>et al.</i> , 2005
Acido ferúlico		Uzel <i>et al.</i> , 2005 Silici <i>et al.</i> , 2005
<b>Flavonoides</b>		
Naringenina		Uzel <i>et al.</i> , 2005 Silici <i>et al.</i> , 2005
Acacetina		Marcucci, 1995 Silici <i>et al.</i> , 2005



**Cuadro 1.** Ejemplos de metabolitos secundarios encontrados en propóleos (continuación).

Clasificación	Estructura química	Referencia
Kaempferol		Liqin <i>et al.</i> , 2008
Crisina		Liqin <i>et al.</i> , 2008
Galangina		Uzel <i>et al.</i> , 2005 Marcucci, 1996 Silici <i>et al.</i> , 2005 Gardana <i>et al.</i> , 2005
Pinocembrina		Uzel <i>et al.</i> , 2005 Marcucci, 1996 Silici, <i>et al.</i> , 2005 Gardana <i>et al.</i> , 2005
Quercetina		Uzel <i>et al.</i> , 2005 Silici <i>et al.</i> , 2005



## 2.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Desde el punto de vista biológico los propóleos han sido objeto de varios estudios farmacológicos realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. En los siguientes párrafos se describen algunas de sus propiedades biológicas mejor estudiadas.

En un estudio realizado por Orsatti y colaboradores, en el año 2010, se demostró que el extracto etanólico del propóleo brasileño verde activó, en ratones, los pasos iniciales de la respuesta inmune mediante la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4 y la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo. Estos eventos permitieron la activación de los linfocitos por las células presentadoras de antígenos y el reconocimiento de microorganismos. También, incrementó la generación de  $H_2O_2$  favoreciendo de esta manera la muerte de los microorganismos. Una respuesta similar se observó al tratar ratones bajo estrés agudo con el propóleo brasileño verde es decir, aumentó la respuesta inmune humoral y la producción de IL-4 (Sforcin, 2007 y 2011; Kumazawa, 2004; Mok-Ryeon, 2009).

En otro estudio realizado por Bratter, el autor, administró cápsulas con 500 mg de propóleo brasileño a seres humanos para analizar sus efectos sobre las citocinas proinflamatorias. Los resultados observados indicaron que hubo un incremento significativo en la concentración de citocinas espontáneas e inducidas por LPS (IL- $1\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) y en la capacidad de secreción de leucocitos (Sforcin, 2011; Kumazawa, 2004; Mok-Ryeon, 2009).

Por otra parte, el CAPE (éster fenil etílico del ácido caféico), uno de los principales constituyentes del propóleo poplar, mostró un efecto inhibitorio sobre los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y NFAT. En consecuencia, el CAPE inhibe la transcripción del gene que codifica para IL-2, la expresión de IL-2R y la proliferación de células T. Estos hallazgos proporcionaron nuevas evidencias sobre el mecanismo molecular involucrado en la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de este compuesto natural. Adicionalmente, el CAPE ha demostrado un efecto protector



contra el estrés hipertérmico de los atletas al incrementar la tolerancia de sus células mononucleares (Sforcin, 2011; Kumazawa, 2004; Mok-Ryeon, 2009).

La actividad antiinflamatoria del propóleo ha sido reportada por varios investigadores utilizando diferentes modelos experimentales. Así, el tratamiento de ratones C57BL/6, durante 14 días, con propóleo verde de Brasil demostró una inhibición de la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$  por las células del bazo (Sforcin, 2011).

Por otro lado, la administración del propóleo brasileño al 10% y del CAPE a ratones de la cepa BALB/c con dosis de 5, 10 y 20 mg/kg incrementaron la producción de anticuerpos. Sin embargo, a pesar del efecto biológico significativo mostrado por los constituyentes individuales algunos autores sugieren que la mayor actividad biológica del propóleo se debe a la mezcla natural de sus componentes (Sforcin, 2011, 2007).

El propóleo brasileño verde también ha demostrado una importante actividad antitumoral contra diferentes líneas tumorales *in vitro*. El mecanismo principal por el cual el propóleo afecta a las células tumorales está relacionado con la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis. Se sabe, por ejemplo, que el CAPE detiene el ciclo celular en la fase G2/M (Sforcin, 2011; Hernández, 2007; Shen, 2010; Singh, 2005; Szliska, 2009).

Estudios *in vivo* realizados con el propóleo brasileño verde al 10% permitieron evidenciar un incremento en la actividad citotóxica de las células "natural killer" contra el linfoma murino. Por su parte, el propóleo poplar y algunos de sus compuestos polifenólicos aislados (ácido caféico, CAPE y quercetina) disminuyeron el número de nódulos tumorales de células de pulmón. Es importante mencionar que la eficacia contra la metástasis del propóleo poplar fue igual a la presentada por sus constituyentes individuales (Sforcin, 2011; Hernández, 2007; Shen, 2010, Singh, 2005).



La actividad antimicrobiana del propóleo se encuentra documentada contra diferentes tipos de bacterias, hongos, virus y parásitos. *In vitro*, el propóleo actúa directamente sobre los microorganismos; *in vivo*, podría estimular el sistema inmune activando los mecanismos involucrados en la muerte del microorganismo (Sforcin, 2011).

De particular interés para algunos investigadores ha sido el estudio de la asociación del propóleo con algunos fármacos antimicrobianos disponibles en el mercado. Así, Oksuz y colaboradores demostraron la actividad sinérgica entre el ciprofloxacino y el propóleo en el tratamiento de la queratitis experimental inducida por *Staphylococcus aureus*. Por su parte, Orsi describió que el propóleo disminuye la resistencia de la pared de la bacteria a los antibióticos amoxicilina, ampicilina y cefalexina y tiene un efecto sinérgico con los antibióticos que actúan sobre el ribosoma como el cloramfenicol, las tetraciclinas y la neomicina. Sin embargo, el propóleo no parece interactuar con los antibióticos que actúan sobre el ADN (ciprofloxacino y norfloxacino) (Sforcin, 2011).

Por último, Libéro y colaboradores publicaron en el año 2009 una revisión de los efectos del propóleo sobre el grupo de *Streptococcus mutans*. Estos estudios permitieron proponer a los autores el uso del propóleo o sus componentes como agentes cariostáticos en el desarrollo de productos higiénicos para combatir la caries y otras infecciones. Por otra parte, Santos refirió la eficacia clínica de un gel preparado con propóleo brasileño en pacientes diagnosticados con estomatitis dental (Sforcin, 2011).

A la fecha, no se han reportado efectos secundarios significativos después de la administración oral del propóleo a seres humanos. Algunos estudios realizados con propóleos brasileños indicaron que las dosis seguras para el ser humano podrían ser de 1.4 - 70 mg/kg al día. Sin embargo, algunos casos de alergia y dermatitis por contacto han sido reportados principalmente por los recolectores y por los usuarios de cosméticos y preparaciones tópicas grado farmacéutico (Sforcin, 2011).



En el año 2009, Shinmei y colaboradores reportaron la utilidad del propóleo para el alivio de los síntomas de la rinitis alérgica de los ratones a través de la inhibición de la histamina. En otro estudio, realizado con pacientes que padecían asma moderada, la administración diaria de un extracto acuoso al 13% de propóleo, durante dos meses, redujo la incidencia y la severidad de los ataques nocturnos al mejorar las funciones de ventilación. La actividad observada fue asociada con la disminución en los niveles de prostaglandinas, leucotrienos y citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL6 e IL-8) y con el aumento de la IL-10 (Sforcin, 2011).

Por último, en 1996, Matsushige y colaboradores demostraron que el extracto acuoso del propóleo (200 mg/kg) posee un efecto preventivo sobre la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas al inhibir la generación del IL-1 $\beta$  y la actividad de la NO sintasa. Posteriormente, Fuliang en el año 2005, observó que la administración, durante 7 semanas, de un extracto acuoso o etanólico de propóleo a ratas diabetizadas con estreptozotocina controlaba la glicemia y modulaba la glucosa y el metabolismo de los lípidos. Más adelante, McLennan y su grupo de trabajo describieron que el propóleo favoreció la reepitelización de heridas en roedores diabéticos. Otros estudios reportaron que los principales fenoles del propóleo brasileño (ácido caféico, ácido p-cumárico y ácido cinámico) poseen propiedades antiulcéricas (Sforcin, 2011).



---

## 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.1 PROPÓLEO

El propóleo fue recolectado en el apiario “Don Federico” ubicado a 1 km del Paraje del Panteón de San Pablo Oztotepec; Delegación Milpa Alta, Distrito Federal. Las muestras fueron colectadas por el personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria.

### 3.2 EXTRACTO DE PROPÓLEO

278 g de propóleo se extrajeron mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente utilizando 1.3 L de etanol durante 8 días. La solución resultante se filtró al vacío y se concentró a presión reducida obteniéndose 92 g de extracto.

#### 3.2.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina de los estándares empleados en este trabajo, se utilizaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 G<sub>254</sub> Merck). El sistema de elución empleado fue CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH en una proporción 95:5. El cromatofolio se visualizó con luz UV (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm) y se reveló con solución de sulfato cérico amoniacal (12 g de sulfato cérico amoniacal en 250 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 3.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control





SCL-10A (VP) SHIMADZU acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC).

El análisis para determinar el contenido de acacetina se realizó en una columna Waters C18 (BEH Technology), con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). La concentración de la muestra oscila entre 100-1000  $\mu\text{g/mL}$ .

El volumen de inyección utilizado fue de 10  $\mu\text{L}$ . La elución se realizó con un sistema isocrático que consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH:ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en una proporción 55:45. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.5 mL/min y la temperatura empleada para el análisis fue de 25  $^{\circ}\text{C}$ . La longitud de onda empleada para la detección de los compuestos fue de 320 nm.

### **3.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE TRABAJO**

Para preparar el extracto de trabajo se pesaron 200 mg del extracto de propóleo en 10 mL de una mezcla de EtOH:acetonitrilo en proporción 1:1. La solución resultante se filtró para su posterior análisis en el cromatógrafo de líquidos.

### **3.5 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

Para identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de propóleo se prepararon, por separado, soluciones de 1mg/mL de acacetina, 4'.7 dimetilapigenina, 4'.7 dimetilnaringenina y pinocembrina. Las señales correspondientes a cada producto se identificaron por coelución de los estándares con la matriz de trabajo.



## 3.6 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO ANALÍTICO

### 3.6.1 ESPECIFICIDAD/ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Para evaluar la especificidad del método analítico y la estabilidad del producto natural se registraron los cromatogramas del estándar antes y después de ser sometidos a las condiciones experimentales descritas en el Cuadro 2.

Para preparar el estándar se pesaron 10 mg de acetina y se disolvieron en 10 mL de una mezcla constituida por EtOH/acetonitrilo (1:1); a partir de esta solución se realizó una dilución para obtener una concentración final de 500 µg/mL.

Condición	Acetina 500 µg/mL	Reactivo	Tiempo
Basicidad	1 mL	2 mL NaOH 1 M	Reflujo por 30 min
Acidez	1 mL	2 mL HCl 1 M	Reflujo por 30 min
Oxidación	1 mL	2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reflujo por 30 min

**Cuadro 2.** Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método.

### 3.6.2 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

La adecuabilidad del método analítico se evaluó mediante el análisis por sextuplicado de una solución de acetina que contenía 500 µg/mL. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que la desviación estándar relativa (DER) debe ser menor del 2% para considerar que el método es adecuado para la aplicación que se pretende.

### 3.6.3 LINEALIDAD

#### 3.6.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar la linealidad del sistema se preparó, por triplicado, una curva de calibración utilizando cinco niveles de concentración. Para ello, 10 mg de acetina se disolvieron en 10 mL de EtOH/acetonitrilo (1:1). A partir de esta solución se prepararon las diluciones necesarias para que cada mililitro de la misma contuviera entre 100-1000 µg/mL. Con los resultados obtenidos se calculó



la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $m$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ) mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos así obtenidos se compararon con los siguientes criterios:  $r^2 > 0.999$ ;  $r \geq 0.999$ ;  $m \neq 0$  y  $b = 0$ .

### **3.6.3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO**

La linealidad del método se evaluó mediante la preparación, por triplicado, de una serie de soluciones estándar que contenían diferentes concentraciones de acacetina (100-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) en un volumen constante de la matriz de trabajo (2 mg/mL extracto). Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple y se calcularon: el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y los intervalos de confianza para la pendiente IC ( $\beta_1$ ) y la ordenada al origen IC ( $\beta_0$ ). Los criterios estadísticos empleados son:  $r^2 > 0.99$ ;  $r \geq 0.99$ ;  $m \neq 0$  y  $b = 0$ . El intervalo de confianza para la pendiente debe incluir la unidad y el intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero.

### **3.6.4 EXACTITUD**

La exactitud del método analítico se determinó de acuerdo con la metodología descrita en el punto 3.6.3.2. Los resultados obtenidos se expresaron en términos de porcentaje de cantidad recuperada (% de recobro). Para considerar que el método analítico es exacto el porcentaje de recuperación deberá encontrarse entre el 98% y el 102% y la DER deberá ser menor del 2%.

### **3.6.5 PRECISIÓN**

#### **3.6.5.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA**

Preparación de la solución estándar: 10 mg de acacetina se disolvieron en 10 mL de EtOH/acetonitrilo (1:1). A continuación en un matraz volumétrico de 5 mL se virtió una alícuota de 2.5 mL de la solución anterior y se llevó a volumen con la misma mezcla de disolventes; esta solución contiene 500  $\mu\text{g/mL}$  de acacetina. Se prepararon tres muestras independientes y se analizaron cada una de ellas por



sextuplicado. Los resultados así obtenidos se expresaron en términos de DER. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que la DER deberá ser menor del 2% para considerar que el método es preciso.

### **3.6.5.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO (REPETIBILIDAD)**

La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de una misma solución del extracto del propóleo que representa el 100% de la concentración que se cuantifica como se describió en el punto anterior. La repetibilidad del método también se evaluó mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la exactitud y la linealidad del método.

### **3.6.5.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO**

#### **(REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO).**

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución estándar que contenía 500 µg/mL de acetina preparada por dos diferentes analistas y en dos diferentes días.

### **3.6.6 ROBUSTEZ DEL MÉTODO**

Para evaluar este parámetro de desempeño se preparó una solución estándar de acetina a una concentración 500 µg/mL. Los factores instrumentales y no instrumentales que se modificaron en las condiciones normales de operación fueron: la velocidad de flujo, la proporción de la fase móvil, la longitud de onda, la temperatura y el volumen de inyección (Cuadro 3). El efecto de cada factor se evaluó mediante el análisis por duplicado de las muestras. Con los resultados obtenidos se determinó la media aritmética de la condición normal de operación y de las condiciones modificadas.



Condición modificada	Valor inicial	(+5 unidades	(-5 unidades
Velocidad de flujo	0.5 mL	1 mL	1.5 mL
Volumen de inyección	10 $\mu$ L	15 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Longitud de onda	320 nm	325 nm	315 nm
Proporción de la fase móvil	MeOH:TFA 0.1% (55:45)	MeOH:TFA 0.11% (60:40)	MeOH:TFA 0.1% (50:50)
Temperatura °C	25 °C	30 °C	20 °C

**Cuadro 3.** Condiciones modificadas de operación para evaluar la robustez del método.

Con los resultados obtenidos se calculó la diferencia absoluta ( $|di|$ ) entre la media aritmética de la condición normal de operación ( $\overline{y_0}$ ) con respecto a la media aritmética de cada condición modificada ( $\overline{y_i}$ ). Los resultados así obtenidos se compararon con el siguiente criterio:  $|di| \leq 2\%$ .



---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

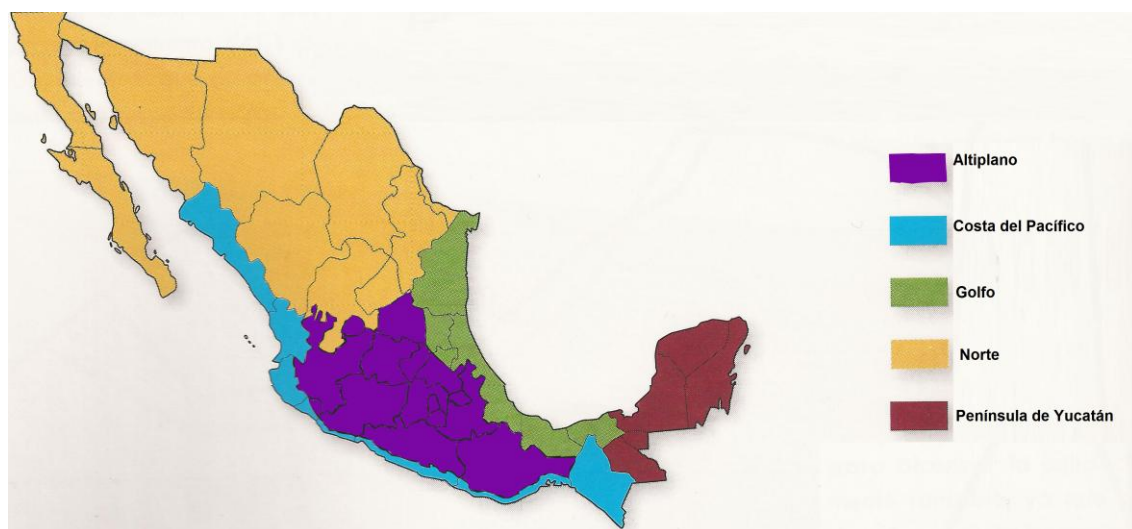
El incremento en el consumo de propóleo durante los últimos 30 años no sólo se refleja en las ventas de los productos que lo contienen sino también, en las múltiples publicaciones a nivel mundial, sobre sus aspectos químicos y farmacológicos. Los diversos estudios publicados a la fecha han permitido demostrar su actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antioxidante y antitumoral, entre otras (Bankova *et al.*, 2005a). Estandarizar diferentes lotes de propóleos es un proceso difícil ya que su composición química varía considerablemente dependiendo de la época y del sitio de recolección. Dicha variabilidad también se debe, en gran medida, a las fuentes naturales que las abejas emplean para elaborar el propóleo (Jiang, 2007; Mitscher, 2000; Peña, 2008; Popova, 2004).

El marcado interés por los organismos reguladores de los países desarrollados para incluir formulaciones de medicina tradicional en sus programas de salud ha estimulado de manera notable la investigación relacionada con el establecimiento de los criterios de calidad necesarios para evaluar los productos derivados de plantas medicinales. Considerando que el propóleo es un producto derivado de las plantas, algunos autores, establecen que es completamente válido abordar el problema de su estandarización de la misma manera en que se realiza para las plantas medicinales. Esto es, si los principios activos son conocidos, la estandarización química se realizaría cuantificando su contenido por un método analítico apropiado. Sin embargo, en la mayoría de los casos los componentes bioactivos son desconocidos y su estandarización se llevaría a cabo cuantificando el contenido de compuestos marcadores. En los últimos años los compuestos marcadores han representado poderosas herramientas para asegurar la calidad y la reproducibilidad lote a lote de los productos derivados de plantas. En el caso



particular del propóleo uno de los principios activos más importantes es el CAPE (éster fenil etílico del ácido caféico). Por este motivo, algunos autores sugieren que este compuesto podría seleccionarse como producto marcador en diferentes tipos de propóleos. Sin embargo, la estandarización de este importante producto se ha realizado correlacionando la actividad biológica con el contenido total de flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y fenoles totales. En este contexto, y para formular recomendaciones especiales para los ministerios de salud se necesitan desarrollar los criterios de calidad básicos que permitan correlacionar un tipo particular de propóleo con una actividad biológica específica.

Con base en estas consideraciones el objetivo primordial de este trabajo consistió en desarrollar y validar un procedimiento experimental por CLAE para cuantificar el contenido de un producto marcador en propóleos de la región del altiplano en México. La región del altiplano se distingue por tener mieles ámbar y ámbar claro de gran auge en el mercado europeo. Su origen floral es el acahual, la acetilla, la jarilla, el toronjil morado y la espinocilla, entre otros. Esta región comprende los estados de Tlaxcala, Puebla, México, Morelos, Distrito Federal, Guanajuato, Aguascalientes, la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y parte de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí (Figura 2) (Hernández, 2007).



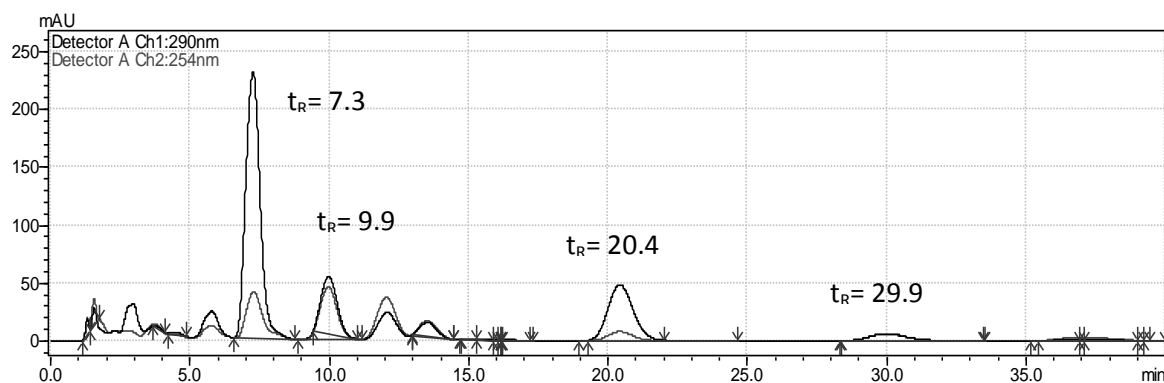
**Figura 2.** Regiones apícolas de México.



En estudios fitoquímicos previos realizados por el Dr. José Fausto Rivero con diferentes propóleos mexicanos pertenecientes a la región del altiplano fue posible purificar y caracterizar a la acacetina como uno de los principales metabolitos secundarios presentes en este importante recurso natural. Por otro lado, se han identificado compuestos como la pinobanksina, la naringenina, la hesperetina, la rutina, el 3-acetato de pinobanksina, la pinocembrina, la acacetina, la crisina, la galangina, el CAPE y el xantomicrool en propóleos del estado de Sonora (región del norte). De lo anterior se deduce que la acacetina podría representar un candidato idóneo para estandarizar los propóleos provenientes de la zona del altiplano en México.

Para el desarrollo del método analítico se registró, en primer lugar, un espectro en el UV con la finalidad de determinar la máxima longitud de onda de absorción (320 nm) de la acacetina en acetonitrilo-EtOH (1:1). Para establecer las condiciones de operación del método analítico fue necesario probar varias columnas cromatográficas así como diversos sistemas de elución. El rango de concentraciones utilizado en la curva de calibración se estableció con base en los resultados de ensayos preliminares con el extracto de propóleo (Nielsen y Dragsted, 1998; Volpi y Bergonzini, 2006; Keinänen y Julkunen-Tiitto, 1998). Así, los niveles de concentración para la curva de calibración se establecieron considerando 500 µg/mL como la concentración al 100%. Las condiciones generales del método analítico desarrollado para la cuantificación de la acacetina en el extracto de propóleo se resumen en el Cuadro 4. Para identificar las señales detectadas en el extracto del propóleo se realizó la coelución de diversos estándares con el extracto de trabajo, con base en los resultados obtenidos se lograron identificar los siguientes metabolitos en el extracto de trabajo: acacetina ( $t_R= 9.9$ ), 4'.7 dimetilnaringenina ( $t_R= 20.4$ ), 4'.7 dimetil apigenina ( $t_R= 29.9$ ) y pinocembrina ( $t_R= 7.3$ ). (Figura 3). Cabe mencionar, que todos estos productos fueron aislados en forma pura y caracterizados por el Dr. Rivero en diferentes estudios fitoquímicos con propóleos.





**Figura 3.** Cromatograma obtenido con el extracto etanólico del propóleo.

Condiciones de operación	
Longitud de Onda	320 nm
Fase móvil	MeOH:TFA 1% (55:45)
Columna	Water's C18 (BEH Technology)
Flujo	0.5 mL/min
Tiempo de análisis	15 min
Temperatura	25°C

**Cuadro 4.** Condiciones de operación desarrolladas para realizar la validación del método.

La 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina) es un flavonoide que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y antipalúdicas. La acacetina también inhibe la actividad de la glutatión reductasa, del citocromo P450 y de la topoisomerasa I. La literatura farmacológica describe que esta flavona no sólo inhibe la proliferación de células de cáncer de pulmón (A549), de hígado (HepG2) y de próstata (DU145 Y LNCaP) también, inhibe la apoptosis y bloquea el ciclo celular en la fase G1. Mediante ensayos de ELISA se ha encontrado que la acacetina detiene el ciclo celular al incrementar, de manera significativa, la expresión de las proteínas p53 y p21/WAF1. Otros estudios indicaron que la flavona disminuye los niveles de las proteínas CDK2, CDK4 y CDK6 en células de carcinoma de próstata, confirmando con ello, su efecto bloqueante del ciclo celular en las fases G1 y G2-M. Por otra parte, el incremento en la expresión del receptor Fas y sus dos ligandos podrían ser los responsables del efecto apoptótico inducido por la acacetina (Hsu *et al.*, 2004a y 2004b; Singh *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2010).



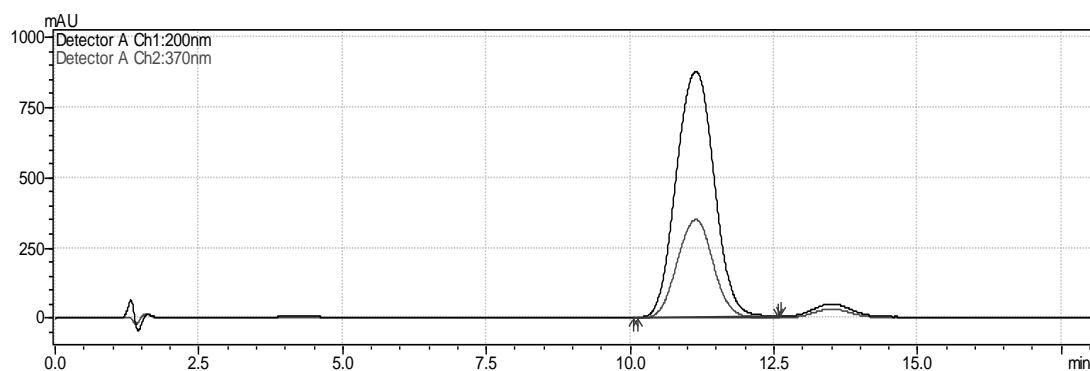
De lo anterior se deduce la importancia de cuantificar este metabolito en los propóleos para garantizar la calidad y la eficacia de los preparados que lo incluyan en su formulación.

Considerando que el método analítico pertenece a la categoría II (cuantificación de ingredientes activos) los parámetros de calidad que se evaluaron para validar la metodología fueron: adecuabilidad, especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. A continuación se discuten los resultados de cada característica de desempeño evaluada.

#### 4.1.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

La adecuabilidad del sistema consiste en obtener datos durante un proceso de medición que permitan tomar decisiones técnicas y administrativas correctas para un propósito establecido. Dicho parámetro se determinó mediante la inyección directa de una solución estándar de acacetina (500  $\mu\text{g/mL}$ ) de acuerdo con el protocolo experimental establecido (Figura 4).

Los resultados obtenidos en este experimento permitieron estimar que la resolución del componente mayoritario es mayor a 2.8 y que el coeficiente de variación entre las réplicas es menor del 2%. (Cuadro 3 y Cuadro 5).



**Figura 4.** Cromatograma correspondiente a una solución de 500  $\mu\text{g/mL}$  de acacetina.



Muestra	Área
Acetina 500 µg/mL-1	38224268
Acetina 500 µg/mL-2	38099224
Acetina 500 µg/mL-3	37639128
Acetina 500 µg/mL-4	38417388
Acetina 500 µg/mL-5	38448996
Acetina 500 µg/mL-6	38531165
<b>ȳ</b>	<b>38226694.8</b>
<b>S</b>	<b>328625.398</b>
<b>DER</b>	<b>0.9%</b>

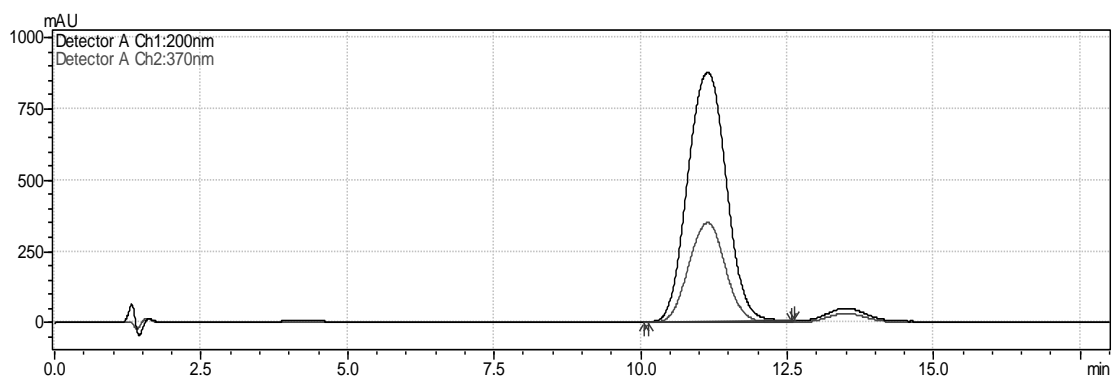
**Cuadro 5.** Resultados obtenidos durante la adecuabilidad del sistema.

Con base en estos resultados se concluye que el sistema cumple con las características de desempeño para llevar a cabo la validación del método analítico.

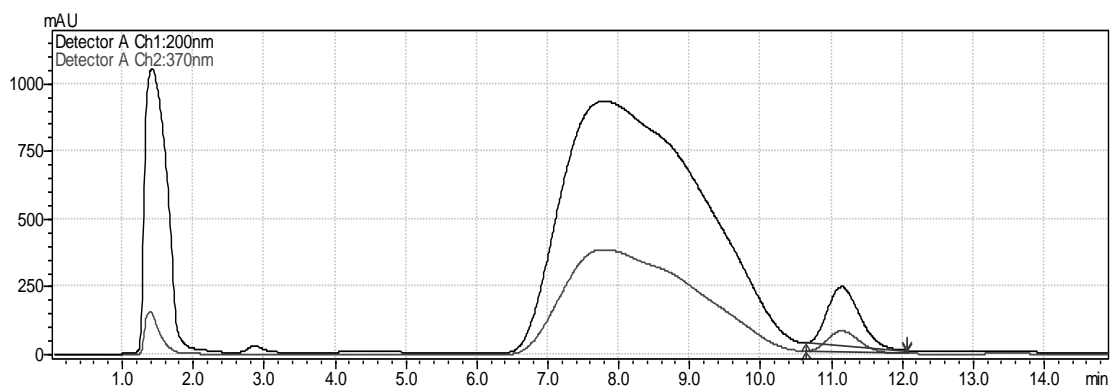
#### 4.1.2 ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

La especificidad/selectividad de un método analítico es su capacidad para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra que puedan estar presentes (especificidad) o que pudieran presentarse por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra.

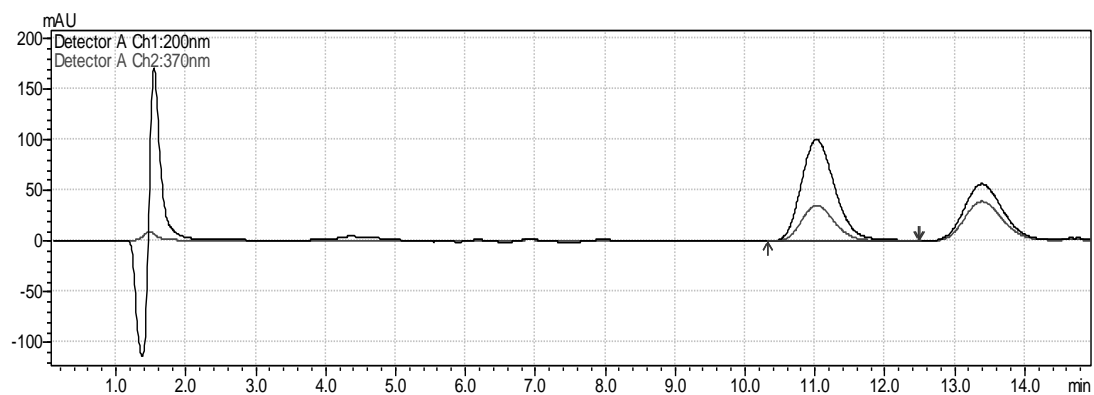
Para evaluar la especificidad/selectividad del método propuesto se determinó la influencia de condiciones especiales como la hidrólisis (ácida y básica) y la oxidación sobre el producto natural. Los cromatogramas resultantes al inicio y al término de los experimentos se resumen en las Figuras 5, 6, 7 y 8. En el Cuadro 6, se resumen los valores obtenidos para los tiempos de retención de las señales obtenidas y los valores de área bajo la curva.



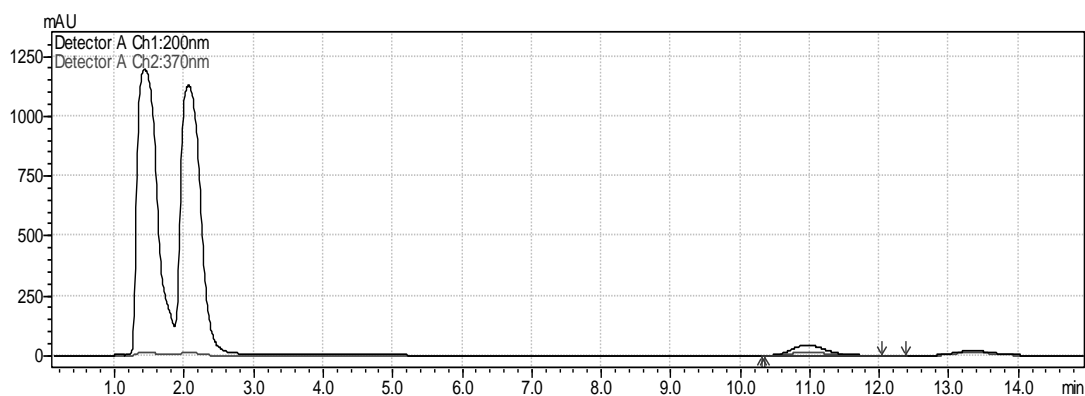
**Figura 5.** Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) en condiciones normales.



**Figura 6.** Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) después de someterse a un tratamiento con NaOH 1 M.



**Figura 7.** Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) después de someterse a un tratamiento con HCl 1 M.



**Figura 8.** Cromatograma correspondiente a una solución estándar de acetina (500 µg/mL) después de someterse a un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%.

Factor a evaluar	Acetina 500 µg/mL	Tiempo de retención (t <sub>R</sub> )	Área bajo la curva (ABC)
Estándar	1	10.338	42253473
	2	10.311	42278415
	3	10.358	42334850
Basicidad	1	11.043	2195577
	2	11.146	2456448
	3	11.228	2305162
Acidez	1	11.063	1179917
	2	11.018	1186108
	3	11.046	1181370
Oxidación	1	10.995	532036
	2	10.997	533446
	3	11.115	531698

**Cuadro 6.** Resultados obtenidos para evaluar la especificidad del método.

Como se deduce de las Figuras 6, 7 y 8 la acetina se degrada en condiciones básicas, ácidas y de oxidación. Dichas condiciones provocaron un 94.5%, 97.2% y 98.7% de degradación, respectivamente. Por otro lado, los resultados obtenidos indican que los tiempos de retención de los productos de degradación generados no interfieren con la señal del metabolito de interés. Con base en estos resultados se concluye que la respuesta obtenida por el compuesto en la matriz de trabajo se debe exclusivamente a la presencia de la acetina. Por lo tanto, el método analítico propuesto es específico y selectivo.



### 4.1.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad para obtener resultados que sean proporcionales a la concentración del analito de interés dentro de un rango determinado. El rango de trabajo utilizado durante este procedimiento, comprende del 20 al 200 % de la concentración encontrada como 100% en ensayos preliminares con el extracto de propóleo. Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 7 y en la Figura 9.

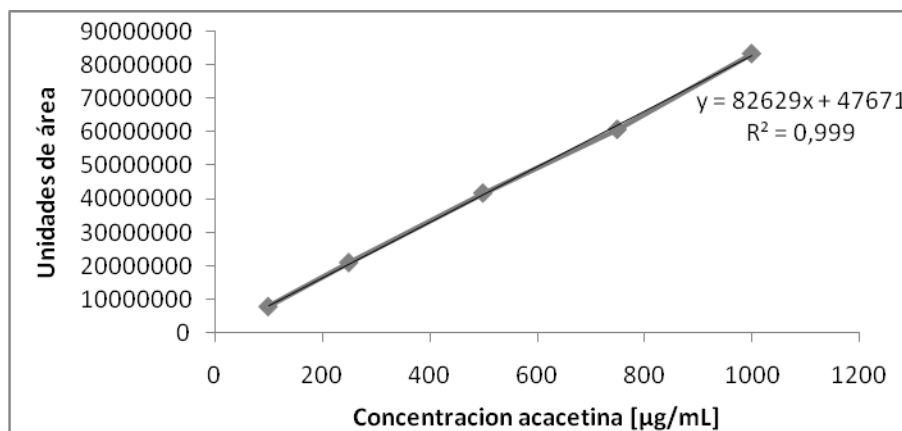
El manejo de los datos se realizó por medio de una regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados fueron la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente [IC ( $\beta_1$ )]. Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Área bajo la curva (ABC)} = 47671 + 82629 \times (\text{concentración de la acetina})$$



Muestra	Concentración Acetina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Concentración real de la Acetina ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Parámetro de adecuabilidad del sistema</b> $\hat{y} = 42618381.8$ $S = 517167.845$ <b>DER = 1.2%</b>
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -1	500	43268680	523.0731	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -2	500	43052357	520.4551	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -3	500	42268467	510.9682	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -4	500	42068793	508.5517	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -5	500	42433612	512.9668	
Acetina 1000 $\mu\text{g/mL}$ -1	1000	83195744	1006.2819	
Acetina 1000 $\mu\text{g/mL}$ -2	1000	83267141	1007.1460	
Acetina 1000 $\mu\text{g/mL}$ -3	1000	83456619	1009.43916	
Acetina 750 $\mu\text{g/mL}$ -1	750	60844822	735.78466	
Acetina 750 $\mu\text{g/mL}$ -2	750	60727294	734.36230	
Acetina 750 $\mu\text{g/mL}$ -3	750	60703824	734.0782	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -1	500	41878059	506.2434	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -2	500	41827613	505.6329	
Acetina 500 $\mu\text{g/mL}$ -3	500	41787726	505.1501	
Acetina 250 $\mu\text{g/mL}$ -1	250	21243826	256.5219	
Acetina 250 $\mu\text{g/mL}$ -2	250	21155913	255.4580	
Acetina 250 $\mu\text{g/mL}$ -3	250	21025833	253.8837	
Acetina 100 $\mu\text{g/mL}$ -1	100	8080586	97.2166	
Acetina 100 $\mu\text{g/mL}$ -2	100	8048457	96.8278	
Acetina 100 $\mu\text{g/mL}$ -3	100	7980061	96.0000	

**Cuadro 7.** Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema.



**Figura 9.** Gráfica que ilustra la relación lineal entre las variables.

Los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada se muestran en el Cuadro 8. Los intervalos de confianza  $[IC(\beta_1)]$  se determinaron utilizando los valores críticos de la distribución  $t$  student con un 97.5% de confianza (anexo B).



Estadístico	Resultado
$b_0$	47671.2683
$b_1$	82629.2883
$r$	0.9996
$r^2$	0.9993
IC ( $\beta_1$ ) ( $t_{0.975, 13} = 2.160$ )	81332.02-83926.7
Error típico	759452.476
Observaciones	15

**Cuadro 8.** Parámetros estadísticos calculados para el modelo.

Para evaluar si el modelo estadístico calculado describe la relación lineal entre las variables, se realizó el análisis de varianza del mismo. Los resultados derivados de este análisis se resumen en el Cuadro 9 (ver el anexo C para el cálculo de F de Fisher).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1.0917E+16	1.0917E+16	18928.4601	5.9456E-22
Residuos	13	7.498E+12	5.7677E+11		
Total	14	1.0925E+16			

	Coefficientes	Error Típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto	47671.268	368762.75	0.1292735	0.8991199	-748992	844334	-748992	844334
Variable X 1	82629.288	600.587613	137.58074	5.95E-22	81331.7	83926.7	81331	83926.7

**Cuadro 9.** Análisis de varianza para el modelo de regresión ( $n=15$ ,  $\alpha= 0.05$ ,  $F_{0.05, 1, 15}=4.54$ ).

Como se deduce de los resultados obtenidos del Cuadro 9 el valor estadístico de F calculado ( $F_{0.05, 1, 15}=4.54$ ) para el modelo propuesto supera su valor crítico, por lo tanto, se concluye que la variación en la respuesta se encuentra explicada por el modelo. Por otra parte, las pruebas de hipótesis relativas a los coeficientes de regresión demostraron que la pendiente de la recta de regresión es diferente de cero. Finalmente, el coeficiente de determinación calculado para el modelo indica que el 99.9% de la variación total de las variables se encuentra descrito por un modelo de regresión lineal. Con base en estas evidencias se estableció que el





método analítico desarrollado es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

#### **4.1.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO Y EXACTITUD**

La exactitud es la proximidad en la concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Se expresa como el porcentaje de recobro y se obtiene del análisis de muestras a las que se ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia a analizar. En el Cuadro 10 y en la Figura 10 se ilustran los resultados obtenidos durante la evaluación de la exactitud del método.



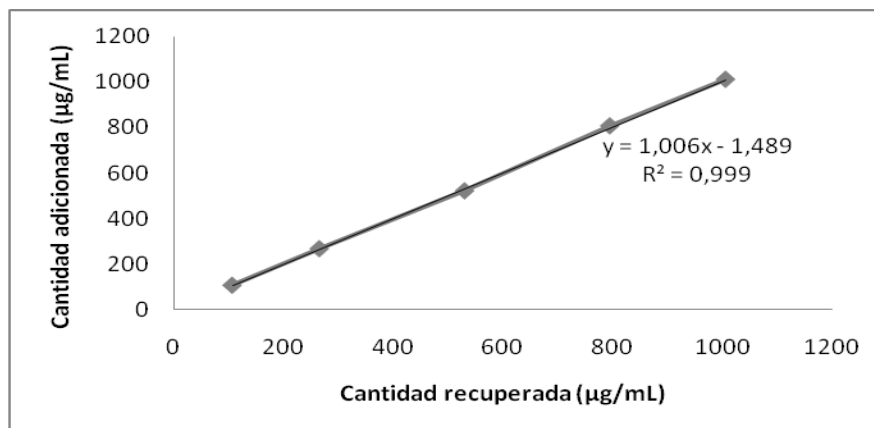
Muestra	t <sub>R</sub>	Área	Concentración Real (µg mL)	% Recobro
Acacetina 1000 µg/mL-1	10.42	76432638	1007.6629	100.16
Acacetina 1000 µg/mL-2	10.28	76614135	1009.0517	100.70
Acacetina 1000 µg/mL-3	10.083	77023301	1012.4218	101.04
Acacetina 750 µg/mL-1	10.613	63462194	806.8735	101.49
Acacetina 750 µg/mL-2	10.512	63348007	805.4217	101.31
Acacetina 750 µg/mL-3	10.613	63317601	805.0351	101.26
Acacetina 500 µg/mL-1	10.359	42253473	520.4966	101.07
Acacetina 500 µg/mL-2	10.311	42278415	520.8038	101.13
Acacetina 500 µg/mL-3	10.359	42334850	521.4990	101.26
Acacetina 250 µg/mL-1	10.064	21925344	267.0426	100.77
Acacetina 250 µg/mL-2	10.082	21983774	267.7542	101.04
Acacetina 250 µg/mL-3	10.157	21971971	267.6105	100.98
Acacetina 100 µg/mL-1	9.884	9210873	107.4005	101.32
Acacetina 100 µg/mL-2	9.975	9187968	107.1334	101.07
Acacetina 100 µg/mL-3	9.84	9191029	107.1691	101.10
			$\bar{y}$	101.05
			<b>D.E.</b>	<b>0.3188</b>
			<b>DER</b>	<b>0.3%</b>
			<b>t<sub>0.975, n-1</sub></b>	<b>2.14</b>
			<b>IC (µ)</b>	<b>100.84-101.25</b>

**Cuadro 10.** Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método.



Muestra	Cantidad Recuperada (µg/mL)	Cantidad Adicionada (µg/mL)
Acetina 1000 µg/mL-1	1006	1007.6629
Acetina 1000 µg/mL-2	1006	1009.0517
Acetina 1000 µg/mL-3	1006	1012.4219
Acetina 750 µg/mL-1	795	806.8735
Acetina 750 µg/mL-2	795	805.4217
Acetina 750 µg/mL-3	795	805.0351
Acetina 500 µg/mL-1	530	520.4966
Acetina 500 µg/mL-2	530	520.8038
Acetina 500 µg/mL-3	530	521.4990
Acetina 250 µg/mL-1	265	267.0426
Acetina 250 µg/mL-2	265	267.7542
Acetina 250 µg/mL-3	265	267.6105
Acetina 100 µg/mL-1	106	107.4005
Acetina 100 µg/mL-2	106	107.1334
Acetina 100 µg/mL-3	106	107.1691

**Cuadro 11.** Cantidad recuperada y cantidad adicionada de acetina (Linealidad del método).



**Figura 10.** Gráfica que ilustra la relación lineal entre las variable del método.



De manera general, los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada se muestran en el Cuadro 12.

Estadístico	Resultado
$b_0$	-1.48921329
$b_1$	1.0061331
$r$	0.9998
$r^2$	0.9996
IC ( $\beta_1$ ) ( $t_{0.975, 13} = 2.160$ )	3.1793806-(-1.0061331)
Error típico	6.5770
Observaciones	15

**Cuadro 12.** Parámetros estadísticos calculados para el modelo.

De acuerdo con los resultados indicados en el Cuadro 10 los porcentajes de recobro se encuentran dentro de los límites establecidos en las guías Q2A y Q2B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, International Conference on Harmonisation, 1995 y 1996) para métodos cromatográficos (98-102%). De nueva cuenta, el ajuste de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. La pendiente calculada para el modelo es diferente de cero y el coeficiente de correlación indica que el 99.9% de los datos se encuentran explicados por el modelo de regresión lineal estimado. Una vez más se realizó el análisis de varianza para evaluar el modelo de regresión. Los resultados derivados de este análisis se resumen en el Cuadro 13. El ANDEVA para  $n=15$  y  $\alpha= 0,05\%$  permite calcular un valor para la distribución F de 38350.7415. Dicho valor es mayor que el valor crítico de F ( $6.0511E-24$ ) obtenido. Por lo tanto, el modelo estadístico calculado es adecuado.



	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1658946.805	1658946.805	38350.7415	6.0511E-24
Residuos	13	562.3439762	43.25722894		
Total	14	1659509.149			

	Coefficientes	Error Típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1.4892132	3.25457797	-0.457574	0.65481148	-8.5203	5.54187	-8.520	5.54187
Variable X 1	1.00613307	0.00513769	195.83345	6.0511E-24	0.99503	1.01723	0.9950	1.01723

**Cuadro 13.** Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo (n=15,  $\alpha=0,05$ ,  $F_{0,05, 1,15}=4.54$ ).

#### 4.1.5 PRECISION

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales. Para determinar la precisión del método analítico se realizaron diferentes experimentos conducentes a evaluar la precisión del sistema (repetibilidad), la precisión del método y la precisión intermedia (reproducibilidad). De manera general, estos resultados se expresan en términos de desviación estándar relativa (DER).

##### 4.1.5.1 PRECISION DEL SISTEMA

La precisión del sistema se evaluó midiendo la concordancia entre los resultados analíticos individuales aplicando el procedimiento repetidamente a una muestra preparada con el estándar. Los resultados de estas determinaciones se resumen en el Cuadro 14.



Muestra	Área
Acetina 500 µg/mL-1.1	43052357
Acetina 500 µg/mL-1.2	41846581
Acetina 500 µg/mL-1.3	42981272
Acetina 500 µg/mL-2.1	42720435
Acetina 500 µg/mL-2.2	42277480
Acetina 500 µg/mL-2.3	42052928
Acetina 500 µg/mL-3.1	42425224
Acetina 500 µg/mL-3.2	41276848
Acetina 500 µg/mL-3.3	42268467
Acetina 500 µg/mL-4.1	43280034
Acetina 500 µg/mL-4.2	43239167
Acetina 500 µg/mL-4.3	43326105
Acetina 500 µg/mL-5.1	43891710
Acetina 500 µg/mL-5.2	42161372
Acetina 500 µg/mL-5.3	42190193
Acetina 500 µg/mL-6.1	42566727
Acetina 500 µg/mL-6.2	42099323
Acetina 500 µg/mL-6.3	42135468
Promedio ( $\bar{y}$ )	<b>42543982.83</b>
Desviación estándar (S)	<b>644651.7983</b>
DER	<b>1.5%</b>

**Cuadro 14.** Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema.

Considerando que la DER calculada es de 1.5% se concluye que el sistema es reproducible bajo las condiciones de ensayo.

#### 4.1.5.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión del método se determinó mediante el análisis por sextuplicado de una solución que contenía 500 µg/mL de acetina en la matriz de trabajo. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 15.



Muestra	Área
Acacetina 500 µg/mL-1.1	35305617
Acacetina 500 µg/mL-1.2	34320916
Acacetina 500 µg/mL-2.1	33896993
Acacetina 500 µg/mL-2.2	34166906
Acacetina 500 µg/mL-3.1	34725564
Acacetina 500 µg/mL-3.2	33273598
<b>Promedio (<math>\bar{y}</math>)</b>	34281599
<b>Desviación estándar (S)</b>	696334.0991
<b>DER</b>	2.0%

**Cuadro 15.** Datos experimentales para evaluar la precisión del método.

De nueva cuenta la DER calculada es de 2.0% por lo tanto el sistema es reproducible bajo las condiciones de ensayo.

#### 4.1.5.3 PRECISION INTERMEDIA

Por último, la reproducibilidad del método se evaluó por medio del análisis de una solución que contenía 500 µg/mL de acacetina. Este ensayo se realizó por dos analistas en dos días diferentes. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 16.

	Analista		DER analista	
	1	2	1	2
<b>Dia 1</b>	26128078	26116200	0.3%	0.5%
	26021673	26310981		
	26150442	26394169		
<b>Dia 2</b>	26399043	26397684		
	26204847	26195544	<b>1</b>	<b>2</b>
	26228396	26137162	0.4%	0.5%
	$\bar{y}$	26223684.92		
	<b>S</b>	125493.1306		
	<b>DER</b>	0.5%		

**Cuadro 16.** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que en todos los casos la DER fue menor del 1.5% por lo tanto, se concluye que el método analítico propuesto es repetible y reproducible.



#### 4.1.6 ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico es una medida que se realiza en el laboratorio para evaluar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en las condiciones ambientales y/o de operación semejantes a aquellos que pudieran surgir en los diferentes ambientes de prueba. El objetivo de esta determinación es identificar las variables controlables que puedan contribuir a determinar cambios significativos de acuerdo con el criterio de aceptación.

Las variables que se modificaron para evaluar este parámetro fueron velocidad de flujo, volumen de inyección, proporción de la fase móvil, temperatura de la columna y longitud de onda.

El criterio de aceptación indica que la diferencia debe ser menor o igual al 2% ( $|di| \leq 2\%$ ). Los resultados obtenidos para este parámetro se resumen en los Cuadros 17 y 18 y en las Figuras 11 a 21.



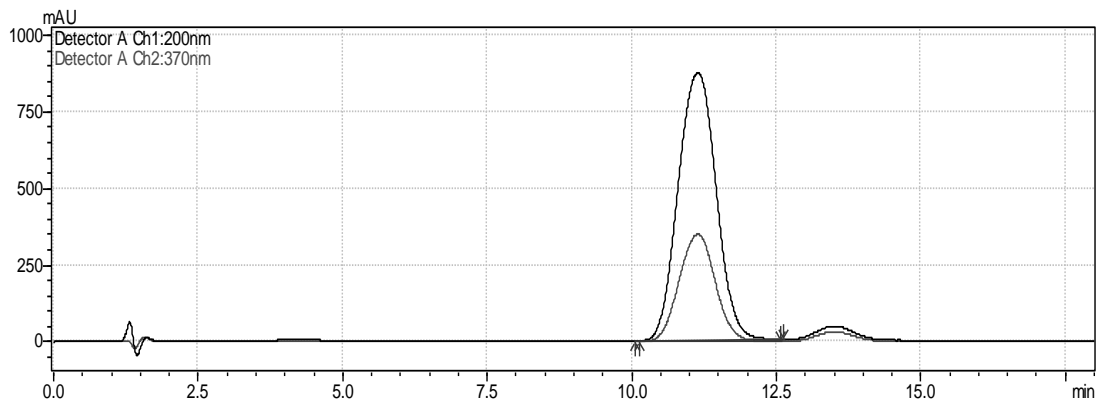


Muestra	Área	Tiempo de retención	
Acetina 500 µg/mL-1	43255705	10.069	<b>Parámetro de adecuabilidad del sistema</b> $\bar{y} = 43413015.67$ $S = 200566.4927$ <b>DER = 0.5%</b>
Acetina 500 µg/mL-2	43370690	10.441	
Acetina 500 µg/mL-3	43386343	10.535	
Acetina 500 µg/mL-4	43803720	10.561	
Acetina 500 µg/mL-5	43392956	10.529	
Acetina 500 µg/mL-6	43268680	10.364	
Acetina 500 µg/mL 325 nm-1	45569666	9.45	
Acetina 500 µg/mL 325 nm-2	45571185	9.484	
Acetina 500 µg/mL 315 nm-1	39640038	9.728	
Acetina 500 µg/mL 315 nm-2	39862912	9.582	
Acetina 500 µg/mL 15 µL-1	64485794	9.327	
Acetina 500 µg/mL 15 µL -2	63832601	9.276	
Acetina 500 µg/mL 5 µL -1	23111416	9.522	
Acetina 500 µg/mL 5 µL -2	23137852	9.395	
Acetina 500 µg/mL 1.0 mL-1	43780610	9.859	
Acetina 500 µg/mL 1.0 mL- 2	43792322	9.732	
Acetina 500 µg/mL 1.5 mL -1	43347768	10.301	
Acetina 500 µg/mL 1.5 mL-2	43351705	10.34	
Acetina 500 µg/mL 60:30 (MeOH:TFA 1%)-1	21591760	3.286	
Acetina 500 µg/mL 60:30 (MeOH:TFA 1%)-2	21982102	3.138	
Acetina 500 µg/mL 50:50 (MeOH:TFA 1%)-1	23118807	8.155	
Acetina 500 µg/mL 50:50 (MeOH:TFA 1%)-2	23132440	8.402	
Acetina 500 µg/mL 30°C-1	42731895	8.979	
Acetina 500 µg/mL 30°C -2	41815454	8.892	
Acetina 500 µg/mL 20°C -1	43894087	10.686	
Acetina 500 µg/mL 20°C -2	44411093	10.621	

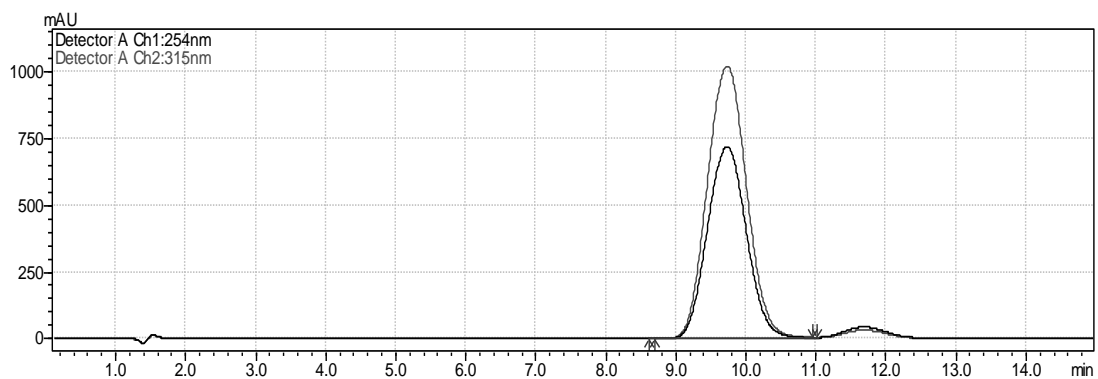
**Cuadro 17.** Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método.

Condición (Media aritmética)	$\bar{y}_i$	$\bar{y}_o$	$ d_i  =  \bar{y}_i - \bar{y}_o $
Normal de operación		43413015.67	
Acetina 500 µg/mL 325 nm-	45570425.5	-	2157409.83
Acetina 500 µg/mL 315 nm-	39751475	-	3661540.67
Acetina 500 µg/mL 15 µL-	64159197.5	-	20746181.83
Acetina 500 µg/mL 5 µL-	23124634	-	20288381.67
Acetina 500 µg/mL 1.0 mL/min	43349736.5	-	63279.17
Acetina 500 µg/mL 1.5 m/min	43786466	-	373450.33
Acetina 500 µg/mL 60:30 (MeOH:TFA 1%)	21786931	-	21626084.67
Acetina 500 µg/mL 50:50 (MeOH:TFA 1%)	23125623.5	-	20287392.17
Acetina 500 µg/mL 30°C	42273674.5	-	1139341.17
Acetina 500 µg/mL 20°C	44152590	-	739574.33

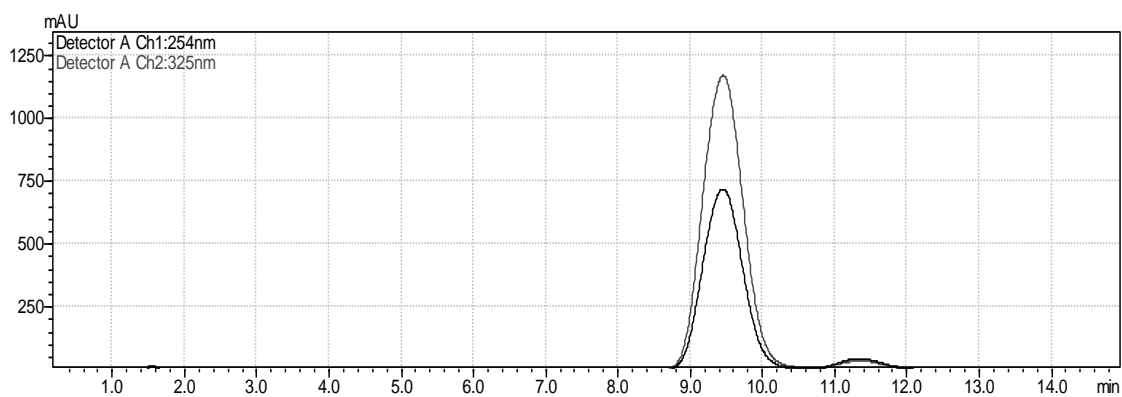
**Cuadro 18.** Diferencia absoluta entre los valores de condiciones de operación modificada y normal.



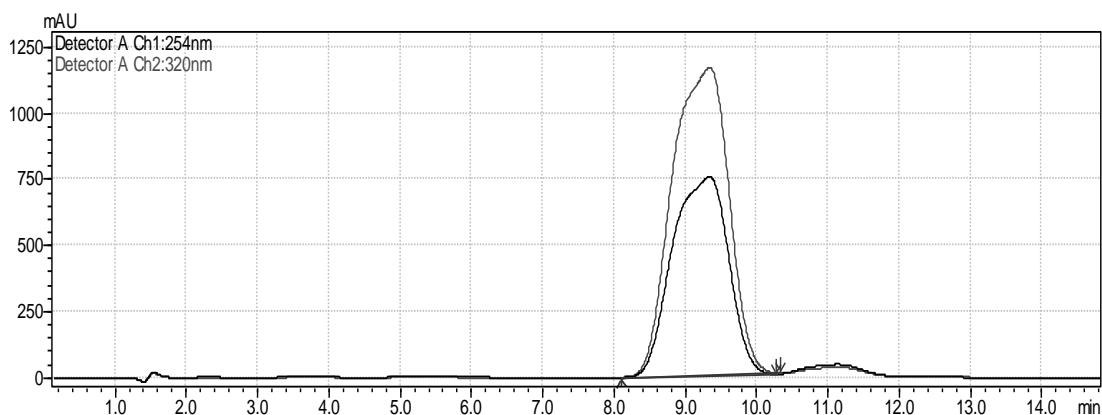
**Figura 11.** Cromatograma de la solución estándar de acetina en condiciones normales de operación (Cuadro 4).



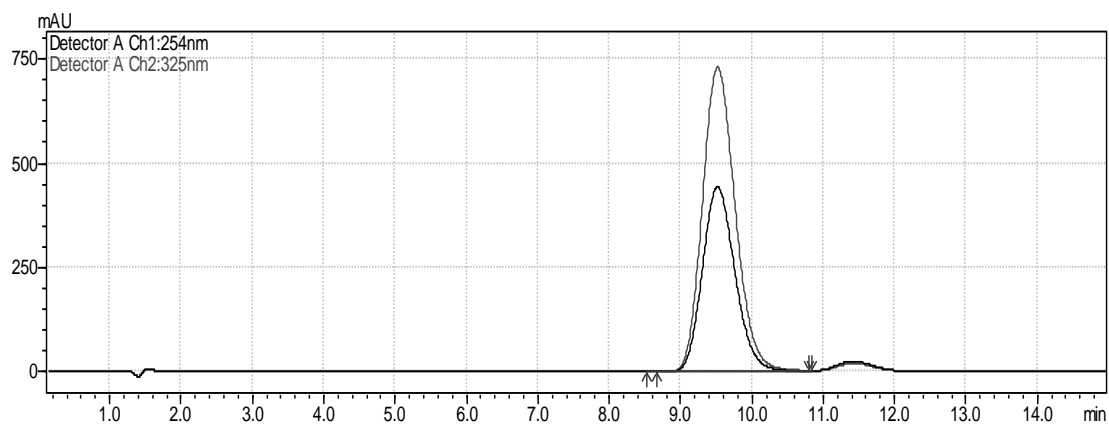
**Figura 12.** Cromatograma de la solución estándar de acetina registrado a una longitud de onda de 315 nm.



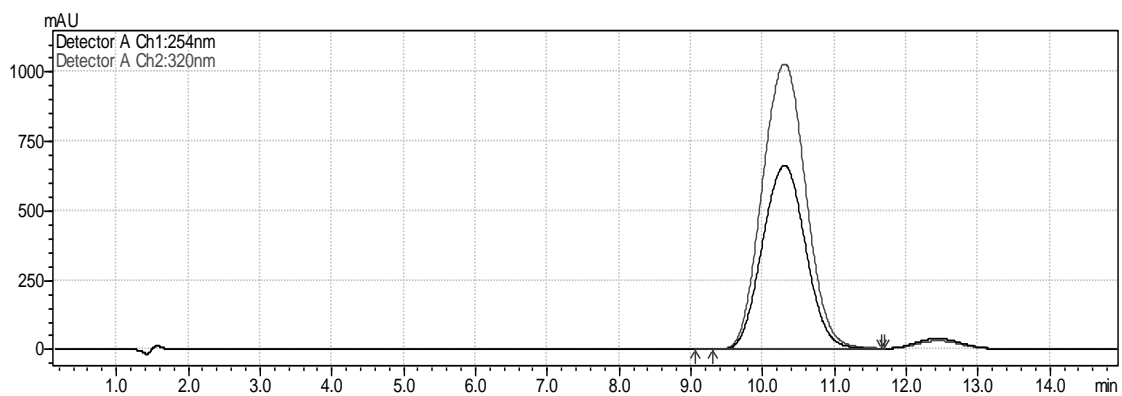
**Figura 13.** Cromatograma de la solución estándar de acetina registrado a una longitud de onda de 325 nm.



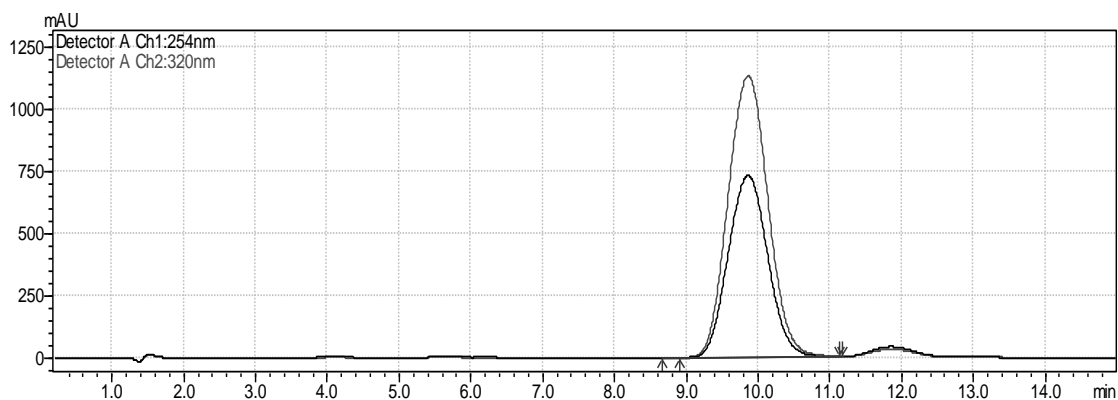
**Figura 14.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando un volumen de inyección de 15  $\mu$ L.



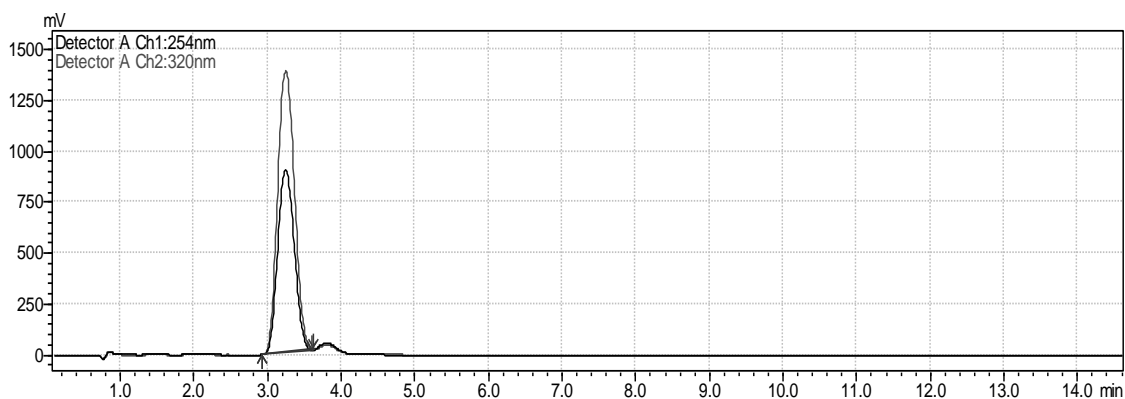
**Figura 15.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando un volumen de inyección de 5  $\mu$ L.



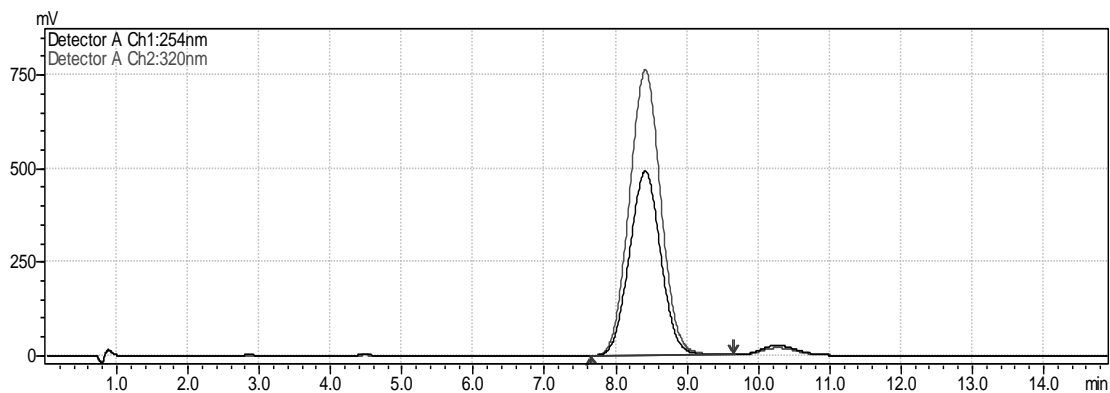
**Figura 16.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.



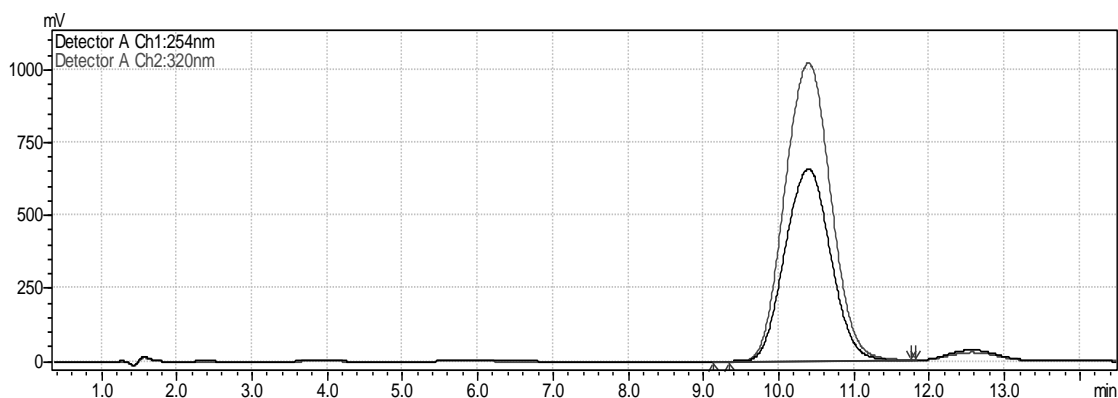
**Figura 17.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando una velocidad de flujo de 1.5 mL/min.



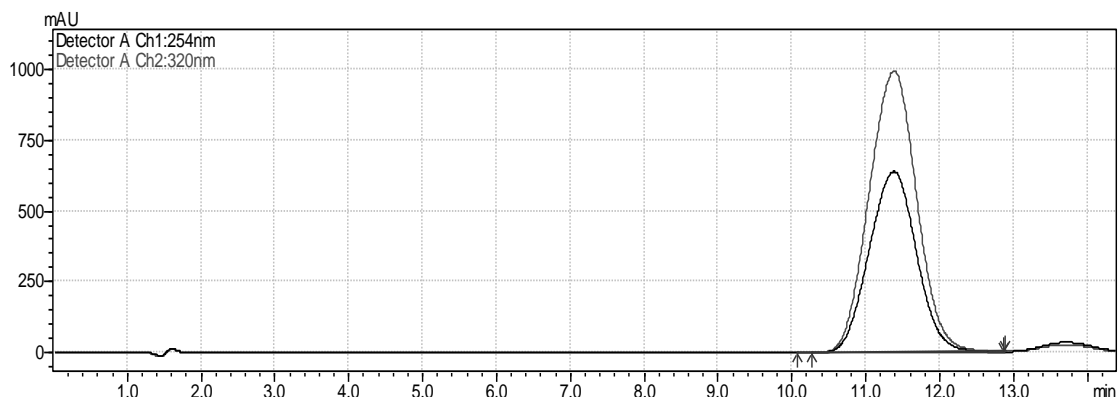
**Figura 18.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando como fase móvil MeOH:TFA 0.1% en proporción 60:40.



**Figura 19.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando como fase móvil de MeOH:TFA 0.1% en proporción 50:50.



**Figura 20.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando 30°C de temperatura en la columna.



**Figura 21.** Cromatograma de la solución estándar de acetina utilizando 20°C de temperatura en la columna.

Como se deduce de los resultados ilustrados en las Figuras anteriores el método analítico no es robusto, debido a que la diferencia entre las condiciones normales de operación y las condiciones modificadas superan el 2% de variación.

Una vez validado el método analítico se analizó la concentración de la acetina presente en el extracto de propóleo. Para ello, se realizaron 6 inyecciones a una concentración aproximada de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de acetina; la DER calculada fue de 0.52%. Con base en los resultados obtenidos anterior se concluye que la concentración de la acetina por cada gramo del extracto de propóleo fue de 2.57 mg/g.



Área de la muestra del extracto	Parámetro de adecuabilidad del sistema
43720806	$\bar{y} = 43413015.67$ $S = 200566.4927$ $DER = 0.5\%$
43603048	
43265220	
43188687	
43188687	
43519352	
43717182	

**Cuadro 19.** Datos para determinar la concentración de la acetina en el extracto de propóleo.



---

## 5. CONCLUSIONES

- a) El método analítico desarrollado para evaluar el contenido de acacetina en el extracto de propóleo es específico, lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones establecido.
- b) El análisis del extracto por CLAE permitió identificar a la acacetina, la 4',7 dimetilapigenina, la 4',7 dimetilnaringenina y la pinocembrina como los constituyentes mayoritarios del propóleo perteneciente a la región del altiplano en México.
- c) La selección de la acacetina como entidad química para el desarrollo y la validación del método analítico por CLAE será de utilidad para estandarizar los lotes de propóleo. Esta actividad permitirá el aseguramiento de la calidad de los productos elaborados con extractos etanólicos de propóleos provenientes de la región del altiplano.
- d) La presencia de la acacetina y la 4',7 dimetilapigenina en los propóleos mexicanos es una característica que permitirá diferenciarlos químicamente de los propóleos provenientes de otras partes del mundo.



---

## 6. PERSPECTIVAS

- a) Completar la validación de la metodología analítica para los siguientes constituyentes: la 4'.7 dimetilapigenina, la 4'.7 dimetilnaringenina y la pinocembrina. Aplicar el método analítico para identificar y cuantificar los flavonoides en diferentes lotes de propóleos y en los preparados farmacéuticos que los contengan.
- b) Evaluar el contenido de los productos seleccionados como marcadores en los extractos de propóleos con la finalidad de desarrollar los criterios de calidad básicos que permitan correlacionar un tipo particular de propóleo con una actividad biológica específica.





---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005a, **100**, 114-117.
2. Bankova, V., Recent trends and important developments in propolis research. *Recent trends in propolis research*, 2005b, **2**, 29-32.
3. Burdock, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food Chemical Toxicology*, 1998, **36**, 347-363.
4. Castaldo, S., Capasso, F., Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002, **73 (Suppl.1)**, S1-S6.
5. Ding, S., Dudley, E., Plummer, S., Tang, J., Newton, R.P. Brenton, A.G. Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. *Phytochemistry*, 2008, **69**, 1555-1564.
6. Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. *Pharmacological Biomedical Analysis*, 2007, **45**, 390-399.
7. Hernández, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 2007, **73**, 1469-1474.
8. Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Lin, C.C. Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 2004b, **67**, 823-829.



9. Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Liu, C.F., Lin, C.C. Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biochemical Pharmacology*, 2004a, **212**, 53-60.
10. International Conference on Harmonisation (ICH Q2A). Guideline For Industry. Text on Validation of Analytical Procedures, 1995.
11. International Conference on Harmonisation (ICH Q2B). Guideline Validation of Analytical Procedures: methodology, 1996.
12. Jiang, F., Tao, Y. fingerprint quality control of quianghuo by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, **111**, 265-270.
13. Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography A*, 1998, **793**, 370–377.
14. Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 2004, **84**, 329-339.
15. Liqin, J., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G., Wang, S. Analysis of Flavonoids in Propolis and Ginkgo biloba by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56 (24)**, 11571–11577.
16. Marcucci, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, 1995, **26**, 83-99.
17. Mitscher, A., Pillai, S., Shankel, D.M. Some Transpacific Thoughts on the Regulatory Need for Standardization of Herbal Medical Products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2000, **8 (4)**, 229-234.
18. Mok-Ryeon, A., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Ohta, T. Correlation between antiangiogenic



- activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular nutrition food research*, 2009, **53**, 643–651.
19. Nielsen, S.E., Dragsted, L.O. Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of apigenin and acacetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, **713(2)**, 379–386.
20. Peña, R.C. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación Agraria*, 2008, **35(1)**, 17-26.
21. Pietta, P.G., Gardana, C., Pietta, A.M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 2002, **73(Suppl.1)**, S7-S20.
22. Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B, Sabatini, G.A., Marcazzan, G.L., Bogdanov, S. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochemical Analysis*, 2004, **15(4)**, 235–240.
23. Salatino, A., Weinstein, E., Negri, G., Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Advance Access Publication*, 2005, **2(1)**, 33-38.
24. Sforcin, J.M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, **113**, 1–14.
25. Sforcin, J.M., Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, **133(2)**, 253–260.
26. Shen, K.H., Hung, S.H., Yin, L.T., Huang, C.S., Chao, C.H., Liu, C.L, Shih, Y.W. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem.*, 2010, **333**, 279–291.



27. Silici, S., Kutluca, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **99 (1)**, 69-73.
28. Singh, P. R., Agrawal, P., Yim, D., Agarwal, C., Agarwal, R., Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure-activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis*, 2005, **26(4)**, 845-854.
29. Springfield, E.P.; Eagles, P.K., Scott, G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **101(1-3)**, 75-83.
30. Szliszka, E., Czuba, Z.P., Domino, M., Mazur, B., Zydowicz, G., Wojciech, K. Ethanolic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. *Molecules*, 2009, **14(2)**, 738-754.
31. Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, O., Çoğulu, D., Gençay, O., Salih, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 2005, **160**, 189-195.
32. Volpi, N., Bergonzini, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **42(3)**, 354–361.
33. Walker, P., Crane, E. Constituents of propolis. *Apidologie*, 1987, **18 (4)**, 327-334.
34. Xu, C.J., Liang, Y.Z., Chau, F.T., Heyden, Y.V. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1134(1-2)**, 253-259.



## 9. ANEXOS

### ANEXO A

Ecuaciones para determinar los parámetros estadísticos

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABREVIATURA	ECUACIÓN
Coefficiente de correlación	r	$r = \sqrt{\frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coefficiente de determinación r	r <sup>2</sup>	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coefficiente de variación	CV	$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$
Desviación estándar	S	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada al origen	b <sub>0</sub>	$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}\right)}$
Desviación estándar de la pendiente	S <sub>b1</sub>	$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}\right)}$
Desviación estándar de la regresión	S <sub>y/x</sub>	$S_{y/x} = \sqrt{\left(\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}\right)}$



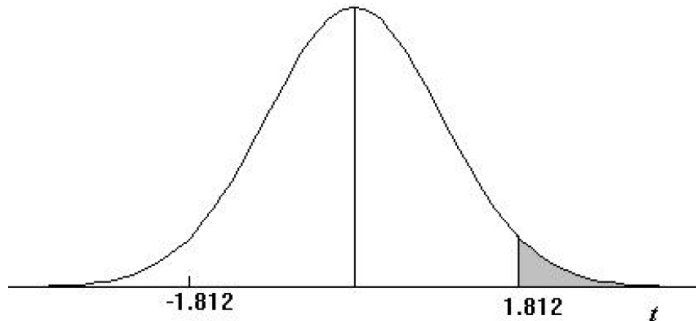
PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABREVIATURA	ECUACIÓN
Diferencia absoluta de las medias	$ d_i $	$ d_i  =  \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\mu)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional	$IC(\beta_0)$	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} \cdot S b_0$
Intervalo de confianza para la pendiente poblacional	$IC(\beta_1)$	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} \cdot S b_1$
Media aritmética	$\bar{x}, \bar{y}, \bar{y}_i$	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y}{n}, \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n}$
Ordenada al origen	$b_0$	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Pendiente	$b_1$	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Suma de x	$\sum x$	$\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$
Suma de y	$\sum y$	$\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$
Suma al cuadrado de x	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2 = (\sum_{i=1}^n x_i)^2$



PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABREVIATURA	ECUACIÓN
Suma al cuadrado de y	$(\sum y)^2$	$(\sum y)^2 = (\sum_{i=1}^n y_i)^2$
Suma de x al cuadrado	$\sum x^2$	$\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$
Suma de y al cuadrado	$\sum y^2$	$\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$
Suma de x por y	$\sum xy$	$\sum xy = \sum_{i=1}^n x_i y_i$
Suma de x por suma de y	$\sum x \sum y$	$\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i$
% de Recobro	%R	$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$



## ANEXO B TABLA DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT



### Ejemplo

Para  $r = 10$  grados de libertad:

$$P[t > 1.812] = 0.05$$

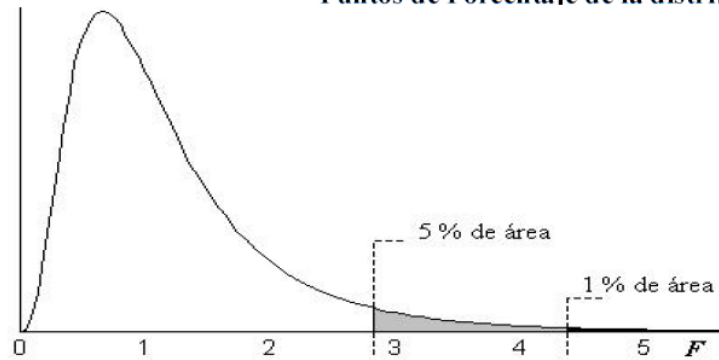
$$P[t < -1.812] = 0.05$$

$\alpha$ r	t								
	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0005
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	0,679	0,848	1,045	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
$\infty$	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,290





### Puntos de Porcentaje de la distribución F



Ejemplo:

Para  $n_1 = 9, n_2 = 12$  grados de libertad:

$$P[F > 2.80] = 0.05$$

$$P[F > 4.39] = 0.01$$

n <sub>2</sub>	5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F																				n <sub>2</sub>				
	n <sub>1</sub> grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	
1	161	199	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	246	248	249	250	251	252	253	253	254	254	254	1
2	<b>4052</b>	<b>4999</b>	<b>5404</b>	<b>5624</b>	<b>5764</b>	<b>5859</b>	<b>5928</b>	<b>5981</b>	<b>6022</b>	<b>6056</b>	<b>6083</b>	<b>6107</b>	<b>6143</b>	<b>6170</b>	<b>6209</b>	<b>6234</b>	<b>6260</b>	<b>6286</b>	<b>6302</b>	<b>6324</b>	<b>6334</b>	<b>6350</b>	<b>6360</b>	<b>6366</b>	2
3	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.42	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.48	19.49	19.49	19.49	19.50	3
4	<b>98.50</b>	<b>99.00</b>	<b>99.16</b>	<b>99.25</b>	<b>99.30</b>	<b>99.33</b>	<b>99.36</b>	<b>99.38</b>	<b>99.39</b>	<b>99.40</b>	<b>99.41</b>	<b>99.42</b>	<b>99.43</b>	<b>99.44</b>	<b>99.45</b>	<b>99.46</b>	<b>99.47</b>	<b>99.48</b>	<b>99.48</b>	<b>99.48</b>	<b>99.49</b>	<b>99.49</b>	<b>99.50</b>	<b>99.50</b>	4
5	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.71	8.69	8.66	8.64	8.62	8.59	8.58	8.56	8.55	8.54	8.53	8.53	5
6	<b>34.12</b>	<b>30.82</b>	<b>29.46</b>	<b>28.71</b>	<b>28.24</b>	<b>27.91</b>	<b>27.67</b>	<b>27.49</b>	<b>27.34</b>	<b>27.23</b>	<b>27.13</b>	<b>27.05</b>	<b>26.92</b>	<b>26.83</b>	<b>26.69</b>	<b>26.60</b>	<b>26.50</b>	<b>26.41</b>	<b>26.35</b>	<b>26.28</b>	<b>26.24</b>	<b>26.18</b>	<b>26.15</b>	<b>26.13</b>	6
7	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.87	5.84	5.80	5.77	5.75	5.72	5.70	5.68	5.66	5.65	5.64	5.63	7
8	<b>21.20</b>	<b>18.00</b>	<b>16.69</b>	<b>15.98</b>	<b>15.52</b>	<b>15.21</b>	<b>14.98</b>	<b>14.80</b>	<b>14.66</b>	<b>14.55</b>	<b>14.45</b>	<b>14.37</b>	<b>14.25</b>	<b>14.15</b>	<b>14.02</b>	<b>13.93</b>	<b>13.84</b>	<b>13.75</b>	<b>13.69</b>	<b>13.61</b>	<b>13.58</b>	<b>13.52</b>	<b>13.49</b>	<b>13.46</b>	8
9	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.64	4.60	4.56	4.53	4.50	4.46	4.44	4.42	4.41	4.39	4.37	4.37	9
10	<b>16.26</b>	<b>13.27</b>	<b>12.06</b>	<b>11.39</b>	<b>10.97</b>	<b>10.67</b>	<b>10.46</b>	<b>10.29</b>	<b>10.16</b>	<b>10.05</b>	<b>9.96</b>	<b>9.89</b>	<b>9.77</b>	<b>9.68</b>	<b>9.55</b>	<b>9.47</b>	<b>9.38</b>	<b>9.29</b>	<b>9.24</b>	<b>9.17</b>	<b>9.13</b>	<b>9.08</b>	<b>9.04</b>	<b>9.02</b>	10
11	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.96	3.92	3.87	3.84	3.81	3.77	3.75	3.73	3.71	3.69	3.68	3.67	11
12	<b>13.75</b>	<b>10.92</b>	<b>9.78</b>	<b>9.15</b>	<b>8.75</b>	<b>8.47</b>	<b>8.26</b>	<b>8.10</b>	<b>7.98</b>	<b>7.87</b>	<b>7.79</b>	<b>7.72</b>	<b>7.60</b>	<b>7.52</b>	<b>7.40</b>	<b>7.31</b>	<b>7.23</b>	<b>7.14</b>	<b>7.09</b>	<b>7.02</b>	<b>6.99</b>	<b>6.93</b>	<b>6.90</b>	<b>6.88</b>	12
13	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.53	3.49	3.44	3.41	3.38	3.34	3.32	3.29	3.27	3.25	3.24	3.23	13
14	<b>12.25</b>	<b>9.55</b>	<b>8.45</b>	<b>7.85</b>	<b>7.46</b>	<b>7.19</b>	<b>6.99</b>	<b>6.84</b>	<b>6.72</b>	<b>6.62</b>	<b>6.54</b>	<b>6.47</b>	<b>6.36</b>	<b>6.28</b>	<b>6.16</b>	<b>6.07</b>	<b>5.99</b>	<b>5.91</b>	<b>5.86</b>	<b>5.79</b>	<b>5.75</b>	<b>5.70</b>	<b>5.67</b>	<b>5.65</b>	14
15	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.24	3.20	3.15	3.12	3.08	3.04	3.02	2.99	2.97	2.95	2.94	2.93	15
16	<b>11.26</b>	<b>8.65</b>	<b>7.59</b>	<b>7.01</b>	<b>6.63</b>	<b>6.37</b>	<b>6.18</b>	<b>6.03</b>	<b>5.91</b>	<b>5.81</b>	<b>5.73</b>	<b>5.67</b>	<b>5.56</b>	<b>5.48</b>	<b>5.36</b>	<b>5.28</b>	<b>5.20</b>	<b>5.12</b>	<b>5.07</b>	<b>5.00</b>	<b>4.96</b>	<b>4.91</b>	<b>4.88</b>	<b>4.86</b>	16
17	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.03	2.99	2.94	2.90	2.86	2.83	2.80	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71	17
18	<b>10.56</b>	<b>8.02</b>	<b>6.99</b>	<b>6.42</b>	<b>6.06</b>	<b>5.80</b>	<b>5.61</b>	<b>5.47</b>	<b>5.35</b>	<b>5.26</b>	<b>5.18</b>	<b>5.11</b>	<b>5.01</b>	<b>4.92</b>	<b>4.81</b>	<b>4.73</b>	<b>4.65</b>	<b>4.57</b>	<b>4.52</b>	<b>4.45</b>	<b>4.41</b>	<b>4.36</b>	<b>4.33</b>	<b>4.31</b>	18
19	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.86	2.83	2.77	2.74	2.70	2.66	2.64	2.60	2.59	2.56	2.55	2.54	19
20	<b>10.04</b>	<b>7.56</b>	<b>6.55</b>	<b>5.99</b>	<b>5.64</b>	<b>5.39</b>	<b>5.20</b>	<b>5.06</b>	<b>4.94</b>	<b>4.85</b>	<b>4.77</b>	<b>4.71</b>	<b>4.60</b>	<b>4.52</b>	<b>4.41</b>	<b>4.33</b>	<b>4.25</b>	<b>4.17</b>	<b>4.12</b>	<b>4.05</b>	<b>4.01</b>	<b>3.96</b>	<b>3.93</b>	<b>3.91</b>	20





n <sub>2</sub>	5 % (normal) y 1 % (negritas) puntos para la distribución de F																								n <sub>2</sub>
	n1 grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.74	2.70	2.65	2.61	2.57	2.53	2.51	2.47	2.46	2.43	2.42	2.40	11
12	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.46	4.40	4.29	4.21	4.10	4.02	3.94	3.86	3.81	3.74	3.71	3.66	3.62	3.60	12
	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.64	2.60	2.54	2.51	2.47	2.43	2.40	2.37	2.35	2.32	2.31	2.30	12
13	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.05	3.97	3.86	3.78	3.70	3.62	3.57	3.50	3.47	3.41	3.38	3.36	13
	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.55	2.51	2.46	2.42	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.23	2.22	2.21	13
14	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.86	3.78	3.66	3.59	3.51	3.43	3.38	3.31	3.27	3.22	3.19	3.17	14
	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.48	2.44	2.39	2.35	2.31	2.27	2.24	2.21	2.19	2.16	2.14	2.13	14
15	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.70	3.62	3.51	3.43	3.35	3.27	3.22	3.15	3.11	3.06	3.03	3.00	15
	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.42	2.38	2.33	2.29	2.25	2.20	2.18	2.14	2.12	2.10	2.08	2.07	15
16	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.56	3.49	3.37	3.29	3.21	3.13	3.08	3.01	2.98	2.92	2.89	2.87	16
	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.37	2.33	2.28	2.24	2.19	2.15	2.12	2.09	2.07	2.04	2.02	2.01	16
17	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.45	3.37	3.26	3.18	3.10	3.02	2.97	2.90	2.86	2.81	2.78	2.75	17
	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.33	2.29	2.23	2.19	2.15	2.10	2.08	2.04	2.02	1.99	1.97	1.96	17
18	8.40	6.11	5.19	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.35	3.27	3.16	3.08	3.00	2.92	2.87	2.80	2.76	2.71	2.68	2.65	18
	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.29	2.25	2.19	2.15	2.11	2.06	2.04	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92	18
19	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.27	3.19	3.08	3.00	2.92	2.84	2.78	2.71	2.68	2.62	2.59	2.57	19
	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.26	2.21	2.16	2.11	2.07	2.03	2.00	1.96	1.94	1.91	1.89	1.88	19
20	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.19	3.12	3.00	2.92	2.84	2.76	2.71	2.64	2.60	2.55	2.51	2.49	20
	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.22	2.18	2.12	2.08	2.04	1.99	1.97	1.93	1.91	1.88	1.86	1.84	20
21	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.13	3.05	2.94	2.86	2.78	2.69	2.64	2.57	2.54	2.48	2.44	2.42	21
	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.20	2.16	2.10	2.05	2.01	1.96	1.94	1.90	1.88	1.84	1.83	1.81	21
22	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.07	2.99	2.88	2.80	2.72	2.64	2.58	2.51	2.48	2.42	2.38	2.36	22
	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.17	2.13	2.07	2.03	1.98	1.94	1.91	1.87	1.85	1.82	1.80	1.78	22
23	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.02	2.94	2.83	2.75	2.67	2.58	2.53	2.46	2.42	2.36	2.33	2.31	23
	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.15	2.11	2.05	2.01	1.96	1.91	1.88	1.84	1.82	1.79	1.77	1.76	23
24	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	2.97	2.89	2.78	2.70	2.62	2.54	2.48	2.41	2.37	2.32	2.28	2.26	24
	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.13	2.09	2.03	1.98	1.94	1.89	1.86	1.82	1.80	1.77	1.75	1.73	24
25	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.09	3.03	2.93	2.85	2.74	2.66	2.58	2.49	2.44	2.37	2.33	2.27	2.24	2.21	25
	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.11	2.07	2.01	1.96	1.92	1.87	1.84	1.80	1.78	1.75	1.73	1.71	25
26	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	3.06	2.99	2.89	2.81	2.70	2.62	2.54	2.45	2.40	2.33	2.29	2.23	2.19	2.17	26
	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.09	2.05	1.99	1.95	1.90	1.85	1.82	1.78	1.76	1.73	1.71	1.69	26
27	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	3.02	2.96	2.86	2.78	2.66	2.58	2.50	2.42	2.36	2.29	2.25	2.19	2.16	2.13	27
	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.08	2.04	1.97	1.93	1.88	1.84	1.81	1.76	1.74	1.71	1.69	1.67	27
28	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.99	2.93	2.82	2.75	2.63	2.55	2.47	2.38	2.33	2.26	2.22	2.16	2.12	2.10	28
	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.06	2.02	1.96	1.91	1.87	1.82	1.79	1.75	1.73	1.69	1.67	1.65	28
29	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.96	2.90	2.79	2.72	2.60	2.52	2.44	2.35	2.30	2.23	2.19	2.13	2.09	2.06	29
	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.05	2.01	1.94	1.90	1.85	1.81	1.77	1.73	1.71	1.67	1.65	1.64	29
30	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.93	2.87	2.77	2.69	2.57	2.49	2.41	2.33	2.27	2.20	2.16	2.10	2.06	2.03	30
	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.04	1.99	1.93	1.89	1.84	1.79	1.76	1.72	1.70	1.66	1.64	1.62	30
32	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.91	2.84	2.74	2.66	2.55	2.47	2.39	2.30	2.25	2.17	2.13	2.07	2.03	2.01	32
	4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14	2.10	2.07	2.01	1.97	1.91	1.86	1.82	1.77	1.74	1.69	1.67	1.63	1.61	1.59	32
	7.50	5.34	4.46	3.97	3.65	3.43	3.26	3.13	3.02	2.93	2.86	2.80	2.70	2.62	2.50	2.42	2.34	2.25	2.20	2.12	2.08	2.02	1.98	1.96	





$n_2$	5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F																						$n_2$		
	n1 grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	$\infty$	
34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12	2.08	2.05	1.99	1.95	1.89	1.84	1.80	1.75	1.71	1.67	1.65	1.61	1.59	1.57	34
	<b>7.44</b>	<b>5.29</b>	<b>4.42</b>	<b>3.93</b>	<b>3.61</b>	<b>3.39</b>	<b>3.22</b>	<b>3.09</b>	<b>2.98</b>	<b>2.89</b>	<b>2.82</b>	<b>2.76</b>	<b>2.66</b>	<b>2.58</b>	<b>2.46</b>	<b>2.38</b>	<b>2.30</b>	<b>2.21</b>	<b>2.16</b>	<b>2.08</b>	<b>2.04</b>	<b>1.98</b>	<b>1.94</b>	<b>1.91</b>	
36	4.11	3.26	2.87	2.63	2.48	2.36	2.28	2.21	2.15	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.87	1.82	1.78	1.73	1.69	1.65	1.62	1.59	1.56	1.55	36
	<b>7.40</b>	<b>5.25</b>	<b>4.38</b>	<b>3.89</b>	<b>3.57</b>	<b>3.35</b>	<b>3.18</b>	<b>3.05</b>	<b>2.95</b>	<b>2.86</b>	<b>2.79</b>	<b>2.72</b>	<b>2.62</b>	<b>2.54</b>	<b>2.43</b>	<b>2.35</b>	<b>2.26</b>	<b>2.18</b>	<b>2.12</b>	<b>2.04</b>	<b>2.00</b>	<b>1.94</b>	<b>1.90</b>	<b>1.87</b>	
38	4.10	3.24	2.85	2.62	2.46	2.35	2.26	2.19	2.14	2.09	2.05	2.02	1.96	1.92	1.85	1.81	1.76	1.71	1.68	1.63	1.61	1.57	1.54	1.53	38
	<b>7.35</b>	<b>5.21</b>	<b>4.34</b>	<b>3.86</b>	<b>3.54</b>	<b>3.32</b>	<b>3.15</b>	<b>3.02</b>	<b>2.92</b>	<b>2.83</b>	<b>2.75</b>	<b>2.69</b>	<b>2.59</b>	<b>2.51</b>	<b>2.40</b>	<b>2.32</b>	<b>2.23</b>	<b>2.14</b>	<b>2.09</b>	<b>2.01</b>	<b>1.97</b>	<b>1.90</b>	<b>1.86</b>	<b>1.84</b>	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.95	1.90	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.61	1.59	1.55	1.53	1.51	40
	<b>7.31</b>	<b>5.18</b>	<b>4.31</b>	<b>3.83</b>	<b>3.51</b>	<b>3.29</b>	<b>3.12</b>	<b>2.99</b>	<b>2.89</b>	<b>2.80</b>	<b>2.73</b>	<b>2.66</b>	<b>2.56</b>	<b>2.48</b>	<b>2.37</b>	<b>2.29</b>	<b>2.20</b>	<b>2.11</b>	<b>2.06</b>	<b>1.98</b>	<b>1.94</b>	<b>1.87</b>	<b>1.83</b>	<b>1.81</b>	
42	4.07	3.22	2.83	2.59	2.44	2.32	2.24	2.17	2.11	2.06	2.03	1.99	1.94	1.89	1.83	1.78	1.73	1.68	1.65	1.60	1.57	1.53	1.51	1.49	42
	<b>7.28</b>	<b>5.15</b>	<b>4.29</b>	<b>3.80</b>	<b>3.49</b>	<b>3.27</b>	<b>3.10</b>	<b>2.97</b>	<b>2.86</b>	<b>2.78</b>	<b>2.70</b>	<b>2.64</b>	<b>2.54</b>	<b>2.46</b>	<b>2.34</b>	<b>2.26</b>	<b>2.18</b>	<b>2.09</b>	<b>2.03</b>	<b>1.95</b>	<b>1.91</b>	<b>1.85</b>	<b>1.80</b>	<b>1.78</b>	
44	4.06	3.21	2.82	2.58	2.43	2.31	2.23	2.16	2.10	2.05	2.01	1.98	1.92	1.88	1.81	1.77	1.72	1.67	1.63	1.59	1.56	1.52	1.49	1.48	44
	<b>7.25</b>	<b>5.12</b>	<b>4.26</b>	<b>3.78</b>	<b>3.47</b>	<b>3.24</b>	<b>3.08</b>	<b>2.95</b>	<b>2.84</b>	<b>2.75</b>	<b>2.68</b>	<b>2.62</b>	<b>2.52</b>	<b>2.44</b>	<b>2.32</b>	<b>2.24</b>	<b>2.15</b>	<b>2.07</b>	<b>2.01</b>	<b>1.93</b>	<b>1.89</b>	<b>1.82</b>	<b>1.78</b>	<b>1.75</b>	
46	4.05	3.20	2.81	2.57	2.42	2.30	2.22	2.15	2.09	2.04	2.00	1.97	1.91	1.87	1.80	1.76	1.71	1.65	1.62	1.57	1.55	1.51	1.48	1.46	46
	<b>7.22</b>	<b>5.10</b>	<b>4.24</b>	<b>3.76</b>	<b>3.44</b>	<b>3.22</b>	<b>3.06</b>	<b>2.93</b>	<b>2.82</b>	<b>2.73</b>	<b>2.66</b>	<b>2.60</b>	<b>2.50</b>	<b>2.42</b>	<b>2.30</b>	<b>2.22</b>	<b>2.13</b>	<b>2.04</b>	<b>1.99</b>	<b>1.91</b>	<b>1.86</b>	<b>1.80</b>	<b>1.76</b>	<b>1.73</b>	
48	4.04	3.19	2.80	2.57	2.41	2.29	2.21	2.14	2.08	2.03	1.99	1.96	1.90	1.86	1.79	1.75	1.70	1.64	1.61	1.56	1.54	1.49	1.47	1.45	48
	<b>7.19</b>	<b>5.08</b>	<b>4.22</b>	<b>3.74</b>	<b>3.43</b>	<b>3.20</b>	<b>3.04</b>	<b>2.91</b>	<b>2.80</b>	<b>2.71</b>	<b>2.64</b>	<b>2.58</b>	<b>2.48</b>	<b>2.40</b>	<b>2.28</b>	<b>2.20</b>	<b>2.12</b>	<b>2.02</b>	<b>1.97</b>	<b>1.89</b>	<b>1.84</b>	<b>1.78</b>	<b>1.73</b>	<b>1.70</b>	
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.99	1.95	1.89	1.85	1.78	1.74	1.69	1.63	1.60	1.55	1.52	1.48	1.46	1.44	50
	<b>7.17</b>	<b>5.06</b>	<b>4.20</b>	<b>3.72</b>	<b>3.41</b>	<b>3.19</b>	<b>3.02</b>	<b>2.89</b>	<b>2.78</b>	<b>2.70</b>	<b>2.63</b>	<b>2.56</b>	<b>2.46</b>	<b>2.38</b>	<b>2.27</b>	<b>2.18</b>	<b>2.10</b>	<b>2.01</b>	<b>1.95</b>	<b>1.87</b>	<b>1.82</b>	<b>1.76</b>	<b>1.71</b>	<b>1.68</b>	
55	4.02	3.16	2.77	2.54	2.38	2.27	2.18	2.11	2.06	2.01	1.97	1.93	1.88	1.83	1.76	1.72	1.67	1.61	1.58	1.53	1.50	1.46	1.43	1.41	55
	<b>7.12</b>	<b>5.01</b>	<b>4.16</b>	<b>3.68</b>	<b>3.37</b>	<b>3.15</b>	<b>2.98</b>	<b>2.85</b>	<b>2.75</b>	<b>2.66</b>	<b>2.59</b>	<b>2.53</b>	<b>2.42</b>	<b>2.34</b>	<b>2.23</b>	<b>2.15</b>	<b>2.06</b>	<b>1.97</b>	<b>1.91</b>	<b>1.83</b>	<b>1.78</b>	<b>1.71</b>	<b>1.67</b>	<b>1.64</b>	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.86	1.82	1.75	1.70	1.65	1.59	1.56	1.51	1.48	1.44	1.41	1.39	60
	<b>7.08</b>	<b>4.98</b>	<b>4.13</b>	<b>3.65</b>	<b>3.34</b>	<b>3.12</b>	<b>2.95</b>	<b>2.82</b>	<b>2.72</b>	<b>2.63</b>	<b>2.56</b>	<b>2.50</b>	<b>2.39</b>	<b>2.31</b>	<b>2.20</b>	<b>2.12</b>	<b>2.03</b>	<b>1.94</b>	<b>1.88</b>	<b>1.79</b>	<b>1.75</b>	<b>1.68</b>	<b>1.63</b>	<b>1.60</b>	
65	3.99	3.14	2.75	2.51	2.36	2.24	2.15	2.08	2.03	1.98	1.94	1.90	1.85	1.80	1.73	1.69	1.63	1.58	1.54	1.49	1.46	1.42	1.39	1.37	65
	<b>7.04</b>	<b>4.95</b>	<b>4.10</b>	<b>3.62</b>	<b>3.31</b>	<b>3.09</b>	<b>2.93</b>	<b>2.80</b>	<b>2.69</b>	<b>2.61</b>	<b>2.53</b>	<b>2.47</b>	<b>2.37</b>	<b>2.29</b>	<b>2.17</b>	<b>2.09</b>	<b>2.00</b>	<b>1.91</b>	<b>1.85</b>	<b>1.77</b>	<b>1.72</b>	<b>1.65</b>	<b>1.60</b>	<b>1.57</b>	
70	3.98	3.13	2.74	2.50	2.35	2.23	2.14	2.07	2.02	1.97	1.93	1.89	1.84	1.79	1.72	1.67	1.62	1.57	1.53	1.48	1.45	1.40	1.37	1.35	70
	<b>7.01</b>	<b>4.92</b>	<b>4.07</b>	<b>3.60</b>	<b>3.29</b>	<b>3.07</b>	<b>2.91</b>	<b>2.78</b>	<b>2.67</b>	<b>2.59</b>	<b>2.51</b>	<b>2.45</b>	<b>2.35</b>	<b>2.27</b>	<b>2.15</b>	<b>2.07</b>	<b>1.98</b>	<b>1.89</b>	<b>1.83</b>	<b>1.74</b>	<b>1.70</b>	<b>1.62</b>	<b>1.57</b>	<b>1.54</b>	
80	3.96	3.11	2.72	2.49	2.33	2.21	2.13	2.06	2.00	1.95	1.91	1.88	1.82	1.77	1.70	1.65	1.60	1.54	1.51	1.45	1.43	1.38	1.35	1.33	80
	<b>6.96</b>	<b>4.88</b>	<b>4.04</b>	<b>3.56</b>	<b>3.26</b>	<b>3.04</b>	<b>2.87</b>	<b>2.74</b>	<b>2.64</b>	<b>2.55</b>	<b>2.48</b>	<b>2.42</b>	<b>2.31</b>	<b>2.23</b>	<b>2.12</b>	<b>2.03</b>	<b>1.94</b>	<b>1.85</b>	<b>1.79</b>	<b>1.70</b>	<b>1.65</b>	<b>1.58</b>	<b>1.53</b>	<b>1.50</b>	
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93	1.89	1.85	1.79	1.75	1.68	1.63	1.57	1.52	1.48	1.42	1.39	1.34	1.31	1.28	100
	<b>6.90</b>	<b>4.82</b>	<b>3.98</b>	<b>3.51</b>	<b>3.21</b>	<b>2.99</b>	<b>2.82</b>	<b>2.69</b>	<b>2.59</b>	<b>2.50</b>	<b>2.43</b>	<b>2.37</b>	<b>2.27</b>	<b>2.19</b>	<b>2.07</b>	<b>1.98</b>	<b>1.89</b>	<b>1.80</b>	<b>1.74</b>	<b>1.65</b>	<b>1.60</b>	<b>1.52</b>	<b>1.47</b>	<b>1.43</b>	
125	3.92	3.07	2.68	2.44	2.29	2.17	2.08	2.01	1.96	1.91	1.87	1.83	1.77	1.73	1.66	1.60	1.55	1.49	1.45	1.40	1.36	1.31	1.27	1.25	125
	<b>6.84</b>	<b>4.78</b>	<b>3.94</b>	<b>3.47</b>	<b>3.17</b>	<b>2.95</b>	<b>2.79</b>	<b>2.66</b>	<b>2.55</b>	<b>2.47</b>	<b>2.39</b>	<b>2.33</b>	<b>2.23</b>	<b>2.15</b>	<b>2.03</b>	<b>1.94</b>	<b>1.85</b>	<b>1.76</b>	<b>1.69</b>	<b>1.60</b>	<b>1.55</b>	<b>1.47</b>	<b>1.41</b>	<b>1.37</b>	
150	3.90	3.06	2.66	2.43	2.27	2.16	2.07	2.00	1.94	1.89	1.85	1.82	1.76	1.71	1.64	1.59	1.54	1.48	1.44	1.38	1.34	1.29	1.25	1.22	150
	<b>6.81</b>	<b>4.75</b>	<b>3.91</b>	<b>3.45</b>	<b>3.14</b>	<b>2.92</b>	<b>2.76</b>	<b>2.63</b>	<b>2.53</b>	<b>2.44</b>	<b>2.37</b>	<b>2.31</b>	<b>2.20</b>	<b>2.12</b>	<b>2.00</b>	<b>1.92</b>	<b>1.83</b>	<b>1.73</b>	<b>1.66</b>	<b>1.57</b>	<b>1.52</b>	<b>1.43</b>	<b>1.38</b>	<b>1.33</b>	
200	3.89	3.04	2.65	2.42	2.26	2.14	2.06	1.98	1.93	1.88	1.84	1.80	1.74	1.69	1.62	1.57	1.52	1.46	1.41	1.35	1.32	1.26	1.22	1.19	200
	<b>6.76</b>	<b>4.71</b>	<b>3.88</b>	<b>3.41</b>	<b>3.11</b>	<b>2.89</b>	<b>2.73</b>	<b>2.60</b>	<b>2.50</b>	<b>2.41</b>	<b>2.34</b>	<b>2.27</b>	<b>2.17</b>	<b>2.09</b>	<b>1.97</b>	<b>1.89</b>	<b>1.79</b>	<b>1.69</b>	<b>1.63</b>	<b>1.53</b>	<b>1.48</b>	<b>1.39</b>	<b>1.33</b>	<b>1.28</b>	
400	3.86	3.02	2.63	2.39	2.24	2.12	2.03	1.96	1.90	1.85	1.81	1.78	1.72	1.67	1.60	1.54	1.49	1.42	1.38	1.32	1.28	1.22	1.17	1.13	400
	<b>6.70</b>	<b>4.66</b>	<b>3.83</b>	<b>3.37</b>	<b>3.06</b>	<b>2.85</b>	<b>2.68</b>	<b>2.56</b>	<b>2.45</b>	<b>2.37</b>	<b>2.29</b>	<b>2.23</b>	<b>2.13</b>	<b>2.05</b>	<b>1.92</b>	<b>1.84</b>	<b>1.75</b>	<b>1.64</b>	<b>1.58</b>	<b>1.48</b>	<b>1.42</b>	<b>1.32</b>	<b>1.25</b>	<b>1.19</b>	
1000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.11	2.02	1.95	1.89	1.84	1.80	1.76	1.70	1.65	1.58	1.53	1.47	1.41	1.36	1.30	1.26	1.19	1.13	1.08	1000
	<b>6.66</b>	<b>4.63</b>	<b>3.80</b>	<b>3.34</b>	<b>3.04</b>	<b>2.82</b>	<b>2.66</b>	<b>2.53</b>	<b>2.43</b>	<b>2.34</b>	<b>2.27</b>	<b>2.20</b>	<b>2.10</b>	<b>2.02</b>	<b>1.90</b>	<b>1.81</b>	<b>1.72</b>	<b>1.61</b>	<b>1.54</b>	<b>1.44</b>	<b>1.38</b>	<b>1.28</b>	<b>1.19</b>	<b>1.12</b>	
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.79	1.75	1.69	1.64	1.57	1.52	1.46	1.39	1.35	1.28	1.24	1.17	1.11	1.00	$\infty$
	<b>6.63</b>	<b>4.61</b>	<b>3.78</b>	<b>3.32</b>	<b>3.02</b>	<b>2.80</b>	<b>2.64</b>	<b>2.51</b>	<b>2.41</b>	<b>2.32</b>	<b>2.25</b>	<b>2.18</b>	<b>2.08</b>	<b>2.00</b>	<b>1.88</b>	<b>1.79</b>	<b>1.70</b>	<b>1.59</b>	<b>1.52</b>	<b>1.42</b>	<b>1.36</b>	<b>1.25</b>	<b>1.15</b>	<b>1.00</b>	

