



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en propóleos mexicanos”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DIANA ALEJANDRA MARTÍNEZ CHÁVEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Inés Fuentes Noriega
VOCAL: Dr. Francisco Rojo Callejas
SECRETARIO: Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
1er. SUPLENTE: Dra. Rachel Mata Essayag
2° SUPLENTE: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA: _____

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

Dr. José Fausto Rivero Cruz

SUSTENTANTE: _____

Diana Alejandra Martínez Chávez

Agradecimientos

El presente trabajo experimental fue realizado mediante el apoyo económico otorgado a través del proyecto PAPIIT IA200512-2.

A los MVZ Ángel López y Adriana Correa Benítez por proporcionar las muestras de propóleo para realizar el presente trabajo experimental.

A los miembros del jurado Inés Fuentes Noriega y Francisco Rojo Callejas por la revisión del manuscrito de tesis.

Al subprograma 127 por la beca otorgada.

A la Dra. Blanca, primeramente por darme la oportunidad de trabajar con usted, también por su confianza, por su apoyo y su tiempo en todo momento y por ser una gran persona.

Al Dr. Fausto por todo su apoyo en la realización del trabajo experimental y por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Isabel por su ayuda y su tiempo dedicado en este escrito.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 111 por su ayuda y apoyo durante mi estancia ahí.

A Marco y a Alan, por todo su apoyo en esta última etapa.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México, porque me ha dado todo para crecer como persona, además de la mejor formación académica que pudiese recibir. Es un orgullo indescriptible pertenecer, por mucho, a la mejor Universidad.

Por mi raza hablará el espíritu.

DEDICATORIAS

A mi mamá y a mi papá porque todo lo que soy se lo debo a ustedes. Gracias por apoyarme en todo momento y por darme todo aun en las situaciones más difíciles que hemos pasado. Porque este también es su logro. Los quiero mucho.

A mi tita, a mi tito y a Lula por cuidarme cuando más lo necesité, por todo su cariño y apoyo, por estar conmigo siempre y por enseñarme lo que más importa en la vida. Los quiero mucho.

A Ilse por ser mi hermanita y estar conmigo, y a Arturo por compartir tantas cosas conmigo.

A Alan por ser mi principal apoyo durante la carrera, porque sin tu ayuda no hubiera logrado muchas cosas, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por ser como eres y ser tan especial. Gracias.

A todos mis tíos y tías que siempre me han apoyado y han estado conmigo. A mis primos y, en general, a toda mi familia por los momentos que hemos pasado juntos.

A mis amigos que en alguna etapa fueron parte importante de mi vida, porque a pesar del tiempo y la distancia aún siguen siendo especiales. A Daniela, Bárbara y Priscila por todas las risas y aventuras que vivimos juntas. A mis amigos de la Prepa 9 (Susana, Jean, Yiré, Rubio, Luisss, Buba, Beli y Cristina) por compartir con ustedes una de las mejores etapas de mi vida. A Gicela porque crecimos juntas y por ser mi confidente en muchos momentos.

A todos mis amigos y compañeros de la Facultad, por todos los momentos que vivimos y porque sin su apoyo y sin el trabajo en equipo no se podría llegar hasta aquí.

A todos, gracias.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Propóleos.....	4
2.1.1 Definición.....	4
2.1.2 Formación.....	5
2.1.3 Función en la colmena.....	7
2.1.4 Usos en la medicina tradicional.....	7
2.1.5 Actividad farmacológica.....	8
2.1.5.1 Actividad antimicrobiana y antiprotozoaria.....	8
2.1.5.2 Actividad antiviral.....	10
2.1.5.3 Actividad citotóxica y antitumoral.....	10
2.1.5.4 Actividad inmunoestimulante.....	11
2.1.5.5 Actividad antiulcerosa.....	11
2.1.5.6 Actividad antioxidante.....	12
2.1.5.7 Actividad antidiabética.....	12
2.1.6 Composición del propóleo.....	12
2.1.7 Análisis del propóleo.....	16
2.1.7.1 Técnicas empleadas para el análisis de propóleos.....	16
2.2 4',7-dimetilnaringenina.....	18
2.3 4',7-dimetilapigenina.....	20
3. METODOLOGÍA	23
3.1 Propóleo	23
3.1.1 Recolección.....	23
3.1.2 Extracción.....	23
3.2 Caracterización de los compuestos.....	23
3.3 Identificación de los compuestos en el extracto.....	24
3.3.1 Identificación por Cromatografía en Capa Fina.....	24
3.3.2 Identificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia...	24
3.4 Desarrollo del método analítico para cuantificar a la 4',7-dimetilnaringenina y a la 4',7-dimetilapigenina por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.....	25
3.5 Validación del método analítico.....	26
3.5.1 Preparación de las soluciones patrón.....	26
3.5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño.....	26
3.5.2.1 Adecuabilidad del sistema.....	26
3.5.2.2 Especificidad.....	26
3.5.2.3 Linealidad del sistema.....	27
3.5.2.4 Linealidad del método y exactitud.....	28
3.5.2.5 Precisión.....	29
3.5.2.5.1 Precisión del sistema.....	29
3.5.2.5.2 Precisión del método (Repetibilidad).....	29
3.5.2.5.3 Precisión intermedia	30



3.5.2.6 Robustez	30
3.6 Estabilidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.....	31
3.7 Análisis de diferentes muestras de propóleo.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1 Identificación de los compuestos en el extracto.....	34
4.1.1 Identificación por Cromatografía en Capa Fina.....	34
4.1.2 Identificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia...	37
4.2 Desarrollo del método analítico.....	39
4.3 Validación del método analítico.....	40
4.3.1 Evaluación de los parámetros de desempeño.....	43
4.3.1.1 Adecuabilidad del sistema.....	43
4.3.1.2 Especificidad.....	44
4.3.1.3 Linealidad	49
4.3.1.3.1 Linealidad del sistema.....	49
4.3.1.3.2 Linealidad del método.....	53
4.3.1.4 Exactitud.....	58
4.3.1.5 Precisión	60
4.3.1.5.1 Precisión del sistema.....	60
4.3.1.5.2 Precisión del método.....	61
4.3.1.5.3 Precisión intermedia.....	61
4.3.1.6 Robustez.....	62
4.4 Estabilidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.....	69
4.5 Análisis de diferentes extractos de propóleo	72
5. CONCLUSIONES.....	82
6. PERSPECTIVAS.....	83
7. REFERENCIAS.....	84
Anexo I: Compuestos identificados a partir de propóleos de diferentes países	92



Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 2.1 Compuestos identificados en los propóleos.....	14
Cuadro 3.1 Condiciones cromatográficas desarrolladas para validar el método analítico...	25
Cuadro 3.2 Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método.....	27
Cuadro 3.3 Diluciones empleadas para preparar las curvas de calibración (linealidad del sistema).....	27
Cuadro 3.4 Preparación de las curvas para evaluar la linealidad del método y la exactitud.....	28
Cuadro 3.5 Factores evaluados para evaluar la resolución de los productos naturales.....	30
Cuadro 3.6 Datos de las muestras de propóleo analizadas.....	32
Cuadro 4.1 Parámetros cromatográficos del método analítico	39
Cuadro 4.2 Adecuabilidad del sistema.....	44
Cuadro 4.3 Resultados de especificidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.....	45
Cuadro 4.4 Porcentaje de degradación de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.....	45
Cuadro 4.5 Datos de la regresión lineal del sistema empleando 4',7-dimetilnaringenina...	50
Cuadro 4.6 Intervalos de confianza de la ordenada al origen y la pendiente, para el modelo de linealidad del sistema empleando 4',7-dimetilnaringenina.....	50
Cuadro 4.7 Datos de la regresión lineal del sistema empleando 4',7-dimetilapigenina.....	51
Cuadro 4.8 Intervalos de confianza de la ordenada al origen y la pendiente, para el modelo de linealidad del sistema empleando 4',7-dimetilapigenina.....	51
Cuadro 4.9 Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para la 4',7-dimetilnaringenina.....	52
Cuadro 4.10 Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para la 4',7-dimetilapigenina.....	52
Cuadro 4.11 Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método empleando la 4',7-dimetilnaringenina.....	54
Cuadro 4.12 Parámetros de la regresión lineal del método empleando 4',7-dimetilnaringenina.....	55
Cuadro 4.13 Intervalos de confianza de la ordenada al origen y la pendiente del modelo de linealidad del método para la 4',7-dimetilnaringenina.....	55
Cuadro 4.14 Datos obtenidos para determinar la linealidad del método empleando 4',7-dimetilapigenina.....	56
Cuadro 4.15 Parámetros del la regresión lineal del método empleando 4',7-dimetilapigenina.....	56
Cuadro 4.16 Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente, para el modelo lineal del método empleando 4',7-dimetilapigenina.....	56
Cuadro 4.17 Análisis de varianza de la regresión lineal del método para la 4',7-dimetilnaringenina.....	57
Cuadro 4.18 Análisis de varianza de la regresión lineal del método para la 4',7-dimetilapigenina.....	57



Cuadro 4.19	Resultados para evaluar la exactitud del método con la 4',7-dimetilnaringenina.....	59
Cuadro 4.20	Resultados para evaluar la exactitud del método con la 4',7-dimetilapigenina.	59
Cuadro 4.21	Precisión del sistema.....	60
Cuadro 4.22	Repetibilidad.....	61
Cuadro 4.23	Precisión intermedia.....	62
Cuadro 4.24	Resultados obtenidos para la resolución del pico de la 4',7-dimetilnaringenina.....	63
Cuadro 4.25	Análisis de varianza de la resolución del pico de la 4',7-dimetilnaringenina....	64
Cuadro 4.26	Resultados obtenidos para la resolución del pico de la 4',7-dimetilapigenina..	66
Cuadro 4.27	Análisis de varianza de la resolución del pico de la 4',7-dimetilapigenina.....	67
Cuadro 4.28	Resultados de la estabilidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.....	72
Cuadro 4.29	Identificación y cuantificación de los flavonoides en los propóleos.....	79



Lista de figuras

	Página
Figura 2.1 Propóleo.....	4
Figura 2.2 Formación del propóleo.....	6
Figura 2.3 Estructura de la 4',7-dimetilnaringenina.....	18
Figura 2.4 Estructura de la 4',7-dimetilapigenina.....	20
Figura 4.1 Cromatofolios del extracto de propóleo y compuestos identificados.....	35
Figura 4.2 Reacción entre el DPPH• y un antioxidante.....	36
Figura 4.3 Cromatograma del extracto etanólico del propóleo.....	38
Figura 4.4 Cromatograma correspondiente a una solución de 200 µg/mL de 4',7-dimetilnaringenina.....	46
Figura 4.5 Degradación ácida de la 4',7-dimetilnaringenina.....	46
Figura 4.6 Degradación básica de la 4',7-dimetilnaringenina.....	46
Figura 4.7 Oxidación de la 4',7-dimetilnaringenina.....	47
Figura 4.8 Cromatograma correspondiente a una solución de 60 µg/mL de 4',7-dimetilapigenina.....	47
Figura 4.9 Degradación ácida de la 4',7-dimetilapigenina.....	47
Figura 4.10 Degradación básica de la 4',7-dimetilapigenina.....	48
Figura 4.11 Oxidación de la 4',7-dimetilapigenina.....	48
Figura 4.12 Gráficas de superficie de respuesta estimada para la resolución del pico de la 4',7-dimetilnaringenina.....	65
Figura 4.13 Gráficas de superficie de respuesta estimada para la resolución del pico de la 4',7-dimetilapigenina.....	68
Figura 4.14 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilnaringenina después de almacenarse 1 mes a 60°C.....	70
Figura 4.15 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilnaringenina después de almacenarse 2 meses a 60°C.....	70
Figura 4.16 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilnaringenina después de almacenarse durante 3 meses a 60°C.....	70
Figura 4.17 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina después de almacenarse 1 mes a 60°C.....	71
Figura 4.18 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina después de almacenarse 2 meses a 60°C.....	71
Figura 4.19 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina después de almacenarse 3 meses a 60°C.....	71
Figura 4.20 Cromatograma de la muestra utilizada como matriz de trabajo en la validación. Propóleo proveniente del Apiario "El Búho", San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2009.....	73
Figura 4.21 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario "El Búho", San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 1).....	73
Figura 4.22 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario "El Panteón", San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 2).....	74
Figura 4.23 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario	



	“Las Trojes”, San Antonio Tecómitl, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 3).....	74
Figura 4.24	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Valentín”, San Pedro Actopan, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 4).....	74
Figura 4.25	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Acuexcomatl”, San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 5).....	75
Figura 4.26	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Acuexcomatl”, San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, DF; colectado en Agosto del 2011 (Muestra 6).....	75
Figura 4.27	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Humberto Malo”, Topilejo, Tlalpan, DF; colectado en Agosto del 2011 (Muestra 7).....	75
Figura 4.28	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Don Nico”, Topilejo, Tlalpan, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 8).....	76
Figura 4.29	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Álamo Blanco”, Valsequillo, Puebla colectado en Mayo del 2011 (Muestra 9).....	76
Figura 4.30	Cromatograma obtenido con los extractos de propóleo provenientes de San Cristóbal de las Casas Chiapas; colectados en Octubre del 2010 (Muestra 10).....	76
Figura 4.31	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “El Cheque”, Tlaltenango, Zacatecas; colectado en Octubre-Noviembre del 2010 (Muestra 12).....	77
Figura 4.32	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “El Cheque”, Tlaltenango, Zacatecas; colectado en Abril-Mayo del 2011 (Muestra 13).....	77
Figura 4.33	Cromatograma obtenido del extracto etanólico del propóleo proveniente del estado de Tlaxcala, colectado en Octubre del 2010 (Muestra 14).....	77
Figura 4.34	Cromatograma obtenido del extracto etanólico de propóleo proveniente de Irapuato, Guanajuato (Muestra 15).....	78
Figura 4.35	Cromatograma obtenido del extracto de propóleo proveniente de abejas del género <i>Scaptotrigona</i> ; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 16).....	78
Figura 4.36	Cromatograma obtenido del extracto etanólico de propóleo proveniente de abejas del género <i>Melipona</i> ; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 17)...	78
Figura 4.37	Cromatograma obtenido con una muestra comercial de propóleo Chino (Muestra 18).....	79
Figura 4.38	Abejas de los géneros <i>Scaptotrigona</i> y <i>Melipona</i>	81



Lista de Gráficas

	Página
Gráfica 4.1 Linealidad del sistema para la 4',7-dimetilnaringenina.....	50
Gráfica 4.2 Linealidad del sistema para la 4',7-dimetilapigenina.....	51
Gráfica 4.3 Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema utilizando 4',7-dimetilnaringenina.....	52
Gráfica 4.4 Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema utilizando 4',7-dimetilapigenina.....	53
Gráfica 4.5 Linealidad del método para la 4',7-dimetilnaringenina.....	54
Gráfica 4.6 Linealidad del método para la 4',7-dimetilapigenina.....	55
Gráfica 4.7 Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del método utilizando 4',7-dimetilnaringenina.....	57
Gráfica 4.8 Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del método utilizando 4',7-dimetilnaringenina.....	58



Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
ABC	Área bajo la curva
AChE	Acetilcolinesterasa
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
BChE	Butirilcolinesterasa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CV	Coefficiente de variación
DE ₅₀	Dosis efectiva cincuenta
DER	Desviación estándar relative
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical libre)
EEP	Extracto etanólico del propóleo
EtOH	Etanol
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
GC	Cromatografía de gases
H ₁	Hiplótesis alterna
H _o	Hipótesis nula
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
IC	Intervalo de confianza
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
IL	Interleucina
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
k'	Factor de capacidad
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramos
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
M	Molar
MEKCC	Cromatografía capilar electrocinética
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mUA	Miliunidades de absorbancia



nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPT	Número de platos teóricos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPARγ	Receptor proliferador-activado de peroxisoma
ppm	Partes por millón
R	Coefficiente de correlación
r²	Coefficiente de determinación
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear protónica
RP	Fase reversa
Rs	Resolución
S	Desviación estándar
T	Factor de coleo
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
TLR	Receptor tipo toll
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Factor de necrosis tumoral
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
\hat{y}	Media
β_1	Pendiente
β_0	Ordenada al origen



I. INTRODUCCIÓN



El auge de los medicamentos herbolarios en los últimos años ha propiciado que la Organización Mundial de la Salud dicte las pautas para seleccionar medicamentos herbolarios inocuos y eficaces que se puedan utilizar en los sistemas nacionales de asistencia sanitaria (OMS, 2002).

Este renacimiento de la medicina tradicional ha sido el resultado de la preferencia de los consumidores por los productos de origen natural debido a la preocupación del público por los efectos secundarios de la medicina alopática y a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para tratar las enfermedades crónicas. Además, a menudo los medicamentos herbolarios manufacturados acompañan a los inmigrantes procedentes de los países en donde los medicamentos tradicionales desempeñan una función importante (OMS, 2002).

En los países en desarrollo, la medicina herbolaria tiene una amplia tradición y representa en muchas ocasiones la única alternativa para el cuidado primario de la salud de la población con escasos recursos. Por este motivo es necesario asistir a las autoridades sanitarias con información actualizada y autorizada sobre las propiedades benéficas y los posibles efectos nocivos de todos los medicamentos herbolarios (OMS, 2002).

Así, en 1989 durante la quinta conferencia de reglamentación farmacéutica celebrada en París se estableció que la OMS debía examinar la conveniencia de preparar un modelo de pautas en las que figuraran elementos básicos de legislación para ayudar a los países que desearan implantar sistemas apropiados de reglamentación y registro de esos productos (OMS, 2002).

El objetivo de estas pautas es formular criterios básicos para la evaluación de la calidad, la inocuidad y la eficacia de los medicamentos herbolarios y, en consecuencia, ayudar a los organismos nacionales de reglamentación, las organizaciones científicas y los fabricantes para evaluar la documentación, los



informes y los expedientes que se presenten respecto de dichos productos. Como norma general, en esa evaluación se tendrá en cuenta la experiencia tradicional, es decir, el uso prolongado y los antecedentes etnomédicos e históricos de dichos productos. Por consiguiente, la evaluación deberá considerar los usos mejor documentados de las especies medicinales y tomar en cuenta las autorizaciones de comercialización otorgadas por otros países a productos semejantes (OMS, 2002).

Con respecto a los parámetros de control de calidad, deberá ajustarse la preparación a cierta concentración de constituyentes químicos (principios activos y/o productos marcadores) con la finalidad de garantizar su eficacia terapéutica. Por analogía con los medicamentos alopáticos el dossier para el registro de medicamentos herbolarios deberá contener en detalle el procedimiento de fabricación de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura y la fórmula cuantitativa incluyendo la cantidad de excipientes. Deberá contener además, las especificaciones del producto terminado, el método de identificación y cuantificación del principio activo y sus perfiles cromatográficos para garantizar la calidad constante del producto (OMS, 2002).

Otro aspecto importante para el estudio de estos productos son los estudios de estabilidad. En este sentido, la carencia de sustancias de referencia y la falta de información sobre los productos de degradación generados durante el almacenamiento dificulta esta tarea. En consecuencia, el tiempo de vida útil en condiciones de anaquel para muchos de estos productos no se ha determinado aún (OMS, 2002).

Por otra parte, como norma básica, para evaluar la inocuidad de estos productos se debe tener en cuenta la información sobre su uso tradicional a lo largo del tiempo. Así, cuando no se cuente con estudios toxicológicos detallados, la evaluación del riesgo tendrá que sustentarse con base en el uso prolongado sin que se hayan documentado riesgos toxicológicos crónicos que cursen de forma inadvertida. Por esta razón, en el informe de farmacovigilancia debe especificarse



el periodo de uso, el padecimiento a tratar, el número de usuarios, la dosis y los países con experiencia al respecto. Si se conoce el riesgo toxicológico, habrá que presentar los datos de toxicidad (OMS, 2002).

En México, a pesar de la gran tradición en el uso de plantas medicinales existe una carencia notable de estándares para realizar el control de calidad de los recursos naturales y sus preparados.

En este marco de referencia el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en extractos etanólicos de propóleo. La información generada permitirá asistir a las autoridades regulatorias y a los productores con los criterios de calidad básicos para estandarizar los productos elaborados con propóleos pertenecientes a la región del altiplano de México.



2.1 PROPÓLEOS

2.1.1 Definición

Etimológicamente, la palabra propóleo proviene del griego *propolis* (“*pro*”, en defensa, y “*polis*”, ciudad) y significa en defensa de la ciudad. El propóleo es una mezcla de sustancias producida por abejas, principalmente por la especie *Apis mellifera*, mediante la recolección de las resinas que se encuentran en las plantas y la mezcla de las mismas con cera y enzimas que posee la abeja (Sforcin y Bankova, 2011; Simone-Finstrom, 2010).



Figura 2.1 Propóleo.

Físicamente, el propóleo es una sustancia resinosa, con un olor característico y su color varía dependiendo de la fuente botánica y su edad; el más común es el café oscuro, pero se han observado propóleos rojos en las zonas tropicales (Marucci, 1995; Lotti *et al.*, 2010).



2.1.2 Formación

La formación del propóleo comienza con la recolección de resinas (**Figura 2.2 A**) por las abejas llamadas recolectoras. El material disponible que tienen las abejas para formar el propóleo se produce mediante una gran variedad de procesos botánicos en las diferentes partes de la planta y puede ser clasificado en dos grupos dependiendo del tipo de secreción. En el primero se encuentran las sustancias que son secretadas activamente por las plantas y, en el segundo, las sustancias que son exudadas mediante grietas en la corteza de la planta, como el material lipofílico, los mucílagos, las gomas y las resinas entre otros (Bankova *et al.*, 2000).

Las abejas extraen las resinas de los tricomas (abultamientos epidérmicos de las plantas) y de los ductos mediante la fragmentación de las hojas pequeñas con sus mandíbulas. De manera general, el proceso de recolección comprende las siguientes etapas: en primer lugar, las abejas desprenden una parte de la resina con las mandíbulas enseguida, la procesan y la sujetan con las patas delanteras hasta transferirla a su media pata. Por último, la transfieren a un órgano especializado de transporte que se encuentra en las patas de las abejas, denominado corbícula. (Simone-Finstrom y Spivak, 2010; Bankova *et al.*, 2000). La secuencia se repite hasta que ambas corbículas están totalmente cargadas de resina (**Figura 2.2 B**). Una vez que la abeja ha reunido una cantidad suficiente de resina, regresa a su colmena para descargarla en los sitios donde el panal necesita propóleo. Posteriormente, la abeja recolectora espera a otras, conocidas como abejas de cementación, que se encargan de suavizar la resina con sus mandíbulas. Durante la colecta y el procesamiento de las resinas los compuestos presentes en éstas son modificados químicamente; por ejemplo, los glucósidos fenólicos son hidrolizados por las enzimas β -glucosidasas para generar las respectivas agliconas y los azúcares (Simone-Finstrom y Spivak, 2010; Kosalec *et al.*, 2003; Walker y Crane, 1987). Finalmente, las resinas son mezcladas con ceras para producir el propóleo (**Figura 2.2 C**).



A



B



C

Figura 2.2. Formación del propóleo. **A**, Recolección de resinas y polen; **B**, Traslado de resinas; **C**, Mezcla de resinas y ceras.



2.1.3 Función en la colmena

El propóleo es la mezcla de sustancias más importante que tienen las abejas en contra de los microorganismos patógenos. Esto es, protege a la colmena de enfermedades y es usado como producto embalsamante para cubrir los cadáveres de los invasores que no pueden ser transportados fuera de la colmena evitando así, su putrefacción (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Bankova, 2005). Dentro del panal el propóleo también es utilizado para tapar los agujeros de los panales; para fortalecer sus bordes, y para arreglar las paredes internas de la colmena (Sforcin y Bankova, 2011; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

2.1.4 Usos en la medicina tradicional

Desde la época antigua los egipcios consignaron su uso para evitar la putrefacción (embalsamado de los muertos); los asirios describen su importancia para tratar las infecciones y la hinchazón; los griegos y los romanos lo usaban como agente antiséptico y cicatrizante y los incas como agente antipirético. En el siglo XVII, aparece señalado en la farmacopea inglesa como un medicamento oficial y en el siglo XX describen su utilidad durante la segunda guerra mundial para curar las heridas en la ya desaparecida Unión Soviética. A partir de 1980 su empleo en la medicina alternativa se ha incrementado de manera significativa y se ha documentado su uso para prevenir varias enfermedades, tales como la diabetes, el cáncer, las disfunciones cardiovasculares y como agentes regenerantes en aplicaciones tópicas (Sforcin y Bankova, 2011; Soleo *et al.*, 2007).

Actualmente, la literatura farmacológica ha documentado su actividad antiséptica, antimicótica, antiviral, antiinflamatoria, anestésica, antioxidante, inmunoestimulante, antiulcerosa, hipotensiva e hipocolesterolemia. Además, es utilizado para aliviar varios tipos de dermatitis mediante su aplicación tópica; para prevenir la caries y para tratar la gingivitis y la estomatitis (Sforcin y Bankova, 2011; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).



Los usos populares más recurrentes incluyen preparaciones de venta libre (jarabes y pastillas) elaboradas con extractos etanólicos para la sintomatología del resfriado y preparaciones dermatológicas para curar las heridas y tratar el acné, entre otros. También, se ha utilizado como aditivo en alimentos y bebidas (Volpi y Bergonzini, 2006; Trusheva, 2007).

2.1.5 Actividad farmacológica

Los estudios farmacológicos realizados con diferentes tipos de propóleo han permitido establecer que las propiedades curativas del propóleo se deben a la mezcla natural de los constituyentes que lo conforman y al efecto sinérgico de los mismos en los sistemas biológicos. En los siguientes párrafos se describen algunas de las actividades biológicas mejor documentadas para este importante recurso natural.

2.1.5.1 Actividad antimicrobiana y antiprotozoaria

La actividad antimicrobiana de los propóleos ha sido investigada utilizando diferentes bacterias, levaduras y parásitos. En los ensayos *in vitro*, el propóleo actúa directamente sobre los microorganismos mientras que, *in vivo*, es capaz de estimular el sistema inmunológico, activando los mecanismos involucrados en la muerte de los mismos (Sforcin y Bankova, 2011). Se ha descrito que el extracto de propóleo posee un efecto antibacteriano importante en cepas de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Así, el extracto etanólico en contra de la cepa 209P de *S. aureus* presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 10 mg/mL y una concentración mínima bactericida de 120 mg/mL. Por otra parte, Grange y Davey demostraron que un extracto etanólico de propóleo (EEP) a una concentración de 3 mg/mL inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Fuentes y Hernández también demostraron que el EEP tiene una notable actividad contra bacterias Gram positivas y contra las siguientes cepas



patógenas: *S. aureus*, *E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* y estreptococos β -hemolíticos (Marcucci, 1995; Orozco, 2010).

Con relación a la actividad antibacteriana ensayada con propóleos mexicanos se ha descrito que un extracto metanólico de una colecta proveniente del estado de Sonora presentó actividad antibacteriana en contra de *S. aureus* (ATCC 6538P) con una CMI de 100 μ g/mL sin embargo, no demostró actividad antibacteriana en cepas de microorganismos Gram negativos. Asimismo, una muestra de propóleo del Estado de México extraída con EtOH al 70% además de presentar actividad en contra del crecimiento de cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* presentó actividad sobre *V. cholerae*; para todas las cepas la CMI fue menor a 125 μ g/mL (Velázquez *et al.*, 2007). También, se ha demostrado que el EEP tiene actividad en contra de algunas bacterias orales anaerobias entre las que se encuentran: *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*: bacterias frecuentemente asociadas con la periodontitis (Santos *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha encontrado que los extractos de propóleo pueden potenciar el efecto de ciertos antibióticos. Por ejemplo, se ha observado que existe un sinergismo entre el ciprofloxacino y el propóleo en el tratamiento contra *S. aureus*. Además, se ha observado sinergismo entre el propóleo y los antibióticos que actúan a nivel del ribosoma como el cloranfenicol, las tetraciclinas y la neomicina. Así mismo, se ha reportado que el propóleo disminuye la resistencia bacteriana a los antibióticos tales como la amoxicilina, la ampicilina y la cefalexina. (Marcucci, 1995; Sforcin y Bankova, 2011).

Finalmente, la literatura farmacológica describe que el mecanismo de acción antimicrobiano del propóleo puede ser atribuido a un sinergismo entre los compuestos activos del propóleo como los flavonoides, los hidroxiácidos y los sesquiterpenos (Marcucci, 1995).

Con relación a la actividad antifúngica del propóleo se ha observado que la combinación de antifúngicos con un 10% de propóleo inhibe crecimiento de



Candida albicans. También, en pruebas *in vitro* se ha encontrado que el propóleo al 5 % inhibe el crecimiento de *Trichophyton verrucosum* (Marcucci, 1995).

Por último, la evaluación antiprotozoaria del extracto de propóleo reveló su eficacia en contra de 3 cepas de *Trichomonas vaginalis*. La concentración letal calculada con este bioensayo fue de 150 mg/mL. Por otra parte, el EEP a una concentración de 11.6 mg/mL inhibió 98% el crecimiento del parásito *Gardia lamblia* (Marcucci, 1995).

2.1.5.2 Actividad antiviral

Existe poca información acerca de la actividad antiviral del propóleo. Sin embargo, en estudios realizados con diferentes sistemas biológicos se observó que algunas fracciones del extracto etanólico de propóleo afectaron la reproducción de los virus de la influenza A y B y del virus de la viruela. También, se encontró que el extracto de propóleo inhibe la propagación del poliovirus y disminuye el crecimiento del virus del herpes a una concentración de 30 µg/mL (Marcucci, 1995).

2.1.5.3 Actividad citotóxica y antitumoral

Estudios *in vitro* realizados con propóleo brasileño permitieron evidenciar los mecanismos relacionados con la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis en diferentes líneas tumorales. Asimismo, los ensayos *in vitro* realizados con dicho propóleo demostraron un incremento en la actividad citotóxica de las células NK contra el linfoma murino. Por otro lado, el propóleo poplar a una dosis de 50 y 150 mg/kg disminuyó el número de nódulos tumorales pulmonares. También se ha reportado que la acción antitumoral del propóleo puede ser consecuencia de una actividad sinérgica de los compuestos fenólicos que contiene (Sforcin y Bankova, 2011).

Por último, se ha determinado que el propóleo presenta actividad citoestática sobre algunas líneas celulares humanas, tales como KB (carcinoma nasofaríngeo) y HeLa (carcinoma cervical). En otro ensayo realizado con propóleo



se demostró su capacidad de inducir la muerte de las células HeLa (Marcucci, 1995).

2.1.5.4 Actividad inmunoestimulante

En estudios farmacológicos realizados *in vivo* se observó que, a una dosis de 200 mg/kg durante 3 días, el EEP estimuló la inmunidad innata de los ratones tratados. Esto es, el EEP activó los pasos iniciales de la respuesta inmune a través de la sobrerregulación de la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4 y la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo. Por otra parte, con la administración de cápsulas de 500 mg de propóleo durante 2 semanas se observó un aumento en la capacidad de secreción de citocinas espontáneas e inducidas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) y en los leucocitos periféricos sanguíneos (Sforcin y Bankova, 2011).

La actividad antiinflamatoria del propóleo ha sido reportada por varios investigadores. Así, la administración de 200 mg/kg de propóleo brasileño por 14 días a ratones ocasionó una inhibición en la producción de las interleucinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2 e IL-10 en las células del bazo, las cuales han sido encontradas en estados crónicos inflamatorios de varias patologías, demostrando con ello sus propiedades antiinflamatorias (Sforcin y Bankova, 2011).

Finalmente, se observó un incremento significativo en la producción de anticuerpos después de administrar propóleo brasileño al 10% (Sforcin y Bankova, 2011).

2.1.5.5 Actividad antiulcerosa

En la literatura se ha reportado que el propóleo presenta efecto gastroprotector a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg. También, se han descrito las propiedades antiulcerogénicas de los ácidos fenólicos aislados a partir del propóleo brasileño (50 y 250 mg/kg) en diferentes modelos: úlcera inducida por fármacos AINEs, úlcera inducida por etanol y úlcera inducida por estrés (Sforcin y Bankova, 2011).



2.1.5.6 Actividad antioxidante

Existen numerosos reportes en la literatura que describen las propiedades antioxidantes del propóleo. Cabe mencionar que una muestra de 100 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de propóleo recolectado en el estado de Sonora (Méx.) presentó un porcentaje de neutralización de radicales libres del 86%, mientras que los controles positivos, la vitamina C, a una concentración de 70 μM , y el BTH (butilhidroxitolueno), a una concentración de 140 μM , obtuvieron un porcentaje de 87.4 y 66.7, respectivamente (Velázquez *et al.*, 2007).

2.1.5.7 Actividad antidiabética

Se observó que el extracto acuoso de propóleo a una dosis de 200 mg/kg tiene un efecto preventivo en la destrucción de las células β pancreáticas, inhibiendo la generación de la IL-1 β y de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa. Por otra parte, Abo-Salem y colaboradores (2009) sugirieron que la gran capacidad antioxidante del propóleo (a una dosis de 100, 200 y 300 mg/kg) puede disminuir el estrés oxidativo y retrasar la nefropatía diabética en esta enfermedad. (Sforcin y Bankova, 2011).

2.1.6 Composición del propóleo

De acuerdo con la literatura, el propóleo se compone de aproximadamente 50% de resinas (formadas principalmente por compuestos polifenólicos), 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otros compuestos orgánicos (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Hrobonová *et al.*, 2007).

La resina es la sustancia de mayor interés, ya que es la fuente natural de los compuestos activos, entre los que destacan los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres). Estos compuestos se consideran las moléculas farmacológicamente más importantes del propóleo, debido a que son capaces de inhibir enzimas específicas, estimular algunas hormonas y



neurotransmisores y capturar radicales libres, por lo que se les atribuyen efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos. También, se ha encontrado que los flavonoides, un grupo de compuestos polifenólicos, tienen efectos inhibitorios en la oxidación de las lipoproteínas LDL, además inhiben la coagulación de las plaquetas y el metabolismo del ácido araquidónico, reduciendo así el daño hepático y previniendo el cáncer (Volpi y Bergonzini, 2006; Gómez-Caravaca *et al.*; 2006; Hrbonorá *et al.*, 2009).

Sin embargo, la composición del propóleo es altamente variable, ya que depende de la flora local donde las abejas recolectan las resinas, del tiempo y sitio de colecta, así como también de sus características geográficas y climáticas (Marucci, 1995; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

La variabilidad genética entre las razas de abejas puede también generar diferencias en la composición debido a las preferencias hacia el tipo de planta. Otro tipo de variación en la composición del propóleo es la reducción en la disponibilidad de las principales fuentes de resinas por lo que, las abejas comienzan a recolectar el material de plantas alternativas (Salatino *et al.*, 2011).

Debido a la variabilidad geográfica, entre las muestras de propóleo de diferentes regiones del mundo existe una disimilitud en cuanto a su composición química. Por ejemplo, se ha encontrado que los propóleos de Europa y China contienen flavonoides, ésteres y ácidos fenólicos, mientras que los compuestos principales de propóleo de zonas tropicales, como Brasil, son terpenoides y derivados del ácido *p*-cumárico. Finalmente, los propóleos cubanos contienen benzoquinonas como principales componentes (Kumazawa *et al.*, 2004). En el Anexo I se describen algunos compuestos que se han encontrado en muestras de propóleo provenientes de varios países, así como también la técnica empleada para su análisis.

De acuerdo con la literatura, en los propóleos se han identificado alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, azúcares, chalconas y dihidrochalconas, flavonoides, ésteres y éteres,



ácidos cerosos, cetonas, terpenoides, esteroides y esteroides. En la **Cuadro 2.1** se enlistan los principales compuestos que se han identificado en los propóleos:

Cuadro 2.1 Compuestos identificados en los propóleos.

Ácidos aromáticos	
Ácido p-anísico	Ácido hidroxicinámico
Ácido benzoico	Ácido hidroxibenzoico
Ácido caféico	Ácido isoferúlico
Ácido cinámico	Ácido 4-metoxicinámico
Ácido 3,4-dimetoxicinámico	Ácido protocatequico
Ácido ferúlico	Ácido salicílico
Ácido gálico	Ácido vainíllinico
Ácido gentísico	Ácido verátrico
Chalconas y dihidrochalconas	
Alpinetina chalcona	Pinostrobinina chalcona
Naringenina chalcona	Sakuranetina chalcona
Pinobanksina chalcona	2',6',a-trihidroxi,4'-metoxichalcona
Pinobanksina-3-acetato chalcona	2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona
Pinocembrina chalcona	2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona
	2,4',6-trihidroxi-4-metoxichalcona
Flavonoides	
<u>Denominación común internacional (DCI)</u>	<u>Nombre químico</u>
Acacetina	2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanona
Alnusina	3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanona
Alnusitol	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona
Alpinetina	3,5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona
Apigenina	3,5,7-trihidroxi-6-metoxiflavanona
Apigenina-7-metileter	7-hidroxi-5-metoxiflavanona
Betuletol	4',5,7-trihidroxi-flavona
Crisina	4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Ermanina	3,5,7-trihidroxi-4',6-dimetoxiflavona
Galangina	5,7-dihidroxi-flavona
Galangina-3-metileter	3,5,7-trihidroxi-flavona
Isoramnetina	5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona
Izalpinina	3,5,4',7-tetrahidroxi-5'-metoxiflavona
Caempferida	3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Caempferol	3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona
Caempferol -7,4'-dimetileter	3,4',5,7-tetrahidroxiflavona
Caempferol-3-metileter	3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona
Caempferol-7-metileter	4',5,7-trihidroxi-3-metoxiflavona
Naringenina	3,4',5-trihidroxi-7-metoxiflavona
Pectolinarigenina	4',5,7-trihidroxi-flavanona
Pinobanksina	5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxiflavona
	3,5,7-trihidroxi-flavona

**Cuadro 2.1** Compuestos identificados en los propóleos (continuación)

Flavonoides	
Denominación común internacional (DCI)	Nombre químico
Pinobanksina-3-acetato	5,7-dihidroxi-3-acetoflavanona
Pinobanksina-3-butarato	5,7-dihidroxi-3-butilflavanona
Pinobanksina-3-hexanoato	5,7-dihidroxi-3-hexanoilflavanona
Pinobanksina-3-metileter	5,7-dihidroxi-3-metoxiflavanona
Pinobanksina-3-pentanoato	5,7-dihidroxi-3-pentanoilflavanona
Pinobanksina-3-pentenoato	5,7-dihidroxi-3-pentenoilflavanona
Pinobanksina-3-propanoato	5,7-dihidroxi-3-propanoilflavanona
Pinocembrina	5,7-dihidroxi-3-metoxiflavanona
Pinostrobina	5-hidroxi-7-metoxiflavanona
Quercetina	3,3',4',5,7-pentahidroxi-3,7-dimetoxiflavona
Quercetina-3,7-dimetileter	4',5,7-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona
Ramnetina	7-metilquercetina
Ramnocitrina	3,4',5-trihidroxi-7-metoxiflavona
Sakuranetina	4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Tectocrisina	5-hidroxi-7-metoxiflavona
	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona
	3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona
	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona
Isosakuranetina	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona
	4',5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona
	5,7-dihidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona
	3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona
	3,4',5-trihidroxi-3',7-dimetoxiflavona
	7-metoxiquercetina
	3,7-dimetoxiquercetina
	5,7-dihidroxi-5-metoxiflavona
	3,7-dihidroxi-5-metoxiflavona
	2,5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Terpenoides y otros compuestos	
α -Acetoxibutenol	Naftaleon
β -bisabolol	4-hexanolactona
1,8-cineol	Alcohol sesquiterpenico
α -copaeno	Geraniol
Cimeno	Nerolidol
Limoneno	Guaiol
Pteroestilbeno	Farnesol
Estireno	Dihidroeudesmol
Xantorreol	
Xilitol	

(Marcucci, 1995; Walker, 1987)



2.1.7 Análisis de los propóleos

Además de las dificultades asociadas con el análisis de mezclas complejas encontradas en matrices vegetales, el análisis del propóleo es una tarea complicada debido a los cambios en su composición química de acuerdo con la región donde se colecta. Sin embargo, resulta necesario hacerlo ya que, su actividad biológica depende de su composición química, por lo que es sumamente importante caracterizar y cuantificar a los compuestos responsables de ella (Chang *et al.*, 2008; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Algunas veces las abejas pueden coleccionar sustancias peligrosas y también por esto es importante evaluar el propóleo tanto química como biológicamente antes de usarlo en los alimentos o en la medicina tradicional (Midorikawa, 2001).

2.1.7.1 Técnicas empleadas para el análisis de propóleos

A la fecha, la caracterización completa del propóleo se ha realizado mediante análisis cualitativos y cuantitativos. Así, el contenido de compuestos fenólicos, puede determinarse mediante una gran variedad de métodos, tales como la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), las reacciones colorimétricas, la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés), la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés), la espectrofotometría y la electroforesis capilar. (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Su-hsiang *et al.*, 2005).

Los métodos colorimétricos y espectrofotométricos son útiles para el control de calidad rutinario de los propóleos. Entre sus ventajas se encuentran: su simplicidad, buena repetibilidad y exactitud aceptable. Aunque estos métodos son útiles para el análisis de rutina, ninguno de ellos puede discriminar entre los diferentes tipos de compuestos fenólicos. En contraste, el resto de las técnicas mencionadas permiten identificar individualmente a estos compuestos (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Su-hsiang, *et al.*, 2005).



Existen pocos reportes sobre el uso de la electroforesis capilar en muestras de propóleo. Ésta es una técnica de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de los analitos cargados eléctricamente en el seno de una solución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante; la velocidad de migración depende de la carga y del tamaño del ión, entre mayor es la relación carga-tamaño más rápido migra el ión. Esta técnica tiene la ventaja de ser rápida y de tener alta eficiencia en la separación, pero es útil sólo para analitos de naturaleza iónica (Skoog *et al.*, 2001; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Otra variable de la electroforesis capilar que se ha usado recientemente para el análisis del propóleo es la cromatografía capilar electrocinética (MEKCC, por sus siglas en inglés), que es la combinación de la electroforesis capilar y la cromatografía. En ésta, se añade un tensoactivo a una solución reguladora de pH por debajo de la concentración micelar crítica, las micelas ocasionan sitios de interacción iónicos e hidrofóbicos, lo cual mejora la selectividad de la separación (Jiang *et al.*, 2008).

La HPLC representa la técnica analítica más usada y confiable para la caracterización e identificación de compuestos fenólicos debido a las numerosas ventajas que tiene. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su utilidad para la separación de especies no volátiles y termolábiles y su aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos presentes en matrices con multicomponentes, tales como los extractos vegetales y los preparados herbolarios. Entre sus desventajas se encuentra el largo tiempo de análisis (Skoog *et al.*, 2001 y Waksmundzka y Sherma, 2011)



2.2 4',7-dimetilnaringenina

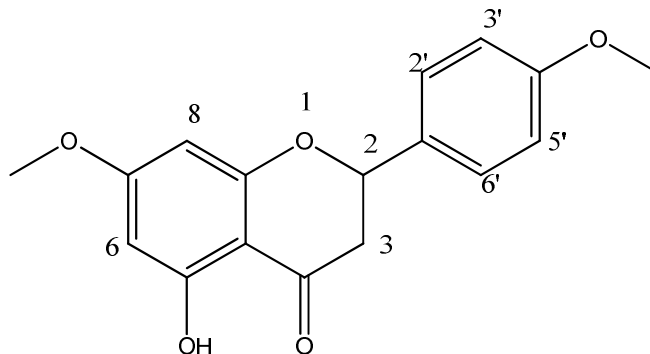


Figura 2.3 Estructura de la 4',7-dimetilnaringenina (CAS: 29424-96-2).

La 4',7-dimetilnaringenina, también conocida como 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona, es un compuesto que pertenece al grupo de las flavanonas debido al hidrógeno presente en la posición 3 y a la ausencia del doble enlace en las posiciones 2 y 3. Su nombre designado por la IUPAC es 7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-croman-4-ona. Físicamente, son cristales blancos; su masa molecular es de 300 g/mol y presenta un pico de absorción máxima a la radiación ultravioleta a los 287-290 nm (Kuklinski, 2000).

No existen muchos estudios acerca de este compuesto en la literatura. Sin embargo, ha sido aislado a partir de varias especies como: *Piper mollicomun* (hojas) y *Piper ihotzkyanum* (Piperaceae) (Lago *et al.* 2007); *Chromolaena odorata* (Pisutthanan *et al.*, 2006); *Terminalia fagifolia* (Combretaceae) (Garcez *et al.*, 2006); *Aglaca odorata* (Xiang-Hai *et al.*, 2003); *Artemisa campestris* subsp. *gluminosa* (Valant *et al.*, 2003); *Baccharis conferta* (Weimann *et al.*, 2002) y *Adenothamus validus* (Crins y Bohm, 1998). También, se ha descrito en algunas especies de los géneros *Aniba* (Rossi, *et al.*, 1997), *Garcinia* y *Allabkaja* (Gutiferae) (Duddeck *et al.*, 1978) y se ha identificado en la resina de *Passiflora foetida* (Echeverri *et al.*, 1991). Asimismo, se encontró como uno de los compuestos principales en especies del género *Arnica* como: *A. attenuata*, *A. angustifolia* y *A. tomentosa* (Schmidt y Willum, 2000).



Desde el punto de vista biológico, la 4',7-dimetilnaringenina ha sido poco estudiada. Lago y colaboradores (2007) evaluaron su actividad antifúngica contra cepas de *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum* encontrando que la cantidad mínima requerida para inhibir el crecimiento de los hongos fue de 25 µg y la obtenida para los controles nistatina y miconazol fue de 1 µg.

Por otra parte, se evaluó su actividad citotóxica en las líneas celulares cancerígenas Hep2 (carcinoma de laringe) y H2a2 (carcinoma pulmonar mucoepidermoide) sin embargo, no mostró actividad (Garcez *et al.*, 2006). En un ensayo citoestático basado en la inhibición de la biosíntesis de proteínas celulares se encontró que su DE₅₀ fue >1000 µg/mL.

Por último, Weimann y colaboradores (2002) determinaron el potencial espasmolítico del extracto etanólico de *Baccharis conferta* utilizando como modelo farmacológico las contracciones inducidas por histamina y KCl en el íleon aislado de cobayo. De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad antiespasmódica se concentró en la fracción constituida por circimaritina y 4',7-dimetilnaringenina.



2.3 4',7-dimetilapigenina

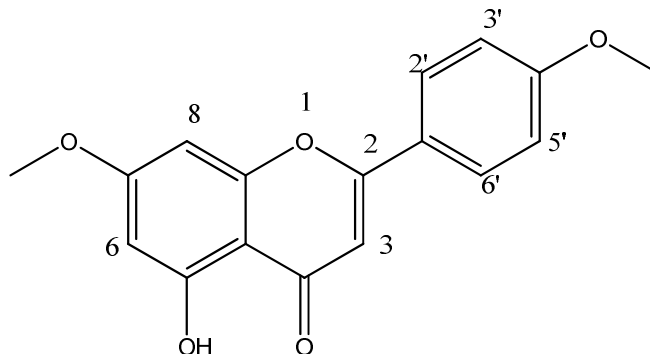


Figura 2.4 Estructura de la 4',7-dimetilapigenina (CAS: 5128-44-9).

La 4',7-dimetilapigenina, también conocida como 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona y cuyo nombre designado por la IUPAC es 7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona, es una molécula que pertenece al grupo de las flavonas por el doble enlace presente en las posiciones 2 y 3 y el hidrógeno presente en esta última posición. Físicamente, son cristales amarillos, tienen un peso molecular de 298.3 g/mol y su punto de fusión es de 146.7 °C (Kuklinski, 2000).

Este compuesto se ha identificado en la resina de las hojas de la especie vegetal *Cistus ladanifer* (Chaves *et al.*, 1998); en *Rosmarinus officinalis* (Amela *et al.*, 2007); en las hojas de *Baccharis trinervis* (Herrera *et al.*, 1996); en las siguientes especies del género *Salvia*: *S. dorri*, *S. hypoleuca*, *S. lavandulifolia*, *S. macrosphon*, *S. moorcroftiana*, *S. nicolsoniana*, *S. officinalis*, *S. sapinae*, *S. syriaca*, *S. texana*, *S. verbenaca*, *S. yosgadensis* (Yinrong y Yeap, 2002) y en las hojas y el tallo de *Piper khasiana*. También, se ha aislado de las yemas de *Daphne genkwa* y de los siguientes vegetales: *Isodon grandifolia* var *Atuntzensis* (Shun-Hua *et al.*, 1993), *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson (Lemos *et al.*, 2011), *Combretum erythrophyllum* (Martini *et al.*, 2004), *Posocarpus fascuculus* (Yu-Jen *et al.*, 2008), *Kaempferia parviflora* (Sutthanut *et al.*, 2007; Sawasdee *et al.*, 2009; Tewtrakul 2008), *Cruptomeria japonica* (Wen-Chiung, 1995), *Heteroplexis micocephal*, *Teucrium porium* (Mirghazanfari, 2010), *Ballota*



inaequidins (Saltan *et al.*, 2004), *Eremposparton songoricum*, (Litv) vass (Liu *et al.*, 2006) y *Baccharis conferta* (Weinmann *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha descrito en las siguientes especies del género *Artemisa*: *A. ordosica*, *A. iwayomogi* y *A. afra* (Dong-Bao *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Kraft, 2003); y en la raíz del árbol *Rhus undulata* Jacq. var *undulata* (Fourie y Snyckers, 1984).

Finalmente, se ha identificado en propóleos de Polonia y, recientemente en propóleo proveniente de Argentina (Macejewicz, 2001; Vera, 2011).

Desde el punto de vista farmacológico la 4',7-dimetilapigenina es capaz de modular la resistencia bacteriana de *S. aureus* a la meticilina. El mecanismo de acción de este compuesto es mediante la inhibición de la bomba de eflujo Nor A presente en las diferentes cepas de *S. aureus*. (Lemos *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2011). Asimismo, la 4',7-dimetilapigenina demostró actividad antibacteriana contra las siguientes enterobacterias: *Escherichia coli* (CMI=50 µg/mL), *Shigella sonnei* (CMI =50 µg/mL), *Vibrio cholerae* (CMI =25 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (CMI =50 µg/mL), *Micrococcus luteus* (CMI = 100 µg/mL) y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 100 µg/mL) (Martini *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* realizados con este compuesto permitieron establecer que a una CI_{50} =43 µg/mL, la 4',7-dimetilapigenina inhibe el crecimiento del agente etiológico de la malaria (*Plasmodium falciparum*). La CI_{50} reportada para la cloroquina (control positivo) en este estudio fue de 0.008 µg/mL (Kraft, 2003).

También, se ha observado que actúa inhibiendo la producción de radicales libres, sin embargo esta actividad no es significativa (Martini *et al.*, 2004).

Una investigación realizada por Sawasdee y colaboradores en el 2009 permitió establecer que el compuesto natural, a una concentración de 0.1 mg/mL, inhibe en un 19.0 y en un 22.8% la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE), respectivamente. La galantamina, utilizada como control positivo en este estudio, inhibió el 94.0% a la AChE y en un 95.5% a la BChE.



Las propiedades insulino-trópicas de la 4',7-dimetilapigenina se evaluaron utilizando el modelo *in vitro* con células 3T3-L1. Este tipo de células poseen el receptor PPAR γ (Receptor proliferador-activado de peroxisoma) donde se unen potentes sensibilizadores de insulina. La unión del ligando al receptor ocasiona un incremento en la concentración de adipotectina y ha sido utilizado para el desarrollo de compuestos antidiabéticos. El ensayo de la 4',7-dimetilapigenina con este sistema permitió demostrar que a una concentración 3 μ M las células incrementaron una 12.2% su nivel de triglicéridos mientras que la Troglitazona (control positivo) incrementó un 34.6% dicho nivel (Matsuda *et al.*, 2011).

Por otra parte, en una investigación realizada en el 2008 por Tewtrakul y colaboradores se estableció que la flavona posee una CI_{50} =26.0 μ M utilizando un modelo de inhibición de liberación de la hexosaminidasa antígeno inducido (indicador de la degranulación de la célula RBL-2H3). En otro ensayo utilizando como modelo farmacológico la inhibición de la vía clásica del complemento se calculó una CI_{50} de 5.76 mM para la flavona y de 38.50 mM para la heparina de sodio utilizada como control positivo (Zhang y Chen, 2008).

Con respecto a su actividad citotóxica se ha demostrado que este compuesto inhibe el crecimiento de las células de carcinoma uterino (HeLa) a una CI_{50} de 544 μ g/mL (Mori *et al.*, 1998). También se encontró que inhibe la peroxidación de lípidos con una CI_{50} de 54.0 μ M (Liu *et al.*, 2006). Por último, se evaluó su actividad antiinflamatoria, y la DE_{25} calculada fue de 75 mg/kg con una potencia de 13 unidades antiinflamatorias/g (Fourie y Snyckers, 1984).



3.1 Propóleo

3.1.1 Recolección

El propóleo fue recolectado en octubre del 2009 en el apiario “El Búho” ubicado a 1 km del Paraje del Panteón Tecomic, en San Pablo Oztotepec, delegación Milpa Alta, Distrito Federal.

3.1.2 Extracción

165 g del propóleo se extrajeron durante de 72 horas mediante la técnica de maceración y utilizando etanol (EtOH) como disolvente. Posteriormente, se realizó una filtración al vacío para separar la materia insoluble y el extracto resultante se concentró al vacío. El proceso de extracción se repitió 3 veces empleando las condiciones descritas anteriormente.

3.2 Caracterización de los compuestos

La resolución del extracto etanólico del propóleo mediante cromatografía en columna permitió el aislamiento de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en forma pura. Ambos productos fueron caracterizados mediante Resonancia Magnética Nuclear protónica (NMR-¹H, 400 MHz), de carbono 13 (NMR-¹³C, 100 MHz) y espectrometría de masas cloroformo deuterado (CDCl₃) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.



3.3 Identificación de los compuestos en el extracto

3.3.1 Identificación por Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina se realizó empleando placas de vidrio o aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 G₂₅₄ o F₂₅₄ Merck, malla de 3.5-7.0 μ m ASTM). La placa cromatográfica se desarrolló aplicando en carriles separados una muestra del extracto de propóleo y de los estándares pinocembrina, acacetina, galangina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina. El sistema de elución utilizado consistió en una mezcla binaria compuesta por diclorometano-metanol en proporción 98:2. Como agentes cromógenos se emplearon una solución al 0.2%, en metanol, de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y anisaldehído; este último se preparó mezclando 85 mL de MeOH, 10 mL ácido acético gacial, 5 mL de ácido sulfúrico y 0.5 mL de anisaldehído.

3.3.2 Identificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La identificación de los productos naturales en los extractos de propóleo se realizó mediante la coelución de los estándares pinocembrina, acacetina, galangina, 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina con los extractos bajo análisis. Para ello, se prepararon las soluciones de los extractos y los estándares a una concentración de 1 mg/mL. Todas las muestras se prepararon utilizando como disolvente una mezcla de etanol-acetonitrilo 1:1. Los perfiles cromatográficos se registraron empleando una columna XBridge C₁₈, marca Waters, con un tamaño de partícula de 5 μ m, 4.6 mm de diámetro interno y 50 mm de longitud. La fase móvil empleada consistió en una mezcla de MeOH:TFA al 0.1% en agua en una proporción 55:45. El flujo de fase móvil fue de 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μ L, la temperatura de 25°C y se detectó en el UV a 290 y 254 nm.



3.4 Desarrollo del método analítico para cuantificar a la 4',7-dimetilnaringenina y a la 4',7-dimetilapigenina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) 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 LCsolution. El método analítico se desarrolló empleando una columna C₁₈; una mezcla binaria compuesta por 55% de MeOH y 45% de ácido trifluoroacético al 0.1% en agua. La respuesta registrada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC). También se registraron la resolución, el factor de coe, el factor de capacidad y el número de platos teóricos. En síntesis, las condiciones cromatográficas para validar la metodología analítica conducente a la cuantificación de la 4',7-dimetilnaringenina y de la 4',7-dimetilapigenina se enlistan en el **Cuadro 3.1**.

Cuadro 3.1 Condiciones cromatográficas desarrolladas para validar el método analítico.

	4',7-dimetilnaringenina	4',7-dimetilapigenina
Fase móvil	Mezcla binaria de MeOH:H ₂ O 0.1% TFA (55:45); elución isocrática.	
Temperatura	25 °C	
Velocidad de flujo	1 mL/min	1.5 mL/min
Volumen de inyección	10 µL	20 µL
Longitud de onda de detección	290 nm	340 nm



3.5 Validación del Método Analítico

3.5.1 Preparación de las soluciones patrón

- 10 mg de 4',7-dimetilnaringenina se disolvieron en 10 mL de la mezcla etanol-acetonitrilo1:1. Esta solución contiene 1000 µg/mL de 4',7-dimetilnaringenina.
- 5 mg de la 4',7-dimetilapigenina se disolvieron en 25 mL de etanol-acetonitrilo1:1. La concentración de esta solución es de 200 µg/mL del producto natural.

3.5.2 Evaluación de los parámetros de desempeño

3.5.2.1 Adecuabilidad del sistema

A partir de las soluciones mencionadas anteriormente se prepararon las diluciones necesarias para llegar a una concentración de 100 µg/mL y 30 µg/mL de 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina, respectivamente.

Una vez preparadas las soluciones de ensayo se evaluó este parámetro de desempeño mediante la inyección por quintuplicado de ambas soluciones. En los dos casos se registró: el factor de coelución (T) y el número de platos teóricos (NPT). El criterio de aceptación establecido en los protocolos de validación establece que el CV obtenido para la respuesta de cada analito debe ser menor al 2.0%.

3.5.2.2 Especificidad

Para evaluar la especificidad del método se cuantificó el efecto de la oxidación y las hidrólisis ácida y básica sobre los analitos de prueba. Las muestras se prepararon de acuerdo con lo descrito en el numeral **3.5.1** y se diluyeron apropiadamente para obtener las concentraciones indicadas en el **Cuadro 3.2**. Cada muestra se sometió a reflujo durante 30 minutos. Las soluciones así obtenidas (**Cuadro 3.2**) se inyectaron en el sistema cromatográfico (numeral **3.4**) y se determinó el porcentaje de degradación y la generación de compuestos relacionados. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad del método estipula que la respuesta debe corresponder únicamente al analito de interés.

**Cuadro 3.2.** Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método.

		Hidrólisis ácida	Hidrólisis básica	Oxidación
Especificidad para la 4',7-dimetilnaringenina	4'7-dimetilnaringenina	1 mL	1 mL	1 mL
	200 µg/mL	+	+	+
	Reactivo	1 mL HCl 1 M	1 mL NaOH 1 M	1 mL de H ₂ O ₂ 0.3%
Especificidad para la 4',7-dimetilapigenina	4'7-dimetilapigenina	1 mL	1 mL	1 mL
	60 µg/mL	+	+	+
	Reactivo	1 mL HCl 1 M	1 mL NaOH 1 M	1 mL de H ₂ O ₂ 0.3%

3.5.2.3 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó mediante la preparación de tres curvas de calibración para cada compuesto, con 5 niveles de concentración y preparadas por pesadas independientes. El esquema empleado para realizar las diluciones de trabajo se resume en el **Cuadro 3.3**. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal de las variables concentración (x) y área bajo la curva (y) y se calculó la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r).

Los criterios de aceptación establecidos para esta característica son: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.999$; el intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) no debe incluir el cero mientras que, el de la ordenada al origen IC (β_0) debe incluir el cero.

Cuadro 3.3 Diluciones empleadas para preparar las curvas de calibración (linealidad del sistema).

Concentración de la disolución stock	Nivel de concentración	Volumen de la alícuota (mL)	Aforo con EtOH/ACN 1:1 (mL)	Concentración final (µg/mL)	Concentración en %*
4',7-dimetilnaringenina 1000 µg/mL	1	0.25	10	25	25
	2	0.5	10	50	50
	3	1.0	10	100	100
	4	1.5	10	150	150
	5	2.0	10	200	200
4',7-dimetilapigenina 200 µg/mL	1	0.4	10	8	27
	2	0.75	10	15	50
	3	1.5	10	30	100
	4	2.0	10	40	133
	5	3.0	10	60	200

*Respecto a la concentración nominal



3.5.2.4 Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método y la exactitud se evaluaron preparando, por triplicado y para cada compuesto, una curva con 5 niveles de concentración, en los que se adicionó 1 mL de una solución del extracto de propóleo a una concentración constante. La preparación de las curvas se realizó con base en lo indicado en el **Cuadro 3.4**.

Cuadro 3.4 Preparación de las curvas para evaluar la linealidad del método y la exactitud.

Concentración de la disolución stock	Nivel de concentración	Alícuota de la disolución stock (mL)	Alícuota de la disolución del extracto [3.33 mg/mL] (mL)	Aforo con EtOH/ ACN 1:1 (mL)
4',7-dimetilnaringenina 1000 µg/mL	1	0.25	1	10
	2	0.5	1	10
	3	1.0	1	10
	4	1.5	1	10
	5	2.0	1	10
Concentración de la disolución stock	Nivel de concentración	Alícuota de la disolución stock (mL)	Alícuota de la disolución del extracto [4.66 mg/mL] (mL)	Aforo con EtOH/ ACN 1:1 (mL)
4',7-dimetilapigenina 200 µg/mL	1	0.4	1	10
	2	0.75	1	10
	3	1.5	1	10
	4	2.0	1	10
	5	3.0	1	10

Para determinar la linealidad del método se realizó un análisis de regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y) y se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: β_0 , β_1 , r y r^2 .

Finalmente, los criterios de aceptación establecidos para la linealidad del método son: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.999$; el intervalo de confianza de la pendiente IC (β_1) no debe incluir el cero pero sí la unidad y el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC (β_0) debe incluir el cero.

Por otro lado, para determinar la exactitud de la metodología se calculó el porcentaje de recobro para cada muestra adicionada por medio de la siguiente ecuación:



$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

Asimismo, se calculó para cada nivel, el promedio aritmético y la desviación estándar relativa (DER). La exactitud se confirma si se cumplen los siguientes requisitos: el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 98.0% - 102.0% y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor al 2.0%.

3.5.2.5 Precisión

3.5.2.5.1 Precisión del Sistema

La precisión del sistema se evaluó mediante la preparación de seis soluciones (a la concentración establecida como 100%) preparadas por diluciones independientes a partir de una misma solución patrón. El proceso se realizó de manera independiente para los dos productos de prueba. Con los datos obtenidos en el sistema cromatográfico se calcularon la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación (CV) debe no debe ser mayor al 1.5 %.

3.5.2.5.2 Precisión del Método (Repetibilidad)

Este parámetro se evaluó mediante la preparación por triplicado de una muestra de extracto de propóleo que contenía 3.33 mg/mL de la 4',7-dimetilnaringenina y 4.66 mg/mL de la 4',7-dimetilapigenina. Ambas concentraciones representan el 100% de la concentración que se cuantifica. La respuesta analítica obtenida permitió calcular la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV).

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación (CV) no debe ser mayor al 2.0 %.



3.5.2.5.3 Precisión intermedia

El parámetro de precisión intermedia se evaluó mediante el análisis por triplicado de la solución estándar de cada compuesto en dos días y por dos analistas. Con el área bajo la curva para cada compuesto se calculó la media aritmética (\hat{y}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV).

Para cumplir con este parámetro es necesario obtener un coeficiente de variación $\leq 2.0\%$.

3.5.2.6 Robustez

La robustez del método se evaluó mediante un diseño de experimentos factorial 2^3 para cada compuesto. Las variables seleccionadas fueron composición de la fase móvil, la velocidad de flujo, y la temperatura (**Cuadro 3.5**). La muestra utilizada para los análisis consistió en el extracto de propóleo a la concentración encontrada como 100% para cada compuesto. La respuesta medida en cada experimento fue la resolución del pico correspondiente a cada analito.

Cuadro 3.5 Factores evaluados para la resolución de los productos naturales.

Factor	Nivel -	Nivel normal	Nivel +
Composición de la fase móvil (%MeOH)	45	55	65
Flujo 4',7-dimetilnaringenina (mL/min)	0.5	1.0	1.5
Flujo 4',7-dimetilapigenina (mL/min)	1.0	1.5	2.0
Temperatura (°C)	20	25	30

Las muestras se inyectaron al cromatógrafo obteniendo una réplica de todas las combinaciones posibles entre los factores y sin modificar el resto de las condiciones cromatográficas. Posteriormente, los resultados fueron analizados estadísticamente.



3.6 Estabilidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina

La estabilidad de cada compuesto se evaluó mediante el análisis del efecto de la temperatura durante 1, 2 y 3 meses. Para ello, 5 mg de cada compuesto se almacenaron a 60°C en una estufa marca Felisa modelo 1991. Transcurrido el tiempo indicado se analizaron las muestras se disolviéndolas en la mezcla etanol-acetonitrilo 1:1 y se diluyeron adecuadamente hasta obtener la concentración correspondiente al 100% (100 µg/mL para la 4',7-dimetilnaringenina y 30 µg/mL para la 4',7-dimetilapigenina). Una vez preparadas las muestras se inyectaron bajo las condiciones cromatográficas establecidas para cada método.

3.7 Análisis de diferentes muestras de propóleo

Una vez validado el método analítico, se aplicó para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en muestras de propóleo de diferentes regiones del país. Previamente, fueron identificadas las señales correspondientes a los flavonoides.

Las muestras se prepararon a partir de un extracto etanólico seco, pesando para la mayoría aproximadamente 100 mg y disolviéndolo en la mezcla etanol-acetonitrilo 1:1 para llegar una concentración aproximada de 10 mg/mL. Una vez preparadas, se filtraron utilizando unidades de filtración Millex HV de 13 mm (PVDF) 0.45 µm Millipore.

En el **Cuadro 3.6** se describen las características de las muestras así como la concentración a la que se prepararon para ser analizadas.

**Cuadro 3.6** Datos de las muestras de propóleo analizadas.

No. de muestra	Lugar de procedencia	Fecha de colecta	Concentración de la muestra (mg/mL)
1	Apiario “El Búho”, Poblado de San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF.	Octubre 2010	5.02
2	Apiario “El Panteón”, Poblado de San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF.	Octubre 2010	2.48
3	Apiario “Las Trojes”, Poblado de San Antonio Tecómitl, Delegación Milpa Alta, DF.	Octubre 2010	10.56*
4	Apiario “Valentín”, Poblado de San Pedro Actopan, Milpa Alta, DF.	Octubre 2010	12.41
5	Apiario “Acuexcomatl”, Poblado de San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, DF.	Octubre 2010	10.08
6	Apiario “Acuexcomatl”, Poblado de San Luis Tlaxialtemalco Xochimilco, DF.	Agosto 2011	10.08
7	Apiario “Humberto Malo”. Topilejo, Tlalpan. D.F.	Agosto 2011	8.3
8	Apiario “Don Nico”. Topilejo, Tlalpan, DF.	Octubre 2010	10.69
9	Apiario “Álamo blanco”. Valsequillo, Puebla.	Mayo 2011	2.56
10	Apiario “Choy”, San Cristóbal de las Casas, Chiapas.	Octubre 2010	10.16
11	Apiario “Ecosur”, San Cristóbal de las Casas, Chiapas.	Octubre 2010	10.11
12	Apiarios “El Cheque”. Tlaltenango, Zacatecas. ¹	Octubre-Noviembre 2010	30
13	Apiarios “El Cheque”. Tlaltenango, Zacatecas. ¹	Abril-Mayo 2011	30
14	Tlaxcala, Tlaxcala.	Octubre 2010	10.04
15	Irapuato, Guanajuato.		10.08
16	Propóleo de <i>Scaptotrigona</i>	Octubre 2010	10.24
17	Propóleo de <i>Melipona</i>	Octubre 2010	10.89
18	Muestra comercial de propóleo Chino ¹	---	--- ²

¹ Las muestras se proporcionaron como preparados etanólicos, por lo que únicamente se diluyeron con la mezcla EtOH-ACN 1:1.

² No fue posible establecer la concentración de propóleo, debido a que no se proporcionaron los datos de la preparación del preparado, ni el tiempo de colecta.

*Para cuantificar el producto fue necesario realizar una dilución 1:10.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En México, las autoridades sanitarias han prestado poca atención al desarrollo de remedios y medicamentos herbolarios con calidad constante. Debido a que este tipo de productos tienen una amplia aceptación en los diferentes sectores de la sociedad su comercio se ha incrementado de manera notable en las últimas décadas. En este sentido, los productos elaborados con propóleo son ampliamente valorados por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales, entre otras. Estandarizar los lotes de propóleo no es una tarea sencilla ya que su composición química es altamente variable. Dicha variabilidad se debe a factores tales como la fuente vegetal, las características geográficas y el clima del sitio donde se localiza el panal (Bankova, 2005).

A la fecha, la estandarización del propóleo se realiza con base en el contenido total de flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y fenoles. Estos parámetros proporcionan una idea acerca de la calidad del propóleo sin embargo, no proporcionan información exacta sobre su composición química ni sobre los compuestos responsables de la actividad biológica.

Para realizar recomendaciones especiales a la Secretaría de Salud y a los fabricantes se necesitan desarrollar criterios de calidad básicos que permitan correlacionar un tipo particular de propóleo con una actividad biológica específica. Por este motivo, antes de estandarizar el propóleo deberá clasificarse de acuerdo con las regiones apícolas de nuestro país. Una vez clasificado, podrá desarrollarse un método analítico cuantitativo para determinar, en márgenes estrechos, el contenido de compuestos marcadores o activos que conlleven a asegurar la calidad y la eficacia de los extractos que deriven de los diferentes tipos de propóleo.

Desde el punto de vista científico el propóleo mexicano ha recibido poca atención y solo existen dos estudios que describen el análisis de muestras recolectadas en los estados de Sonora y de Yucatán. Los productos aislados y caracterizados a partir de estos propóleos son en su mayoría flavonoides y pterocarpanos (Anexo I).



Para el desarrollo experimental de este trabajo fue necesario aislar en cantidades suficientes los productos naturales utilizados para desarrollar y validar el método propuesto. Así, la resolución cromatografía del extracto etanólico del propóleo utilizado para este estudio permitió el aislamiento y la caracterización de la pinocembrina (**1**), la acacetina (**2**), la 4',7-dimetilnaringenina (**4**) y la 4',7-dimetilapigenina (**5**). La selección de los productos naturales **4** y **5** se realizó considerando que la 4',7-dimetilnaringenina no ha sido identificada en los propóleos provenientes de otros países y la 4',7-dimetilapigenina ha sido identificada únicamente en los propóleos de Argentina y Polonia (Maciejewicz, 2001; Vera *et al.*, 2011). Por otra parte, las propiedades farmacológicas de ambos productos naturales sustentan el uso de ambos compuestos como marcadores químicos del propóleo en estudio. Entre las propiedades biológicas demostradas para la 4',7-dimetilnaringenina se encuentra: la actividad antimicótica, citoestática y espasmolítica mientras que, para la 4',7-dimetilapigenina se ha documentado su actividad antimicrobiana, antipalúdica, antidiabética, inmunológica y citotóxica.

4.1 Identificación de los compuestos en el extracto

4.1.1 Identificación por Cromatografía en Capa Fina

La identificación de los constituyentes en el extracto etanólico del propóleo se realizó mediante cromatografía en capa fina. Los estándares utilizados fueron: la pinocembrina, la acacetina, la galangina, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina. Este procedimiento permitió identificar la presencia de todos los metabolitos en el extracto. En las **Figuras 4.1A** y **4.1B** se ilustran los cromatofolios obtenidos.

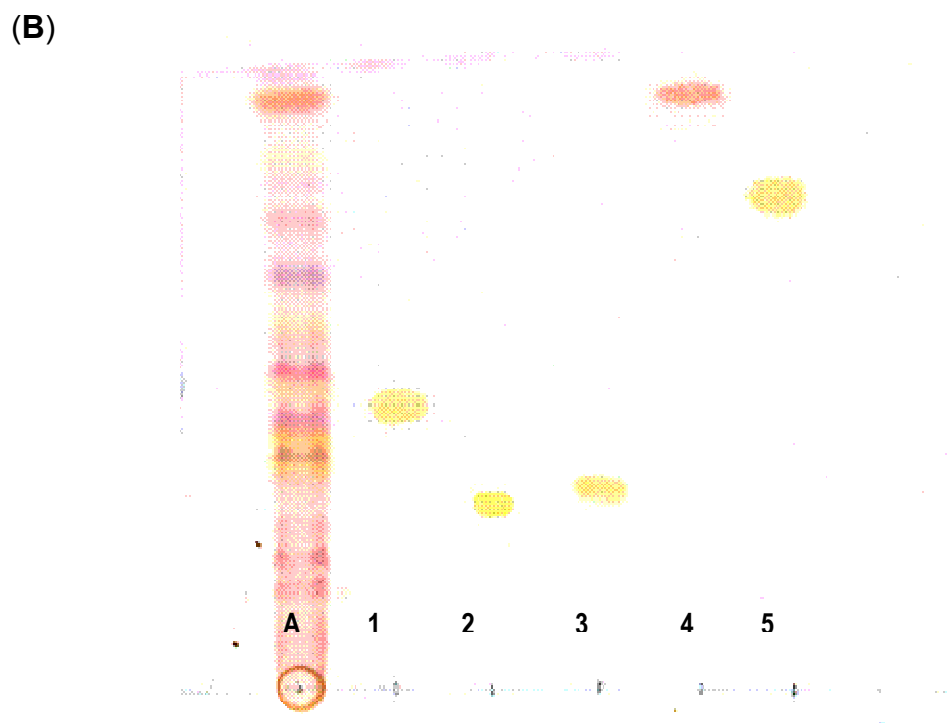
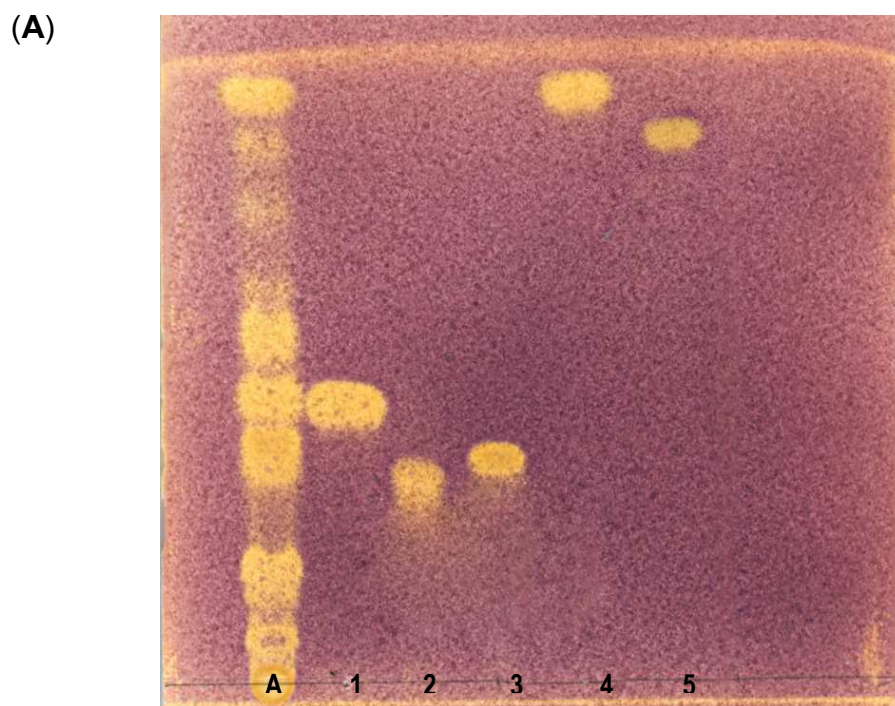


Figura 4.1 Cromatofolios del extracto de propóleo y compuestos identificados. Carril A: extracto de propóleo; 1: pinocembrina; 2: acacetina; 3: galangina; 4: 4',7-dimetilnaringenina; 5: 4',7-dimetilapigenina. (A) Cromatofolio revelado con DPPH. (B) Cromatofolio revelado con anisaldehído.



4.1.2 Identificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La identificación de los flavonoides en el extracto se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y las absorbancias que presentaron cada uno de los estándares con las señales presentes en el cromatograma obtenido con el extracto. De manera adicional, se realizó la co-elución de los estándares con la matriz de trabajo utilizada para validar el método. Los tiempos de retención obtenidos para cada compuesto, bajo las condiciones de análisis, fueron los siguientes:

Flavonoide:	t _R (min)
Pinocembrina (1)	7.641
Acacetina (2)	10.606
Galangina (3)	12.807
4',7-dimetilnaringenina (4)	21.340
4',7-dimetilapigenina (5)	31.451

La pinocembrina y la 4',7-dimetilnaringenina presentaron una mayor absorbancia a los 290 nm que a los 254 nm. En contraste, la galangina absorbe más a 254 nm que a 290 nm. Finalmente, la acacetina y la 4',7-dimetilapigenina presentaron una absorbancia similar en ambas longitudes de onda.

En la **Figura 4.3A** se ilustra el perfil cromatográfico del extracto utilizado como matriz de trabajo. Como se observa en dicha Figura la pinocembrina es el compuesto que presenta la señal de mayor tamaño, seguida de la 4',7-dimetilnaringenina y finalmente de la acacetina. En la **Figura 4.3B** se ilustra una ampliación del cromatograma que permite observar, de mejor forma, la señal correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina. También se observa que con estas condiciones cromatográficas no es posible determinar el contenido de galangina debido a la baja resolución de la señal.

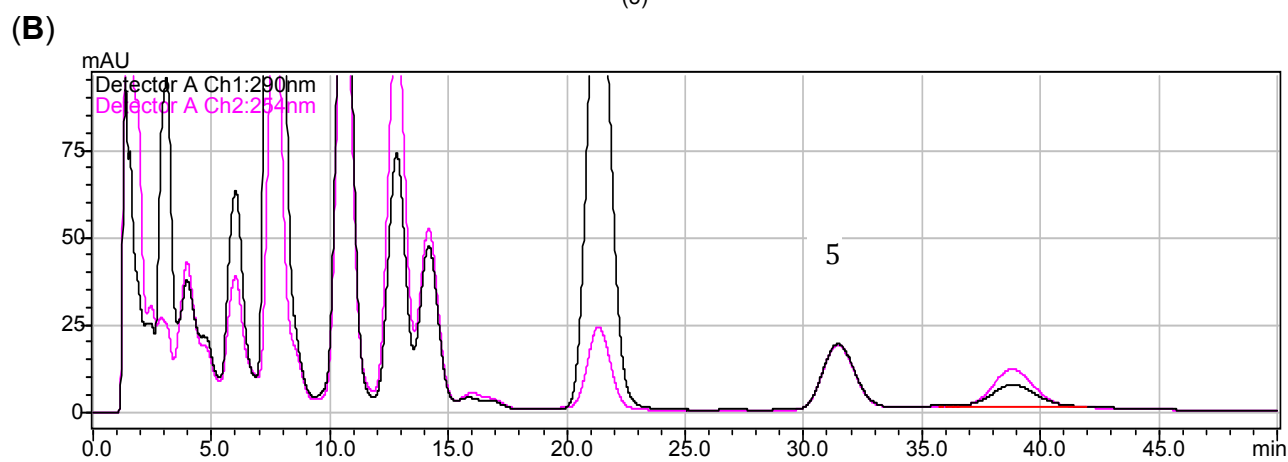
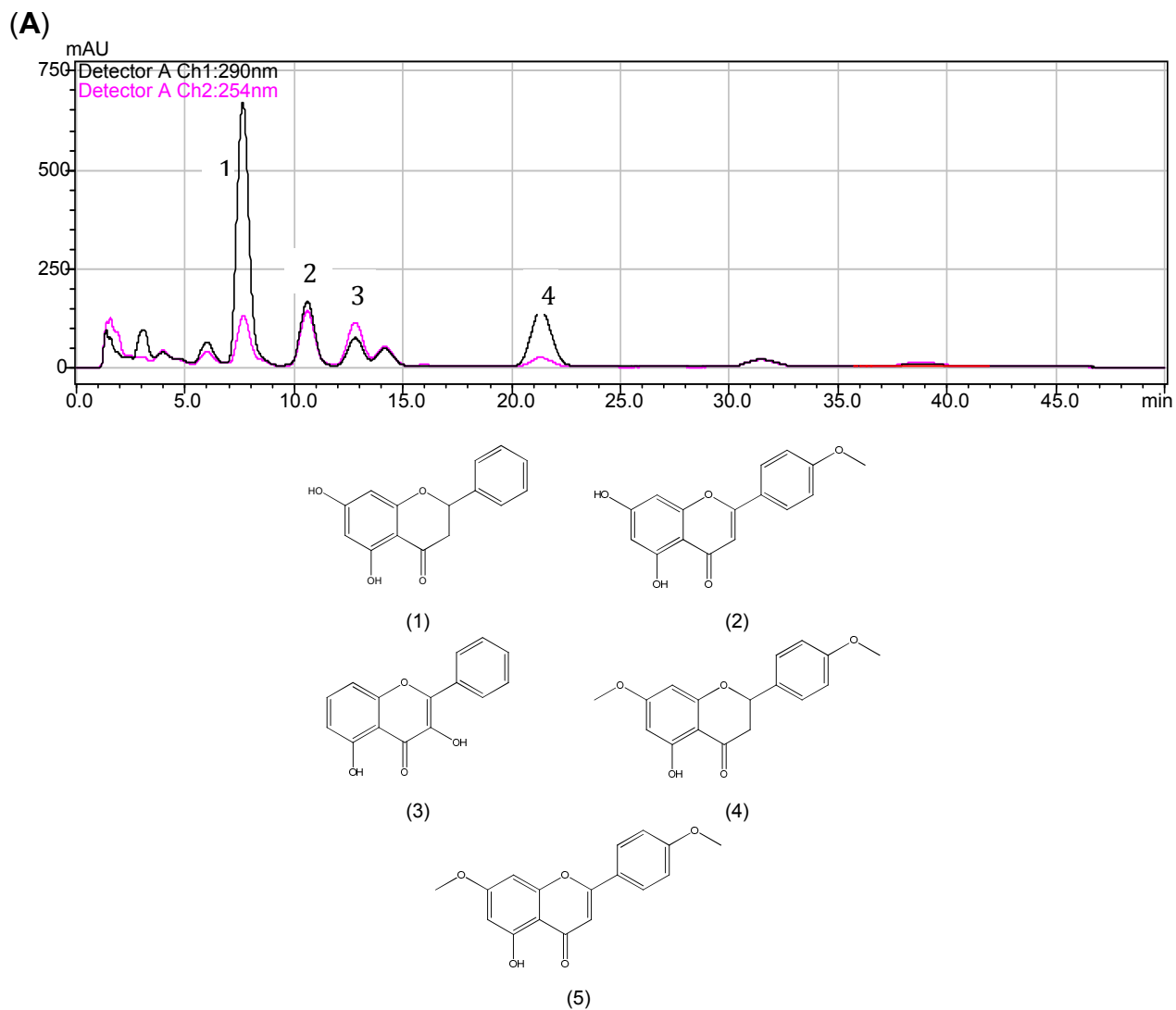


Figura 4.3 Cromatograma del extracto etanólico del propóleo. (A) Identificación de la pinocembrina (1), acacetina (2), galangina (3) y 4',7-dimetilnaringenina (4). (B) Ampliación del cromatograma para identificar a la 4',7-dimetilapigenina (5).



4.2 Desarrollo del método analítico

Para el desarrollo del método analítico se revisó, en primer lugar, los métodos publicados para determinar la presencia de flavonoides en diferentes matrices vegetales. Las condiciones cromatográficas descritas señalan el uso de una columna C₁₈ (RP), un sistema binario de disolventes (agua acidificada y acetonitrilo o MeOH como disolventes orgánicos) y un detector UV, PDA o MS (Zhou *et al.*, 2008).

Con base en estas consideraciones se probaron varias columnas C₁₈ de diferentes longitudes, así como diversos sistemas de elución y flujo, hasta encontrar las mejores condiciones de separación de los compuestos presentes en el extracto. Una vez lograda la separación, fue necesario modificar el flujo para disminuir el factor de coeol en los picos correspondientes a la 4',7-dimetilnaringenina y a la 4',7-dimetilapigenina. Por esta razón, las condiciones de flujo para la identificación y la cuantificación de cada uno de los analitos son diferentes.

Después de establecer las condiciones cromatográficas del método de cuantificación, se registraron los siguientes parámetros cromatográficos para cada analito (**Cuadro 4.1**):

Cuadro 4.1 Parámetros cromatográficos del método analítico.

	4',7-dimetilnaringenina	4',7-dimetilapigenina
Factor de capacidad (k')	11.757	10.865
Factor de coeol (T)	1.106	1.102
Número de platos teóricos	2363.158	1760.516
Resolución (R) con respecto a la señal anterior	2.963	3.911

El **factor de capacidad (k')** es una medida del grado de interacción del analito con la fase estacionaria y, su valor puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil hasta que, el valor del factor de capacidad (k') se encuentre dentro del intervalo comprendido entre 2 y 10. El factor de capacidad se emplea tanto para



evaluar la retención como para ajustar la separación de los analitos. La ecuación que describe el factor de capacidad es:

$$k' = \frac{\text{Tiempo de la sustancia en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo de la sustancia en la fase móvil}}$$

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Cuando se utiliza fase reversa, k' disminuye al aumentar la proporción del disolvente orgánico (MeOH, acetonitrilo, THF) y aumenta al incrementar la proporción de agua. En contraste, cuando se emplea fase normal, k' disminuye al aumentar la proporción del disolvente polar y aumenta al incrementar la proporción del disolvente no polar (Skoog, 2001).

El **factor de coleo (T)** es una medida del coleo del pico. Cuando se incrementa el coleo de un pico cromatográfico la exactitud para la cuantificación de un analito disminuye. Como consecuencia, se dificulta el cálculo del área bajo la curva del pico debido a que el programa de integración no es capaz de distinguir dónde y cuándo termina la señal, aún cuando las variables de integración sean programadas por el analista. El factor de coleo se describe como:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

donde W es el ancho del pico medido al 5% de altura y f es la distancia entre el máximo del pico y el frente al 5% de altura respecto al máximo. Se recomienda un valor de $T < 2$ (CDER, 1994).

El **número de platos teóricos** es una medida de la eficiencia de la columna. Los factores que pueden afectar el número de platos teóricos incluyen el tamaño de partícula, el flujo de la fase móvil, la temperatura de la columna, la viscosidad de la fase



móvil y el peso molecular del analito. Se recomienda un valor de $N > 2000$ (Skoog, 2001).

La **resolución (R)** es una medida relacionada con el grado de separación entre dos picos cromatográficos adyacentes. La resolución es una función de la eficiencia de la columna y se calcula para asegurar que los compuestos que eluyen cerca, se resuelvan unos de otros. Este es un parámetro muy útil cuando los cromatogramas presentan señales que pueden llegar a causar interferencia en la determinación del analito. Es deseable una resolución mayor a 2 entre el pico de interés y la señal más cercana (CDER, 1994). La ecuación que describe a la resolución es:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

donde, t_1 y t_2 son los tiempos de retención de los analitos y W_1 y W_2 , el ancho del pico medido por extrapolación de los lados relativamente rectos en la línea base.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los parámetros cromatográficos calculados para el método analítico desarrollado, el factor de coleo es de 1.1 (para ambos analitos) y la resolución entre las señales supera el valor recomendado de separación. Con respecto al número de platos teóricos es importante señalar que el valor calculado para la 4',7-dimetilapigenina puede explicarse considerando que la longitud de la columna utilizada es de 5 cm.

4.3 Validación del método analítico

La validación de un método de análisis es un proceso que genera, por medio de estudios de laboratorio, una serie de datos que demuestran científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas, es decir, para cumplir con su propósito. El objetivo de la validación es demostrar que el método de análisis es conveniente para los fines previstos (EMA, 2008).



Un método de análisis debe de ser validado cuando es necesario verificar que el desempeño de sus parámetros es adecuado para su uso particular en un problema analítico (Eurachem, 1998).

Además de que la validación de un método de análisis es parte fundamental de su desarrollo, éstos deben ser validados debido a que cualquier resultado analítico debe de ser lo suficientemente confiable para poder emitir una decisión correcta con base en su valor (Eurachem, 1998; ICH, 1994).

Por otra parte, los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, y con otros documentos normativos nacionales e internacionales. La Secretaría de Salud, a través de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) establece que los métodos analíticos que no estén publicados en la FEUM deben ser validados.

De acuerdo con este documento los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías ya que requieren diferentes esquemas de estudio:

- CATEGORÍA I. Método analítico para cuantificar un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.
- CATEGORÍA II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.
- CATEGORÍA III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.
- CATEGORÍA IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés (FEUM, 2008).



Los parámetros de desempeño recomendados para la validación de métodos pertenecientes a la categoría I son la precisión y la linealidad del sistema; la especificidad/selectividad; la exactitud y la linealidad y la precisión del método. La adecuabilidad del sistema, la tolerancia y la robustez pueden ser evaluadas opcionalmente dependiendo de la naturaleza del método.

Con base en estas consideraciones, en el presente trabajo, se evaluaron todos los parámetros de desempeño mencionados anteriormente excepto la tolerancia del método. En todos los casos los criterios de aceptación fueron los reportados en la guía emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (García *et al.*, 2002).

4.3.1 Evaluación de los parámetros de desempeño

4.3.1.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos entre ellos, los cromatográficos. Este parámetro indica si un sistema es adecuado para la ejecución del análisis. Las pruebas de adecuabilidad del sistema están basadas en el concepto de que el equipo, los dispositivos electrónicos, la operación analítica y las muestras constituyen un sistema analítico único (FEUM, 2008).

Esta característica de calidad del método fue evaluada diariamente para cada uno de los compuestos utilizados mediante el registro del área bajo la curva de una solución de concentración conocida. En los dos casos, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2.0% indicando que el sistema, en general, es adecuado para la ejecución del análisis. En el **Cuadro 4.2**, se resume un ejemplo de los resultados obtenidos para la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina, en donde se puede observar que el coeficiente de variación obtenido para ambos compuestos es de aproximadamente 0.6%.

**Cuadro 4.2** Adecuabilidad del sistema.

	4',7-dimetilnaringenina (100 µg/mL)	4',7-dimetilapigenina (30 µg/mL)
Factor de coleo	1.117	1.079
No. de platos teóricos	2197.2593	1693.0356
Adecuabilidad	Área	Área
Inyección 1	3552464	1741730
Inyección 2	3533224	1721545
Inyección 3	3501730	1740829
Inyección 4	3502390	1746484
Inyección 5	3526758	1726172
\hat{y}	3523313.2	1735352
S	21583.9904	10834.0146
CV (%)	0.61	0.62

4.3.1.2 Especificidad

La especificidad se refiere a la capacidad de un método analítico para evaluar inequívocamente a un analito en presencia de otros compuestos que pueden estar presentes tales como impurezas y productos de degradación, entre otros (FEUM, 2008).

La especificidad del método se evaluó determinando el efecto de 3 diferentes condiciones de degradación para cada compuesto. En el **Cuadro 4.3** se resumen los resultados obtenidos para cada compuesto ensayado.



Cuadro 4.3 Resultados de especificidad para la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.

Muestra	4',7-dimetilnaringenina		4',7-dimetilapigenina	
	t _R (min)	Área bajo la curva	t _R (min)	Área bajo la curva
Estándar 1	10.750	3745650	10.958	3735272
Estándar 2	10.860	3711185	10.088	3745658
Degradación ácida 1	11.475	3730209	9.733	1873651
Degradación ácida 2	11.401	3728244	9.800	1894360
Degradación básica 1	10.857	3458054	9.565	2003400
Degradación básica 2	10.575	3451430	9.523	2023374
Oxidación 1	----	----	9.955	2083979
Oxidación 2	----	----	9.805	2078428

Cuadro 4.4 Porcentajes de degradación de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.

	4',7-dimetilnaringenina		4',7-dimetilapigenina	
	% Degradado	CV (%)	% Degradado	CV (%)
Hidrólisis ácida	0.0	0.04	49.6	0.78
Hidrólisis básica	7.3	0.14	46.2	0.70
Oxidación	100.0	-	44.4	0.19

En las **Figuras 4.4-4.7** se ilustran los cromatogramas obtenidos para evaluar la especificidad de la 4',7-dimetilnaringenina.

De manera general, los productos de degradación generados bajo las condiciones de análisis no interfieren con la señal del metabolito de interés. En el **Cuadro 4.4** se resumen los porcentajes de degradación calculados para cada condición analizada. Como se observa en dicho cuadro, las condiciones de oxidación y la hidrólisis básica generaron un 100% y un 7.3% de degradación, respectivamente. Por el contrario, la condición de hidrólisis ácida no generó productos de degradación.

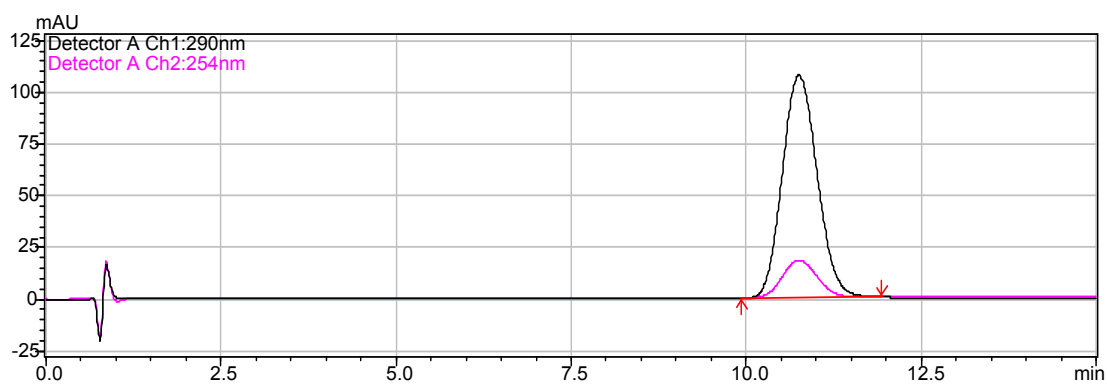


Figura 4.4 Cromatograma correspondiente a una solución de 200 µg/mL de 4',7-dimetilnaringenina.

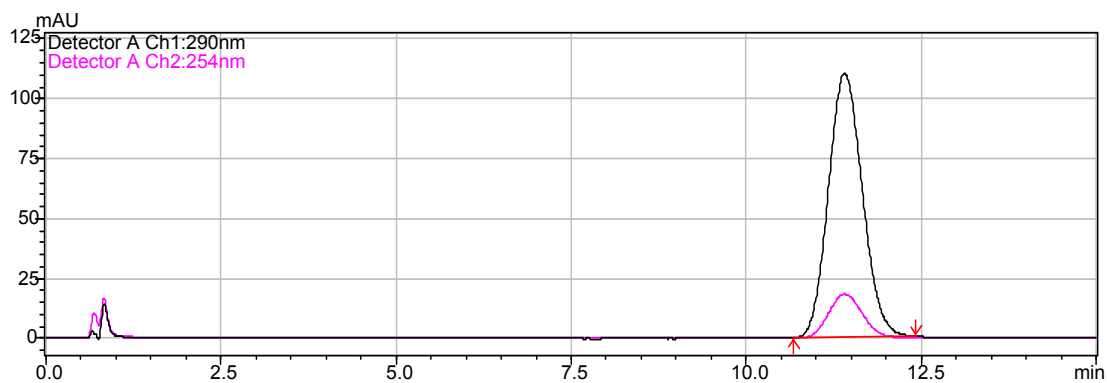


Figura 4.5 Degradación ácida de la 4',7-dimetilnaringenina.

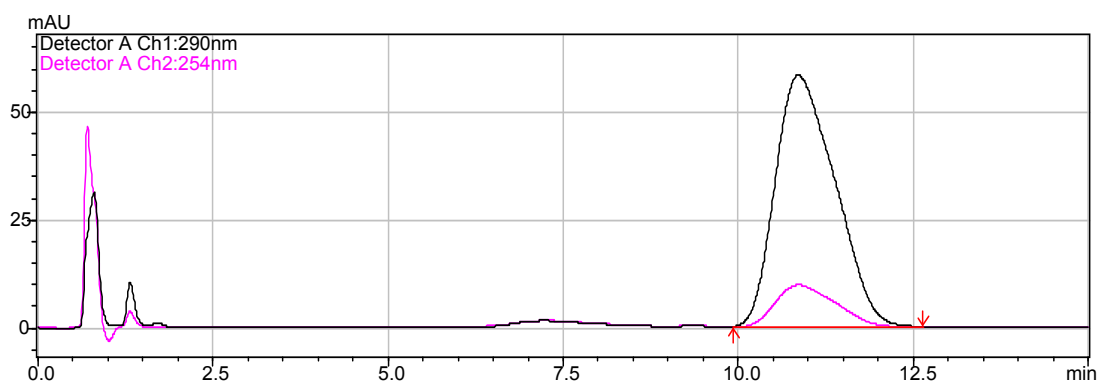


Figura 4.6 Degradación básica de la 4',7-dimetilnaringenina.

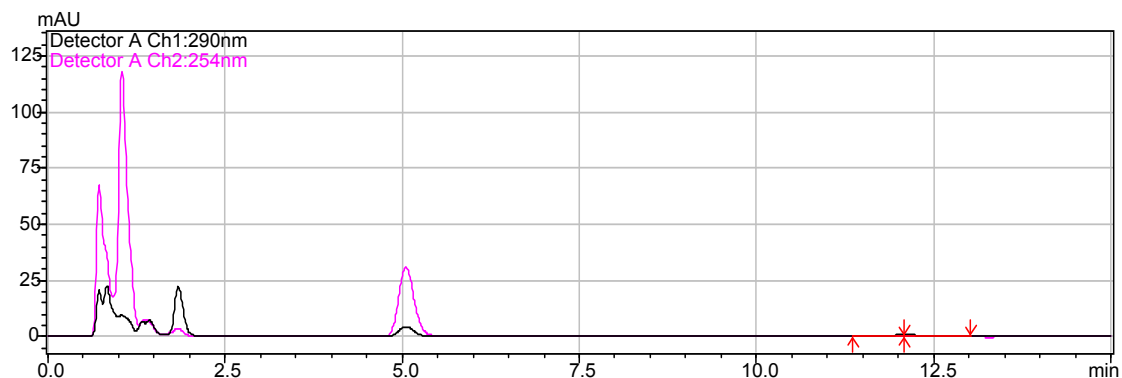


Figura 4.7 Oxidación de la 4',7-dimetilnaringenina.

Con respecto a la 4',7-dimetilapigenina, las **Figuras 4.8-4.11** ilustran los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones de degradación. Como se deduce de las **Figuras 4.0-4.11** la 4',7-dimetilapigenina se degrada bajo todas las condiciones ensayadas. De acuerdo con el **Cuadro 4.4** los porcentajes de degradación fueron menores al 50%.

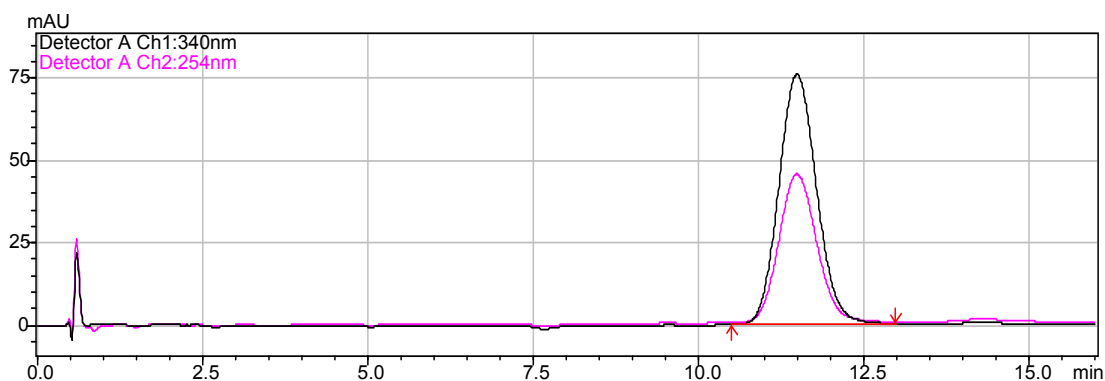


Figura 4.8 Cromatograma correspondiente a una solución de 60 µg/mL de 4',7-dimetilapigenina.

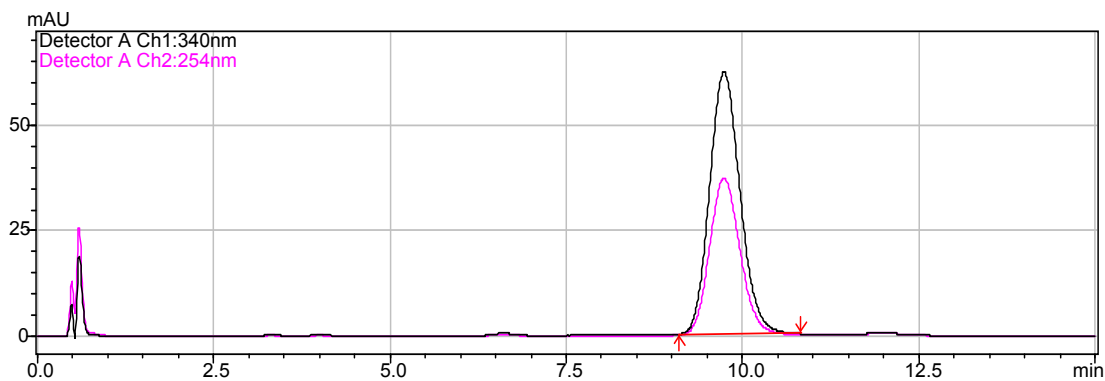


Figura 4.9 Degradación ácida de la 4',7-dimetilapigenina.

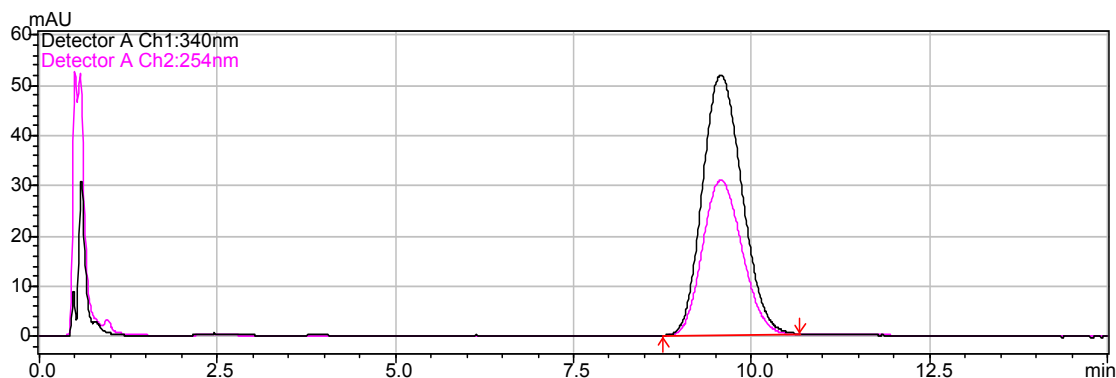


Figura 4.10 Degradación básica de la 4',7-dimetilapigenina.

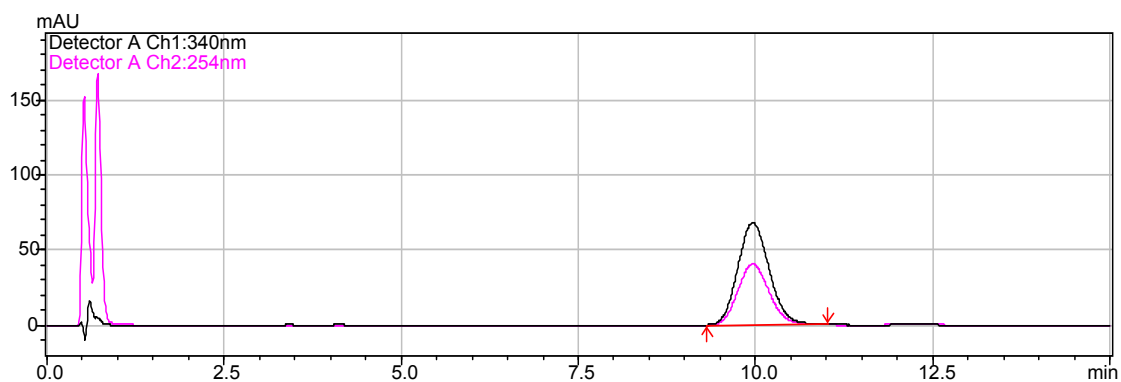


Figura 4.11 Oxidación de la 4',7-dimetilapigenina.

Los resultados obtenidos indican que debido a las diferencias en los tiempos de retención los productos de degradación generados no interfieren con las señales de los analitos de interés.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la respuesta obtenida para cada una de las condiciones cromatográficas se debe exclusivamente a la presencia de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina. Por lo tanto, el método analítico propuesto es específico y selectivo.



4.3.1.3 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo de concentraciones pertinentes con la aplicación analítica (ICH, 1996).

El rango de concentraciones para cada producto natural se estableció mediante el cálculo aproximado de su concentración en la matriz de trabajo; este valor fue asignado como 100%. Este cálculo se realizó inyectando soluciones de concentración conocida de los estándares y del extracto. Una vez establecido el 100%, el intervalo de concentraciones se estableció del 25% hasta el 200% debido a la gran variabilidad del propóleo.

4.3.1.3.1 Linealidad del sistema

Este parámetro de calidad se evaluó de manera independiente para cada flavonoide. Los datos obtenidos para la linealidad del sistema utilizando la 4',7-dimetilnaringenina permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

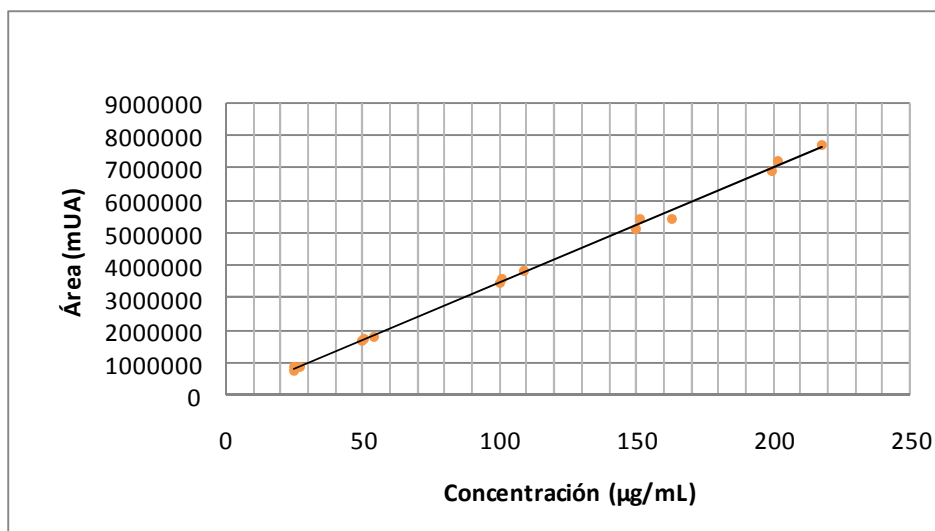
$$\text{Área} = -48208.6 + 35302.3 * \text{Concentración}$$

Como se deduce del **Cuadro 4.5**, el valor del coeficiente de correlación sugiere una relación lineal fuerte entre el área y la concentración (**Gráfica 4.1**). Considerando las cifras significativas y el criterio de aceptación establecido para este parámetro de calidad se concluye que el sistema se ajusta a un modelo de regresión lineal entre las variables.

Por otro lado, el coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 99.8% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo. Finalmente, en el **Cuadro 4.6** se observa que el intervalo obtenido con un nivel de confianza del 95% para la ordenada al origen incluye el cero mientras que, para la pendiente no incluye dicho valor, por lo tanto, el modelo cumple con las especificaciones establecidas para la linealidad del sistema.



Gráfica 4.1. Linealidad del sistema para la 4',7-dimetilnaringenina.



Cuadro 4.5 Datos de la regresión lineal del sistema empleando 4',7-dimetilnaringenina.

Datos de la regresión lineal	
Ordenada al origen (β_0)	-48208.5988
Pendiente de la recta (β_1)	35302.2587
Coefficiente de correlación (r)	0.998978
Coefficiente de determinación (r^2)	0.997957

Cuadro 4.6 Intervalos de confianza de la ordenada al origen y la pendiente, para el modelo de linealidad del sistema empleando 4',7-dimetilnaringenina.

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-48208.5988	-169916.7020	73499.5039
Pendiente de la recta (β_1)	35302.2587	34345.2812	36259.2361

Con respecto a la 4',7-dimetilapigenina, el modelo de regresión lineal calculado para evaluar este parámetro fue:

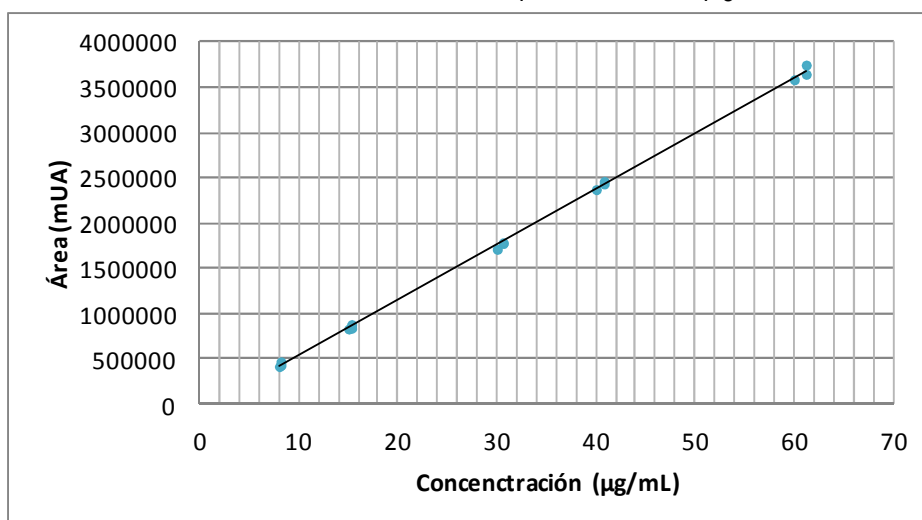
$$\text{Área} = -72453.17 + 61281.34 * \text{Concentración}$$

En la **Gráfica 4.2** se puede observar la tendencia lineal entre los datos obtenidos. En este caso, el coeficiente de determinación calculado indica que el 99.9% de la variabilidad total en la respuesta (área bajo la curva) obtenida es explicada por el modelo propuesto (**Cuadro 4.7**). El valor negativo y positivo de los límites inferior y superior del intervalo de confianza (IC) para la ordenada al origen indican la inclusión



del cero en contraste con el IC para la pendiente (**Cuadro 4.8**). Por lo tanto, el modelo cumple con todos los criterios de aceptación establecidos para la linealidad del sistema empleando a la 4',7-dimetilapigenina como analito.

Gráfica 4.2 Linealidad del sistema para 4',7-dimetilapigenina.



Cuadro 4.7 Datos de la regresión lineal del sistema empleando 4',7-dimetilapigenina.

Datos de la regresión lineal	
Ordenada al origen (β_0)	-72453.1724
Pendiente de la recta (β_1)	61281.3437
Coefficiente de correlación (r)	0.999645
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999289

Cuadro 4.8 Intervalos de confianza de la ordenada al origen y la pendiente para el modelo de linealidad del sistema empleando 4',7-dimetilapigenina.

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-72453.1724	-107925.0420	-36981.3030
Pendiente de la recta (β_1)	61281.3437	60302.1209	62260.5665

Para confirmar estadísticamente el ajuste de los datos al modelo lineal, se realizó un análisis de varianza para cada una de las ecuaciones calculadas. Para ello, se establecieron las siguientes hipótesis:

H_0 : el modelo estadístico no describe una relación lineal

H_1 : el modelo estadístico describe una relación lineal



En los Cuadros 4.9 y 4.10 se resumen los resultados del análisis de varianza en donde se observa que el valor calculado de F, para ambos modelos, es mayor que su valor crítico, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se concluye que los modelos describen una relación lineal entre las variables.

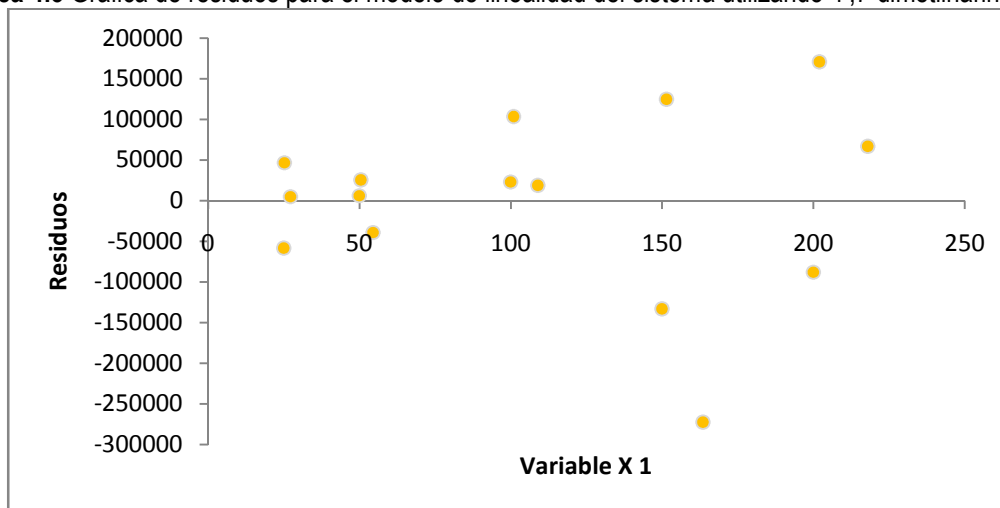
Cuadro 4.9 Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para la 4',7-dimetilnaringenina.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	8.2298x10 ¹³	8.2298x10 ¹³	6351.22206	4.67
Residuos	13	1.6845x10 ¹¹	1.2958x10 ¹⁰		
Total	14	8.2466x10 ¹³			

Cuadro 4.10 Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para la 4'7-dimetilapigenina.

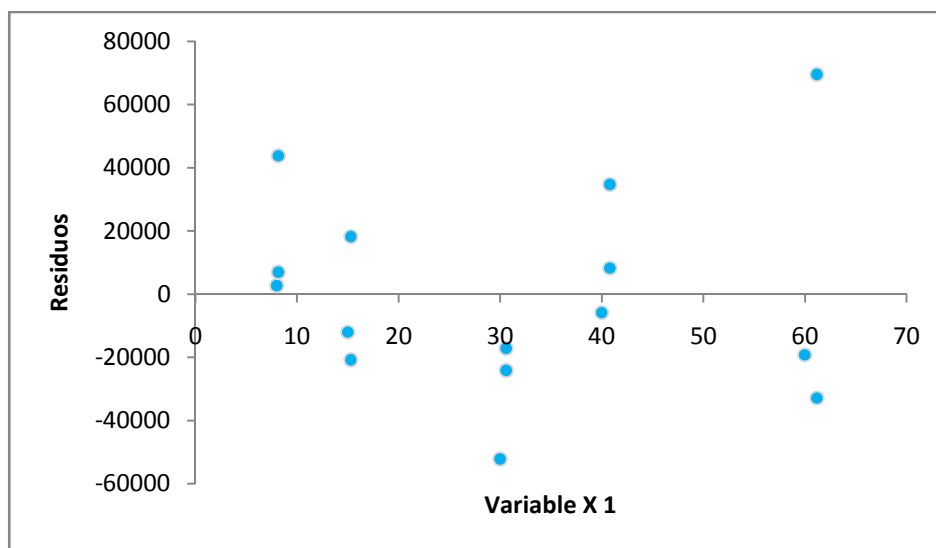
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	1.9756x10 ¹³	1.9756x10 ¹³	18278.8671	4.67
Residuos	13	1.4051x10 ¹⁰	1080832187		
Total	14	1.977x10 ¹³			

Gráfica 4.3 Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del sistema utilizando 4',7-dimetilnaringenina.





Gráfica 4.4 Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema utilizando 4',7-dimetilapigenina.



Como se observa en las Gráficas de residuales (**Gráfica 4.3** y **4.4**) los datos no siguen tendencias por lo que el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende.

Con base en todo el análisis estadístico realizado se concluye que el sistema es lineal para cuantificar a la 4',7-dimetilnaringenina y a la 4',7-dimetilapigenina en los intervalos de concentración establecidos para cada flavonoide.

4.3.1.3.2 Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método se construyó una curva que relaciona la concentración recuperada y la concentración adicionada para ambos metabolitos (**Gráficas 4.5** y **4.6**). Los datos empleados para este propósito se resumen en los **Cuadros 4.11** y **4.14**, respectivamente. Como se observa en las **Gráficas 4.5** y **4.6** los resultados muestran una tendencia lineal. El análisis estadístico de los datos permitió calcular las siguientes ecuaciones para cada uno de los analitos:

Linealidad del método utilizando 4',7-dimetilnaringenina:

$$\text{Concentración recuperada} = -0.898259 + 1.01211 * \text{Concentración adicionada}$$



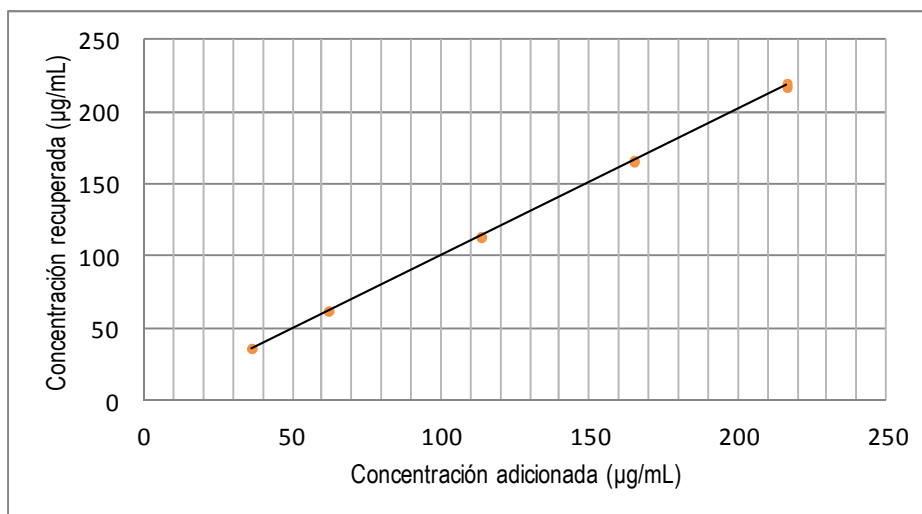
Linealidad del método empleando 4',7-dimetilapigenina:

$$\text{Concentración recuperada} = 0.21217 + 0.989416 * \text{Concentración adicionada}$$

Cuadro 4.11 Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método empleando 4',7-dimetilnaringenina.

Nivel	t _R (min)	Área	Concentración recuperada (µg/mL)	Concentración adicionada (µg/mL)
1	11.669	1234692	36.2907	36.2074
	11.303	1225290	36.0252	36.2074
	10.426	1224080	35.9910	36.2074
2	11.398	2152717	62.2158	61.9144
	11.222	2146554	62.0417	61.9144
	10.727	2142047	61.9144	61.9144
3	11.344	3978866	113.7863	113.4574
	10.955	3946300	112.8667	113.4574
	10.614	3967966	113.4785	113.4574
4	11.354	5850453	166.6400	164.9574
	10.992	5824630	165.9108	164.9574
	10.281	5804725	165.3487	164.9574
5	11.375	7680933	218.3329	216.4574
	11.045	7634879	217.0323	216.4574
	10.247	7743067	220.0875	216.4574

Gráfica 4.5 Linealidad del método para la 4',7-dimetilnaringenina.





Cuadro 4.12 Parámetros de la regresión lineal del método empleando 4',7-dimetilnaringenina.

Datos de la regresión lineal	
Ordenada al origen (β_0)	-0.8167
Pendiente de la recta (β_1)	1.0117
Coefficiente de correlación (r)	0.999943
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999885

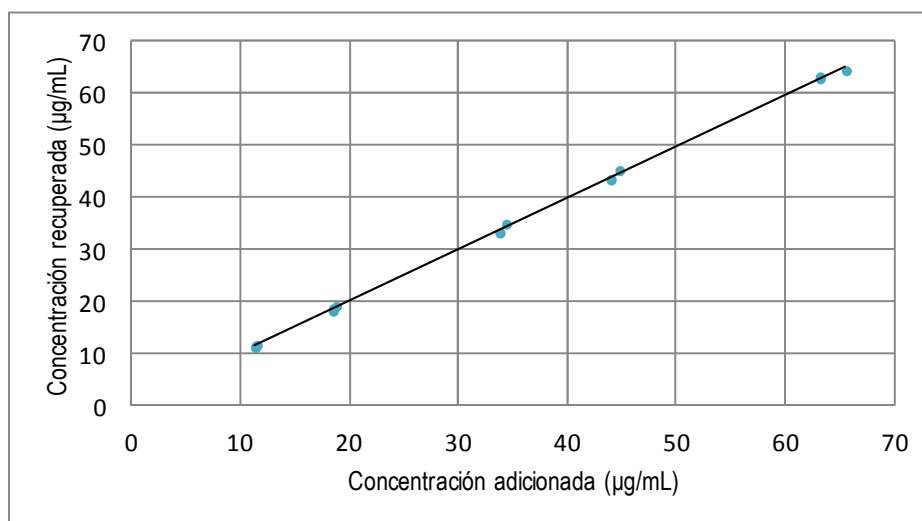
Cuadro 4.13 Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente del modelo de linealidad del método para la 4',7-dimetilnaringenina.

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	-0.8167	-1.6990	0.0656
Pendiente de la recta (β_1)	1.0117	1.0052	1.0182

En los **Cuadros 4.12 y 4.15** se describen los parámetros estadísticos calculados para los dos compuestos. Los coeficientes de correlación para ambos flavonoides son mayores a 0.999 y los de determinación superan el valor de 0.98 por lo tanto, cumplen con los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros.

De nueva cuenta, los intervalos de confianza (**Cuadros 4.13 y 4.16**) para la ordenada al origen incluyen el cero, mientras que para las pendientes incluyen la unidad. Con base en estos hallazgos se concluye que el método cumple con los criterios de linealidad establecidos en la normatividad mexicana.

Gráfica 4.6 Linealidad del método para la 4',7-dimetilapigenina.





Cuadro 4.14 Datos obtenidos para determinar la linealidad del método empleando 4',7-dimetilapigenina.

Nivel	t_R (min)	Área	Concentración recuperada	Concentración adicionada
1	11.429	642412	11.6653	11.5126
	11.869	612951	11.1846	11.3526
	11.628	628796	11.4431	11.3526
2	10.866	1099746	19.1282	18.7926
	11.033	1043244	18.2062	18.4926
	11.791	1071872	18.6733	18.4926
3	11.057	2068378	34.9345	34.3926
	11.156	1967484	33.2881	33.7926
	11.586	1964957	33.2469	33.7926
4	11.320	2698944	45.2242	44.7926
	11.156	2596686	43.5555	43.9926
	11.556	2587648	43.4080	43.9926
5	10.062	3874540	64.4078	65.5926
	10.042	3778877	62.8467	63.1926
	10.920	3802370	63.2301	63.1926

Cuadro 4.15 Parámetros de la regresión lineal del método empleando 4',7-dimetilapigenina.

Datos de la regresión lineal	
Ordenada al origen (β_0)	0.2122
Pendiente de la recta (β_1)	0.9894
Coefficiente de correlación (r)	0.999763
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999527

Cuadro 4.16 Intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente, para el modelo lineal del método empleando 4',7-dimetilapigenina.

	Coefficientes	Inferior 95%	Superior 95%
Ordenada al origen (β_0)	0.2122	-0.2938	0.7181
Pendiente de la recta (β_1)	0.9894	0.9765	1.0023

Finalmente, se realizó un análisis de varianza para los modelos de regresión lineal calculados para ambos compuestos (**Cuadros 4.17 y 4.18**). En los dos casos se obtuvo un valor de F mayor al crítico, por lo que, se confirma el modelo lineal para el método.



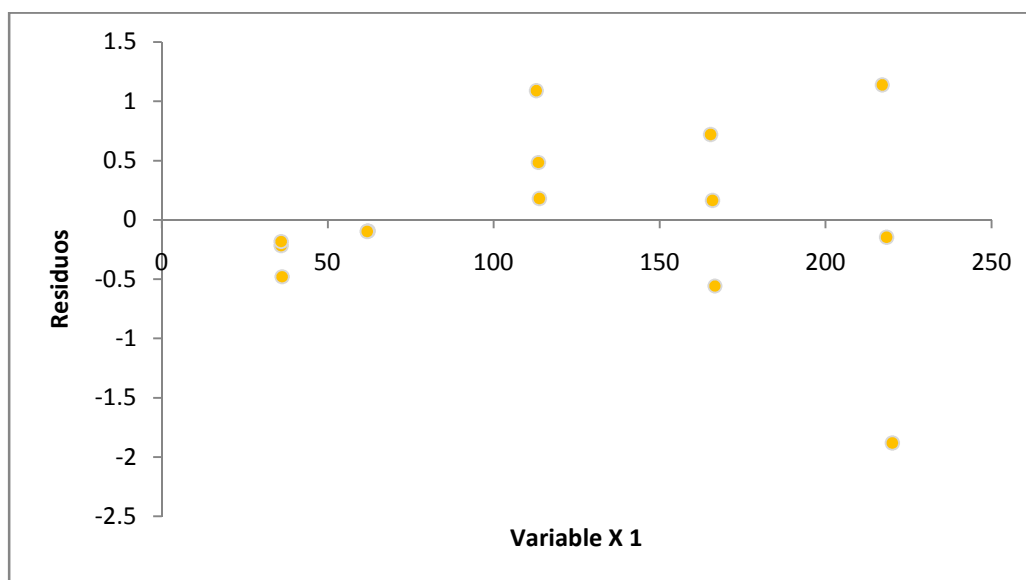
Cuadro 4.17 Análisis de varianza de la regresión lineal del método para la 4',7-dimetilnarigenina.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	66745.0586	66745.0586	113036.413	4.67
Residuos	13	7.6761615	0.59047396		
Total	14	66752.7348			

Cuadro 4.18 Análisis de varianza de la regresión lineal del método para la 4',7-dimetilapigenina.

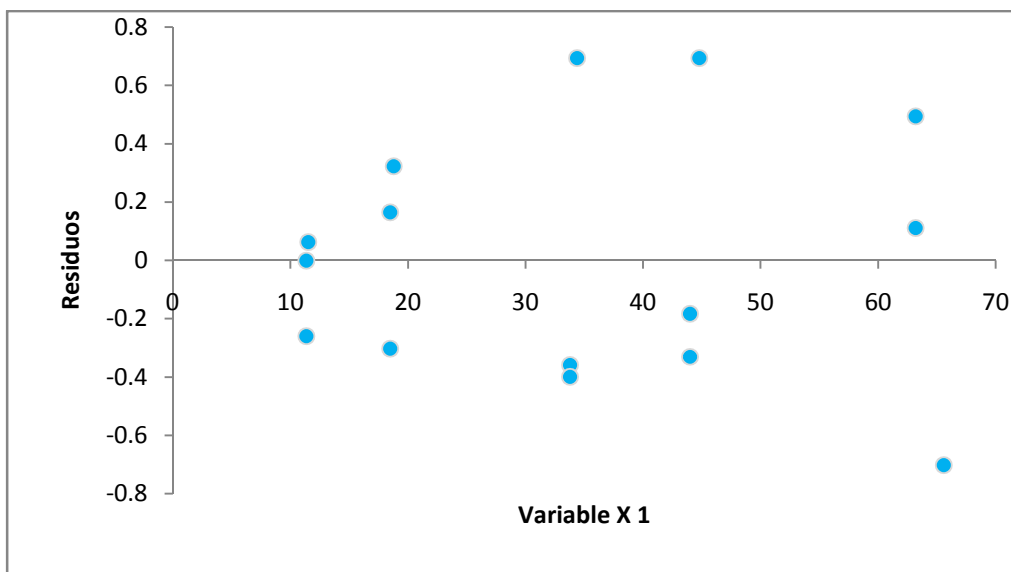
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	5148.88156	5148.88156	27442.2847	4.67
Residuos	13	2.43913584	0.18762583		
Total	14	5151.32069			

Gráfica 4.7 Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del método utilizando 4',7-dimetilnarigenina.





Gráfica 4.8. Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del método utilizando 4',7-dimetilnaringenina.



En las Gráficas de residuos (**Gráficas 4.7 y 4.8**) se observa que los datos no siguen alguna tendencia por lo que, el modelo de linealidad del método es adecuado para la aplicación que se pretende.

De acuerdo con todo el análisis estadístico realizado se determinó que el método analítico es lineal en el rango de concentraciones establecido para la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.

4.3.1.4 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra (ICH, 1996). En los **Cuadros 4.19 y 4.20** se resumen los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método analítico para la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.



Cuadro 4.19 Resultados para evaluar la exactitud del método con la 4',7-dimetilnaringenina.

Nivel	Concentración recuperada (µg/mL)	Concentración adicionada (µg/mL)	% Recobro	\hat{y} %Recobro	S	DER (%)
1	36.2907	36.2074	100.230019	99.71	0.45308488	0.45
	36.0252	36.2074	99.4967077			
	35.9910	36.2074	99.40233345			
2	62.2158	61.9144	100.416992	100.16	0.24414244	0.24
	62.0417	61.9144	100.1360838			
	61.9144	61.9144	99.93065567			
3	113.7863	113.4574	100.2898882	99.93	0.41260745	0.41
	112.8667	113.4574	99.47930599			
	113.4785	113.4574	100.0185824			
4	166.6400	164.9574	101.020029	100.61	0.39251373	0.39
	165.9108	164.9574	100.5779495			
	165.3487	164.9574	100.2371838			
5	218.3329	216.4574	100.8664353	100.94	0.70832943	0.70
	217.0323	216.4574	100.2655931			
	220.0875	216.4574	101.6770647			

Cuadro 4.20 Resultados para evaluar la exactitud del método con la 4',7-dimetilapigenina.

Nivel	Concentración recuperada (µg/mL)	Concentración adicionada (µg/mL)	% Recobro	\hat{y} % Recobro	S	DER (%)
1	11.6653	11.5126	101.326388	100.21	1.49133536	1.49
	11.1846	11.3526	98.5197367			
	11.4431	11.3526	100.797291			
2	19.1282	18.7926	101.785626	100.40	1.73947601	1.73
	18.2062	18.4926	98.4510306			
	18.6733	18.4926	100.977214			
3	34.9345	34.3926	101.575595	99.49	1.80790304	1.81
	33.2881	33.7926	98.5070127			
	33.2469	33.7926	98.3849858			
4	45.2242	44.7926	100.963519	99.55	1.23808077	1.24
	43.5555	43.9926	99.0064683			
	43.4080	43.9926	98.6712215			
5	64.4078	65.5926	98.1936775	99.24	0.95165278	0.96
	62.8467	63.1926	99.4526873			
	63.2301	63.1926	100.059346			



Los porcentajes de recobro obtenidos, para cada uno de los niveles de concentración ensayados con ambos analitos, se encuentra dentro de los límites establecidos por las guías Q2A y Q2B de la *International Conference on Harmonisation* (ICH) para métodos cromatográficos (98.0-102.0%). Asimismo, la desviación estándar relativa obtenida para cada nivel es menor al 2.0%. Por lo tanto, el método analítico es exacto.

4.1.3.5 Precisión

La precisión de un método analítico expresa la concordancia entre una serie de mediciones independientes. La precisión puede ser evaluada a través de los siguientes niveles: precisión del sistema, precisión del método y precisión intermedia (FEUM, 2008).

4.3.1.5.1 Precisión del sistema

La precisión del sistema se refiere a la variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica, que puede ser originada por el analista y el equipo e instrumentos de medición, por tan solo mencionar algunos (FEUM, 2008).

En el **Cuadro 4.21** se resumen los valores de la respuesta analítica obtenida para cada compuesto así como, los resultados estadísticos. El coeficiente de variación para ambos compuestos es menor a 1.5, por lo que se afirma que el sistema es preciso.

Cuadro 4.21 Precisión del sistema.

Disolución	4',7-dimetilnaringenina	4',7-dimetilapigenina
	Área	Área
1	3742313	1763761
2	3741054	1793068
3	3713548	1795106
4	3776548	1799301
5	3777631	1795103
6	3789679	1799406
Ȳ	3756795.5	1790957.5
S	29098.0679	13560.9011
CV (%)	0.77	0.76



4.3.1.5.2 Precisión del método

La precisión del método evalúa la variabilidad de la respuesta analítica debida a factores aleatorios, como la incertidumbre de las mediciones debidas a la balanza analítica, el material y las corridas analíticas, entre otros. Este parámetro se mide en términos de repetibilidad.

La repetibilidad se refiere a la variación de los resultados en las muestras al aplicar el método en una corrida analítica. Ésta es una propiedad crítica del método analítico porque mide su variación durante la rutina de trabajo (FEUM, 2008).

En el **Cuadro 4.22** se resumen las respuestas medidas para cada uno de los compuestos. De acuerdo con el coeficiente de variación calculado el método es preciso ya que su valor es inferior al 2.0%.

Cuadro 4.22 Repetibilidad.

Muestra	4',7-dimetilnaringenina		4',7-dimetilapigenina	
	Concentración del extracto de propóleo (mg/mL)	Área	Concentración del extracto de propóleo (mg/mL)	Área
1	3.33	3220925	4.66	1883151
2	3.33	3221606	4.66	1890544
3	3.33	3224724	4.66	1878356
	\bar{Y}	3222418.33	\bar{Y}	1884017
	S	2025.58987	S	6139.97581
	CV (%)	0.06	CV (%)	0.33

4.3.1.5.3 Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas (FEUM, 2008).

En el **Cuadro 4.23** se resumen los resultados obtenidos para cada compuesto. De nueva cuenta, el coeficiente de variación para cada uno es menor al 2.0% por lo tanto, el método analítico es preciso bajo las condiciones de análisis en el laboratorio.



Cuadro 4.23 Precisión intermedia.

Día	Área 4',7-dimetilapigenina		Área 4',7-dimetilnaringenina	
	Analista		Analista	
	1	2	1	2
1	1805152	1732172	3593912	3661886
	1824821	1789072	3594201	3642320
	1807763	1735345	3621198	3586550
2	1802029	1775873	3639142	3674204
	1804596	1814096	3688669	3644509
	1783860	1811468	3506960	3670846
\hat{Y}	1790520.58		3627033.08	
S	29730.5613		50551.0793	
CV (%)	1.66		1.39	

Con base en los resultados descritos en los incisos **5.3.1.6.1 - 5.3.1.6.3** el método propuesto es preciso.

4.3.1.6 Robustez

La robustez es la capacidad del método analítico de permanecer inalterado al presentarse variaciones experimentales (FEUM, 2008). En métodos cromatográficos, las variaciones típicas que se evalúan para este parámetro de desempeño son: el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes columnas cromatográficas, la temperatura y el flujo (ICH, 1996).

Así, los factores seleccionados para evaluar la robustez del método fueron la temperatura (factor A), la composición de la fase móvil (factor B) y el flujo (factor C) sobre la resolución de los picos correspondientes a la 4',7-dimetilnaringenina y a la 4',7-dimetilapigenina. Para ello se empleó un diseño factorial 2^3 .

Resolución del pico de la 4',7-dimetilnaringenina

El **Cuadro 4.24** muestra los valores obtenidos para la resolución en las diferentes condiciones de análisis. Para calcular el modelo factorial se utilizó el programa



estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

$$\text{Resolución} = -7.21788 + 0.0128875 \cdot \text{Temperatura} + 0.182475 \cdot \text{Composición MeOH en fase móvil} + 7.04913 \cdot \text{Flujo} - 0.0016875 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Composición MeOH en fase móvil} - 0.01025 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Flujo} - 0.108875 \cdot \text{Composición MeOH en fase móvil} \cdot \text{Flujo}$$

Por otra parte, en el **Cuadro 4.25**, se resume el análisis de varianza calculado para el modelo. Como se deduce del **Cuadro 4.25**, el valor de P para cada uno de los factores evaluados y para las interacciones AB y BC es menor a 0.05, indicando que, con un 95% de confianza, todos los factores ejercen un efecto significativo en la resolución. En cambio, el valor de P para la interacción de los factores A y C es mayor a 0.05, por lo que la interacción entre la temperatura y el flujo no tienen un efecto significativo sobre la resolución. Por otra parte, el valor de R-cuadrada indica que el modelo factorial 2³ explica el 99.4% de la variabilidad en los datos.

Cuadro 4.24 Resultados obtenidos para la resolución del pico de la 4',7-dimetilnaringenina.

BLOQUE	Factores			Respuesta
	Temperatura (°C)	Composición MeOH (%)	Flujo (mL/min)	Resolución
1	20	45	0.5	0.726
1	30	45	0.5	0.002
1	30	65	0.5	1.600
1	20	45	1.5	2.427
1	20	65	0.5	2.565
1	20	65	1.5	2.360
1	30	65	1.5	1.230
1	30	45	1.5	1.880
2	20	65	0.5	2.574
2	20	45	1.5	2.830
2	30	45	1.5	1.893
2	20	45	0.5	0.726
2	30	65	0.5	1.585
2	30	45	0.5	0.002
2	20	65	1.5	2.398
2	30	65	1.5	1.200

**Cuadro 4.25** Análisis de varianza de la resolución del pico 4',7-dimetilnaringenina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	3.25261	1	3.25261	330.07	0.0000
B:Composición MeOH en fase móvil	1.57879	1	1.57879	160.21	0.0000
C:Flujo	2.59049	1	2.59049	262.88	0.0000
AB	0.113906	1	0.113906	11.56	0.0094
AC	0.0105063	1	0.0105063	1.07	0.3320
BC	4.74151	1	4.74151	481.16	0.0000
Bloques	0.0109203	1	0.0109203	1.11	0.3232
Error total	0.078834	8	0.00985425		
Total (corr.)	12.3776	15			

R-cuadrada = 99.3631 por ciento

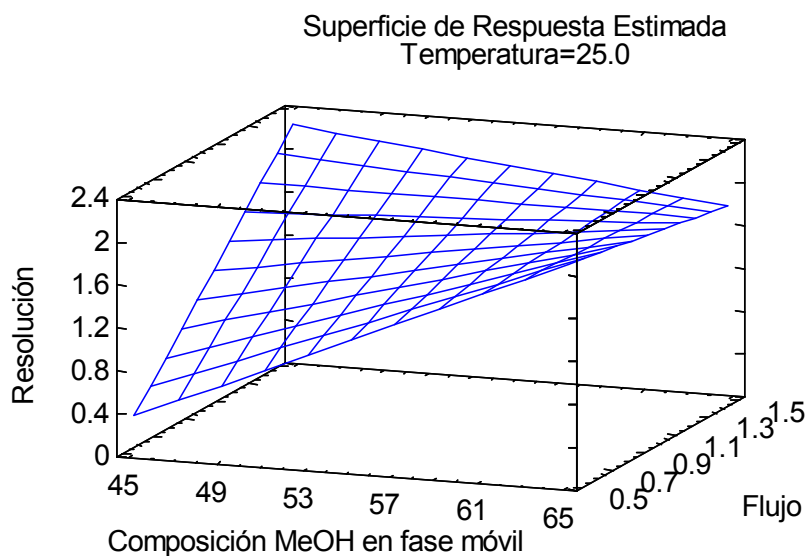
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.9385 por ciento

En la **Figura 4.12A**, se puede observar que de acuerdo con el modelo establecido, a una temperatura de 25 °C, se obtiene una mayor resolución con una composición de 65% de MeOH en la fase móvil y un flujo de 0.5mL/min, o bien, un flujo de 1. 5mL/min y una composición de la fase móvil con 45% de MeOH.

Por otra parte, la gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada (**Figura 4.12B**) ilustra que se obtiene una mayor resolución empleando: una temperatura de 25°C, 65% de MeOH en la fase móvil y un flujo de 0.5 mL/min. También podría emplearse un flujo de 1.5 mL/min y 45% de MeOH en la fase móvil. En cambio, cuando se tiene una temperatura de 30 °C y una composición en la fase móvil de 45% de MeOH la resolución calculada es de 1.0.



(A)



(B)

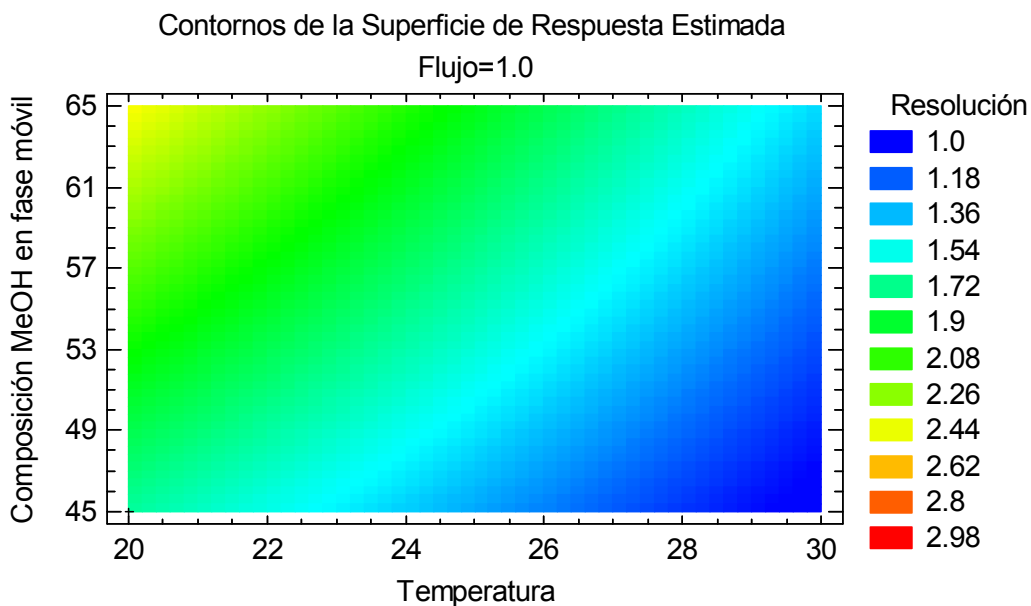


Figura 4.12 Gráficas de superficie de respuesta estimada para la resolución del pico de la 4',7-dimetilnaringenina. (A) Cubo de superficie de la respuesta estimada fijando la temperatura (factor A) a 25 °C. (B) Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada fijando el flujo a 1 mL/min.



Resolución del pico de la 4',7-dimetilapigenina

En los Cuadros 4.26 y 4.27 se resumen los resultados correspondientes a la resolución de la señal atribuida a la 4',7-dimetilapigenina. Los datos obtenidos permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

$$\text{Resolución} = 2.42931 - 0.215188 * \text{Temperatura} + 0.0259625 * \text{Composicion MeOH} - 0.2485 * \text{Flujo} + 0.0022925 * \text{Temperatura} * \text{Composicion MeOH} + 0.01555 * \text{Temperatura} * \text{Flujo} - 0.00545 * \text{Composicion MeOH} * \text{Flujo}$$

Como se observa en el Cuadro 4.27, el valor de P obtenido para todos los factores y sus interacciones es menor a 0.05, por lo tanto, con un nivel de confianza de 95% se concluye que todos los factores tienen un efecto significativo sobre la resolución de la señal. Finalmente, el valor de R-cuadrada establece que el 99.86% de la variabilidad en la resolución se encuentra explicada por el modelo propuesto.

Cuadro 4.26 Resultados obtenidos para la resolución del pico de la 4',7-dimetilapigenina.

BLOQUE	Factores			Respuesta
	Temperatura (°C)	Composicion MeOH (%)	Flujo (mL/min)	Resolución
1	20	45	1	1.171
1	20	65	2	2.168
1	30	45	2	0.156
1	20	45	2	1.023
1	20	65	1	2.527
1	30	45	1	0.236
1	30	65	1	1.992
1	30	65	2	1.924
2	30	65	2	1.847
2	20	45	2	1.013
2	20	65	2	2.199
2	30	45	1	0.236
2	30	45	2	0.156
2	20	65	1	2.529
2	30	65	1	1.946
2	20	45	1	1.125

**Tabla 4.27** Análisis de varianza de la resolución del pico de la 4',7-dimetilapigenina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	1.73054	1	1.73054	898.34	0.0000
B:Composicion MeOH	9.02402	1	9.02402	4684.45	0.0000
C:Flujo	0.101761	1	0.101761	52.83	0.0001
AB	0.210222	1	0.210222	109.13	0.0000
AC	0.0241803	1	0.0241803	12.55	0.0076
BC	0.011881	1	0.011881	6.17	0.0379
Bloques	0.00133225	1	0.00133225	0.69	0.4297
Error total	0.015411	8	0.00192637		
Total (corr.)	11.1193	15			

R-cuadrada = 99.8614 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.769 por ciento

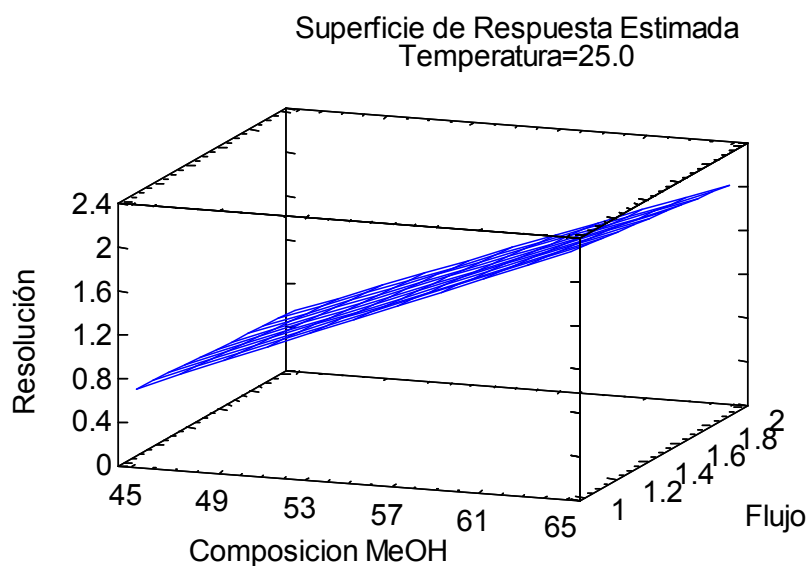
En la **Figura 4.13** se observa que a una temperatura de 25 °C, un flujo mayor a 1 mL/min y 65% de MeOH en la fase móvil la respuesta de resolución estimada es de 0.8 a 2.4 aproximadamente.

Por otro lado, la gráfica de contornos (**Figura 4.13B**) muestra el valor estimado de la resolución cuando el flujo es fijo (1.5 mL/min) y se modifican las condiciones de temperatura y composición de la fase móvil. De esta manera, la mayor resolución se obtiene a una temperatura de 20 °C y una fase móvil con 65% de MeOH.

De acuerdo con el estudio de robustez realizado, se concluye que la temperatura, el flujo y la composición de la fase móvil son factores que influyen significativamente en la resolución del método analítico.



(A)



(B)

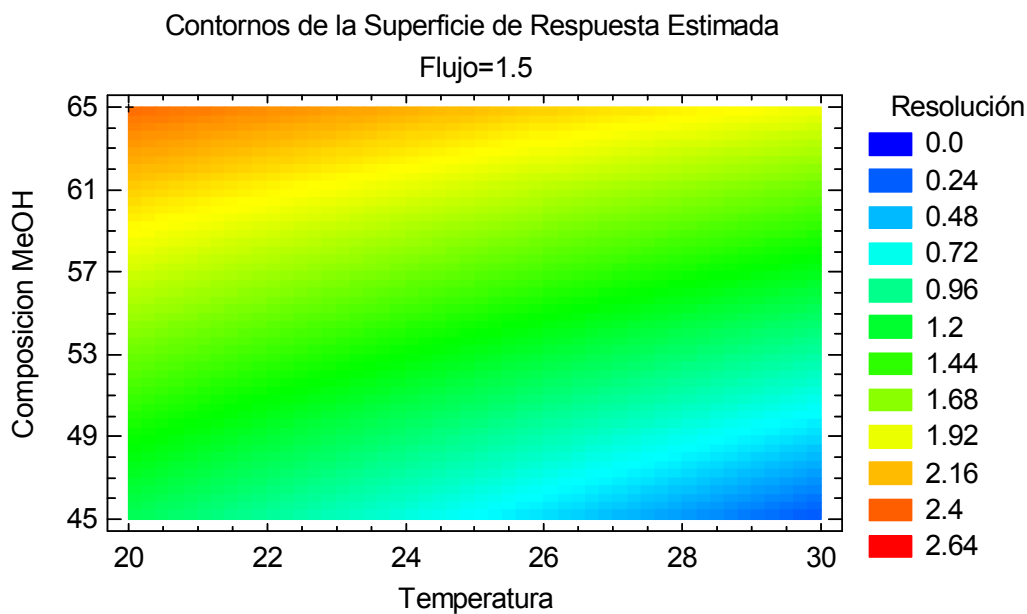


Figura 4.13 Gráficas de superficie de respuesta estimada para la resolución de la 4',7-dimetilapigenina. (A) Cubo de superficie de la respuesta estimada fijando la temperatura (factor A) a 25 °C. (B) Gráfica de contornos de la superficie de la respuesta estimada, fijando el flujo a 1.5 mL/min.

4.4 Estabilidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina



La estabilidad es la capacidad de un compuesto de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene, durante su almacenamiento.

La NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de fármacos y medicamentos” define a los estudios de estabilidad acelerada como los estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o compuesto. Esta norma establece que para evaluar la estabilidad acelerada de un fármaco nuevo, las condiciones de almacenamiento de los compuestos son 40 ± 2 °C y $75 \pm 5\%$ de temperatura y humedad, respectivamente, en un período de 3 y 6 meses. Sin embargo, debido a la demanda de tiempo, los compuestos se analizaron a los 1, 2 y 3 meses de almacenamiento, el cual es el periodo establecido para fármacos conocidos.

Para evaluar este parámetro se tenía previsto someter cada uno de los compuestos a un estudio de estabilidad acelerada; sin embargo, al no contar con cámara de humedad, no fue posible controlar esta condición de almacenamiento. Por esta razón las muestras se sometieron a una temperatura de almacenamiento de 60°C y la humedad no fue controlada.

Para asegurarse de que los compuestos fueran estables a la condición ensayada, se verificó la ausencia de señales correspondientes a productos de degradación para la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.

En las **Figuras 4.14-4.19** se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar las muestras después de cumplir el tiempo de almacenamiento establecido. En todos los casos solo se observó la señal correspondiente al analito, es decir, no se presentaron señales correspondientes a productos de degradación.

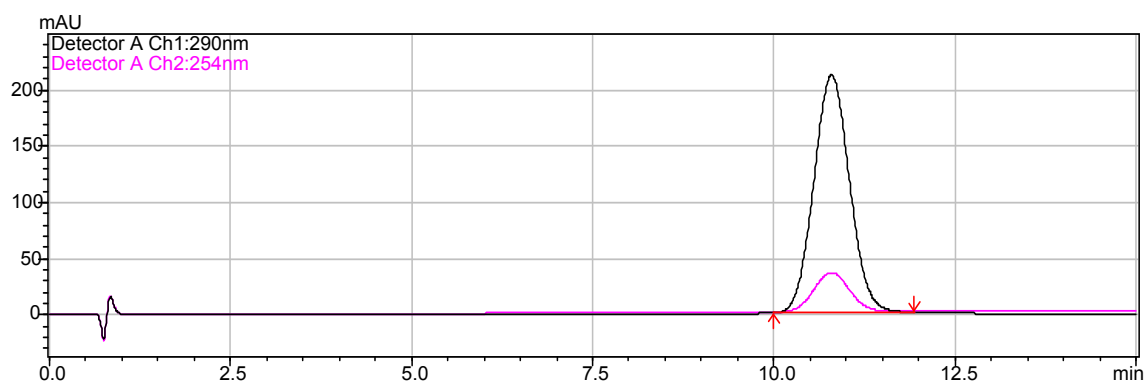


Figura 4.14 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilnaringenina después de almacenarse 1 mes a 60°C.

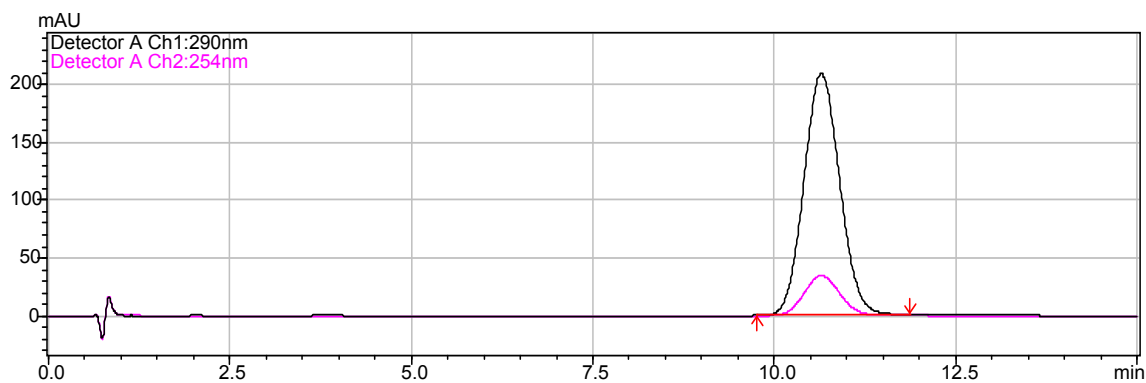


Figura 4.15 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilnaringenina después de almacenarse 2 meses a 60°C.

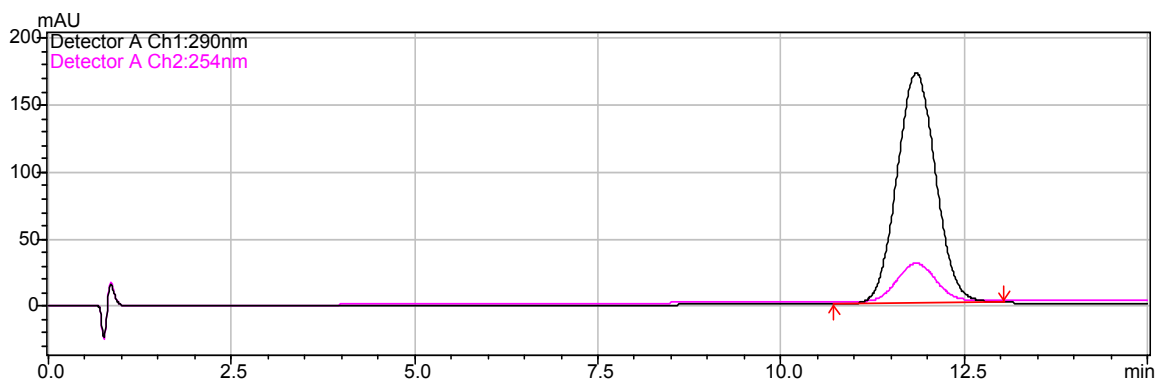


Figura 4.16 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilnaringenina después de almacenarse 3 meses a 60°C.

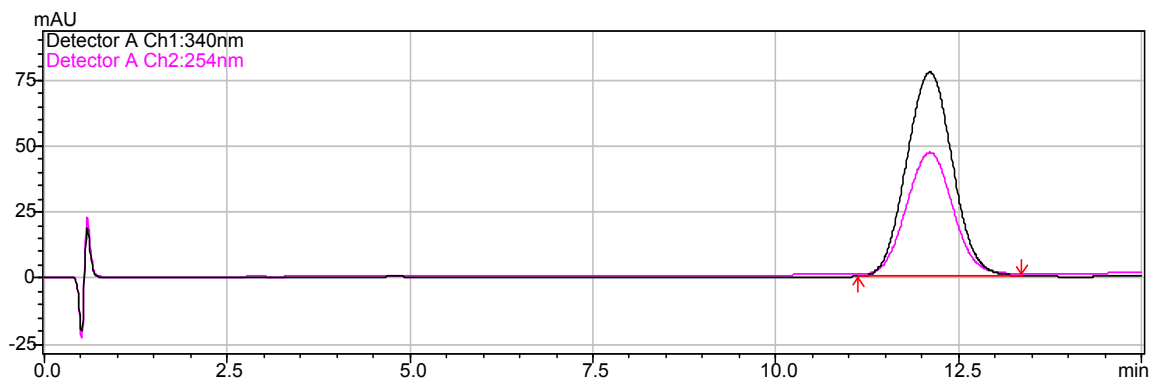


Figura 4.17 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina después de almacenarse 1 mes a 60°C.

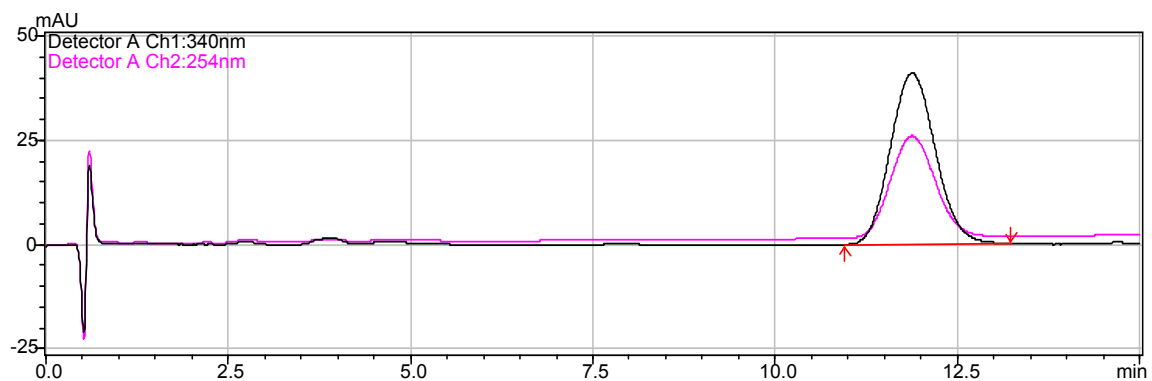


Figura 4.18 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina después de almacenarse 2 meses a 60°C.

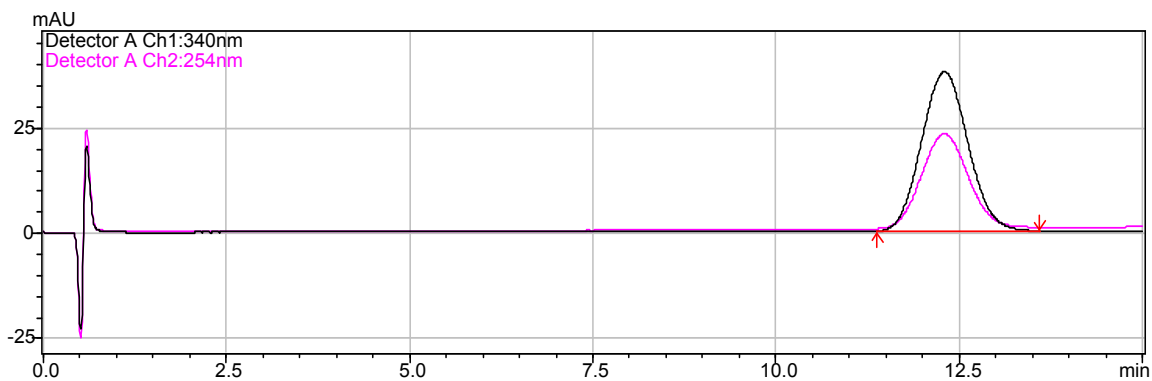


Figura 4.19 Cromatograma correspondiente a la 4',7-dimetilapigenina después de almacenarse 3 meses a 60°C.



De acuerdo con la NOM-073-SSA1-2005, se consideran cambios significativos en un fármaco cualquier variación del 5 por ciento en su concentración original, cambios en su apariencia y cambios en sus propiedades físicas. Al realizar el análisis de las muestras, no se observaron cambios en la apariencia, ya que la 4',7-dimetilnaringenina consistió en cristales blancos, mientras que la 4',7-dimetilapigenina en cristales amarillos.

En el **Cuadro 4.28** se resumen las concentraciones experimentales obtenidas al interpolar la respuesta medida (área) en la curva de cada compuesto. Como se deduce de este Cuadro las variaciones registradas entre la concentración experimental y la teórica son menores al 5 por ciento. Por lo tanto, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina son estables después de almacenarse a la humedad ambiente y a 60°C durante 1, 2 y 3 meses.

Cuadro 4.28 Resultados de la estabilidad de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina.

Tiempo de almacenamiento	4',7-dimetilnaringenina		4',7-dimetilapigenina	
	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL)	Concentración teórica(µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL)
1 mes	200.0	201.5	58.8	57.0
2 meses	200.0	200.5	30.0	30.1
3 meses	200.0	199.7	30.0	29.2

4.5 Análisis de diferentes extractos de propóleo

El análisis de las muestras de propóleo comenzó con la identificación de los flavonoides, utilizando para ello una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Una vez identificadas las señales correspondientes a la 4',7-dimetilnaringenina y a la 4',7-dimetilapigenina (**Figuras 4.20-4.36**) se inyectaron la muestras bajo las condiciones cromatográficas en las que se realizó la validación del método para cada uno de los compuestos.



El **Cuadro 4.29** resume: el flavonoide encontrado en las muestras y las cantidades de 4',7-dimetilnaringenina y 4',7-dimetilapigenina (donde fue posible cuantificarlos) por cada miligramo de propóleo.

El conjunto de resultados obtenidos permitió establecer que la 4',7-dimetilnaringenina se encuentra presente en todas las muestras analizadas excepto, aquellas que pertenecen al estado de Chiapas y a las de abejas de los géneros *Melipona* y *Scaptotrigona*. Por otra parte, la 4',7-dimetilapigenina solo fue detectada en las muestras de propóleo provenientes de la delegación Milpa Alta en el DF.

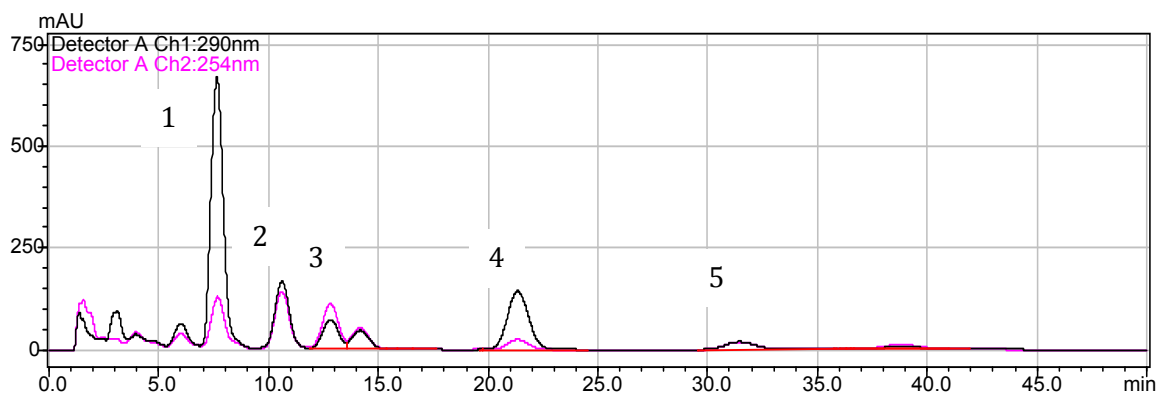


Figura 4.20 Cromatograma de la muestra utilizada como matriz de trabajo en la validación. Propóleo proveniente del Apiario “El Búho”, San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2009.

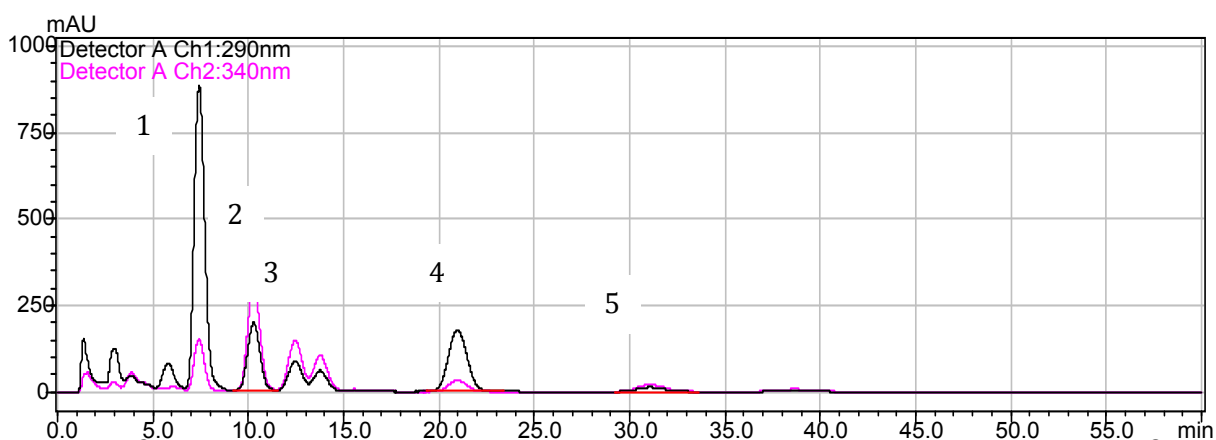


Figura 4.21 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “El Búho”, San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 1).

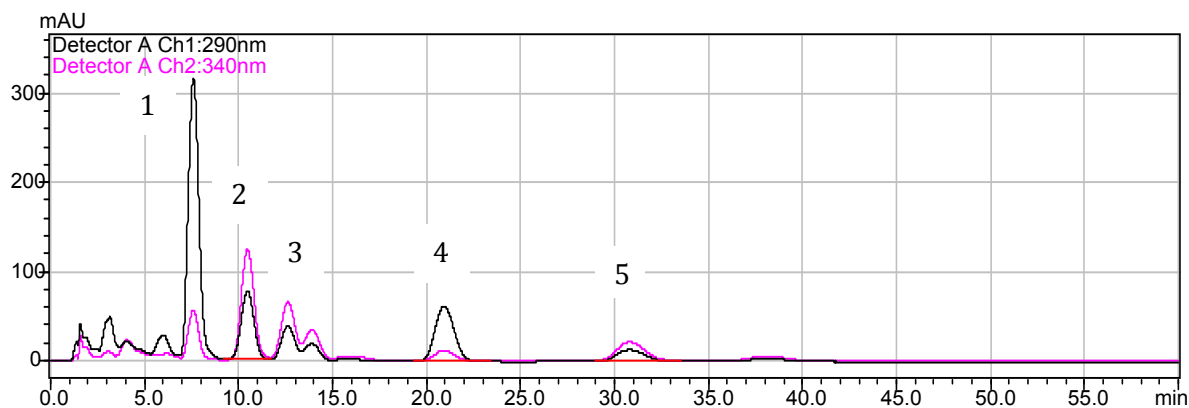


Figura 4.22 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “El Panteón”, San Pablo Oztotepec, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 2).

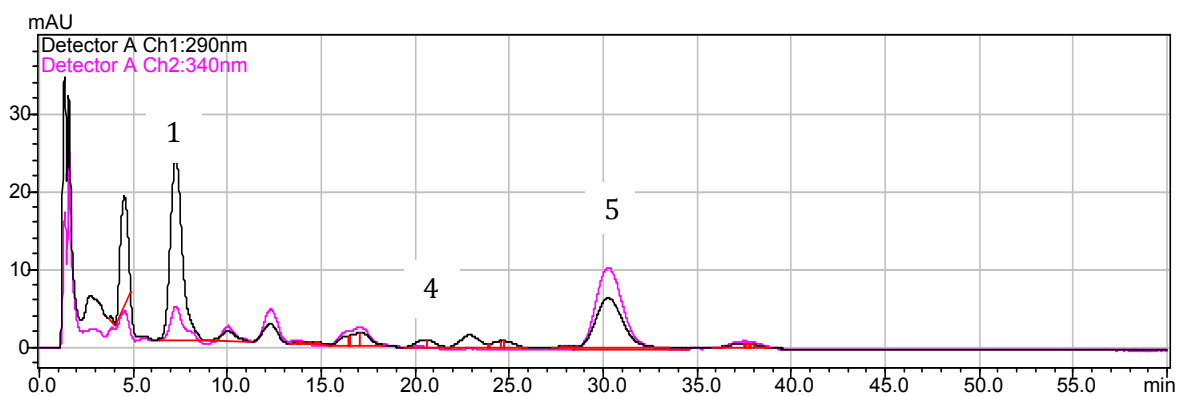


Figura 4.23 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Las Trojes”, San Antonio Tecómitl, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 3).

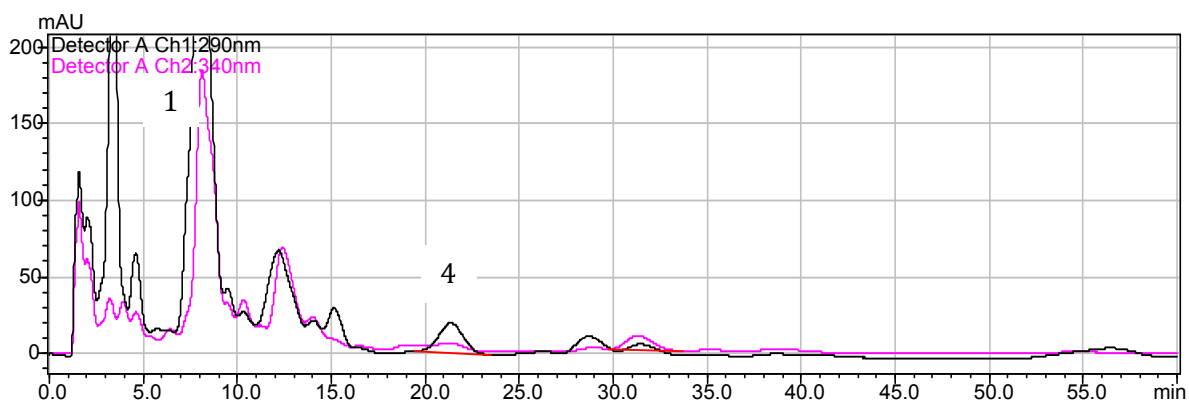


Figura 4.24 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Valentín”, San Pedro Actopan, Milpa Alta, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 4).

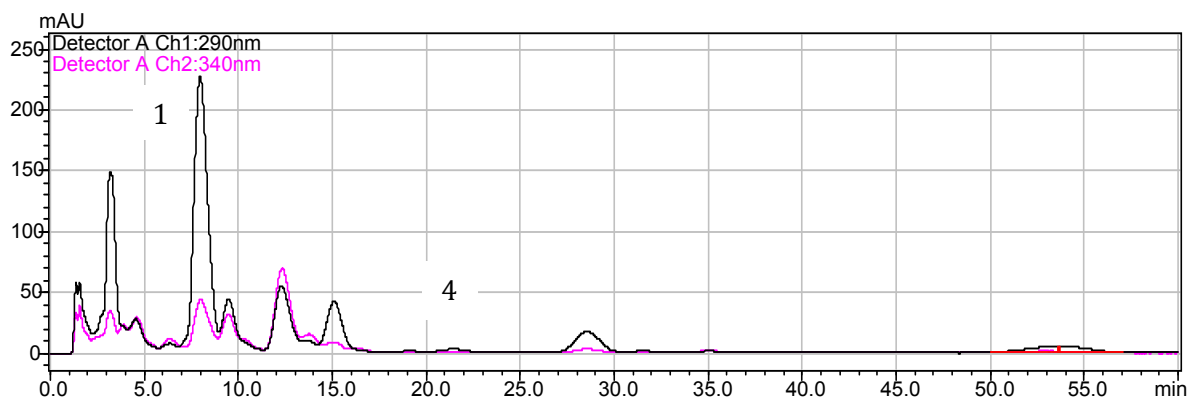


Figura 4.25 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Acuexcomatl”, San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 5).

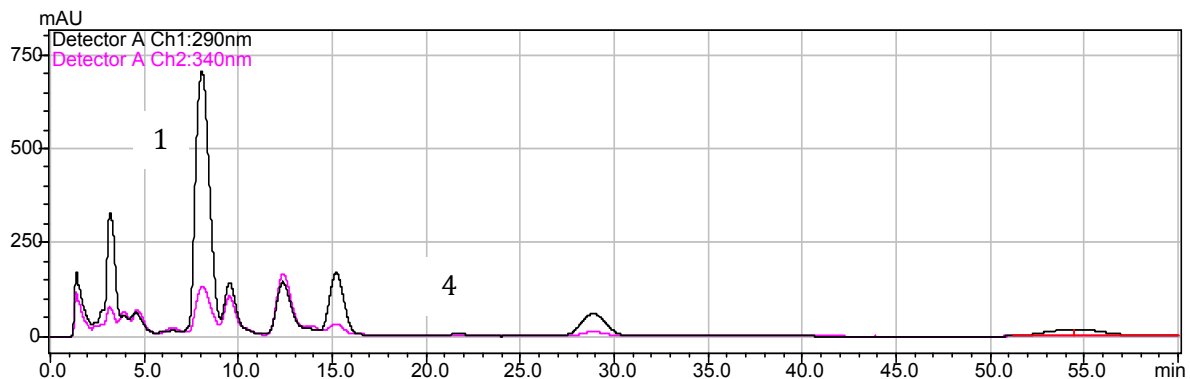


Figura 4.26 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Acuexcomatl”, San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, DF; colectado en Agosto del 2011 (Muestra 6).

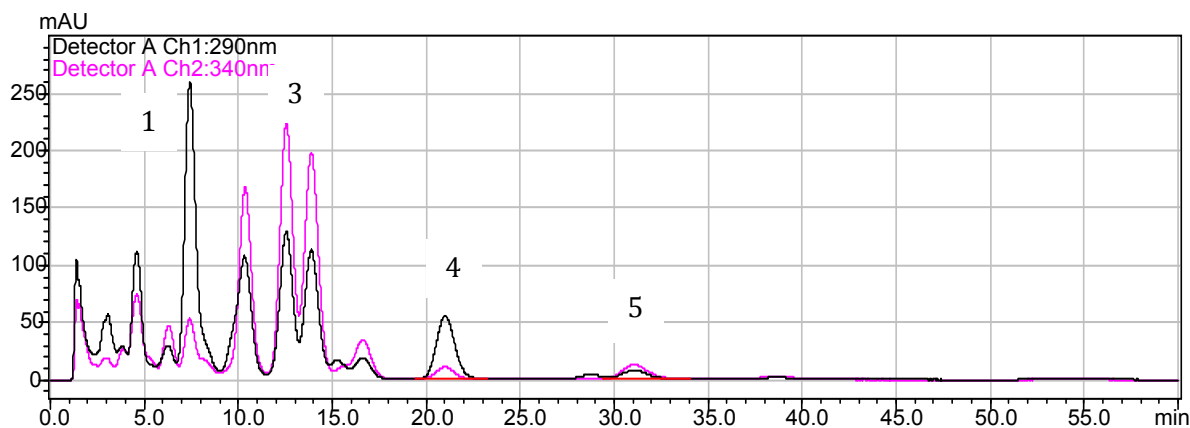


Figura 4.27 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Humberto Malo”, Topilejo, Tlalpan, DF, colectado en Agosto del 2011 (Muestra 7).

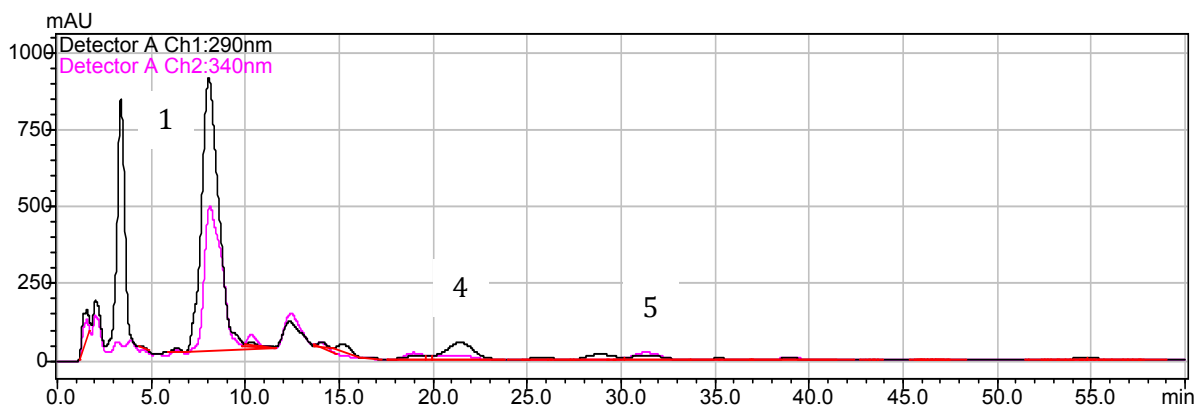


Figura 4.28 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Don Nico”, Topilejo, Tlalpan, DF; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 8).

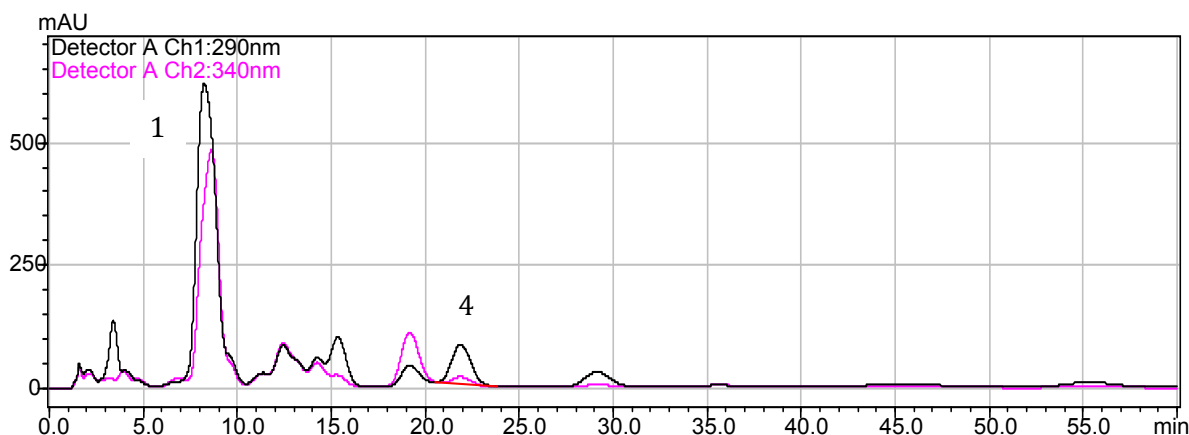
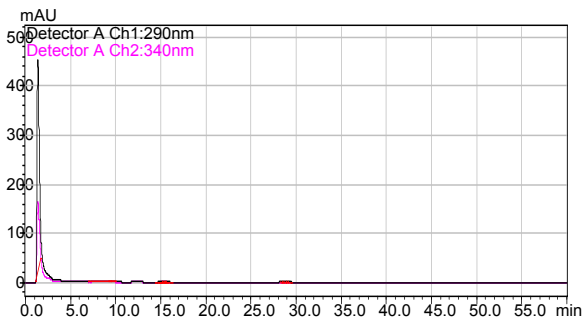


Figura 4.29 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “Álamo Blanco”, Valsequillo, Puebla; colectado en Mayo del 2011 (Muestra 9).

(A)



(B)

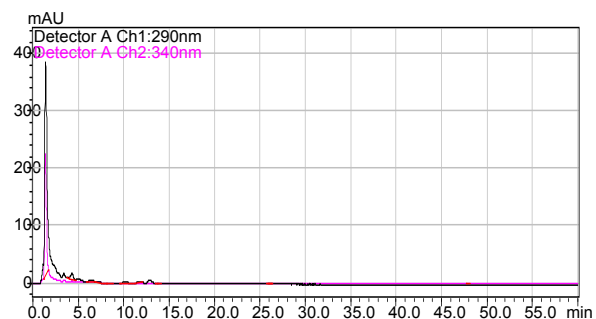


Figura 4.30 Cromatogramas obtenidos con los extractos de propóleo provenientes de San Cristóbal de las Casas, Chiapas; colectados en Octubre del 2010. (A) Apiario “Choy” (Muestra 10). (B) Apiario “Ecosur” (Muestra 11).

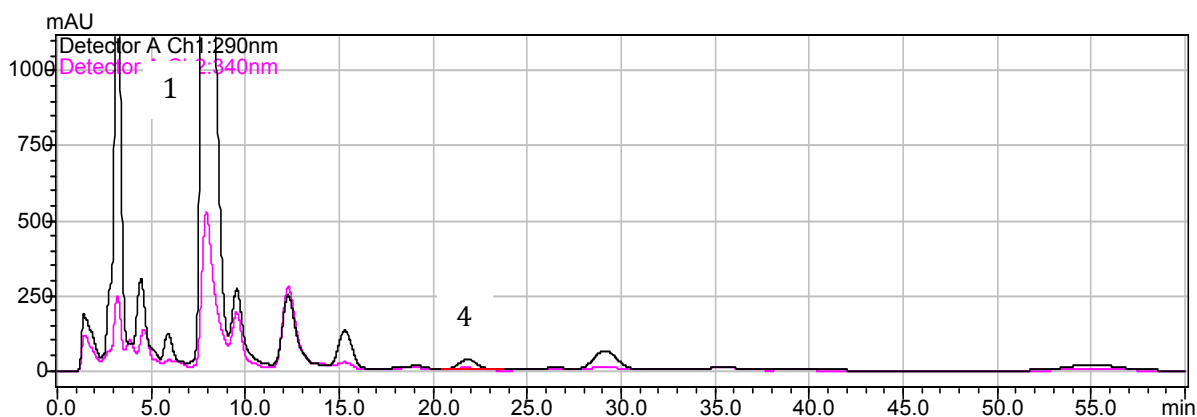


Figura 4.31 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “El Cheque”, Tlaltenango, Zacatecas; colectado en Octubre-Noviembre del 2010 (Muestra 12).

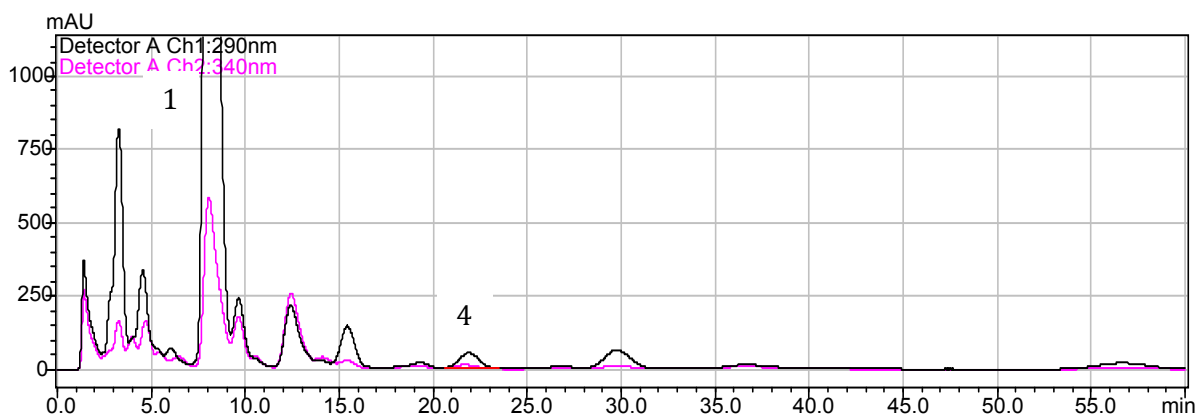


Figura 4.32 Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo proveniente del Apiario “El Cheque”, Tlaltenango, Zacatecas; colectado en Abril-Mayo del 2011 (Muestra 13).

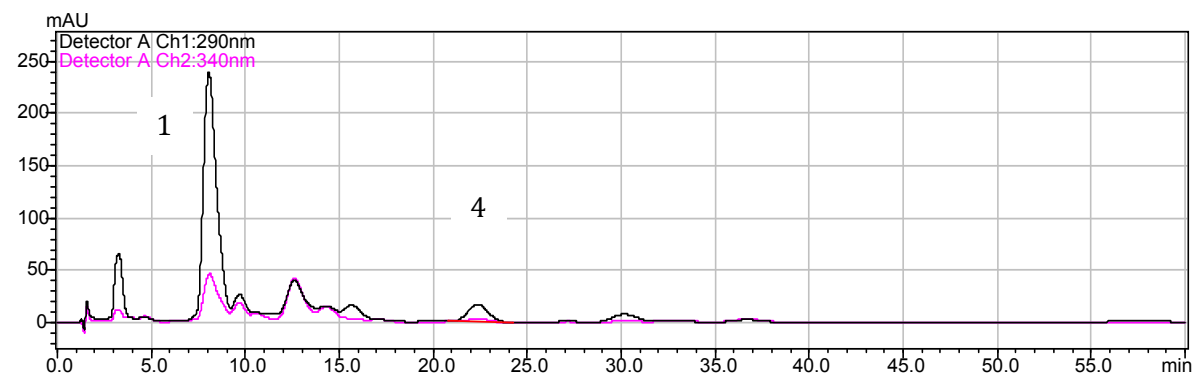


Figura 4.33 Cromatograma obtenido del extracto etanólico del propóleo proveniente del estado de Tlaxcala, colectado en Octubre del 2010 (Muestra 14).

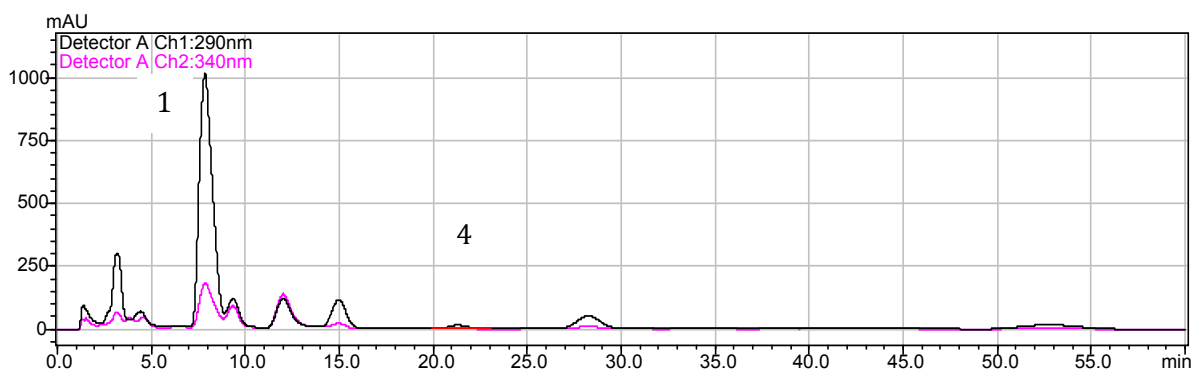


Figura 4.34 Cromatograma obtenido del extracto etanólico de propóleo proveniente del estado de Guanajuato (Muestra 15).

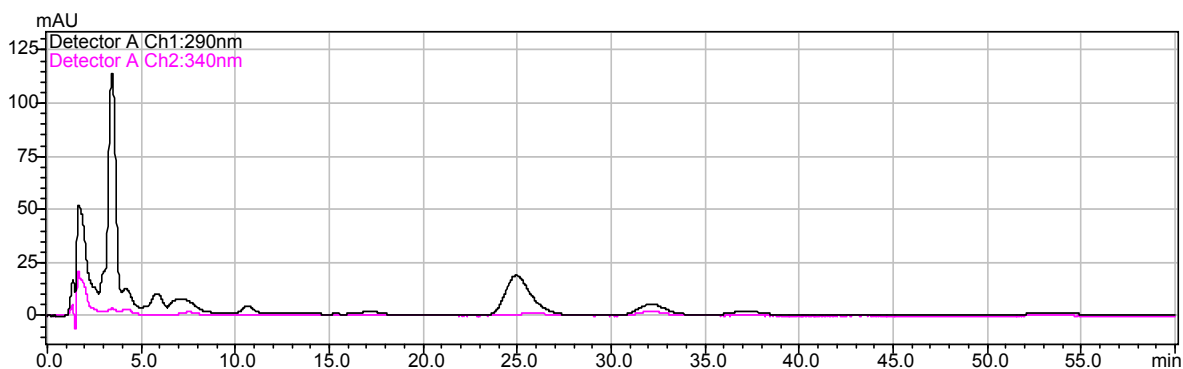


Figura 4.35 Cromatograma obtenido del extracto etanólico de propóleo proveniente de abejas del género *Scaptotrigona*; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 16).

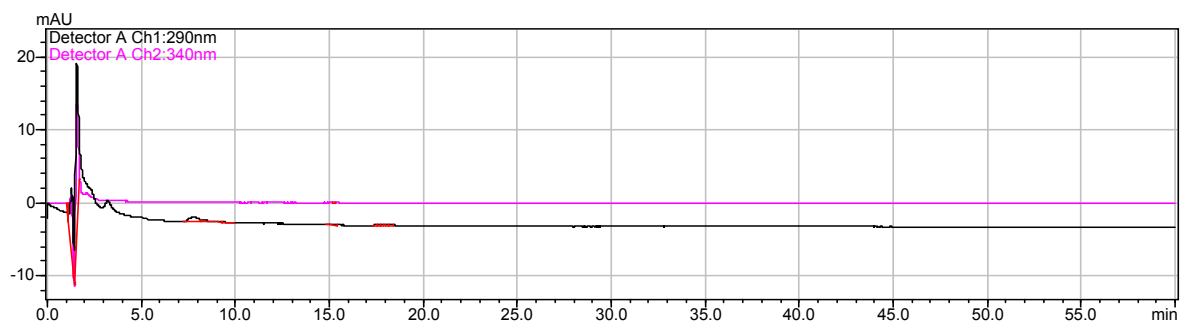


Figura 4.36 Cromatograma obtenido con el extracto etanólico de propóleo proveniente de abejas del género *Melipona*; colectado en Octubre del 2010 (Muestra 17).

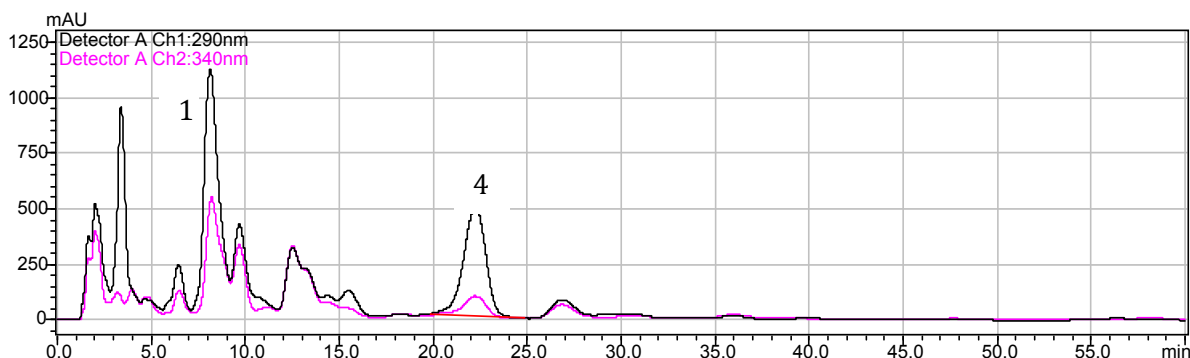


Figura 4.37 Cromatograma obtenido con una muestra comercial de propóleo Chino (Muestra 18).

De acuerdo con el Cuadro 4.29, las muestras 1-3 presentan el mismo perfil cromatográfico que la muestra utilizada como matriz de trabajo. Los resultados obtenidos permiten establecer, además, que la concentración de los flavonoides varía con respecto a la época de colecta y a la vegetación vecina al panal.

Cuadro 4.29 Identificación y cuantificación de los flavonoides en los propóleos.

Muestra	Origen de la muestra	Pinocembrina (1)	Acacetina (2)	Galangina (3)	4',7-dimetilnaringenina (4) (μg compuesto/mg extracto de propóleo)	4',7-dimetilapigenina (5) (μg compuesto/mg extracto de propóleo)
Matriz de trabajo	Milpa Alta, DF.	+	+	+	27.7550 ± 0.0172	6.8511 ± 0.0215
1	Milpa Alta, DF.	+	+	+	69.2738 ± 0.09689	13.2834 ± 0.0637
2	Milpa Alta, DF.	+	+	+	51.1478 ± 0.1273	28.8118 ± 0.0879
3	Milpa Alta, DF.	+	+	+	+ ¹	33.3112 ± 0.0005
4	Milpa Alta, DF.	+	-	-	3.9827 ± 0.2817	2.5290 ± 0.0174
5	Xochimilco, DF.	+	-	-	+ ¹	-
6	Xochimilco, DF.	+	-	-	+ ¹	-
7	Tlalpan, DF.	+	-	+	12.9180 ± 0.0060	9.8043 ± 0.1439
8	Tlalpan, DF.	+	-	-	+ ²	+ ¹
9	Puebla	+	-	-	62.4698 ± 0.3256	-
10	Chiapas	-	-	-	-	-
11	Chiapas	-	-	-	-	-
12	Zacatecas	+	-	-	2.2835 ± 0.0292	-
13	Zacatecas	+	-	-	3.6160 ± 0.0078	-
14	Tlaxcala	+	-	-	3.7534 ± 0.0040	-
15	Guanajuato	+	-	-	2.9311 ± 0.0042	-
16	<i>Scaptotrigona</i>	-	-	-	-	-
17	<i>Melipona</i>	-	-	-	-	-
18	China	+	-	-	+	-

¹ No se pudo cuantificar debido a la baja concentración del compuesto en la muestra. ² No se pudo cuantificar debido a que no se logra separar completamente el pico correspondiente al compuesto.



Por otro lado, en la muestra **4** solo se identificaron 3 flavonoides que incluyen a la pinocembrina, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina (**Figuras 4.24**) debido quizás a la diferente vegetación que rodea el panal. El análisis de las muestras **5** y **6** (ambas recolectadas del mismo apiario pero en diferente época) permite evidenciar, de forma preliminar, las diferencias en las concentraciones de los flavonoides estudiados (**Figuras 4.25 y 4.26**). En el **Cuadro 4.29**, se observa que la 4',7-dimetilnaringenina se identificó en ambas muestras sin embargo, casi no es visible la señal de este compuesto. Para las muestras **7** y **8** (**Figuras 4.27 y 4.28**) se observa que a pesar de que los apiarios pertenecen al mismo poblado no presentan el mismo perfil cromatográfico. Sin embargo, coinciden en el contenido de pinocembrina y de 4',7-dimetilnaringenina.

El análisis de los extractos de propóleo provenientes de los Estados de Puebla, Zacatecas, Tlaxcala y Guanajuato (**Figuras 4.29, 4.31-4.34**) permitió la identificación, en todas las muestras, de la pinocembrina y la 4',7-dimetilnaringenina. La 4',7-dimetilapigenina no se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

Cabe destacar que en los propóleos pertenecientes al Estado de Chiapas no se identificaron los flavonoides objeto de análisis. En la **Figura 4.30** se puede observar que su perfil cromatográfico es prácticamente diferente a las demás muestras analizadas. Este comportamiento probablemente se deba a la ubicación geográfica y por ende a la vegetación característica de un ecosistema tropical. Estos hallazgos se encuentran en armonía con los estudios realizados por Lotti y colaboradores en el 2010, quienes reportaron en su estudio con propóleos rojos (Estado de Yucatán) que los principales constituyentes de este tipo de propóleos son los isoflavonoides y los pterocarpanos.

Posteriormente, se analizaron los propóleos generados por otros tipos de abejas. La muestra **16** (**Figura 4.35**), corresponde al de las abejas del género *Scaptotrigona*, mientras que la **17** al del género *Melipona* (**Figura 4.36**). Ambos géneros junto con *Apis mellifera* pertenecen a la subfamilia Apinae pero pertenecen a diferentes tribus. Esto



es, los primeros pertenecen a la tribu Meliponini, mientras que el género *Apis* a la tribu Apini. Una característica física importante es que las abejas de los géneros *Scaptotrigona* y *Melipona* carecen de aguijón en contraste con la especie *Apis mellifera*; este tipo de abejas se encuentran en la mayoría de las regiones tropicales o subtropicales. Por otra parte, se sabe que las abejas tropicales forman el propóleo mezclando las resinas con barro y tierra, además de ceras. Esta mezcla se conoce como geopropóleo y también es utilizado para la construcción del panal. Entre las plantas utilizadas como fuentes de resina por las abejas tropicales se encuentran las flores de las especies *Calechampia sp* y *Clusia sp*. El hecho de que estos propóleos se formen por otros géneros de abejas, que pertenecen a una región tropical, explica en parte la diferente composición de los propóleos (Simone-Finstrom y Spivak, 2010).

(1)

(2)



Figura 4.38 Abejas de los géneros *Scaptotrigona* (1) y *Melipona* (2).

Finalmente, el análisis de una muestra de propóleo chino permitió identificar a la pinocembrina y a la 4',7-dimetilnaringenina. Este último compuesto no había sido descrito previamente en dicho propóleo (Kumazawa *et al.*, 2004; Volpi y Bergonzini, 2006; Medana *et al.*, 2008).



V. CONCLUSIONES



El método analítico desarrollado por cromatografía de líquidos de alta eficiencia es lineal, preciso, exacto y específico para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en el rango de concentraciones establecido. El estudio de robustez indicó que la proporción de la fase móvil, el flujo y la temperatura de la columna son factores que influyen significativamente en la resolución de las señales correspondientes a los metabolitos de interés.

El análisis de los propóleos provenientes de los apiarios de la delegación Milpa Alta (DF) permitió establecer, en todos los casos, la presencia de la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina, característica que permite identificar químicamente a los propóleos de la región del altiplano en México. Adicionalmente, estos dos principios activos fueron seleccionados como marcadores químicos para el desarrollo y la validación del método analítico con propósitos de control de calidad.

Los resultados obtenidos permiten sugerir, además, que la 4',7-dimetilnaringenina podría representar un compuesto característico de los propóleos mexicanos. Este metabolito fue identificado en todas las muestras de propóleo excepto aquellas provenientes del estado de Chiapas y de otro tipo de abejas. Por otra parte, la 4',7-dimetilapigenina podría permitir la diferenciación química entre los propóleos provenientes del DF y los de los estados de Puebla, Chiapas, Zacatecas, Tlaxcala y Guanajuato.



VI. PERSPECTIVAS



1. Aplicar el método analítico para el control de calidad del propóleo proveniente de apiarios ubicados en la zona correspondiente al altiplano.
2. Aplicar el método analítico para evaluar la calidad de los preparados farmacéuticos que contengan propóleo como ingrediente activo.
3. Evaluar los parámetros de validación del método para cuantificar la pinocembrina debido a que se ha descrito como uno de los principales activos del propóleo con actividad antimicrobiana.
4. Optimizar el método analítico para cuantificar a la galangina, la pinocembrina, la acacetina, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina bajo las mismas condiciones cromatográficas.



VII. REFERENCIAS



1. Abo-Salem, O., El-Edel, R., Harisa, G., El-Halawany, N. y Ghonaim, M. (2009). Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. **22**: 205-210.
2. Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J., Roca, M. y Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*. **1120**: 221-229.
3. Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**: 114-117.
4. Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Advance Access Publication*. **2 (1)**: 29-32.
5. Bankova, V., De Castro, S. y Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **31**: 3-15.
6. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1994). Guidance Validation of Chromatographic Methods. CMC 3.
7. Chang, R., Piló-Veloso, D., Morais, S. y Nascimento, E. (2008). Analysis of a brazilian green propolis from *Baccaris dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **18 (4)**: 549-556.
8. Chaves, N., Ríos, J., Gutiérrez, C., Escudero, J. y Olías, J. (1998). Analysis of secreted flavonoids of *Cistus ladanifer* L. by high performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **799**: 111-115.
9. Christian, G. (2009). *Química Analítica*. 6ª edición. México. McGraw-Hill. pp 604-620.
10. Crins, W. y Bohm B. (1998). Flavonoids of *Adenothamus validus*. *Phytochemistry*. **27 (8)**: 2647-2649.
11. Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A., Campo, M., Márquez, I., Rosado, A. y Rastrelli, L. (2007). Chemical characterization of cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-



- MS and NMR: the brown, red and yellow cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 7502-7509.
12. Dong-Bao, Z., Yu-Xia, Y., Wei, A., Xiu-Hua, L. y Han-Qing, W. (2005). Studies on flavonoids from herb of *Artemisia ordosica*. *Journal of Chinese material medica*. **30 (18)**: 1430-1432.
13. Dos Santos, A., De Miranda, A., Trugo, L., y De Aquino, F. (2003). Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*. **30c**: 590-593.
14. Duddeck, H., Snatzke, G. y Yemul, S. (1978). ¹³C NMR and CP of some 3,8"-biflavonoids from *Garania* species and of related flavanones. *Phytochemistry*. **17**: 1369-1373.
15. Echeverri, F., Cardona, G., Torres, F., Pelaez, C., Quiñones, W. y Rentería, E. (1991). Ermanin: an insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. *Phytochemistry*. **30 (1)**: 153-155.
16. EMA, CENAM. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. 1ª edición. México.
17. Eurachem. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1st digital edition.
18. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2008). Comisión Permanente de la Farmacopea. Tomo II. 9ª Edición. Secretaría de Salud. México, pp 2427-2435.
19. Fourie, T. y Snyckers F. (1984). A flavones with antiinflammatory activity from the roots of *Rhus undulata*. *Journal of Natural Products*. **47 (6)**: 1057-1058.
20. Fuentes, A. y Hernández, N. (1990). Acción antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleos. *Revista Cubana de Farmacia*. **24**: 34-49.
21. Garcez, F., Garcez, W., Santana, A., Alves, M., Matos, M. y Scaliante, M. (2006). Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). *Journal Brazilian Chemical Society*. **17 (7)**: 1223-1228.



22. García, M., Soberón., E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. y Alcántara, A. (2002). Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
23. Gómez-Caravaca A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.
24. Hernández, J., Goyocolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Domínguez, Z., Robles, R., Vázquez-Moreno, L., Velázquez, R., Astiazaran, H., Lugo, E. y Velázquez, C. (2007). Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*. **73**: 1469-1474.
25. Herrera, J., Rosas, A., Crescente, O., Acosta, M. y Pekerar, S. (1996). Analysis of 5-hydroxi-7-methoxyflavones by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **740**: 201-206.
26. Hroboňová, K., Lehotay, J. y Čižmárik, J. (2009). Determination of organic acids in propolis by HPLC using two columns with an On-Line SPE System. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **32**: 125-135.
27. International Conference on Harmonisation (ICH Q2A). Guideline for industry. text on validation of analytical procedures. **1995**. pp 1- 3A.
28. International Conference on Harmonisation (ICH Q2B). Guideline validation of analytical procedures: methodology. **1996**. pp 1-6.
29. Jiang, L., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G. y Wang, S. (2008). Analysis of flavonoids in propolis and Ginkgo biloba by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 11571-11577.
30. Kim, A., Zou, Y., Park, T., Shim, K., Kim, M., Kim, N., Kim, J., Bae, S., Choi, J. y Chung, H. (2004). Active components from *Artemisa iwayomogi* displaying ONOO⁻ Scavenging Activity. *Phytotherapy Research*. **18**: 1-7.
31. Kosalec, I., Bakmaz, M. y Pepeljjak, S. (2003). Analysis of propolis form the continental and adriatic regions of Croatia. *Acta Pharmaceutica*. **53**: 275-285.



32. Kraft, C., Jennett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle, U. y Eich, E. (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytotherapy Research*. **17**: 123-128.
33. Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. Barcelona. pp 106-109.
34. Kumazawa, S., Hamasaka, T. y Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*. **84**: 329-339.
35. Lago, J., Young, M., Reigada, J., Soares, M., Roesler B. y Kato, M. (2007). Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. ihotzkyanum* (Piperaceae). *Química nova*. **30 (5)**:1222-1224.
36. Lemos, G., Dos Santos, V., Vieira, P., De Araújo, J., Fechine, J., Sobral, M., Rodrigues, L., Pinto, J. y Barbosa, J. (2011). Flavonoids from *Praxelis clematidea* R. M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. *Molecules*. **16**: 4828-4835.
37. Liu, G., Ding, L., Lou, C., Yang, H., Yang, D., Liang, G. y Wang, L. (2006). Protection against DNA damage and inhibition of lipid peroxidation by flavones from *Eremosparton songoricum* (Litv) Vass. *Research on Chemical Intermediates*. **32 (2)**: 145-152.
38. Lotti, C., Campo, M., Piccinelli, A., Cuesta-Rubio, O., Márquez, I. y Rastrelli, L. (2010). Chemical constituents of red mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 2209-2213.
39. Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglicones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **24(8)**: 1171-1179.
40. Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. **26**: 89-99.
41. Martini, H., Katerere, D. y Eloff, J. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **93**: 207-212.



42. Matsuda, H., Kogami, Y., Nakamura, S., Sugiyama, T. y Ueno, T. (2011). Structural requirements of flavonoids for the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **19**: 2835-2841.
43. Medana, C., Carbone, F., Aigotti, R., Appendino, G. y Baiocchi C. (2008). Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis*. **19**: 32-39.
44. Midorikawa, K., Banskota, A., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. y Kadota, S. (2001). Liquid Chromatography – Mass Spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*. **12**: 366-373.
45. Mirghazanfari, S., Mansoor, K., Fatemeh, N., Nepton, S. y Kamalinejad, M. (2010). The effect of *Teucrium polium* L. extracts on insulin release from *in situ* isolated perfused rat pancreas in a newly modified isolation method the role of Ca^{2+} and K^+ channels. *Iranian Biomedical Journal*. **14 (4)**: 178-185.
46. Moon, J. y Shibamoto, T. (2009). Antioxidants assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 1655-1666.
47. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. y Tawata, S. (1998). Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells. *Phytochemistry*. **27 (4)**. 1017-1020.
48. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de Medicamentos.
49. Organización Mundial de la Salud (2002). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. pp 3, 27-32.
50. Orozco, A. (2010). Antibacterial comparative study between extracts of mexican propolis and of three plants which use *Apis Mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **9 (8)**: 1250-1254.
51. Pisutthanan, N., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S. y Bremner, J. (2006). A new flavonoid from *Chromolaena odorata*. *Natural Product Research*. **20 (13)**: 1192-1198.
52. Rossi, M., Yoshida, M. y Soares, J. (1997). Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry*. **45 (6)**: 1263-1269.



53. Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Abbud, A., y Salatino, M. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Research*. **28**: 925-936.
54. Saltan, G., Sever, B., Antus, S., Baitz-Gács, E. y Altanlar, N. (2004). Antifungal diterpenoids and flavonoids from *Ballota inaequidens*. *Pharmaceutical Biology*. **42 (8)**: 659-663.
55. Santos, F., Bastos, E., Uzeda, M., Carvalho, M., Farias, L., Moreira, E. y Braga, F. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. **80**: 1-7.
56. Sawasdee, P., Sabphon, C., Sitthiwongwanit, D. y Kokpol, U. (2009). Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytotherapy Research*. **23**: 1792-1794.
57. Schmidt, T. y Willuhn, G. (2000). Sesquiterpene lactone and flavonoid variability of the *Arnica angustifolia* aggregate (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **28**: 133-142.
58. Sforcin, J. y Bankova V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. **133**: 253-260.
59. Shun-Hua, W., Hong-Jie, Z., Zhong-Wen, L. y Han-Dong, S. (1993). Terpenoids from *Isodon grandifolia* var. *atuntzensis*. *Phytochemistry*. **34 (4)**: 1176-1178.
60. Silva, B., Rosalen, P., Cury, J., Ikegaki, M., Souza, V., Esteves, A. y Alencar, S. (2007). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Advance Access Publication*. **59**: 1-4.
61. Simone-Finstrom, M. y Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* **41**: 295-311.
62. Skoog, D., James, F., y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. 5ª Edición. Mc Graw Hill. España. pp 730-735, 785-824.
63. Soleo, C., De Oliveira, V. y Mathor, M. (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. **111**: 206-212.

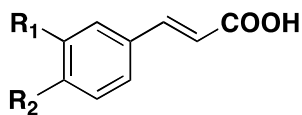


64. Su-Hsiang, F., Ming-Hua, Y., Hwei-Mei, W. y Jiing-Chuan, C. (2005). Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*. **13 (1)**: 43-50.
65. Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C. y Jay, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1143**: 227-233.
66. Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S. y Kummee, S. (2008). Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. **116**: 191-193.
67. Trusheva, B., Trunkova, D. y Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*. **I (13)**: 1-4.
68. Valant-Vetschera, K., Fischer, R. y Wollenweber, E. (2003). Exudate flavonoids in species of *Artemisa* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochemical systematic and Ecology*. **31**: 487-489.
69. Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Domínguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, E., Lugo, F., Goycolea, E., Velázquez, H. y Hernández, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 1747-1756.
70. Vera, N., Solorzano, E., Ordonez, R., Maldonado, L., Bedascarrasbure, E., e Isla, M. (2011). Chemical composition of argentinean propolis collected in extreme regions and its relation with antimicrobial and antioxidant activities. *Natural Product Communications*. **6 (6)**: 823-827.
71. Volpi, N. y Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **42**: 354-361.
72. Waksmundzka, M. y Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in phytochemical analysis. *Chromatography Science Series*. Vol. 102. USA. pp 185-191, 535-539.

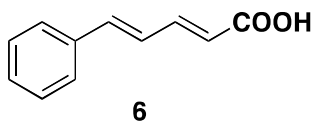


73. Walker, P. y Crane, E. (1987). Constituents of Propolis. *Apidologie*. **18 (4)**: 327-334.
74. Weimann, C., Göransson, U., Pongprayoon-Claeson, U., Claeson, P., Bohlin, L., Rimpler, H. y Heinrich, M. (2002). Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **54**: 99-104.
75. Weinstein, E., Message, D., Negri, G., Salatino, A. y Stringheta, P. (2008). seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of brazilian propolis samples. *Advance Access Publication*. **7 (3)**: 307-315.
76. Wen-Chiung, S., Jim-Min, F. y Yu-Shia, C. (1995). Flavonoids and lignans from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*. **40 (2)**: 563-566.
77. Xiang-Hai, C., Xiao-Dong, L., Jun, Z. y Xiao-Jiang, H. (2005). Dolabellane diterpenoids from the higher plant *Aglaia odorata*. *Helvetica Chimica Acta*. **88**: 2938-2944.
78. Yinrong, L. y Yeap, F. (2002). Polyphenolics of *Salvia*- a review. *Phytochemistry*. **59**: 117-140.
79. Yu-Yen, K., Shy-Yuan, H., Ming-Der, W., Chia-Ching, L., Yu-Han, L., Yao-Haur, K. y Hsiu-O, H. (2008). Cytotoxic constituents from *Podocarpus fasciculus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **56 (4)**: 585-588.
80. Zhang, T. y Chen, D. (2008). Anticomplementary principles of a chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. *Journal of Ethnopharmacology*. **117**: 351-361.
81. Zhou, J., Li, Y., Zhao, J., Xue, X., Wu, L. y Chen F. (2008). Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. *Food Chemistry*. **108**: 749-759.

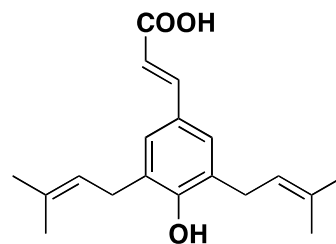
ANEXO I
Compuestos identificados a partir de propóleos de diferentes países



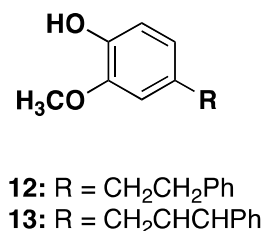
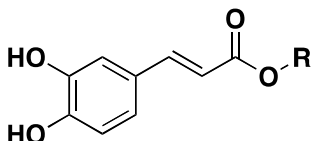
- 1: $R_1, R_2 = OH$
 2: $R_1 = H; R_2 = OH$
 3: $R_1, R_2 = OCH_3$
 4: $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$
 5: $R_1, R_2 = H$



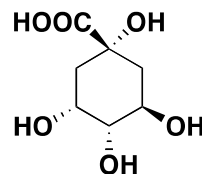
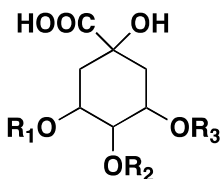
6



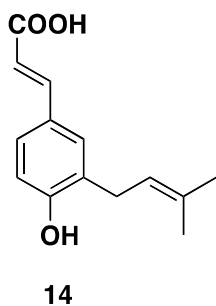
11



- 7: $R = CH_2CH_2Ph$
 8: $R = CH_2CHCHPh$
 9: $R = CH_2Ph$
 10: $R = CH_2CHCH(CH_3)_2$

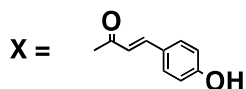


21

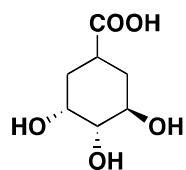


14

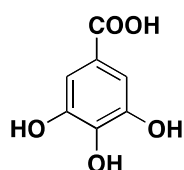
	R_1	R_2	R_3
15:	H	H	X
16:	X	H	H
17:	H	X	H
18:	X	X	H
19:	X	H	X
20:	H	X	X



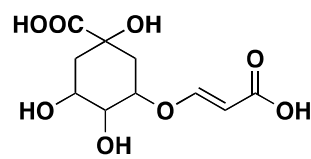
1: ácido caféico, 2: ácido *p*-cumárico, 3: 3,4-dimetoxicinámico, 4: ácido ferúlico, 5: ácido cinámico, 6: ácido cinamoildeneacético, 7: éster fenil etílico del ácido cafeico (CAPE), 8: cafeato de cinamoilo, 9: bencilcafeato, 10: prenilcafeato, 11: artemipilina C, 12: aldehído coniferílico, 13: vainillina, 14: ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico, 15: ácido clorogénico, 16: ácido 3-cafeoilquínico, 17: ácido 4-cafeoilquínico, 18: ácido 3,4-dicafeoilquínico, 19: ácido 3,5-dicafeoilquínico, 20: ácido 4,5-dicafeoilquínico, 21: ácido quínico.



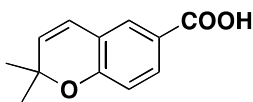
22



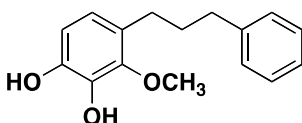
23



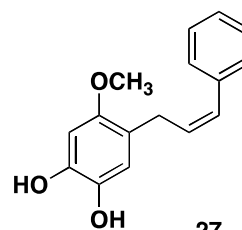
24



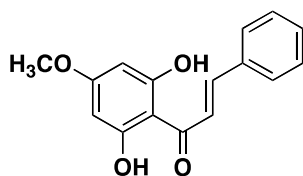
25



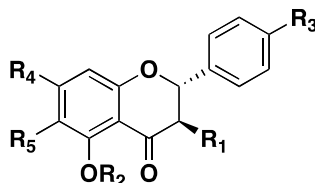
26



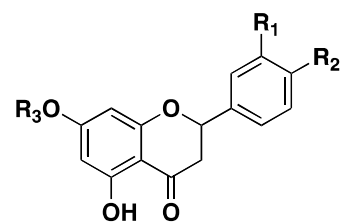
27



28

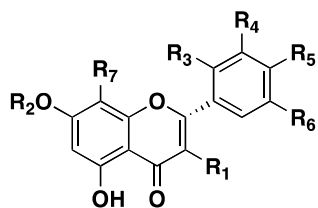


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
29:	OH	CH ₃	H	OH	H
30:	OH	H	H	OH	H
31:	OCOCH ₃	H	H	OH	H
32:	H	H	OCH ₃	OH	H
33:	OH	H	OCH ₃	OH	H
34:	OH	CH ₃	H	H	OCH ₃

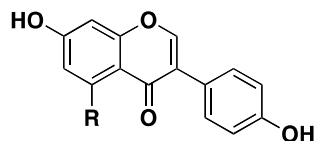


	R ₁	R ₂	R ₃
35:	H	H	H
36:	H	OH	ramnoglicosa
37:	H	OH	H
38:	OH	OCH ₃	H
39:	H	H	CH ₃
40:	H	OH	CH ₃

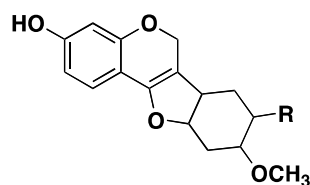
22: ácido siquímico, **23:** ácido gálico, **24:** ácido feruoilquínico, **25:** ácido 2,2-dimetilcromeno-6-carboxílico, **26:** 1-(3',4'-dihidroxi-2'-metoxifenil)-3-fenilpropano, **27:** (Z)-1-(2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil)-2-(3-fenil)-propano, **28:** pinostrobin chalcona, **29:** 5-metilpinobanksina, **30:** pinobanksina, **31:** 3-acetato de pinobanksina, **32:** isosakuranetina, **33:** 3,5,7-trihidroxi-4-metoxiflavonol, **34:** 3-hidroxi-5,6-dimetoxiflavano, **35:** pinocembrina, **36:** naringina, **37:** naringenina, **38:** hesperetina, **39:** pinostrobin, **40:** sakuranetina.



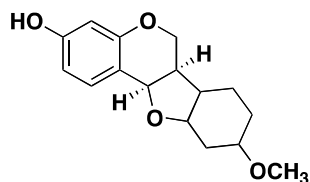
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
41:	OH	H	H	OH	OH	H	H
42:	H	H	H	H	OH	H	H
43:	OH	H	H	H	OH	H	H
44:	H	H	H	H	H	H	H
45:	OH	H	H	H	H	H	H
46:	H	CH ₃	H	H	H	H	H
47:	OH	H	H	H	H	H	H
48:	OH	H	H	OH	OH	OH	H
49:	rutinosa	H	H	OH	OH	H	H
50:	H	H	H	H	OCH ₃	H	H
51:	H	H	H	OH	OH	H	H
52:	OH	OH	H	H	OCH ₃	H	H
53:	H	CH ₃	H	H	H	OH	CH ₃
54:	OH	H	H	H	OCH ₃	H	H
55:	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	H
56:	H	CH ₃	H	H	OCH ₃	H	H
57:	H	CH ₃	H	H	OH	H	H
58:	H	CH ₃	H	OH	OCH ₃	H	H



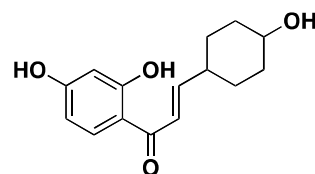
R
59: H
60: OH



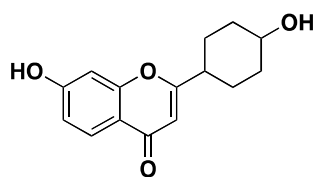
R
61: OCH₃
62: OH



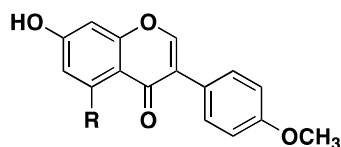
63



64

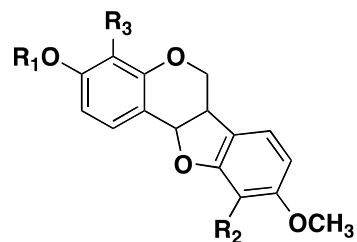
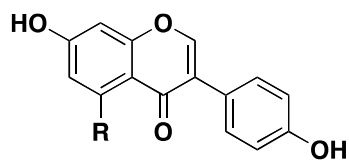


65



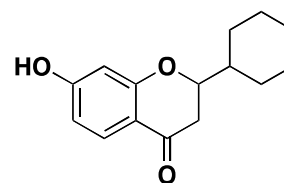
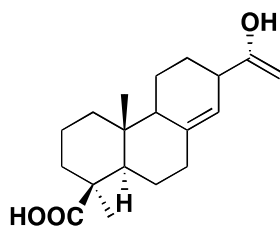
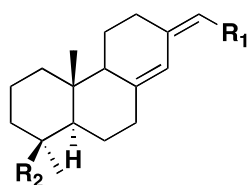
R
66: H
67: OH

41: quercetina, 42: apigenina, 43: caempferol, 44: crisina, 45: galangina, 46: tectocrisina, 47: galangina, 48: miricetina, 49: rutina, 50: acetina, 51: luteolina, 52: caempferida, 53: xantomicol, 54: betuletol, 55: ermanina, 56: 4',7-dimetilapigenina, 57: genkwanina, 58: 3',5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona, 59: daidzeína, 60: genisteína, 61: 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, 62: 3,8-dihidroxi-9-pterocarpano, 63: medicarpina, 64: isoliquiritigenina, 65: liquiritigenina, 66: formononetina, 67: biochanina A.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
68:	OH	OCH ₃	OH	H	H
69:	OCH ₃	OH	OH	H	H
70:	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H
71:	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃
72:	OH	OCH ₃	H	OH	OH

	R ₁	R ₂	R ₃
73:	CH ₃	H	H
74:	H	OH	H
75:	CH ₃	H	OH
76:	CH ₃	OH	OH



	R ₁	R ₂
77:	CH ₂ OAc	COOH
78:	COOH	COOH
79:	COOH	CHO

80

81

68: vestitol, **69:** neovestitol, **70:** 7-*o*-metilvestitol, **71:** mucronulato, **72:** Arizonicanol, **73:** homopterocarpana, **74:** vesticarpano, **75:** melilotocarpano A, **76:** melilotocarpano A, **77:** ácido 15-acetoxisocuprésico, **78:** ácido agático, **79:** ácido agatálico, **80:** ácido cuprésico, **81:** 7-hidroxiflavanona.

Origen del propóleo	Método de extracción	Técnica de Análisis	Compuestos identificados	Referencia	
Argentina	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004.	
	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	42, 43, 44, 35, 47, 37, 60 y 50.	Volpi y Bergonzini, 2006.	
	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	42, 44, 35, 45, 7, 46, 50, 9, 10, 40 y 52.	Medana <i>et al.</i> , 2008.	
Australia	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004.	
Azerbaijan	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	42, 35, 47 y 37.	Volpi y Bergonzini, 2006.	
Brasil	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004	
	Agitación a 200 rpm, 80% EtOH	Electroforesis capilar	42, 44, 47, 43, 41, 49, 36, 37, 38, 59, 60.	Su-hsiahg Fu <i>et al.</i> , 2005.	
	Agitación EtOH 80%, 70°C	HPLC-PDA	41, 44 y 4.	Silva <i>et al.</i> , 2007.	
		CG-MS	61 y 63.		
	Maceración EtOH	HPLC-PDA	1, 2, 43, 11, 15, 4, 52, 32 y 5.	Soleo <i>et al.</i> , 2007.	
	Ultrasonido EtOH 70%	HPLC	1, 2, 15, 4, 16, 17, 18, 19, 20 y 24.	Dos Santos <i>et al.</i> , 2003.	
	Maceración H ₂ O 80 °C	HPLC-MS	1, 2, 15, 4, 18, 19, 12 y 13.	Midorikawa <i>et al.</i> , 2001.	
Reflujo MeOH 3h		1, 2, 43, 11, 15, 4, 52, 18, 19, 12, 13, 33, 25, 14, 54, 55, 77, 78, 79 y 80.			
Bulgaria	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004.	
Chile	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004.	
China	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004	
	Extracto EtOH comercial	MEKC-PDA	42, 43, 44, 49, 50 y 51.	Jiang <i>et al.</i> , 2008.	
	Agitación a 200 rpm, 80% EtOH	Electroforesis capilar	42, 47, 43, 48, 49, 38, 59 y 60.	Su-hsiahg Fu <i>et al.</i> , 2005.	
	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	35, 47, 37 y 50.	Volpi y Bergonzini, 2006.	
	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	41, 42, 44, 35, 45, 7, 46, 50, 9, 10, 40 y 52.	Medana <i>et al.</i> , 2008.	
	Maceración H ₂ O 80°C Reflujo MeOH 3h	HPLC-MS	1, 2, 4, 13 y 23. 5.	Midorikawa <i>et al.</i> , 2001.	
Croacia	Maceración EtOH 80%	HPLC-UV	1, 44, 35, 47 y 37.	Kosalec <i>et al.</i> , 2003.	
		TLC	1, 42, 43, 47 y 37.		
Cuba	Maceración MeOH	HPLC- ESI-MS	61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74 y 62.	Cuesta <i>et al.</i> , 2007.	
Eslovaquia	Agitación Agua	HPLC-DAD/Fluorescencia	15, 21 y 22.	Horbonorá <i>et al.</i> , 2009.	
España	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	42, 43, 44, 35, 47, 37, 60 y 50.	Volpi y Bergonzini, 2006.	
Etiopía	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	42, 44, 35, 47, 37 y 50.	Volpi y Bergonzini, 2006.	
Hungría	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa, <i>et al.</i> , 2004.	
Holanda	Maceración H ₂ O 80 °C	HPLC-MS	1, 2, 44, 15, 4, 5, 12 y 13.	Midorikawa <i>et al.</i> , 2001.	
	Reflujo MeOH 3h		1, 2, 41, 43, 44, 15, 4, 52, 5, 12, 13 y 54.		
Italia	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	42, 43, 44, 35, 47, 37, 60 y 50.	Volpi y Bergonzini, 2006.	
	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	41, 42, 44, 35, 45, 7, 46, 50, 9, 10, 39, 40 y 52.	Medana <i>et al.</i> , 2008.	
Macedonia	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	41, 42, 44, 35, 45, 7, 46, 50, 9, 10, 39, 40 y 52.	Medana <i>et al.</i> , 2008.	
México	Sonora	Maceración MeOH	HPLC-DAD/MS	30, 44, 35, 31, 7, 47, 49, 37, 38, 50 y 53.	Hernández <i>et al.</i> , 2007.
	Yucatán	Maceración MeOH	LC-NMR C ¹³ /IR	41, 68, 34, 71, 72, 75, 76, 81, 26 y 27.	Lotti <i>et al.</i> , 2010.

Nueva Zelanda	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
Sudáfrica	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 29, 43, 30, 44, 35, 45, 31 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
Tailandia	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	-----	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
Taiwán	Agitación a 200 rpm, 80% EtOH	Electroforesis capilar	43, 41 y 36.	Su-hsiang Fu <i>et al.</i> , 2005.
Ucrania	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 29, 42, 43, 30, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
	Maceración EtOH	HPLC-ESI-MS	41, 42, 44, 35, 45, 7, 46, 50, 9, 10, 39, 40 y 52.	Medana <i>et al.</i> , 2008.
Uruguay	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
Estados Unidos	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
Uzbekistán	Maceración EtOH	HPLC-PDA/MS	1, 2, 3, 41, 29, 42, 43, 30, 6, 44, 35, 45, 31, 7, 8 y 46.	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004