



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO
DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES
PRESENTES EN PROPÓLEOS MEXICANOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA:
VERÓNICA HERNÁNDEZ PÉREZ

ASESOR:
DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ
COASESORES:
DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
M. EN C. ENRIQUE RAMOS LÓPEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Implementación del método de cromatografía líquida de alta resolución para la identificación y cuantificación de flavonoides presentes en propóleos mexicanos

Que presenta la pasante: Verónica Hernández Pérez
 Con número de cuenta: 408061214 para obtener el Título de: Ingeniera Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de marzo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo	
SECRETARIO	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
1er SUPLENTE	Q. Aurora Karina Franco Francisco	
2do SUPLENTE	QFB. Martha Angélica Villegas González	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM 223811-3 Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal.

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

El trabajo se realizó en los siguientes laboratorios:

Laboratorio número 6, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

Laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 1, UNAM. Bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

Laboratorios de Farmacognosia y Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Bajo la responsabilidad de la Dra. María Margarita Canales Martínez y Dr. César Mateo Flores Ortiz.

AGRADECIMIENTOS

DIOS

Gracias por demostrarme tu existencia a lo largo de mi vida y permitirme cumplir con esta meta ya que sin ti esto no hubiera sido posible, nunca me dejes sola señor. Te amo.

Dr. Tonatiuh Cruz

Por invitarme a participar en este proyecto tan interesante, por su confianza, paciencia, apoyo, por brindarme los conocimientos para crecer profesionalmente, muchas gracias.

Dra. Margarita Canales

Nunca podré agradecerle todo su apoyo porque usted es pieza clave en este trabajo, por su confianza, por su ejemplo a seguir como ser humano, por eso y más... gracias.

M. en C. Enrique Ramos

Gracias por su apoyo, comprensión, conocimientos y por alentarme a seguir. Gracias por ser pieza clave en este trabajo.

Dra. Amparo Londoño

Por su apoyo, paciencia y conocimientos aportados, gracias.

Profesora Elia Granados

Por su apoyo y conocimientos aportados a este trabajo.

UNAM

Por darme la oportunidad y la dicha de pertenecer a la más grande casa de estudios superiores, por brindarme todos los recursos para formarme como una profesionista y así servir a la humanidad, por eso y más gracias.

FESC

Gracias por ser mi casa durante cinco años y por vivir en ella muchos de los momentos más lindos de mi vida.

A los miembros del jurado: Dra. María Guadalupe Pérez Caballero, Dr. Guillermo Penieres, Q. Aurora Karina Francisco, QFB. Martha Angélica Villegas González.

Por todas las sugerencias y correcciones en la realización de este trabajo, por su enseñanza y paciencia.

Mamá

Gracias por comprenderme y apoyarme sin pedir nada a cambio me has visto sufrir y has querido aliviar mis penas, me has oído llorar y has hecho esfuerzos por hacerme sonreír, tal vez no te lo haya dicho pero valoro todo lo que me has dado. Te amo.

Papá

Gracias a tu paciencia hoy logro culminar una de mis más grandes metas nunca podré pagar tu amor ni aún con las riquezas más grandes del mundo, por esto y más gracias.

Abuelita

Gracias por enseñarme a ver la vida de una forma siempre optimista, por darme un amor incondicional por comprenderme y apoyarme en cada momento.

Abuelito

Gracias por ser un ejemplo a seguir por hacer que valore lo hermoso que es estudiar, por tu amor y por ser como un padre para mí.

Diana

Porque fuiste un ejemplo a seguir en esta etapa en la que culmino mis estudios, por tu amor, tu apoyo, muchas gracias.

Samuel

Por amarme, comprenderme, por distraerme y hacerme sonreír en esos momentos de estrés e impulsarme cuando lo creía todo perdido, nunca tendré con que agradecerte.

Marisol

Gracias por existir eres pieza clave en mi vida, tú me impulsaste y jamás me detuve hasta cumplir este sueño, gracias por hacer que creyera en mí y por recordarme a cada momento que si se puede, te quiero mucho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Antecedentes del propóleo.....	1
I.2. Composición del propóleo.....	2
I.3. Flavonoides.....	4
I. 3.1. Estructura química.....	4
- Quercetina.....	8
- Crisina.....	10
- Pinocembrina.....	10
- Naringenina.....	11
I.4. Técnicas de separación y análisis químico.....	12
I.5. Cromatografía.....	12
I.5.1 Antecedentes históricos.....	12
I.6. Métodos para la caracterización química.....	14
I.7. Cromatografía líquida.....	14
I.7.1. Cromatografía de líquidos en fase normal.....	14
I.7.2. Cromatografía de líquidos en fase inversa.....	15
I.7.3. Cromatografía de líquidos de intercambio iónico.....	15
I.7.4. Cromatografía de líquidos por filtración en gel.....	16
I.7.5. Cromatografía líquida de alta resolución.....	18
I.7.5.1. Columnas de HPLC.....	19
I.7.5.2. Fases estacionarias.....	20
I.7.5.3. Fases móviles.....	20
I.7.5.4. Parámetros cromatográficos.....	21
II. JUSTIFICACIÓN.....	23

III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
IV.1. Objetivo general.....	25
IV.2. Objetivos particulares.....	25
Diagrama del diseño experimental.....	27
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
V.1.Propóleos.....	28
V.1.1.Procedencia de los propóleos.....	28
V.2. Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP).....	31
V.3. Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPL).....	32
V.4. Contenido de fenoles totales (CFT).....	34
V.5. Contenido de flavonoides totales.....	34
V.6. Evaluación de la actividad antioxidante.....	35
VI. RESULTADOS.....	36
VI.1. Obtención de los extractos etanólicos de propóleo.....	36
VI.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	37
VI.3. Contenido de fenoles totales (CFT).....	49
VI.4.Contenido de flavonoides totales.....	51
VI.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	53
VII. DISCUSIÓN.....	60
VIII. TRABAJOS A FUTURO.....	63

IX.	CONCLUSIONES.....	64
X.	PERSPECTIVAS.....	65
XI.	APÉNDICES.....	66
	Apéndice 1: CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT).....	66
	Apéndice 2: CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.....	68
	Apéndice 3: MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1- PICRILHIDRACILO (DPPH).....	70
XII.	LISTA DE REFERENCIAS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Atenuación	ATT
Concentración antioxidante a la cual el DPPH se reduce al %50	CA₅₀
Cromatografía líquida	CL
Cromatografía líquida de alta resolución <i>(high performance liquid chromatography)</i>	HPLC
2,2-Difenil-1-picrilhidracilo	DPPH
Extracto etanólico de propóleo	EEP
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán	FESC
Grados Celsius	°C
Gramo	g
Metanol	MeOH
Microlitro	µL
Miligramo	mg
Mililitro	mL
Minuto	min
Nanómetro	nm
Revoluciones por minuto	rpm
Tiempo de retención	t_r
Velocidad de carta	C. S
Unidad de Investigación Multidisciplinaria	UIM
Universidad Nacional Autónoma de México	UNAM

RESUMEN

El propóleo es una mezcla compleja de resinas, aceites esenciales, polen y microelementos, de consistencia viscosa. Sus propiedades medicinales son conocidas desde épocas antiguas y se le ha empleado en tratamientos de enfermedades hasta el día de hoy, ya que posee actividades como: antiinflamatorio, inmunoestimulantes, hepatoprotector, carcinoestático, antibacteriano, antiviral, antifúngico, antiprotozoario, anestésico, antiparasitario, anticancerígeno, antioxidante y de regeneración tisular, principalmente.

El objetivo de este trabajo fue implementar el método de cromatografía líquida de alta resolución en el laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), para identificar y cuantificar cuatro flavonoides: quercetina, naringenina, pinocembrina y crisina; puesto que a los flavonoides se les atribuyen las principales propiedades antifúngicas del propóleo por lo que se buscó estuvieran presentes en tres extractos etanólicos de propóleo de diferentes regiones de México: Estado de Aguascalientes, Estado de Colima y de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente al Estado de México, ya que estos propóleos fueron los proporcionados por el laboratorio, cumpliendo con la característica de ser mexicanos. También por medio de otros métodos se determinó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante en estos EEP.

Se obtuvo como resultado la existencia del flavonoide pinocembrina en los tres extractos etanólicos de propóleo (EEP) que se trabajaron, EEP de Aguascalientes contiene 75.66 g de pinocembrina/100 g propóleo; EEP de FESC contiene 45.39 g de pinocembrina/100 g propóleo y EEP de Colima 9.83 g de pinocembrina/100 g de propóleo y el flavonoide naringenina estuvo presente en dos EEP, Aguascalientes y FESC; obteniendo que el EEP de Aguascalientes contiene 5.43 g de naringenina/100 g propóleo y EEP de FESC contiene 10.27 g naringenina/100 g propóleo.

También se evaluó para cada uno de los extractos etanólicos de propóleo la actividad antioxidante y el contenido de fenoles y flavonoides totales, encontrando que presentaron una actividad antioxidante muy variada; ya que sus valores de CA_{50} (EEP de Colima CA_{50} es de 122.2 $\mu\text{g/mL}$, EEP de Aguascalientes CA_{50} es de 78.1 $\mu\text{g/mL}$ y EEP de FESC CA_{50} es de 67.3 $\mu\text{g/mL}$); se alejan al valor de la quercetina (control positivo) que mostró una CA_{50} de 2.4 $\mu\text{g/mL}$, por lo que la mejor actividad antioxidante la presentó el EEP de FESC.

La mayor cantidad de fenoles totales (136 mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP) y de flavonoides (112.248 mg equivalentes de quercetina/g de EEP), se encontraron en el EEP de Aguascalientes.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes del propóleo.

La palabra propóleos proviene, del griego pro: ante, y pólis: ciudad, y se refiere al uso que las abejas le dan para cerrar parcialmente las vías de acceso a su comunidad o ciudad (Root, 1990, p. 596).

Es elaborado principalmente por la especie *Apis mellifera* (Ortega, 2010, p. 2). Es una sustancia viscosa y pegajosa, de color variable del amarillo claro al negro pasando por el verde pardo, fabricada por las abejas a partir de resinas naturales. Es utilizada por las obreras para colmatar las fisuras y orificios de su colmena o como sustancia antiséptica para envolver un cuerpo extraño putrescible que no son capaces de evacuar de la colmena. Éste también es empleado por las abejas para endurecer los alveolos y en general todo el interior de la colmena, lo que da a ésta una protección bactericida y antiséptica (Jean, 1990, p. 245).

Las abejas obtienen este material a partir de las gotas de resina que se forman por exudación en la corteza de las ramas y troncos. La abeja desciende cerca de una de esas gotas y separa un trocito de ella con sus mandíbulas. Por la consistencia propia del producto, se forma un hilo que finalmente queda separado de la gota original. La abeja toma estos hilos con las garras del segundo par de patas y los deposita dentro de los cestillos de polen de las patas traseras. Luego, la abeja moldea la resina con las caras internas de los metatarsos del segundo par de patas hasta darle la forma de una pelotita de polen (Root, 1990, p. 596 y 597).

La secreción del ácido 10-hidroxidecenoico por las glándulas mandibulares permite el ablandamiento y trituración del propóleo para facilitar su transporte en los cestillos de polen de las patas traseras (Gutiérrez, 2011, p. 1).

Al propóleo se le considera una de las medicinas más antiguas, la cual es conocida y usada en tratamientos hasta el día de hoy, ya que se le confieren diferentes propiedades como son: antibacteriana, antiparasitaria, anticancerígena, antitumoral, hepatoprotector e incluso citostático (Gutiérrez, 2011, p. 2), antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antifúngica, anestésica y de regeneración tisular (Martínez, 2008, p. 48).

Aristóteles ya hablaba del propóleo y le consideró como remedio para infección de piel, llagas y supuraciones. Galeno, en el siglo II, menciona el propóleo en sus trabajos, así como el filósofo persa Avicena, en el siglo XI, dice del mismo “Tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas, vivifica, limpia fácilmente y ablanda fuertemente. Los Incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y los franceses en los siglos XVII y XIX para el tratamiento de llagas. Se empleó en África del Sur en la guerra de los Bornes en el año 1900 para tratar heridas y como cicatrizante (Ramírez, 2011, p. 10).

I.2. Composición del propóleo.

Su composición es muy compleja ya que depende de su origen botánico, de las condiciones geográficas, climáticas donde se encuentren las plantas que producen las resinas. Se considera un producto de origen mixto, vegetal y animal (Lozina, 2010, p. 102).

En lo referente a los componentes químicos, algunos propóleos son tan complejos que pueden contener más de 160 compuestos activos, de los cuales 50% son fenólicos y a éstos se les atribuyen diversas acciones farmacológicas (Rojas, 2008, p. 60).

El mayor contenido corresponde a resinas y bálsamo que contiene flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%), contenidos muy variables de ceras (7.5-35%) que afectarán a los correspondientes componentes restantes; aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). Además contiene pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de las secreciones de las glándulas salivares de las abejas y posibles contaminantes. Los compuestos activos son los flavonoles, flavononas y flavonoles (Martínez, 2008, p. 45).

Tabla 1. Principales componentes químicos del propóleo (Rojas, 2008, p. 61).

Componentes	Ejemplos
<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos orgánicos 	Ácido benzoico (C ₆ H ₅ -COOH) y el gálico (C ₇ H ₆ O ₅).
<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos-fenólicos 	Ácidos cafeico (C ₉ H ₈ O ₄), cinámico (C ₁₁ H ₁₃ NO ₂ S ₂), fenílico, insofenílico y cumarínico.
<ul style="list-style-type: none"> • Aldehídos aromáticos: 	Vainillina (C ₈ H ₈ O ₃), isovainillina (C ₈ H ₈ O ₃).
<ul style="list-style-type: none"> • Cumarinas: 	Esculetol (C ₉ H ₆ O ₄), escopuletol.
<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides: 	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoles: kaempférido (C₁₆H₁₂O₆), quercetina (C₁₅H₁₀O₇), ramnocitrina. • Flavonas: acacetina (C₁₆H₁₂O₅), crisina amarilla, pectolinarigenina (C₁₇H₁₄O₆), tectocrisina (C₁₆H₁₂O₄). • Flavanonas: naringenina, naringina, hesperetina, hesperidina, taxifolina, pinocembrina (C₁₅H₁₂O₄). • Flavanoles: (+)-catequina, epicatequina, galocatequina.
<ul style="list-style-type: none"> • Minerales: 	Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc.
<ul style="list-style-type: none"> • Vitaminas: 	Provitamina A y vitamina B3

Algunas de las propiedades antibacteriana, antiparasitaria etc., que posee el propóleo han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos y especialmente flavonoides.

I.3. Flavonoides.

Los flavonoides son un gran grupo de compuestos polifenólicos que se encuentra comúnmente en plantas (Rice, 2003, p. 43-61 y 352.). Generalmente en forma de glicósidos y son los pigmentos amarillos, naranjas, azules y rojos de las flores (Martino, 2000, p. 303).

I.3.1 Estructura química.

Este grupo contiene más de 8000 compuestos conocidos, y este número está constantemente creciendo debido a la gran diversidad estructural (Rice, 2003, 43-61 y 352.), ya que son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (fig. 1). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Martínez, 2002, p. 272).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. **Flavanoles**, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. **Flavonoles**, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. **Flavonas**, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. **Antocianidinas**, que tienen unido el grupo -OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Martínez, 2002, p. 272).

Tres características estructurales son importantes para su función: a) la presencia en el anillo B de la estructura catecol; b) la presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) la presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la

primera (fig. 2). A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Martínez, 2002, p. 272).

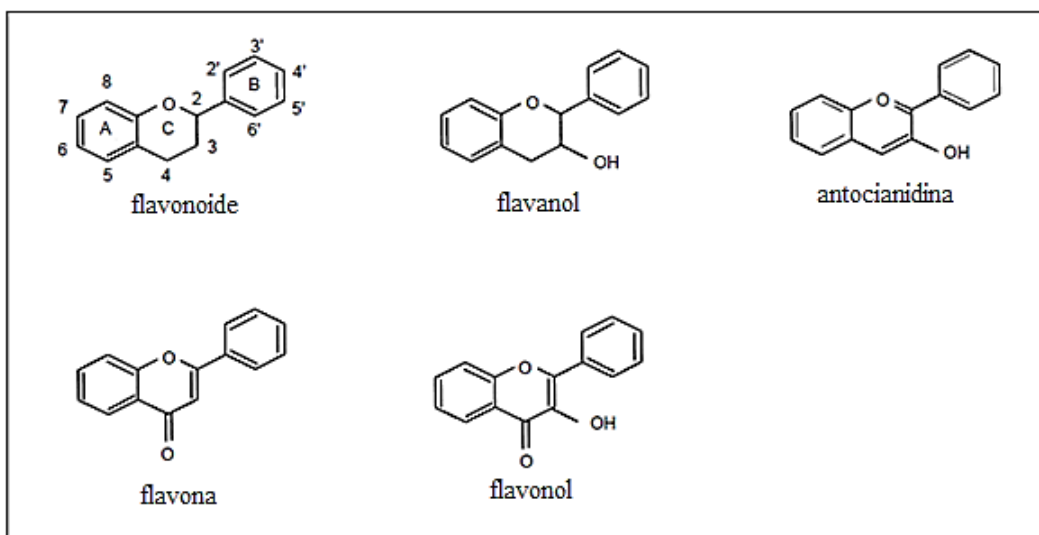


Figura. 1. Flavonoides. Estructura básica y tipos (Martínez, 2002, p. 272).

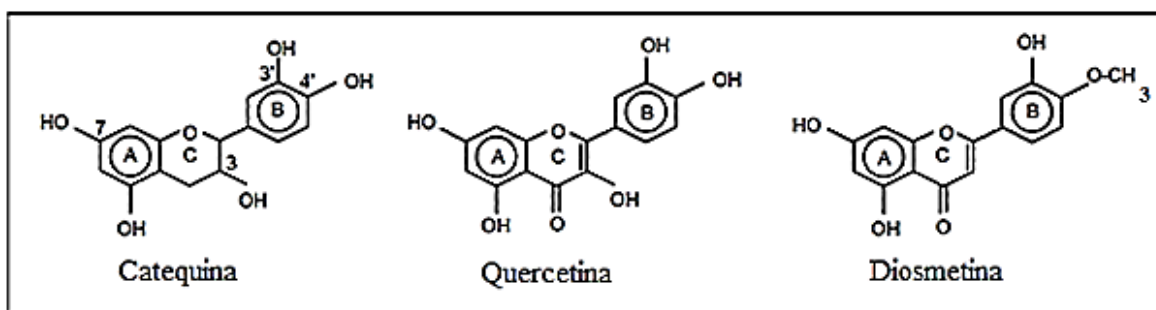


Figura. 2. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides (Martínez, 2002, p. 273).

Las propiedades ácido-base muestran que los flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7 (Martínez, 2002, p. 273).

Actúan como atractores visuales para favorecer la polinización, como un mecanismo de defensa frente al ataque de insectos y microorganismos y como protectores de la radiación UV por sus propiedades antioxidantes. El centro de atención sobre los flavonoides ha

estado dirigido últimamente a su actividad antioxidante, dada su reconocida capacidad de atrapar radicales libres, quelar metales y por poseer un bajo potencial redox. Estos compuestos protegen contra las oxidaciones, ejerciendo un efecto atrapador de los radicales libres que se generan en procesos tales como la inflamación, la hipoxia o por efecto de las radiaciones. El radical superóxido O_2^- y el radical HO son el origen de fenómenos peroxidativos sobre los fosfolípidos que ocasionan, entre otros efectos, alteraciones de las membranas celulares que están ligadas a la aparición de los efectos anteriormente nombrados (Martino, 2000, p. 303-305).

Casi todos los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 como sucede con la quercetina (Pérez, 2003, p. 50).

Son importantes constituyentes de la dieta humana, si bien no son considerados nutrientes. Se encuentran en una gran variedad de vegetales, bebidas, frutas, cítricos, te, vino tinto, etc. El hecho de que estén presentes en la dieta y que se les atribuya una gran variedad de actividades biológicas hace suponer que estos polifenoles podrían cumplir una función protectora frente a las enfermedades cardiovasculares y coronarias y contra ciertas formas de cáncer, ya que existen algunos estudios epidemiológicos que sustentan esta hipótesis. Por otro lado, la toxicidad de los flavonoides es despreciable (Martino, 2000, p. 303 y 304).

El interés en la actividad biológica de estos compuestos comenzó alrededor de 1949 cuando algunos investigadores señalaron que la citrina (que en realidad es una mezcla de 2 flavonoides: eriodictiol y hesperidina), presente en el jugo de ciertos *Citrus*, era el compuesto responsable de disminuir la permeabilidad y la fragilidad capilar y prolongar la vida de conejillos de India escorbúticos. A esa actividad se le denominó inicialmente actividad de vitamina P, término que fue posteriormente abandonado porque estos compuestos no cumplían con los requisitos propios de una vitamina. A partir del

descubrimiento de la actividad de vitamina P de los flavonoides se han descrito muchas más actividades para estos compuestos: antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiespasmódica, antiinflamatoria, inmunomoduladora, hepatoprotectora, antiagregante plaquetaria, etc. Los flavonoides pueden afectar la actividad de numerosas enzimas, actuando tanto como inhibidores o como inductores. Se ha probado que estos compuestos poseen actividad atrapadora de radicales libres, ya que tienen la propiedad de quelatar ciertos metales y afectar la fosforilación de las proteínas celulares (Martino, 2000, p. 306). Los flavonoides más comunes en las plantas y en el propóleo son: apigenina, quercetina, kaempferol, pinocembrina, galangina, crisina y hesperidina (Bedascarrasbure, 2004, p. 370). De los cuales para el presente trabajo se identificaron y cuantificaron: quercetina, naringenina, pinocembrina y crisina.

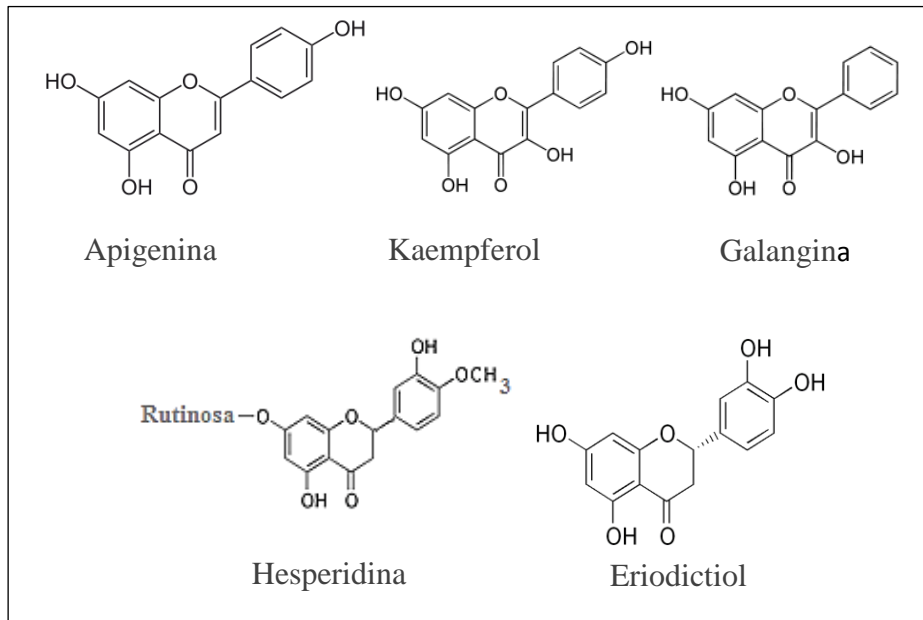


Figura 3. Flavonoides más comunes en plantas y en el propóleo (Martino, 2000).

-Quercetina (Merck S.A. 2000).

La quercetina es un flavonol. Es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal. Se trata de un compuesto polifenólico presente naturalmente en vegetales, frutas, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales (figura 4).

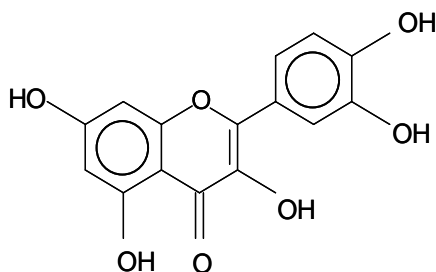


Figura 4. Estructura química de quercetina.

Propiedades

Actividad Antioxidante: Entre las principales virtudes de la quercetina destaca su poder removedor sobre los radicales libres, ejerciendo un papel citoprotector en situaciones de peligro de daño celular. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4.7 mM, lo que equivale a 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C. Su hidrosolubilidad es análoga a la de la vitamina E. La quercetina retira oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidróxidos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquea el accionar mortífero de estas sustancias sobre las células.

Actividad Cardiovascular: La misma propiedad antioxidante previamente descrita es suficiente para reducir el riesgo de muerte por dolencias e injurias cardíacas. En ese sentido, la quercetina demostró disminuir la incidencia de infarto de miocardio y de derrames cerebrales en personas de la tercera edad.

Actividad Antitumoral: Los flavonoides presentes en los alimentos, en especial verduras y frutas, se han relacionado y estudiado desde hace algunas décadas como agentes antiproliferativos de células tumorales. Uno de los mecanismos de acción de la quercetina es a través de su capacidad antimutagénica y de su poder antioxidante.

Actividad Inmunológica: Diferentes estudios han constatado el fortalecimiento del sistema inmunológico, en especial en tracto gastrointestinal, a partir de la administración de quercetina.

Actividad Antiviral: La quercetina ha demostrado ser un potente agente antiviral, pudiendo interferir con la infectividad y replicación de adenovirus, coronavirus y rotavirus en cultivos celulares.

Efectos en la Formación de Cataratas en Diabetes: Como es conocido, las cataratas suelen ser una complicación relativamente común de cuadros diabéticos. Entre los mecanismos de acción se ha descubierto el papel generador de cataratas de la enzima aldolasa-reductasa. Al respecto, distintas experiencias han demostrado la actividad inhibitoria de la quercetina sobre dicha enzima, la cual sería de tipo no competitivo y una de las más potentes entre los diferentes agentes inhibidores ensayados.

Otros Efectos: En lesiones de la mucosa gástrica y del parénquima hepático, provocadas por etanol, la quercetina ha evidenciado una actividad gastroprotectora y hepatoprotectora significativa. Junto a polioles ha resultado efectiva en el abordaje de ratas intoxicadas con vapores de fluoruro de amonio.

Se ha postulado el papel benéfico de la quercetina en pacientes con gota debido a la actividad inhibitoria sobre la enzima xantina-oxidasa (de manera similar al alopurinol).

También se evidenció actividad hipoglucemiante en ratas alimentadas con un 1% de colesterol en su dieta diaria. Por poseer una actividad morfinosimil e inhibir la síntesis de acetilcolina, se recomienda en el abordaje de diarreas agudas (p. 1-3).

-Crisina

El flavonoide crisina (5,7-dihidroxiavona) (figura 5), parece poseer actividad ansiolítica y anticonvulsivante en ratón, sin que induzca sedación y relajación muscular, por lo que se ha propuesto como mecanismo de acción un agonismo parcial sobre receptores benzodiazepínicos centrales (Macedo, 2009, p. 3).

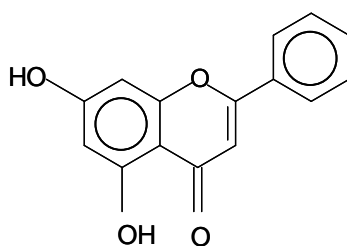


Figura 5. Estructura química de Crisina.

-Pinocembrina

Es una flavanona que se encuentran en altas concentraciones en los propóleos, cuyo origen botánico incluye a la familia de las leguminosas y las plantas de la especie *Dalbergia* (Gutiérrez, 2011, p. 63) Se ha informado de que posee numerosas actividades biológicas beneficiosas para la salud. Estudios previos han demostrado que Pinocembrina tiene efectos neuroprotectores en la demencia vascular isquémica y en modelos animales. Ha sido aprobada por la Food and Drug Administration of China para el uso clínico en pacientes con accidente cerebrovascular (Liu, 2012) (figura 6).

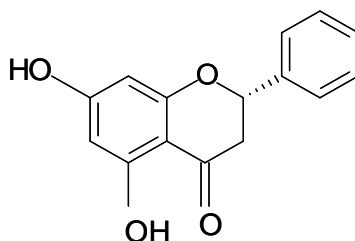


Figura 6. Estructura química de la Pinocembrina.

-Naringenina

La flavanona naringenina ha sido reportada en los propóleos turcos. También se han utilizado equivalentes de naringenina para lograr una estimación de los flavonoides, pues estos compuestos son considerados clave para llevar a cabo un control de calidad de los productos realizados a base de propóleos. También se considera que esta flavanona posee efecto bioactivo en la salud humana como antioxidante, anti-inflamatorio, promotor del metabolismo de carbohidratos y modulador del sistema inmunológico. Investigaciones recientes indican que inhibe la secreción del virus de la hepatitis C en las células infectadas.

Este bioflavonoide es de los más abundantes en los cítricos y es la flavanona predominante en las toronjas. Además, se han encontrado propiedades antibacterianas a este compuesto (Gutiérrez, 2011, p. 63).

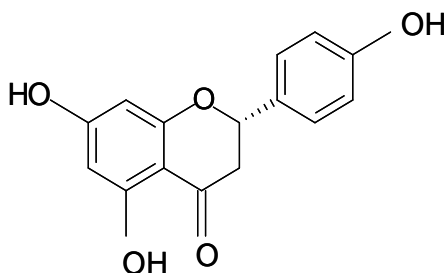


Figura 7. Estructura química de la Naringenina.

El método que se empleó para la identificación y cuantificación de flavonoides fue cromatografía líquida de alta resolución.

I.4. Técnicas de separación y análisis químico.

I.5. Cromatografía.

I.5.1. Antecedentes históricos.

A principios del siglo XX, David Day, geólogo e ingeniero de minas, y el botánico y quimicofísico ruso Mikhail Tswett, efectuaron los primeros experimentos cromatográficos. Day separó crudos de petróleo de las tierras de Fuller (proceso que él llamó “difusión fraccionada” por su similitud con la destilación); Tswett, separó los componentes de una solución de extracto de hojas (Pietrzyk, 1989, p. 463). En 1906 él empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas, vertiendo extracto de hojas verdes en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo en el interior de una probeta, separando varios pigmentos clorofílicos en zonas claramente definidas y diferentemente coloreadas, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas, lo que da el nombre del método (del griego croma: color y grafos: escribir) (Gutiérrez, 2011, p. 13).

Por desgracia, la importancia de estos experimentos no fue reconocida aunque Tswett los publicó con gran detalle (50 trabajos); por ello, la cromatografía no se desarrolló sino hasta finales de los años veinte y principios de los treinta (Pietrzyk, 1989, p. 463).

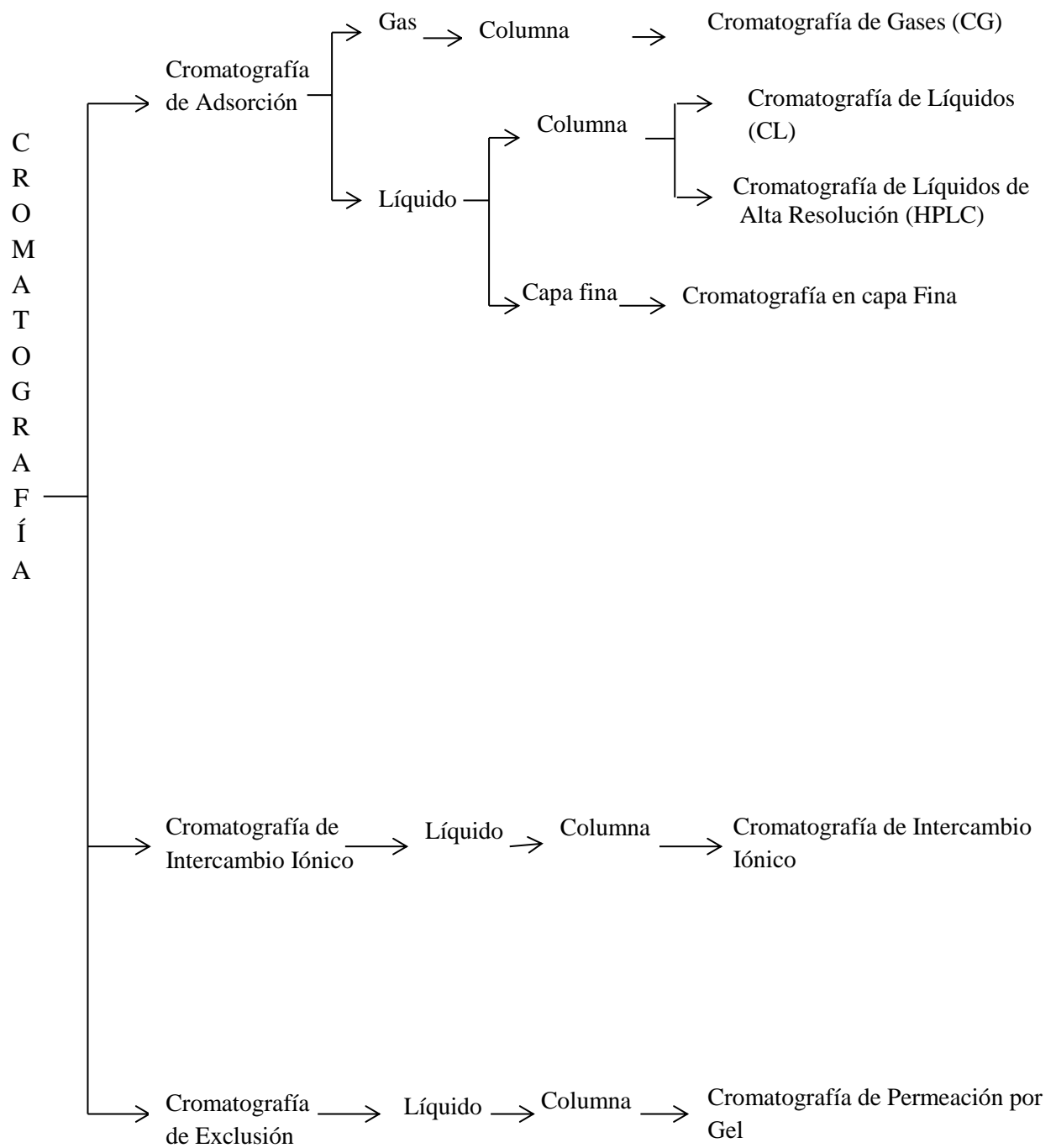


Figura 8. Clasificación Cromatográfica (Aranda, 2011).

I.6. Métodos para la caracterización química.

Actualmente se recomienda el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que al emplear una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, se consiguen así separaciones de gran resolución (Harris, p.694), además de su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general (Peña, 2008, p. 18; Skoog, 1995, p. 731).

I.7. Cromatografía líquida (Rubinson y Rubinson, 2000).

Como su nombre implica, la cromatografía de líquidos (CL), emplea una fase móvil líquida. La gran ventaja de la cromatografía de líquidos reside en la combinación de diversas propiedades de las fases móviles con distintas fases estacionarias y diversos detectores (Fig. 7) (p. 423).

I.7.1. Cromatografía de líquidos en fase normal.

La fase estacionaria es más polar que la fase móvil. La palabra polar se emplea del mismo modo que al hablar de enlaces polares en las moléculas: los enlaces de la fase estacionaria tienen momentos dipolo más grande que los enlaces en las moléculas de disolvente. Las fases estacionarias suelen ser polímeros inorgánicos que tienen gran número de poros de tamaño molecular de modo que sus áreas superficiales son grandes. Los dos materiales más comunes son el óxido de silicio hidratado o polímeros de óxido de aluminio hidratado.

La polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Cuando los disolventes son más polares, los solutos se desplazan con mayor rapidez y se eluyen más pronto (p. 425-428).

I.7.2. Cromatografía de líquidos en fase inversa.

La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se emplean dos tipos fundamentales de fases estacionarias y las más comunes son grupos no polares enlazados con la sílica. Entre ellos los que se emplean más a menudo son los grupos orgánicos $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. De éstos, el más empleado es la cadena de 18 átomos de carbono (el grupo octadecilo). Los grupos orgánicos enlazados ejercen un efecto similar al que produciría una capa sumamente delgada de disolvente orgánico en la superficie de las partículas de sílica. De este modo, los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil a semejanza de una extracción líquido-líquido. Los disolventes menos polares son eluyentes más poderosos en las separaciones, en general, el poder de elución de fase inversa es opuesto al orden para la elución en fase normal. Este poder de elución de fase inversa se indica mediante una escala numérica llamada índice de polaridad (p. 428).

I.7.3. Cromatografía de líquidos de intercambio iónico.

En solución, una de las causas por las que dos iones se enlazan es la atracción de cargas contrarias. Los sitios con carga negativa alta tienden a retener los protones con más fuerza. Del mismo modo, si se anclan grupos con cargas positivas a una fase estacionaria, atraerán iones de carga opuesta. Estas interacciones se emplean para separar las especies que se eluyen según sus diferencias de carga promedio. Los materiales con fases estacionarias que tienen cargas enlazadas se llaman de intercambio iónico. Se llaman así porque las soluciones iónicas siempre contienen un número igual de cargas negativas y positivas. Los iones del soporte de resina siempre se asocian con algún ion de carga opuesta de la fase móvil. El ion asociado inicialmente con el sitio solo lo deja cuando se intercambia por otro nuevo. Las fases estacionarias formadas por polímeros entrecruzados con cargas negativas fijas se intercambian con iones positivos y se llaman resinas de intercambio catiónico y los polímeros con cargas positivas enlazadas covalentemente sobre ellos intercambian iones negativos y se llaman resinas de intercambio aniónico.

Debido a la dependencia crucial del pH, la fase móvil casi siempre se amortigua a un pH fijo y escogido cuidadosamente (p. 429-430).

I.7.4. Cromatografía de líquidos por filtración en gel.

La separación se basa en el tamaño de las moléculas. La fase estacionaria que se emplea es un sólido con poros de corte transversal controlado (con todo el cuidado y precisión posibles). La permeación se produce a través de los poros de las partículas empacadas en las columnas. La separación se produce porque solo las partículas más pequeñas penetran a los poros y son removidas de la fase móvil que fluye. De este modo las moléculas mayores se eluyen en primer lugar, seguidas por las más pequeñas (p. 423-430) (p. 430).

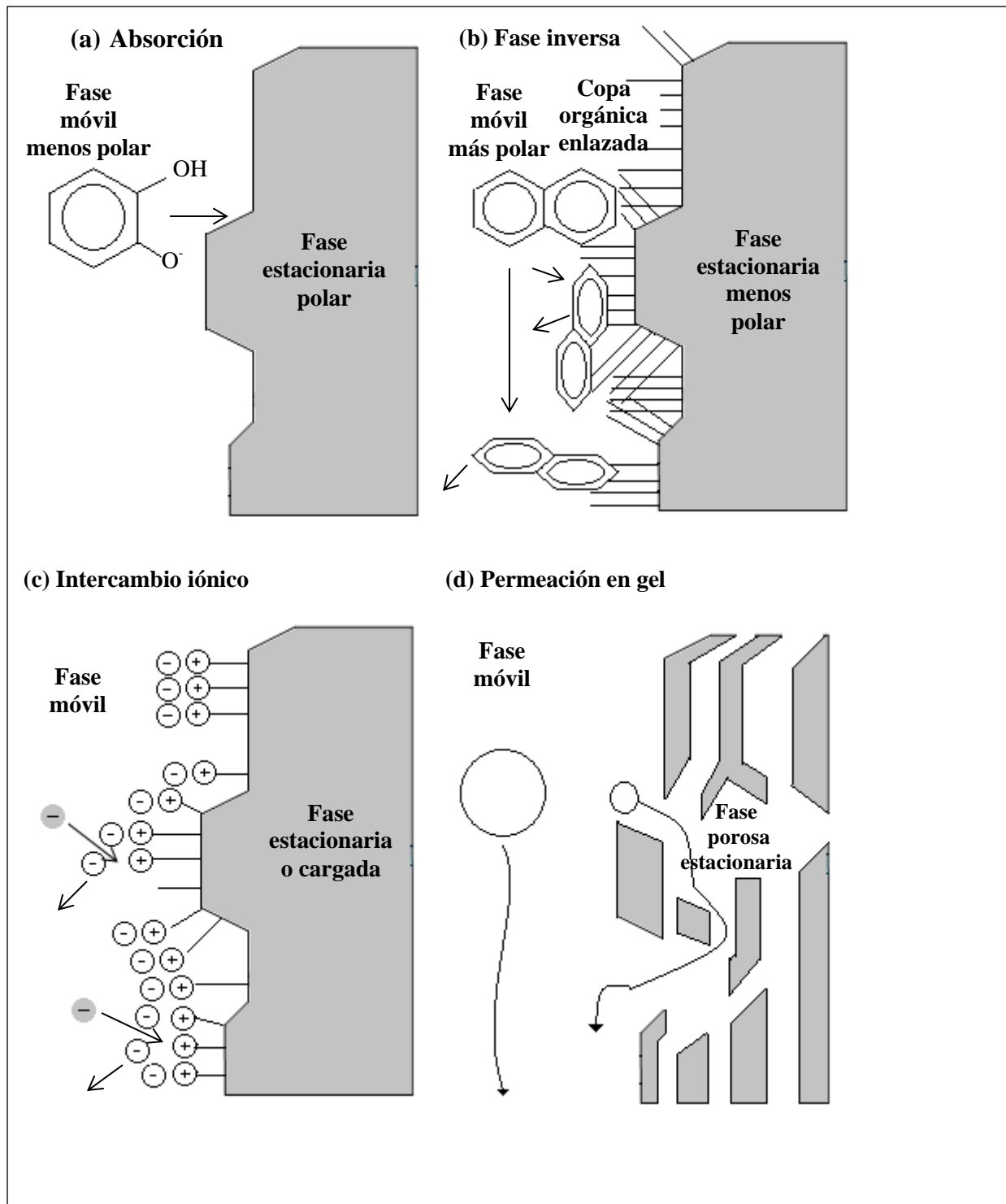


Figura 9. Mecanismos de retraso en cromatografía líquida (Rubinson y Rubinson, 2000, p. 423-430).

I.7.5. Cromatografía líquida de alta resolución (Harvey, 2002).

Es la técnica cromatográfica en la que la fase móvil es un líquido.

En HPLC, una muestra líquida o una muestra sólida disuelta en un disolvente adecuado se hacen pasar por una columna cromatográfica junto con una fase móvil líquida. La separación se efectúa gracias a las interacciones de las fases móvil y estacionaria.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizado. Los químicos la emplean para separar y determinar especies en diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. En cromatografía líquida, la fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra como mezcla de solutos (Skoog, 2005, p. 985).

Instrumentos básicos (figura 10).

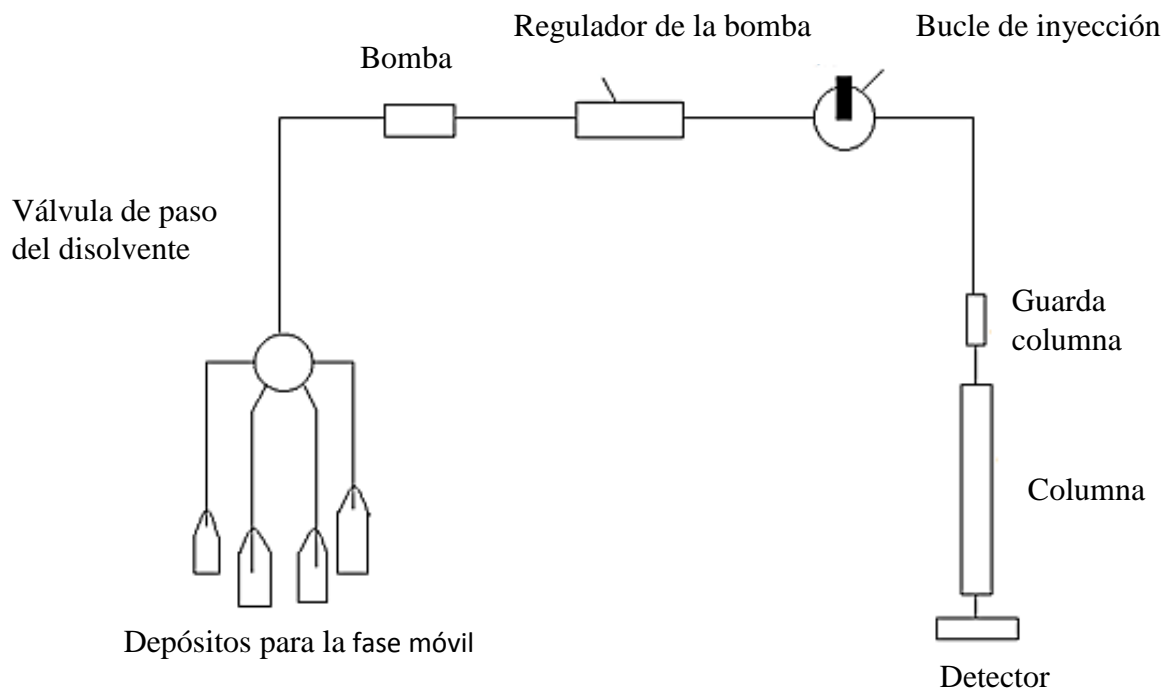


Figura 10. Diagrama esquemático de la cromatografía líquida de alta resolución.

I.7.5.1. Columnas de HPLC.

Consta típicamente de dos columnas: una columna analítica responsable de la separación y un guarda-columna que se coloca antes de la columna analítica para protegerla de la contaminación.

Columnas analíticas. Las columnas de HPLC más utilizadas se fabrican con acero inoxidable. La mayoría de las columnas tienen una longitud de 10-30 cm y diámetro interno de 2-5 mm. Los empaquetamientos de las columnas suelen ser de partículas de 3-10 μm . Las columnas de este tipo proporcionan 40000-60000 platos por metro. Recientemente, han aparecido en el mercado microcolumnas con un diámetro interno de 1-4.6 mm y longitud de 3-7.5 cm. Estas columnas, empaquetadas con partículas de 3 o 5 μm , contienen hasta 100 000 lts por metro y poseen la ventaja de su velocidad y mínimo consumo de disolvente. Esta última propiedad es de importancia considerable, dado que los disolventes de alta pureza necesarios en la cromatografía líquida son muy costosos y tienen que desecharse después de usarlos (Skoog, 2005, p. 990).

Guarda columnas. Existen dos problemas que tienden a acortar el tiempo de vida de las columnas analíticas. El primero es que los solutos se unen de forma irreversible a la fase estacionaria, deteriorando el rendimiento de la columna por pérdida de la fase estacionaria disponible. El segundo es que el material en forma de partículas que se inyecta con la muestra puede ocluir la columna analítica. Los guarda-columnas suelen tener el mismo material empaquetado y la misma fase estacionaria que la columna analítica, pero son significativamente más cortos y más baratos; sus medidas típicas son de 7.5 mm de longitud y cuestan la décima parte que la columna analítica correspondiente.

El empaquetamiento más común en la cromatografía líquida se prepara con partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeración de partículas submicrónicas de sílice en condiciones que producen partículas más grandes y de diámetro muy uniforme, las partículas resultantes suelen cubrirse con películas orgánicas finas, que se enlazan química o físicamente con la superficie. Otros materiales de empaquetamiento son las partículas de alúmina, partículas de polímeros porosos o resinas de intercambio iónico (Skoog, 2005, p. 990).

I.7.5.2. Fases estacionarias.

En cromatografía líquido-líquido, la fase estacionaria es una película líquida que reviste el material empaquetado, formado por partículas de sílice porosa de 3-10 μm . La fase estacionaria puede ser parcialmente soluble en la fase móvil, lo que con el tiempo produce fenómenos de <<sangrado>>. Para evitar las pérdidas de fase estacionaria, ésta se une mediante enlaces covalentes a las partículas de sílice. Las fases estacionarias ligadas se fijan mediante una reacción entre las partículas de sílice y un organoclorosilano de fórmula general $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido.

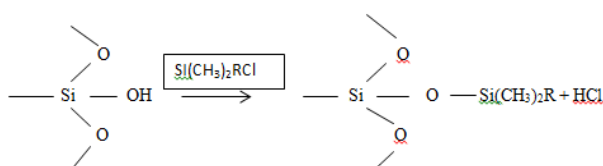


Figura 11. Reacción entre las partículas de sílice y un organoclorosilano de fórmula general $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido.

I.7.5.3. Fases móviles.

El orden de elución de los solutos en HPLC depende de la polaridad. Los tiempos de retención se controlan seleccionando la fase móvil. En separación fase normal, el soluto menos polar pasa proporcionalmente menos tiempo en la fase estacionaria polar y es el primero que eluye en la columna. En la separación de fase inversa, el orden de elución es el inverso, y el soluto que primero sale es el más polar.

El índice de polaridad ayuda a seleccionar la fase móvil ya que es la medida cuantitativa de la polaridad del disolvente.

Elución isocrática, uso de una fase móvil cuya composición permanece constante durante la separación.

Eluciones en gradiente ocurre cuando hay un cambio de la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo.

Los disolventes de fase móvil antes de ser utilizados deben ser tratados para eliminar los gases disueltos tales como N_2 y O_2 . La desgasificación se efectúa usando una bomba de

vacío o una purga con gas inerte y las partículas capaces de ocluir las tuberías o la columna se eliminan mediante filtración.

Los disolventes de la fase móvil se transportan hasta sus depósitos con una bomba.

La muestra se introduce, usando un bucle de inyección en la que dichas muestras se cargan en un corto segmento de tubo y se inyectan en la columna, redirigiendo la fase móvil a través del bucle. Cuando se usa detector UV/Vis, el cromatograma resultante es una gráfica de absorbancia en función del tiempo de elución (p. 402-409).

I.7.5.4. Parámetros cromatográficos (Sosa, 2011).

Factor de capacidad (k'): El factor de capacidad (k') es una medición del tiempo de retención de una especie, relativo al volumen muerto (volumen de eluyente que se consume sin que se detecte ningún componente) de la columna.

Factor de coleo o asimetría (T): una medida de la simetría del pico, vale 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada. En algunos casos pueden observarse valores menores de la unidad.

Factor de respuesta (FR): El cociente de dividir concentración de estándar (mg/ml) entre respuesta del estándar (abs ó área de estándar según sea el caso).

Número de platos teóricos, eficiencia (N): mide la capacidad de la columna para separar los componentes, no la retención de los mismos. La eficiencia o el número de platos se puede observar directamente a partir del cromatograma, observando la agudeza de los picos.

Resolución (R): También es función de la eficiencia de la columna (N) y se especifica para asegurar que exista una separación entre los compuestos que eluyen muy cercanos, para establecer el poder de resolución general del sistema y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de la muestra.

Tiempo de retención (t_r): El tiempo (en minutos) que una especie requiere para eluir. Este es medido desde el momento de la inyección hasta el máximo del pico. Es característico para cada analito, según el solvente utilizado y el empaque de la columna, a una temperatura dada (p. 24-27).

La concepción más actualizada del control de calidad de los propóleos consiste en la determinación de sus propiedades físico-químicas y la estimación de su actividad biológica (Palomino, 2009).

Para el presente trabajo se llevaron a cabo estudios comparativos mediante la determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales, evaluación de la actividad antioxidante y la identificación y cuantificación de naringenina, pinocembrina, quercetina y crisina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, de muestras de propóleos colectadas en tres diferentes regiones de México.

Para ello primero se determinó el contenido de fenoles totales por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, con el agente oxidante Folin-Ciocalteu, una vez obtenido como resultado la existencia de fenoles totales se podía proceder a cuantificar los flavonoides totales presentes mediante la formación de un complejo estable con cloruro de aluminio ya que los flavonoides suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos, condición que facilita su clasificación y reactividad frente respecto del tricloruro de aluminio (Salamanca, 2007). Por otro lado, si la capacidad antioxidante de los extractos EEP se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de polifenoles, como se reporta generalmente en la literatura, se debe tener en cuenta que el DPPH es más selectivo que otros métodos como el de ABTS^{•+} y, a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Palomino, 2009).

II. JUSTIFICACIÓN

Dada la limitada información existente acerca de su composición química de los propóleos (Palomino, 2009, p. 389) y la importancia que tiene establecer un estándar de calidad, ya que su actividad biológica depende de los diferentes compuestos que lo integran, y su actividad antibacteriana (Gutiérrez, 2011, p. 68) está directamente relacionada con el contenido de flavonoides que contienen, se busca obtener información acerca de esta mezcla en cuanto a su perfil químico para determinar si pueden ser empleados como alternativa a diferentes tratamientos dentro de la medicina animal y humana, debido a que el problema principal para su industrialización está ligado a su calidad y heterogeneidad.

Es por eso que en este trabajo se cuantificará el contenido de fenoles y flavonoides totales, se determinará la actividad antioxidante y principalmente se identificarán y cuantificarán los flavonoides presentes mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución, en los propóleos ya mencionados.

III. HIPÓTESIS

Si los propóleos se componen del material que recolectan las abejas de la flora circundante al panal, entonces dada la variación de flora a lo largo de México, muy probablemente los propóleos de tres diferentes estados de la República Mexicana, presentarán variación en el tipo y cantidad de flavonoides, los cuales podrán ser identificados y cuantificados mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución, una vez establecidas las condiciones.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general. Identificar y cuantificar el contenido de quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona), crisina (5,7-dihidroxi flavona), naringenina (4',5,7-trihidroxi flavanona) y pinocembrina (5,7-dihidroxi flavanona), en tres extractos etanólicos de propóleo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

IV.2. Objetivos particulares.

1. Obtener los extractos etanólicos de tres propóleos de diferentes regiones geográficas de México (Estado de México, Estado de Colima y Estado de Aguascalientes), por el método de maceración.
2. Establecer el método de cromatografía líquida de alta resolución para identificar la presencia de flavonoides en los propóleos.
3. Analizar los extractos etanólicos de propóleo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución para reportar la cantidad de g de cada flavonoide/100 g de propóleo, mediante el uso de curvas de calibración.
4. Determinar el contenido de fenoles totales (CFT) en cada uno de los extractos etanólicos de propóleo por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, con el agente oxidante Folin-Ciocalteu.
5. Determinar el contenido de flavonoides totales (CFT) en cada uno de los extractos etanólicos de propóleo mediante el método Dowd.

6. Determinar la actividad antioxidante de los propóleos mediante el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

A continuación se muestra de manera gráfica el diseño experimental (Figura 12) que se utilizó para el desarrollo del trabajo.

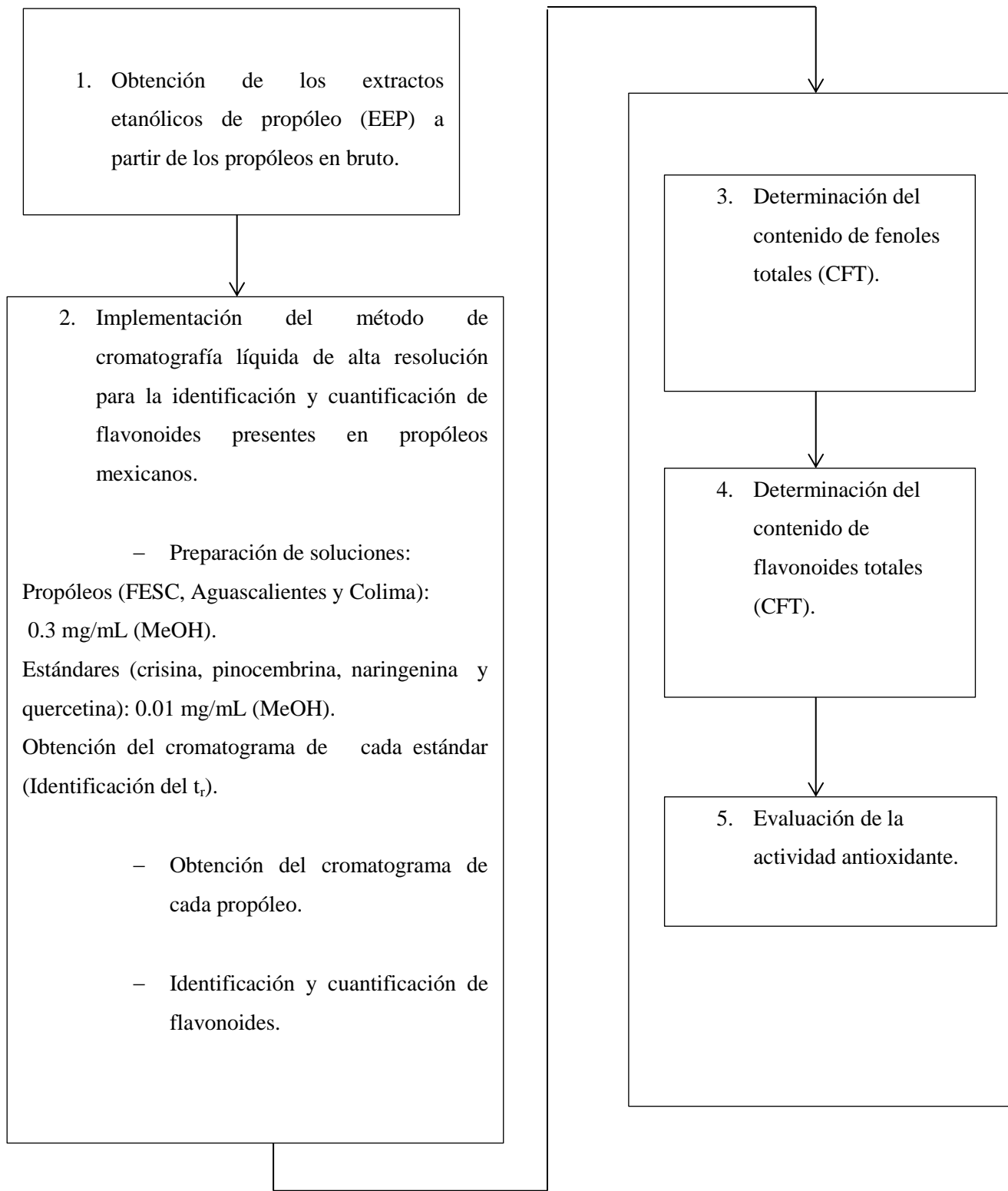


Figura 12. Diagrama del diseño experimental.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Propóleos.

Se trabajó con propóleos brutos o en greña (es decir, tal como se colectan del panal) de diferentes municipios de la República Mexicana, con la finalidad que todos procedieran de diferentes condiciones geográficas: clima, altitud y vegetación.

V.1.1 Procedencia de los propóleos.

Los propóleos se obtuvieron en greña (propóleo bruto) y fueron colectados de los apiarios por los propios apicultores.

Se obtuvieron en el siguiente orden:

1. El propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli perteneciente al Estado de México que se ubica a la latitud: 19° 40' 50'' N, longitud: 99° 12' 25'' O, altitud: 2,260 msnm. El municipio cuenta con ahíles, jacarandas, álamos blancos, colorines, fresnos, eucaliptos, encinos, pirules, capulines, sauces, ahuehuetes, etc. Colectado en el mes de Octubre 2011, (Figura 13).



Figura 13. Propóleo en bruto de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2. El propóleo de Colima del cual se desconoce el municipio donde fue colectado, por lo que no se tiene información precisa de la flora del lugar. El Estado de Colima se ubica a latitud: $19^{\circ} 31'$ - $18^{\circ} 41'$, longitud: $103^{\circ} 29'$ - $104^{\circ} 41'$. Colectado en el mes de Enero 2012, (Figura 14).



Figura 14. Propóleo en bruto del Estado de Colima.

3. El propóleo de Aguascalientes del cual se desconoce el municipio donde fue colectado, por lo que no se tiene información precisa de la flora del lugar. El Estado de Aguascalientes se ubica a latitud: 22° 27' - 21° 38', longitud: 101° 53' - 102° 52'. Colectado en el mes de Enero 2012, (Figura 15).



Figura 15. Propóleo en bruto del Estado de Aguascalientes.

Los propóleos se colectaron de Octubre de 2011 a Enero de 2012 y antes de ser procesados se conservaron en obscuridad y a temperatura ambiente.

Tabla 2. Cantidad de los propóleos en bruto expresada en gramos.

Lugar de procedencia	Peso (g)
FES-C	143.2
Colima	86
Aguascalientes	102.4

En la Figura 16 se presenta un mapa de la República Mexicana donde se marca a cada uno de los Estados en los cuales se obtuvieron los diferentes propóleos.



Figura 16. Mapa de la República Mexicana donde se muestran con el número 1 el Estado de Colima, el 2 nos indica el estado de Aguascalientes, el 3 al Estado de México, de los cuales proceden los propóleos estudiados.

V.2. Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP).

Este procedimiento se realizó en el laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 1, UNAM.

Los propóleos se obtuvieron en bruto, cada uno se limpió eliminando restos de abejas, de plantas, etc., se trituró y se pesó; obteniendo 86 g de propóleo de Colima, 102.4 g del de Aguascalientes y 143.2 g del de FES-C para la extracción (Tabla 2). Cada uno se colocó en un frasco ámbar con etanol al 70% a razón de 1 a 3 peso/volumen, marca FERMONT. La mezcla se mantuvo en maceración durante 48 hrs., agitándose esporádicamente (no menos de 3 veces al día), a temperatura ambiente y en ausencia de luz (Gutiérrez, 2011, p. 27) (Herrera, 2010, p. 76) (Palomino, 2009, p. 390).

Se filtró al vacío con papel filtro (Whatman número 5), en una sola etapa.

A las fracciones filtradas les fue eliminado el exceso de etanol con un Rotovapor Büchi R-205 B-490 con unas constantes de 115 revoluciones por minuto (rpm), una temperatura de vapor de 25°C y con una temperatura del baño de 55°C. Cada propóleo se llevó a sequedad por evaporación en campana de vacío. Los extractos se mantuvieron en frascos ámbar, en obscuridad y a temperatura ambiente (Gutiérrez, 2011, p. 27).

V.3. Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para poder llevar a cabo la identificación y cuantificación de la quercetina, crisina, naringenina y pinocembrina en cada propóleo, se usó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Merck-Hitachi, equipado con una bomba modelo L-6000, un detector UV, modelo L-4000. La separación se realizó en una columna 151355 *LiChroCART*® 250-4 LiChrosorb® RP-18 (5 µm), Merck, Alemania. Con un Integrador D-7500, MERCK HITACHI. Bucle de 20 µL.

El sonicador que se empleó: Branson 1510 R-MTH Ultrasonic Cleaner.

Balanza analítica: AND, HR-200.

Fase móvil: metanol: acetonitrilo: agua (25: 25: 50) (Londoño, 2010, p. 1252). La cual se filtró con papel filtro resistente al acetonitrilo de 0.45 µm. La fase móvil se sónico.

Preparación de los estándares de los flavonoides.

La preparación de los estándares se realizó a partir de las soluciones stock para posteriormente obtener las soluciones de trabajo. Los datos de los estándares empleados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Estándares empleados*

Estándar	Marca
Quercetina (3,3',4',5, 7-pentahidroxi flavona)	SIGMA-ALDRICH (Q3001)
Crisina (5,7-dihidroxi flavona)	SIGMA-ALDRICH (C80105)
Naringenina (4', 5, 7-trihidroxi flavanona)	SIGMA-ALDRICH
Pinocembrina (5,7-dihidroxi flavanona)	SIGMA-ALDRICH

*Todos los estándares poseen una pureza de 95-97%

Soluciones Stock

Se prepararon las soluciones para cada estándar a una concentración de 0.01 mg/mL en MeOH. Se filtraron en filtros de jeringa Whatman de 0.45 µm., y se sonicaron.

Preparación de las muestras (propóleos: Aguascalientes, Colima y FESC).

Se prepararon las soluciones para cada propóleo a una concentración de 0.3 mg/mL en MeOH. Se filtraron en filtros de jeringa Whatman de 0.45 µm., y se sonicaron.

V.4. Contenido de fenoles totales (CFT).

Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Para el CFT se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu, se realizó una curva de calibración de ácido gálico en MeOH con las siguientes concentraciones: 0.0120, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL. La concentración que se utilizó para cada extracto fue de 0.05 mg/mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 760 nm. Y las absorbancias se interpolaron en la curva de calibración del ácido gálico. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra. El contenido total de fenoles se expresa como mg de equivalentes de ácido gálico/g de EEP (Método modificado de Singleton et al., 1999) (Apéndice 1).

V.5. Contenido de flavonoides totales.

Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

El contenido total de flavonoides se determinó utilizando el método Dowd (Apéndice 2), realizando algunas modificaciones en la concentración del extracto. 3 ml de 2% de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) en metanol se mezcló con el mismo volumen de la solución de extracto (0,2 mg / ml). Lecturas de absorción a 415 nm utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer UV-VIS Lambda 25, fueron tomadas después de 10 minutos contra un blanco de muestra que consiste en una solución de extracto de 3 ml con 3 ml de metanol sin $AlCl_3$. El contenido total de flavonoides se determinó utilizando una curva estándar con quercetina (1 - 70 mg / L) como el estándar. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra. Contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina (CE) / g de extracto (Ramamoorthy, et al., 2007).

V.6. Evaluación de la actividad antioxidante.

Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

La actividad antioxidante se evaluó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Apéndice 3). En este caso se pesaron 3 mg los cuales se disolvieron en 3 mL de MeOH grado HPLC para cada uno de los propóleos (Aguascalientes, Colima, FES-C) y para la quercetina. Se determinó la Capacidad antioxidante 50 (CA₅₀), utilizando únicamente las siguientes concentraciones de las que sugiere el método para el compuesto problema: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/mL. Utilizando como control positivo la quercetina y como control negativo se utilizaron pozos con 200 µL de MeOH grado HPLC (Okusa et al., 2007). Inmediatamente se protegieron de la luz y se mantuvieron en agitación constante durante 20 min a 36 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra.

VI. RESULTADOS

VI.1. Obtención de los extractos etanólicos de propóleo.

A continuación en la Tabla 4 se presenta la cantidad (g) de propóleo en bruto utilizado para la obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), así como los gramos de extracto etanólico que se obtuvieron para cada propóleo por el método de maceración y el % de rendimiento de cada uno de los EEP.

Tabla 4. Rendimiento de extracto etanólico de propóleo que se obtuvo para cada propóleo, por el método de maceración, así como los gramos de propóleo en bruto empleados y % de rendimiento.

Lugar de procedencia	Peso (g) En bruto	EEP (g)	Rendimiento (%)
FES-C	143.2	68.03	47.51
Colima	86	58.6	68.13
Aguascalientes	102.4	75.278	73.513

Una vez obtenidos los EEP de cada región se procedió a implementar el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para identificar y cuantificar los flavonoides presentes, obteniendo los siguientes resultados.

VI.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Como resultado se obtuvo que las siguientes condiciones de trabajo fueron las adecuadas para la identificación de los flavonoides de interés por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución las cuales son las siguientes: longitud de onda de 290 nm en general (Herrera, 2010, p. 76) (Pellati, 2011, p. 935), ya que es la longitud de onda idónea en la cual se pueden identificar a los cuatro flavonoides de interés (quercetina 254 nm, crisina 265 nm, pinocembrina y naringenina 290) (Pellati, 2011, p. 935), una velocidad de carta de 2.5, concentración de los propóleos 0.3 mg/mL, concentración de los estándares 0.01 mg/mL, y un flujo de 0.4 mL/min, manejando una presión aproximada de 90 bar, a temperatura ambiente para evitar la degradación térmica de los compuestos activos.

Estos son los resultados obtenidos de la cromatografía líquida de alta resolución, donde se pueden observar los cromatogramas de cada estándar, así como de los tres EEP de cada región.

Quercetina

En primer lugar se obtuvo el cromatograma del estándar quercetina (Figura 17) a una longitud de onda de 290 nm, con una concentración de $0.01 \frac{mg}{mL}$, velocidad de carta (C.S) 2.50, atenuación (ATT) 2, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min., ya que éstas fueron las condiciones que permitieron obtener el mejor cromatograma para el estudio de la quercetina, obteniendo para el caso de ésta un tiempo de retención (t_r) de 7.75 min.

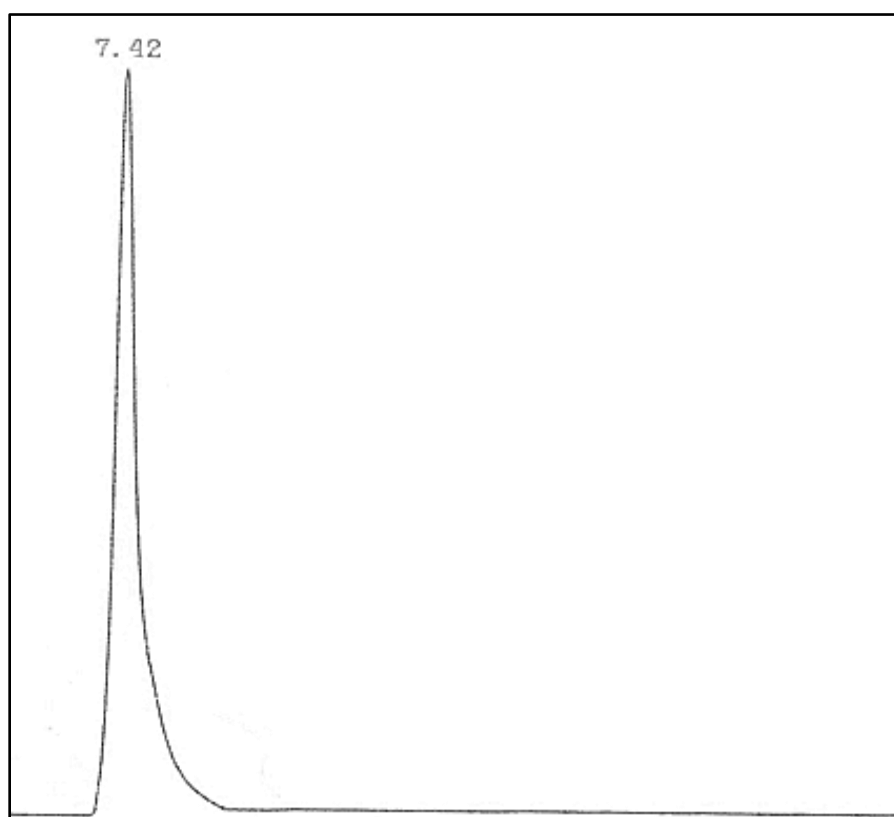


Figura 17. Cromatograma del estándar de quercetina. A 290 nm, concentración de $0.01 \frac{mg}{mL}$, velocidad de carta (C.S) 2.50, atenuación (ATT) 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida 60 min.

Naringenina

Después se obtuvo el cromatograma del estándar de naringenina (Figura 18) bajo las siguientes condiciones: longitud de onda de 290 nm, concentración $0.01 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 5, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min., dando como resultado un t_r de 13.39 min.

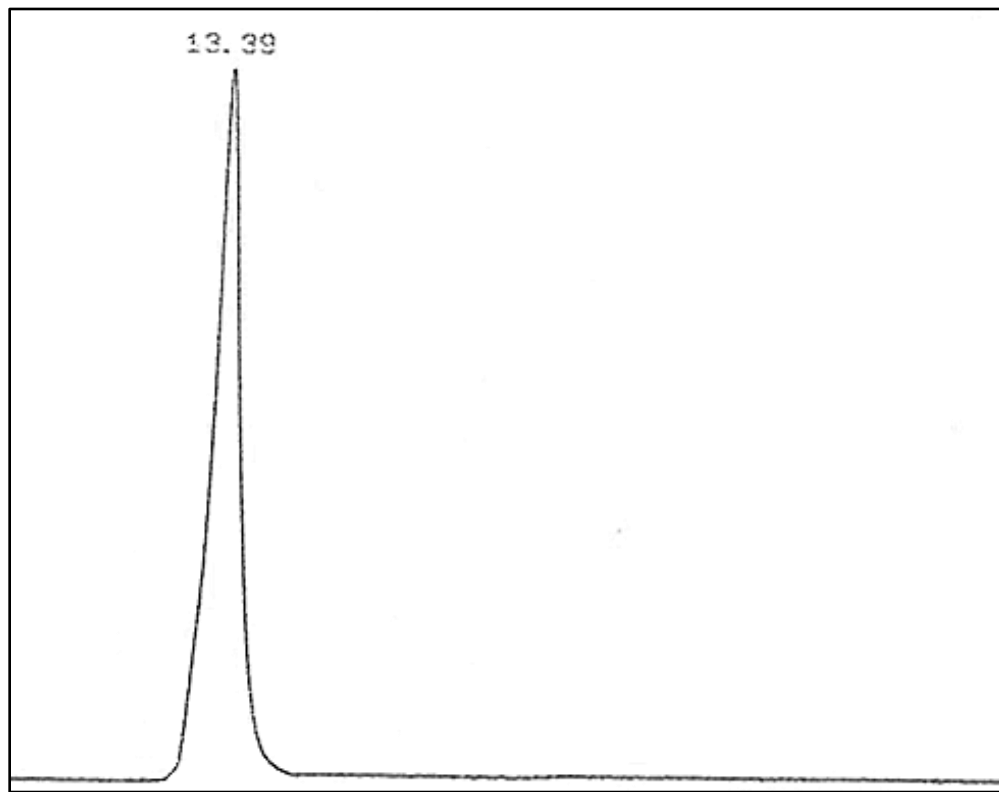


Figura 18. Cromatograma del estándar naringenina. A 290 nm, concentración $0.01 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 5, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min.

Pinocembrina

Cromatograma del estándar pinocembrina (Figura 19) a una longitud de onda de 290 nm, concentración $0.01 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min., el estándar pinocembrina presentó un t_r de 30.37 min.

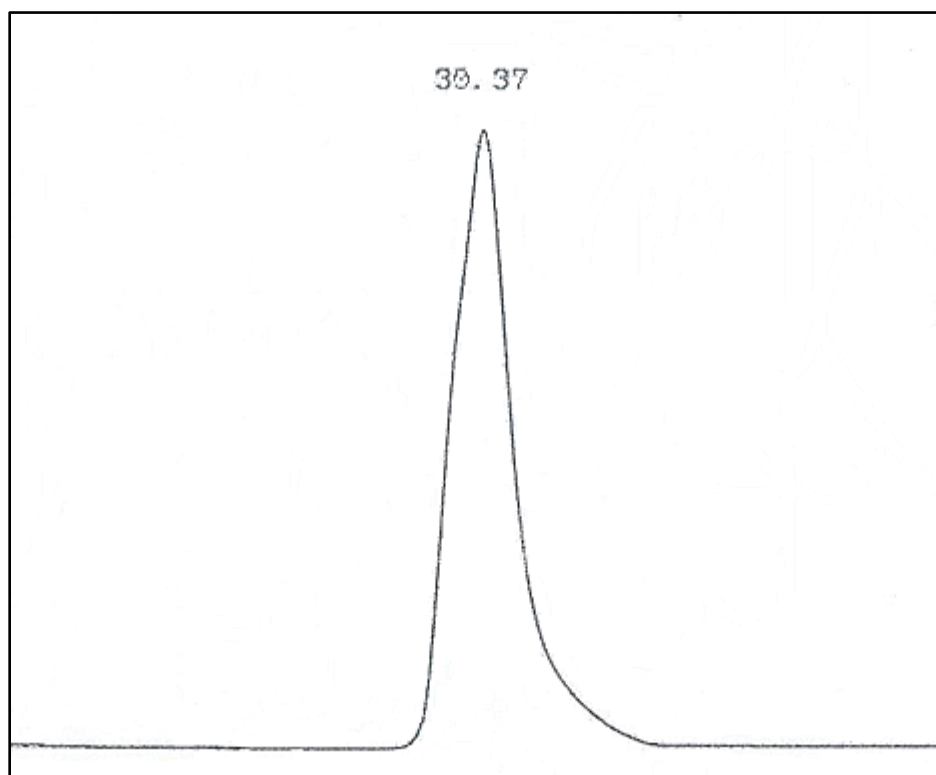


Figura 19. Cromatograma del estándar pinocembrina. A 290 nm, concentración $0.01 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min.

Crisina

Cromatograma del estándar crisina (Figura 20) a una longitud de onda de 290 nm, concentración $0.01 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 6, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min., mostró un t_r 41.14 min.

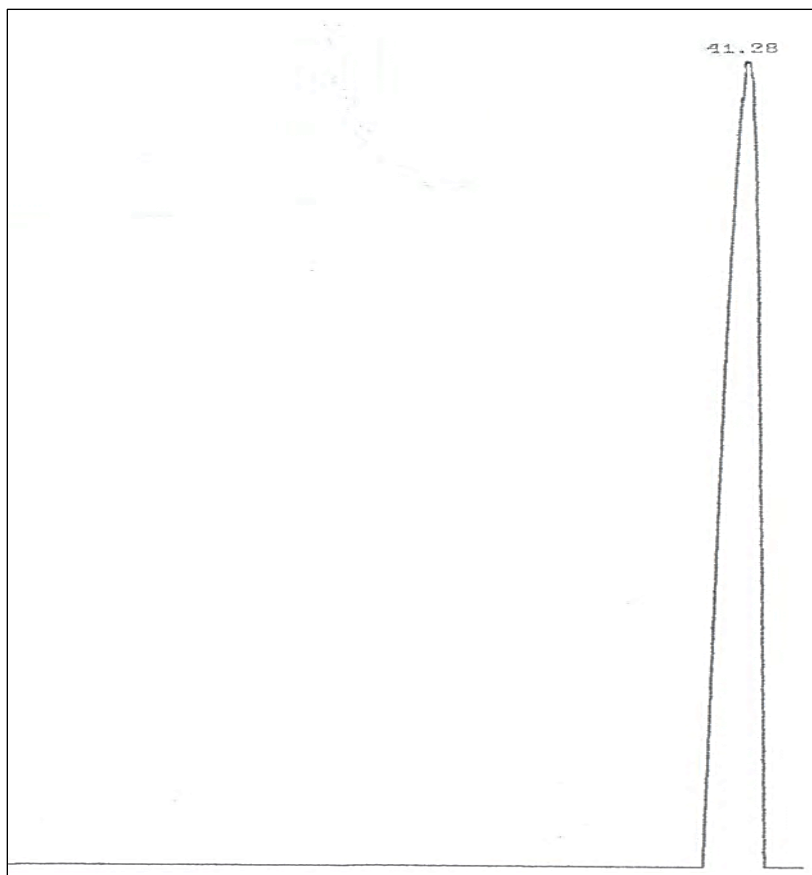


Figura 20. Cromatograma del estándar crisina. A 290 nm, concentración $0.01 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 2, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$, tiempo de corrida de 60 min.

En la siguiente tabla se presentan los tiempos de retención que presentaron los estándares de quercetina, naringenina, pinocembrina y crisina a una longitud de onda de 290 nm.

Tabla 5. Tiempo de retención que se obtuvo para cada estándar a la longitud de onda de 290 nm. \pm Desviación estándar.

Estándar	t_r (min)
Quercetina	7.42 ± 0.45
Naringenina	13.39 ± 0.77
Pinocembrina	30.37 ± 1.35
Crisina	41.28 ± 0.23

Conociendo los tiempos de retención para cada estándar se procedió a obtener los cromatogramas para cada uno de los EEP.

Propóleo de FESC

Cromatograma del propóleo de la FESC-C4 (Figura 21) a una longitud de onda de 290 nm, concentración $0.3 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$ y tiempo de corrida de 60 min. Como se puede observar en el siguiente cromatograma el EEP de FESC presenta tres de los estándares, pero solo dos de ellos, la pinocembrina y la naringenina, presentan un pico definido, mientras que la quercetina presenta un pico muy pequeño, por lo tanto no se cuantifica.

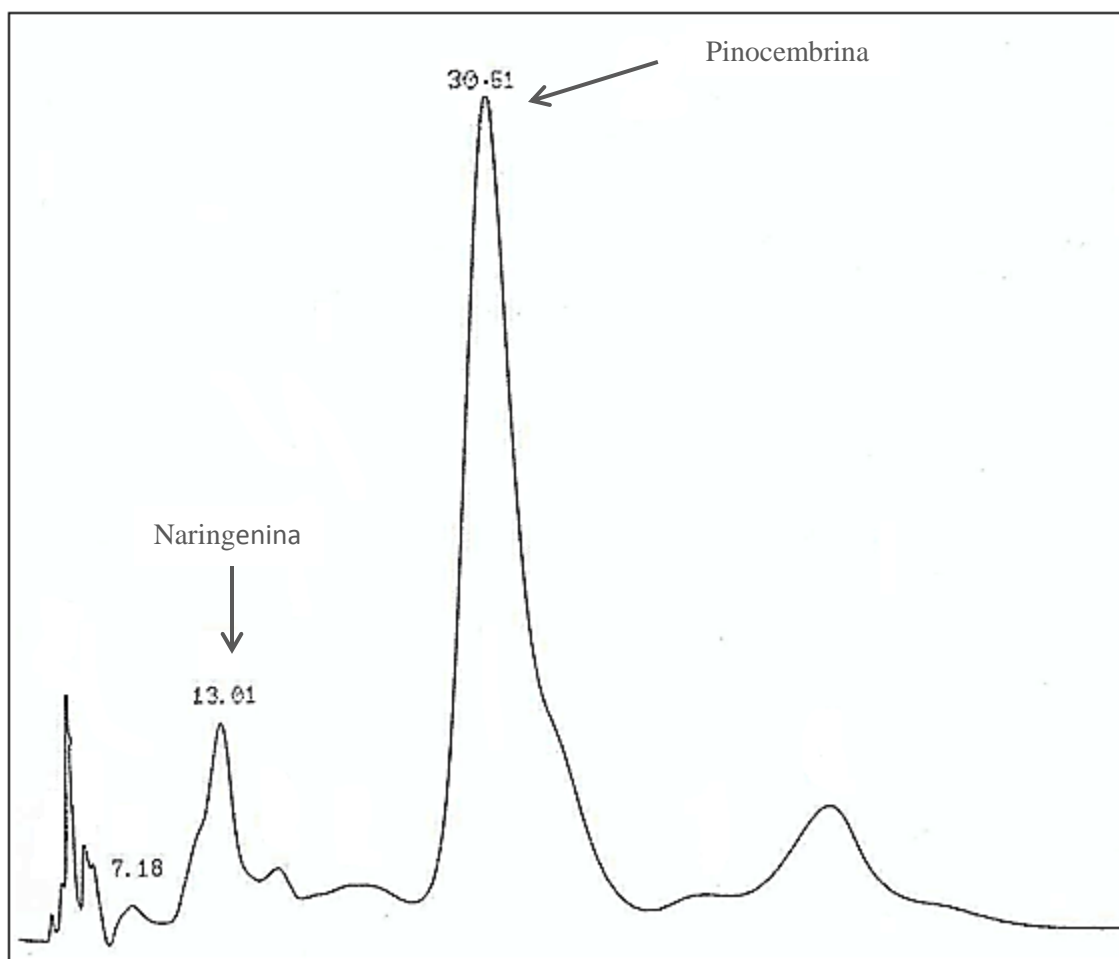


Figura 21. Cromatograma del EEP de FESC-C4. A 290 nm, concentración $0.3 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$ y tiempo de corrida de 60 min.

Propóleo de Colima

Cromatograma del propóleo de Colima (Figura 22) a una longitud de onda de 290 nm, concentración $0.3 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$ y tiempo de corrida de 60 min. El cromatograma presenta tres de los estándares quercetina, naringenina y pinocembrina, de los cuales el único pico definido es pinocembrina, ya que los otros dos si están presentes pero en una cantidad muy pequeña y sus picos no se muestran definidos, es por eso que el único que se cuantificó en este caso es la pinocembrina.

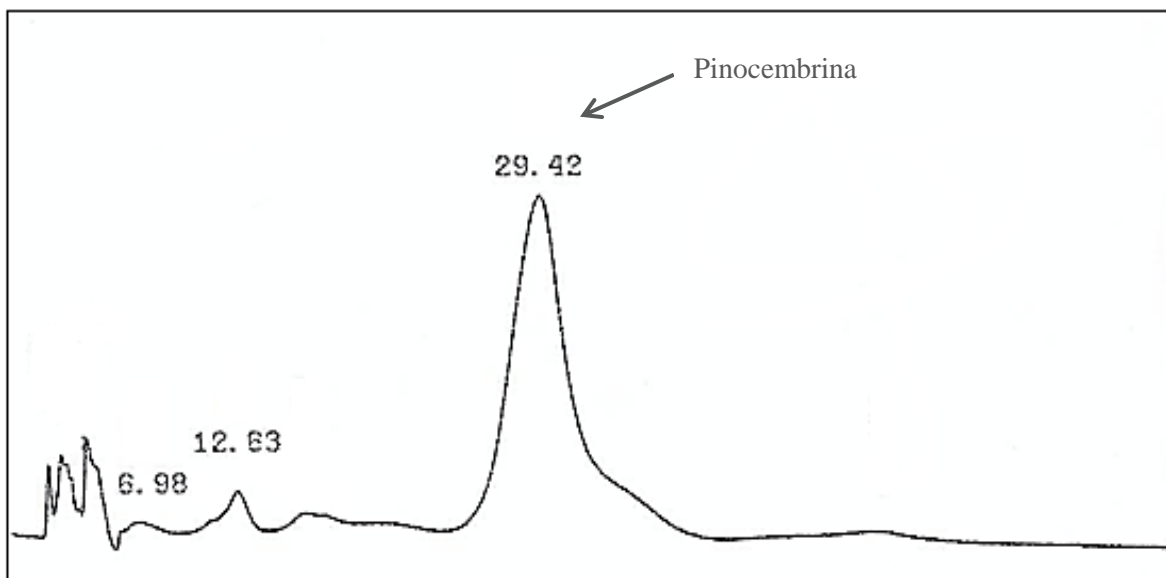


Figura 22. Cromatograma del EEP de Colima. A 290 nm, concentración $0.3 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 4, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$ y tiempo de corrida de 60 min.

Propóleo de Aguascalientes

Cromatograma del propóleo de Aguascalientes (Figura 23) a una longitud de onda de 290 nm, concentración $0.3 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 6, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$ y tiempo de corrida de 60 min., El cromatograma presenta tres de los estándares quercetina, naringenina y pinocembrina pero únicamente se cuantificaran dos de ellos la naringenina y la pinocembrina, ya que la quercetina está presente pero en una cantidad muy pequeña y el pico no está definido.

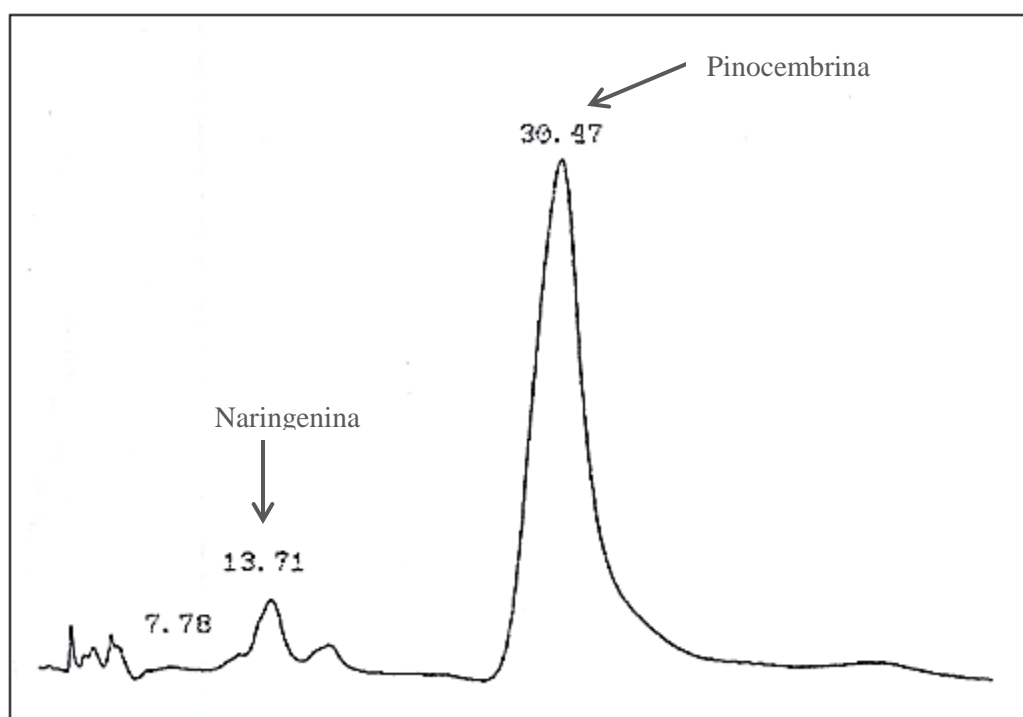


Figura 23. Cromatograma del EEP de Aguascalientes. A 290 nm, concentración $0.3 \frac{mg}{mL}$, C.S 2.50, ATT 6, flujo $0.4 \frac{mL}{min}$ y tiempo de corrida de 60 min.

La identificación de quercetina (3,3',4',5,7-Pentahidroxi flavona), crisina (5,7-dihidroxi flavona), naringenina (4',5,7-trihidroxi flavanona) y pinocembrina (5,7-dihidroxi flavanona) en los extractos de los propóleos, se realizó tomando como base los tiempos de retención de los estándares obtenidos experimentalmente.

La tabla 6 presenta los flavonoides que se identificaron en cada uno de los EEP, así como el tiempo de retención de cada uno, para todos se usó una longitud de onda de 290 nm.

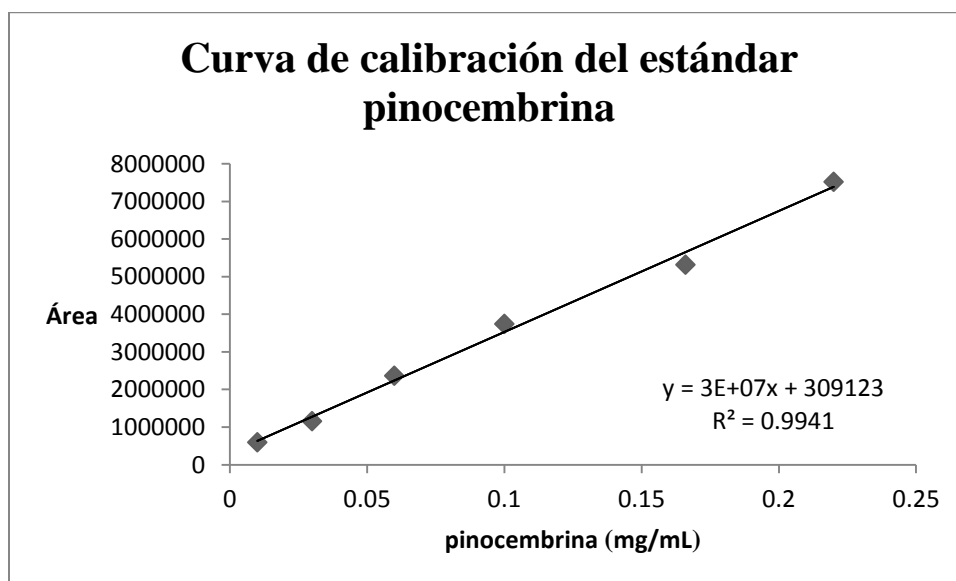
Tabla 6. Flavonoides que se identificaron en cada uno de los EEP con sus respectivos tiempos de retención, empleando una longitud de onda de 290 nm. ± Desviación estándar.

Propóleo (EEP)	Flavonoide identificado	tr (min)
FESC	Naringenina	13.01 ± 0.51
	Pinocembrina	30.51 ± 1.59
Colima	Pinocembrina	29.42 ± 0.60
Aguascalientes	Naringenina	13.71 ± 0.36
	Pinocembrina	30.47 ± 0.53

Una vez identificadas la naringenina y la pinocembrina en cada uno de los tres propóleos que se trabajaron, se llevó a cabo la cuantificación para cada uno. Se cuantificaron prepararon una curva de calibración de pinocembrina y de naringenina, se inyectaron al equipo para obtener sus áreas correspondientes (tabla 7 y 8), información que permitió obtener las curvas de calibración (gráfica 1 y 2).

Tabla 7. Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones del estándar de pinocembrina.

Pinocembrina	
Concentración (mg/mL)	Área
0.01	599090
0.03	1161240
0.06	2363801
0.1	3743525
0.166	5318793
0.22	7520279

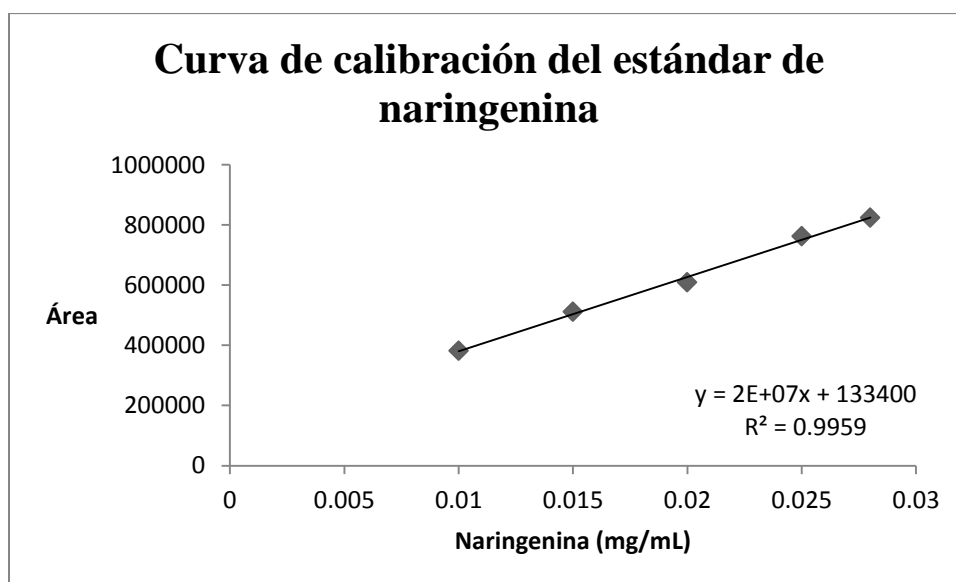


Gráfica 1. Curva de calibración del estándar pinocembrina.

En la siguiente tabla se presentan las concentraciones que se usaron para la curva de calibración del estándar naringenina, la cual solo se empleó para cuantificar el contenido de naringenina en los EEP de FESC y Aguascalientes, ya que Colima no presentó naringenina.

Tabla 8. Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones del estándar de naringenina.

Naringenina	
Concentración (mg/mL)	Área
0.01	381405
0.015	511365
0.02	609094
0.025	762573
0.028	823758



Gráfica 2. Curva de calibración del estándar de naringenina.

Por medio de interpolación tomando como referencia el área obtenida en los cromatogramas de cada propóleo se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 9. Miligramos de flavonoide obtenidos para cada EEP, de las curvas de calibración de naringenina y pinocembrina. \pm Desviación estándar.

Flavonoides	EEP de FESC-C4 (mg/mL)	EEP de Colima (mg/mL)	EEP de Aguascalientes (mg/mL)
pinocembrina	0.14 ± 0.0082	0.0295 ± 0.0010	0.227 ± 0.0075
naringenina	0.03 ± 0.0095	-	0.0163 ± 0.0035

Pero tomando en cuenta que la solución original que se preparó fue 6mg de propóleo en 2mL de MeOH, de la cual se tomaron 100 μ L y se aforaron a un volumen final de 1 mL, esta última fue la solución que se inyectó al equipo de HPLC; por lo tanto haciendo los cálculos necesarios y recordando que los resultados se reportaran en gramos de flavonoide (F)/100 gramos de propóleo, se obtienen los siguientes resultados.

En la siguiente tabla se presentan los gramos de cada uno de los flavonoides/100 g de propóleo, identificados para cada uno de los EEP.

Tabla 10. Resultados obtenidos de la cuantificación de los flavonoides de cada EEP. \pm Desviación estándar.

Flavonoides	EEP de FESC-C4 (g de F/100 g de propóleo)	EEP de Colima (g de F/100 g de propóleo)	EEP de Aguascalientes (g de F/100 g de propóleo)
pinocembrina	45.39 \pm 3.78	9.83 \pm 0.35	75.66 \pm 2.50
naringenina	10.27 \pm 3.14	-	5.43 \pm 1.16

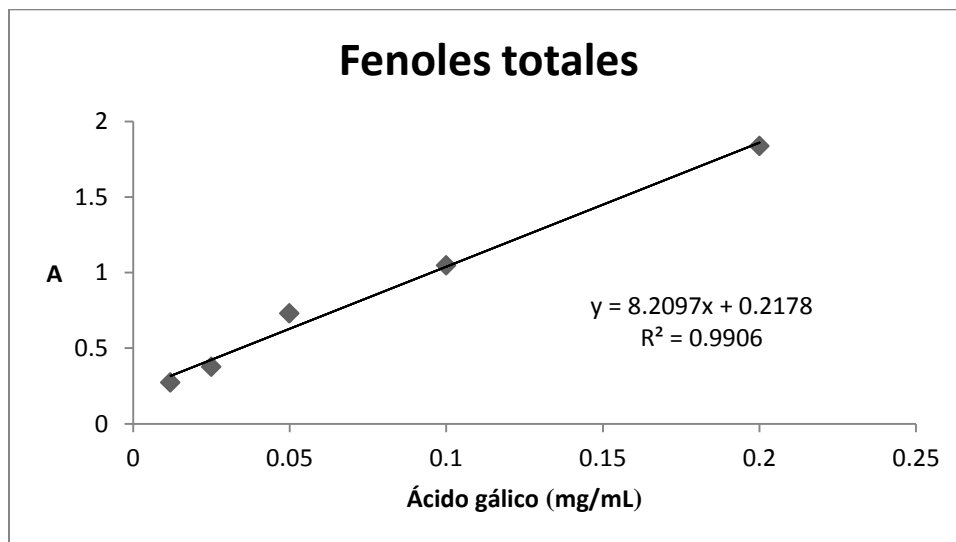
VI.3. Contenido de Fenoles totales (CFT).

Para poder obtener el contenido de fenoles totales se leyeron las absorbancias del ácido gálico a diferentes concentraciones.

Tabla 11. Absorbancias de diferentes concentraciones de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico ($\frac{mg}{mL}$)	Absorbancia (A)
0.0120	0.273
0.0250	0.3769
0.0500	0.7302
0.1000	1.0479
0.2000	1.8380

Obteniendo la siguiente gráfica.

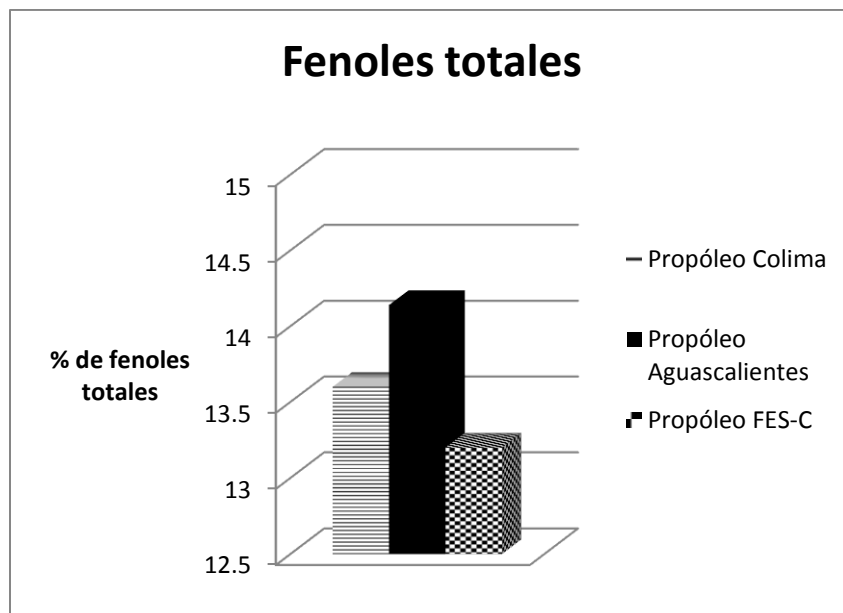


Gráfica 3. Curva de calibración de ácido gálico.

Se obtuvieron las absorbancias de cada EEP y con estos datos se leyeron las concentraciones de fenoles totales en la curva de calibración del ácido gálico, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 12. mg de equivalentes de ácido gálico/g de EEP, % de fenoles totales obtenidos en cada uno de los EEP. Los resultados representan la media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

EEP	$\left(\frac{mg}{mL}\right)$	mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP	% de fenoles totales
Colima	0.0067	136 \pm 2.23	13.6 \pm 4.47
Aguascalientes	0.007	141.4 \pm 2.22	14.14 \pm 4.44
FES-C	0.0066	132 \pm 0.53	13.2 \pm 1.06



Gráfica 4. % de fenoles totales que contiene cada uno de los EEP.

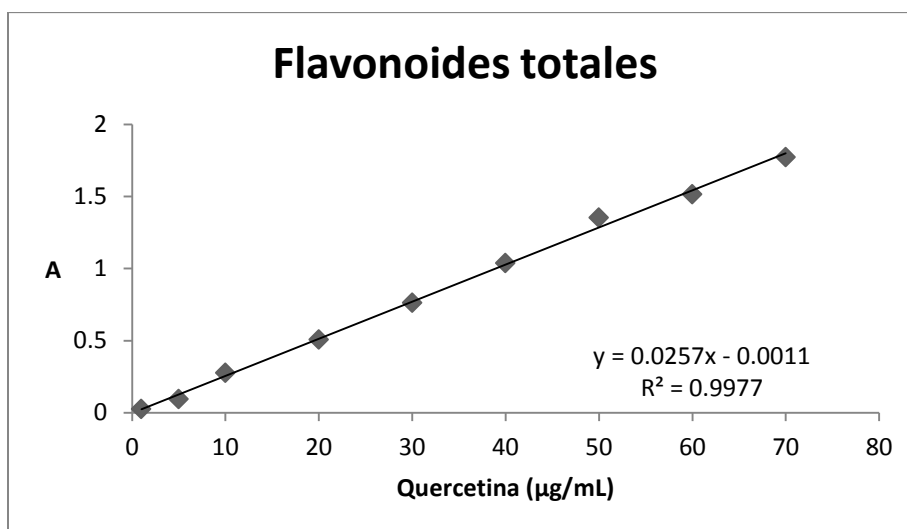
VI.4. Contenido de flavonoides totales.

Para poder obtener el contenido de flavonoides totales se leyeron las absorbancias de quercetina a diferentes concentraciones.

Tabla 13. Absorbancias de diferentes concentraciones de quercetina.

Concentración de quercetina ($\frac{\mu g}{mL}$)	Absorbancia (A)
1	0.0262
5	0.0950
10	0.2772
20	0.5065
30	0.7622
40	1.0376
50	1.3520
60	1.5154
70	1.7720

Obteniendo la siguiente gráfica.

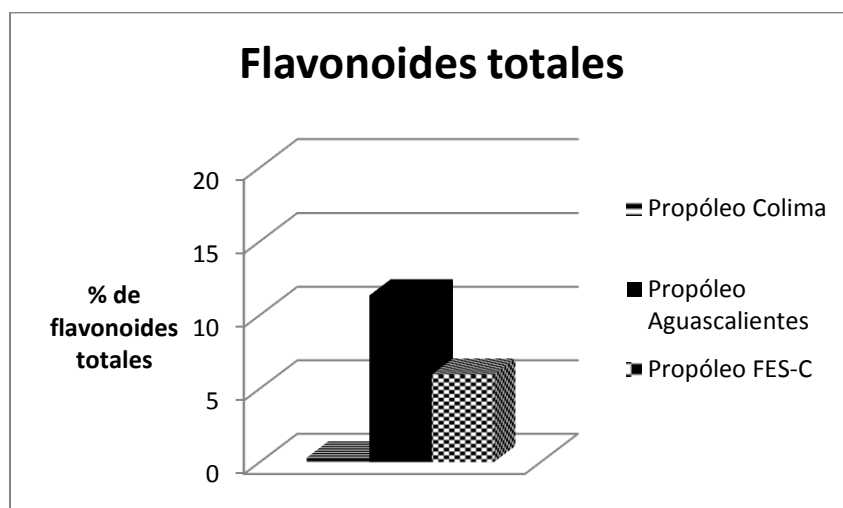


Gráfica 5. Curva de calibración de quercetina.

Se obtuvieron las absorbancias de cada EEP y con estos datos se leyeron las concentraciones de flavonoides totales en la curva de calibración de quercetina, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 14. mg equivalentes de quercetina/g de EEP de cada uno de los EEP. Los resultados representan la media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

EEP	Concentración obtenida de la interpolación ($\frac{\mu g}{mL}$)	mg equivalentes de quercetina/g de EEP.	% de flavonoides
Colima	1.7732	2.955 ± 0.83	0.3 ± 0.11
Aguascalientes	68	113.324 ± 1.54	11.33 ± 0.26
FES-C	35.65	59.4 ± 2.51	5.94 ± 0.41



Gráfica 6. % de flavonoides totales de cada uno de los EEP.

VI.5. Evaluación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se evaluó con los extractos etanólicos de cada propóleo y se usó como control positivo la quercetina, ya que se sabe que posee gran actividad antioxidante. En la Figura 24 conforme aumenta la concentración de quercetina se observa el desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro lo cual muestra la fuerte actividad antioxidante que presenta el estándar de quercetina. Lo mismo sucedió con los EEP dependiendo del grado de actividad antioxidante que presentaron.

50 μ L de quercetina y su respectivas ppm +
150 μ L de DPPH

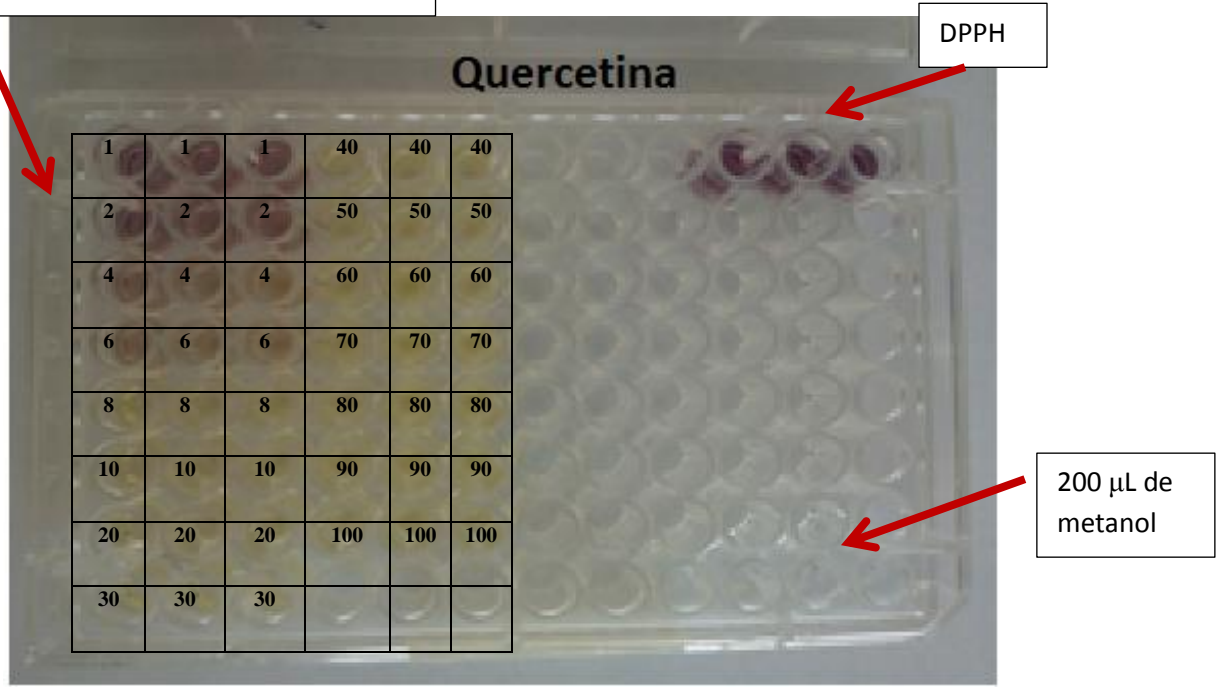
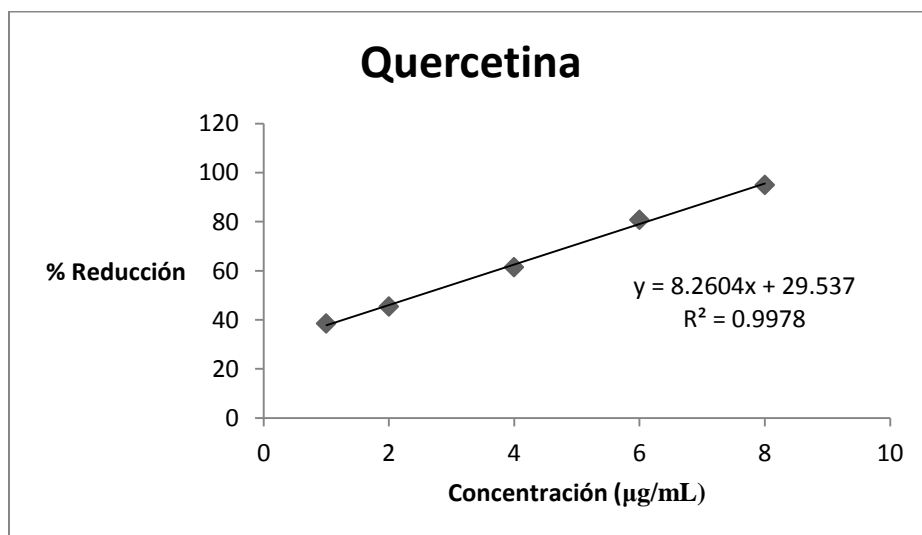


Figura 24. Caja de Elisa de 96 pozos, que muestra la actividad antioxidante de la quercetina (control positivo), mediante el método de reducción del radical DPPH.

Por medio del método de reducción del radical DPPH se obtuvo el % de reducción para el control positivo (quercetina) y para los EEP. Con estos resultados se obtuvieron las gráficas para cada EEP y para la quercetina.

Tabla 15. % de reducción del DPPH, que presentó la quercetina. Los resultados presentan la media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Reducción
1	38.452 ± 1.51
2	45.448 ± 5.66
4	61.523 ± 6.22
6	80.743 ± 2.58
8	94.984 ± 0.46



Gráfica 7. % de reducción del DPPH, que presentó la quercetina.

Se obtuvo la ecuación de cada gráfico y se realizó el siguiente despeje para conocer el valor de CA_{50} de cada EEP y de la quercetina, este valor nos indica la cantidad de μg que se necesitan para hacer reaccionar el 50% de DPPH, por lo tanto mientras menor sea el valor de CA_{50} mayor será su actividad antioxidante.

$$y = 8.2604x + 29.537$$

$$50\% = 8.2604x + 29.537$$

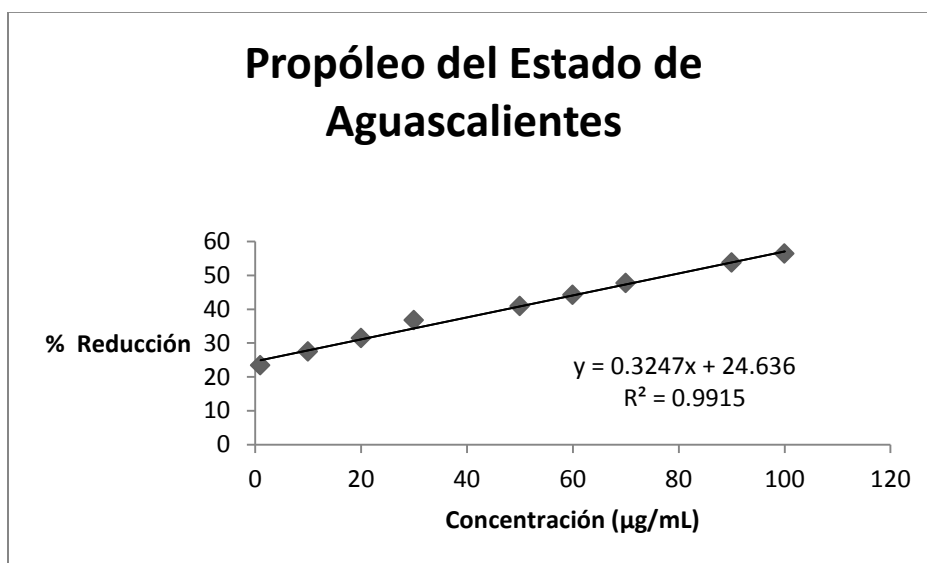
$$X = \frac{50 - 29.537}{8.2604} = 2.4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

La quercetina (control positivo) mostró una CA_{50} de $2.4 \mu\text{g/mL}$ (Gráfica 7) (Figura 24).

EEP de Aguascalientes

Tabla 16. % de reducción del EEP de Aguascalientes. Los resultados presentan la media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Reducción
1	23.3988 \pm 1.46
10	27.4331 \pm 2.8
20	31.4170 \pm 1.55
30	36.7120 \pm 0.93
50	40.8976 \pm 2.78
60	44.1250 \pm 1.52
70	47.6550 \pm 0.51
90	53.7065 \pm 1.78
100	56.3287 \pm 1.06



Gráfica 8. Gráfica del % de reducción del EEP de Aguascalientes.

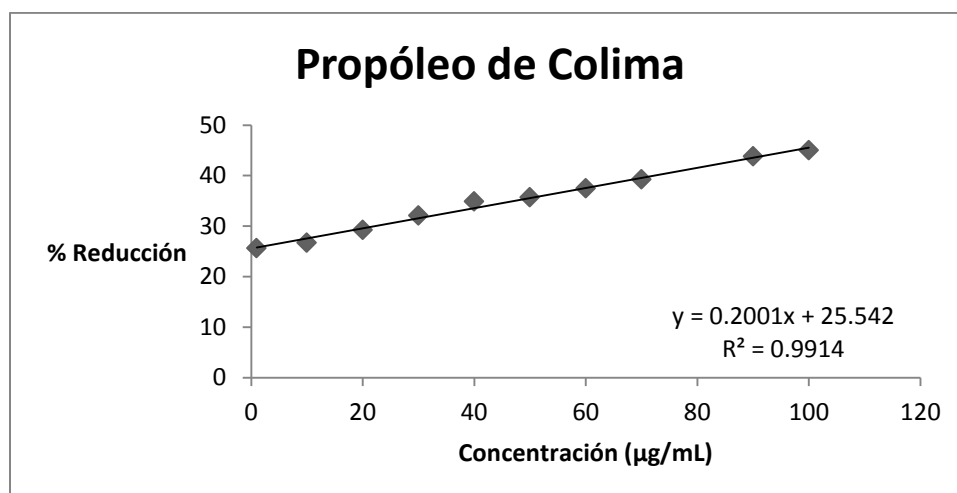
$$y = 0.3247x + 24.636$$
$$50\% = 0.3247x + 24.636$$
$$X = \frac{50 - 24.636}{0.3247} = 78.1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

EEP de Aguascalientes obtuvo una CA_{50} de 78.1 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfica 8).

EEP de Colima

Tabla 17. % de reducción del EEP de Colima. Los resultados presentan la media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Reducción
1	25.6324 \pm 2.74
10	26.6825 \pm 1.42
20	29.2124 \pm 1.08
30	32.0763 \pm 1.82
40	34.8926 \pm 1.34
50	35.7040 \pm 0.97
60	37.4701 \pm 1.01
70	39.2362 \pm 0.64
90	43.7708 \pm 1.72
100	45.0119 \pm 0.66



Gráfica 9. % de reducción del EEP de Colima.

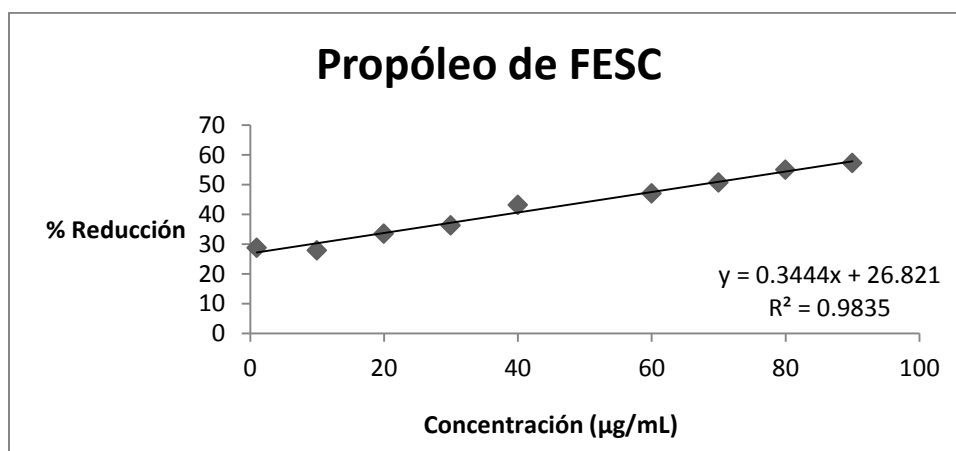
$$y = 0.2001x + 25.542$$
$$50\% = 0.2001x + 25.542$$
$$X = \frac{50 - 25.542}{0.2001} = 122.2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

EEP de Colima presentó una CA_{50} de 122.2 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfica 9).

EEP de FESC

Tabla 18. % de reducción del EEP de FESC. Los resultados presentan la media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Reducción
1	28.7456 \pm 2.25
10	27.9326 \pm 0.88
20	33.5075 \pm 0.51
30	36.2369 \pm 2.68
40	43.1475 \pm 1.57
60	47.0383 \pm 1.81
70	50.6968 \pm 2.9
80	54.9361 \pm 2.63
90	57.2590 \pm 2.84



Gráfica 10. % de reducción del EEP de FES-C.

$$y = 0.3444x + 26.821$$

$$50\% = 0.3444x + 26.821$$

$$X = \frac{50 - 26.821}{0.3444} = 67.3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

EEP de FES-C presentó una CA_{50} de 67.3 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfica 10).

En la siguiente tabla se presenta de manera resumida los resultados obtenidos en cada una de las pruebas a las que fueron sometidos los EEP de Aguascalientes, Colima y FESC.

Tabla 19. Gramos de naringenina/100 g de propóleo, g de pinocembrina/100 g de propóleo, contenido de fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de cada uno de los EEP.

	Aguascalientes	FESC	Colima
g de naringenina/100 g de propóleo	5.43	10.27	0
g de pinocembrina/100 g de propóleo	75.66	45.39	9.83
Contenido de fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP)	141.4	132	136
Contenido de flavonoides totales (mg equivalentes de quercetina/g de EEP)	113.324	59.4	2.955
CA₅₀ ($\frac{\mu g}{mL}$)	78.1	67.3	122.2

VII. DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue identificar y cuantificar el contenido de quercetina, crisina, naringenina y pinocembrina, mediante cromatografía líquida de alta resolución en tres propóleos de diferentes regiones de México. Los propóleos provienen del Estado de Aguascalientes, del Estado de Colima y de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el municipio de Cuautitlán Izcalli perteneciente al Estado de México.

Para lo cual fue necesario obtener los extractos etanólicos de cada propóleo obteniendo que el propóleo con el mejor rendimiento fue el de Aguascalientes, en la (Tabla 4) se puede observar que después siguió el propóleo de Colima y el de menor rendimiento el propóleo de la FESC, lo cual nos indica que al tenerlo en bruto fue el que contenía menos impurezas y en su composición menor porcentaje de cera.

En los cromatogramas obtenidos de la cromatografía líquida de alta resolución, la cual es suficientemente sensible para la determinación de los ácidos fenólicos y flavonoides en muestras de propóleo como se comprobó en el presente trabajo y como lo había comprobado (Pellati, 2011) en el trabajo que realizó con extractos de propóleos representativos del mercado Italiano, la cromatografía líquida de alta resolución nos permitió identificar la presencia de pinocembrina y naringenina en los EEP de FESC, Colima y Aguascalientes (Figura 21-23). La pinocembrina considerada dentro de algunos de los componentes patrón de los propóleos europeos (Gutiérrez, 2011, p. 63), ya que estos compuestos son considerados clave para llevar a cabo un control de calidad de los productos realizados a base de propóleos, el cual es uno de los proyectos que se realizan en el laboratorio 6 de la UIM, FESC, conociendo que el contenido de flavonoides está directamente relacionado con la actividad antibacteriana (Gutiérrez, 2011, p. 68).

Al llevar a cabo la cuantificación se encontró que el propóleo con mayor cantidad de pinocembrina fue el de Aguascalientes presentando 75.66 g de pinocembrina/100 g de propóleo y 5.43 g de naringenina/100 g de propóleo y el de la FESC presentó una mayor cantidad de naringenina 10.27 g/100 g de propóleo y 45.39 g de pinocembrina/100 g de propóleo, mientras que el de Colima únicamente contiene pinocembrina en 9.83 g/100 g de propóleo, por lo que se espera que los tres propóleos tengan una buena calidad y potencial biológico, ya que estos resultados son respaldados con los obtenidos en las pruebas de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante que presentaron, debido a que el contenido de fenoles y flavonoides en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico. En el presente estudio, se obtuvieron como resultados de fenoles totales los siguientes valores: el propóleo de Aguascalientes presento 141.4 mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP, FESC 132 mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP y Colima 136 mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP. Para el contenido de flavonoides totales el propóleo de Aguascalientes presentó 113.324 mg equivalentes de quercetina/g de EEP, FESC 59.4 mg equivalentes de quercetina/g de EEP y Colima 2.955 mg equivalentes de quercetina/g de EEP.

Normativas como la de Argentina y Brasil, han establecido requisitos mínimos de concentración que deben cumplir el propóleo y sus extractos para ser utilizados como materia prima en el desarrollo de productos; para los compuestos etanólicos, el valor mínimo es de 50 mg equivalentes de ácido gálico/g de EEP, y para flavonoides, de 5 mg equivalentes de quercetina/g de EEP (Palomino, 2009, p.392). De acuerdo con lo anterior, los propóleos de Aguascalientes, FESC y Colima satisfacen los requisitos de calidad establecidos por estas normativas, excepto Colima en el caso de flavonoides totales ya que su valor (2.955 mg equivalentes de quercetina/g de EEP) queda por debajo del establecido en la norma (5 mg equivalentes de quercetina/g de EEP).

Como se puede observar la concentración en la que se encuentran los flavonoides en los EEP difiere, por lo que se puede atribuir a que su composición es muy compleja y depende principalmente de su origen botánico y de las condiciones geográficas y climáticas donde se encuentren las plantas que producen las resinas. Se considera un producto de origen mixto, vegetal y animal (Lozina, 2010, p. 102).

El centro de atención sobre los flavonoides ha estado dirigido últimamente a su actividad antioxidante, dada su reconocida capacidad de atrapar radicales libres, quelar metales y por poseer un bajo potencial rédox (Pérez, 2003, p. 49). Es por eso que se evaluó para cada uno de los extractos etanólicos de cada propóleo, y se encontró que presentaron una actividad antioxidante muy variada; ya que sus valores de CA_{50} (EEP de Colima CA_{50} es de 122.2 $\mu\text{g/mL}$, EEP de Aguascalientes CA_{50} es de 78.1 $\mu\text{g/mL}$ y EEP de FESC CA_{50} es de 67.3 $\mu\text{g/mL}$; se alejan al valor de la quercetina (control positivo) que mostró una CA_{50} de 2.4 $\mu\text{g/mL}$, ya que es un flavonoide que se caracteriza principalmente por su fuerte actividad antioxidante. Esto puede ser debido a que los extractos son una mezcla de una gran cantidad y variedad de compuestos y la quercetina es un estándar el cual se encuentra puro. Sin embargo, si presentaron actividad antioxidante ya que reducen al radical libre del DPPH.

Finalmente, relacionando todos los datos obtenidos de cada muestra de propóleo, se puede afirmar que el propóleo de Aguascalientes es el que contiene la mayor cantidad de flavonoides (113.324 mg equivalentes de quercetina/g de EEP), pero la mejor capacidad antioxidante la presentó el propóleo de la FESC puesto que tuvo una concentración mayor de naringenina (10.27 g de naringenina/100 g de propóleo). Sin embargo, dadas las propiedades (antibacteriana, antiparasitaria, anticancerígena, antitumoral, hepatoprotector e incluso citostático (Gutiérrez, 2011, p. xiii), antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antifúngica, anestésica y de regeneración tisular (Martínez, 2008, p. 47)) que presentan los flavonoides, seguramente es el propóleo de Aguascalientes el que tendría la mayor actividad medicinal. De tal forma queda claro que al analizar diversas características químicas del propóleo, éstas coinciden directamente con el análisis realizado por cromatografía líquida de alta resolución, en cuanto al contenido de flavonoides.

VIII. TRABAJOS A FUTURO

Considerando los resultados obtenidos experimentalmente y tomando en cuenta que el objetivo de este trabajo fue implementar el método de cromatografía líquida de alta resolución para la identificación y cuantificación de flavonoides presentes en propóleos mexicanos, se observaron algunas condiciones de trabajo que deben mejorarse como el uso de una microbalanza analítica para pesar los estándares y propóleos y tener menor porcentaje de error en el pesado, así como hacer los cambios adecuados para disminuir el % de error de la ordenada al origen en las curvas de % de reducción y la curva de calibración de la naringenina.

Tomando en cuenta que este trabajo es un precedente para el desarrollo de métodos que permitan obtener el perfil químico de los propóleos; ya que la información existente sobre la composición química de estos es limitada.

IX. CONCLUSIONES

- El análisis por cromatografía líquida de alta resolución es adecuado para detectar y cuantificar los flavonoides presentes en los propóleos.
- Los valores encontrados de fenoles y flavonoides totales cumplen con aquellos establecidos por diferentes normatividades técnicas para la fijación de identidad y calidad de propóleos.
- Se encontró una buena correlación entre el contenido de flavonoides, actividad antioxidante y el contenido de fenoles de los extractos.
- Su alto contenido de fenoles y flavonoides de los tres EEP, la actividad antioxidante que presentan, los hacen promisorios como agentes activos para la elaboración de productos con fines terapéuticos.

X. PERSPECTIVAS

Con la implementación del método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se estableció el precedente para identificar y cuantificar otros flavonoides; ya que el contenido de los flavonoides se relaciona directamente con la actividad antibacteriana (Gutiérrez, 2011, p. 68). En el presente trabajo se identificó y cuantificó naringenina y pinocembrina en los propóleos. Con esto se espera establecer en un futuro normas internas de calidad para la evaluación de los propóleos que se emplearán en las formulaciones de diversos productos con fines terapéuticos, en el laboratorio seis de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán.

Ya que el propóleo es un producto prometedor para la medicina y la industria farmacéutica tomando algunas de las ventajas que se atribuyen a los extractos de propóleos es su superioridad respecto a los antibióticos que son:

- No afecta la presencia de los microorganismos miembros de la microbiota residente, capaces de impedir la implantación de bacterias patógenas en los sitios anatómicos que ocupan.
- No degrada la mucosa del tracto gastrointestinal como hacen los antibióticos
- No promueve la resistencia de microorganismos mutantes (Rojas, 2008, p. 61).

Por ello es importante continuar con esta investigación, la cual podría enfocarse a un estudio detallado de la composición química del propóleo tomando en cuenta que el problema principal para su industrialización y comercialización, está ligado a que debido a su heterogeneidad es importante determinar estándares de calidad.

Es evidente la necesidad de pruebas adicionales y de investigar en profundidad los efectos biológicos del propóleo, especialmente considerando la variabilidad de su composición. Al mismo tiempo parece necesario desarrollar protocolos de producción debidamente estandarizados ya que ha sido abandonado temporalmente por la industria farmacéutica. Sólo se tienen preparados galénicos consistentes en extractos hidroalcohólicos carentes de protocolos de producción. Sin embargo, existe un renovado interés por parte de la industria farmacéutica y dermocosmética (Peña, 2008, p. 22 y 23).

XI. APÉNDICES

Apéndice 1

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

(Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría en base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6^+ . La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5^+ y 6^+ , formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales.

Se utiliza una solución estándar ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL (tabla 20).

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), se toma una alícuota de 250 μ L de esta y se agregan 750 μ L de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL (tabla 20).

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determina por triplicado. Tomando como blanco el agua destilada.

Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

Tabla 20. Concentraciones de ácido gálico para la curva patrón.
Curva patrón

Tubo B (blanco)	[Ácido gálico] mg/mL	μL patrón	μL agua destilada
1	0.00625	31.25 (31)	968.75 (968.5)
2	0.0120	62.5	937.5
3	0.025	125	875
4	0.05	250	750
5	0.1	500	500
6	0.2	1000	0
P (problema)	-	250	750

Apéndice 2

CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES

(Ramamoorthy et al., 2007)

El método espectrofotométrico con Tricloruro de aluminio exhibe sensibilidad, especificidad y selectividad en este tipo de cuantificaciones. Se forman complejos de color amarillo (Salamanca, 2007).

MÉTODO DOWD:

El contenido de flavonoides totales se determina usando una curva patrón con quercetina (1-70 mg/L).

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK:

1 mg de quercetina- 1 mL de MeOH

Considerando que el volumen total de solución STOCK es 1785 μ L, se emplearan 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

Tabla 21. Concentraciones de quercetina para la curva de calibración.

[] ppm	μ L STOCK (quercetina)	μ L MeOH	(AlCl ₃) al 2%
1	3	2997	3
2	6	2994	3
3	9	2991	3
4	12	2988	3
5	15	2985	3
6	18	2982	3
7	21	2979	3
8	24	2976	3
9	27	2973	3
10	30	2970	3
20	60	2940	3
30	90	2910	3
40	120	2880	3
50	150	2850	3
60	180	2820	3
70	210	2790	3

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO EN SOLUCIÓN:

Para el análisis de flavonoides totales del extracto se preparan 3 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en metanol, se mezcla con 3 mL del extracto en solución a probar (0.4 mg/mL).

- La prueba se hace por triplicado.

PREPARACIÓN DEL BLANCO:

- 3 mL del extracto en solución con 3 mL de metanol sin (AlCl_3).

LECTURA:

- Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm.
- Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar.
- Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

Apéndice 3

MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRACIL (DPPH) (Okusa et al., 2007)

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 µg/mL), por medio de espectrometría UV-VIS.

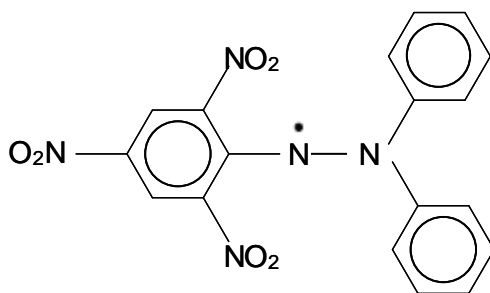
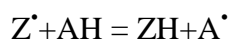


Figura 25. Difenilpicrilhidracilo (DPPH) (radical libre)

La cual es caracterizada como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre de la molécula en su conjunto, de modo que las moléculas no lo hacen dimerise, como sería el caso con la mayoría de los otros radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción centrada en solución de etanol a aproximadamente 520 nm (Molyneux, 2003).

Cuando la solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida teniendo como consecuencia la pérdida de este color violeta (aunque debería esperarse que sea un color amarillo pálido residual del grupo picrilo todavía presente) (Molyneux, 2003).

Representando el radical DPPH por Z^{\bullet} y la molécula donante por AH, la reacción es:



Donde ZH es la forma reducida y A^{\bullet} es el radical libre producido en esta primera parte. Este radical se someterá a reacciones adicionales que controlaran la estequiometría global, es

decir, el número de moléculas de DPPH reducida (decolorado) por uno molécula del reductor (Molyneux, 2003).

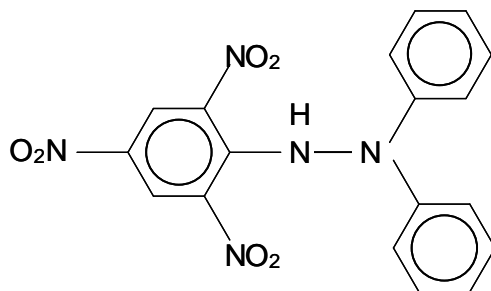


Figura 26. Difenilpicrilhidracina (no radical)

Para la interpretación de los resultados del método DPPH, se emplea el parámetro CA₅₀, el cual está definido como la concentración antioxidante a la cual el DPPH se reduce al %50. Lo cual implica que a mayor actividad antioxidante menor será el valor de CA₅₀ (Molyneux, 2003).

El método es el siguiente:

Se prepara una solución STOCK con 10 mg del extracto o fracción a evaluar y 10 mL de MeOH grado HPLC. Las concentraciones a evaluar son las siguientes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm, las cuales se preparan siguiendo tabla 22.

La solución de DPPH se prepara en un matríz aforado pesando 0.00197 (0.002 gr) y agregando 50 mL de MeOH grado HPLC.

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100 µg/mL) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz y se mantiene en agitación constante durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA.

Como control negativo se llenan pozos con 200 µl de metanol. Y para control positivo se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Tabla 22. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.

[] ppm	µl STOCK	µl MeOH
1	4	996
2	8	992
4	16	984
6	24	976
8	32	968
10	40	960
15	60	940
20	80	920
25	100	900
30	120	880
35	140	860
40	160	840
45	180	820
50	200	800
60	240	760
70	280	720
80	320	680
90	360	640
100	400	600

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(C - E)}{C} * 100$$

En donde:

C= (Absorbancia promedio del DPPH - absorbancia promedio del metanol)

E= (Absorbancia promedio de la muestra - absorbancia del metanol).

Una vez obtenidas las absorbancias de cada una de las muestras (propóleos y quercetina) así como la absorbancia del DPPH y del MeOH. Se calcula el promedio de cada una ya que la prueba se realizó por triplicado, al valor promedio de cada muestra y al del DPPH se le resta el valor promedio de MeOH. Y los valores se sustituyen en la ecuación para conocer el % de reducción.

XII. LISTA DE REFERENCIAS

- Aranda, J. I. (2011). “*Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar muestras de 17-β estradiol y progesterona provenientes de perfiles de disolución*”. México: UNAM, Facultad de Química. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Alvarez, A. y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo argentino, *Acta Farm. Bonaerens*, 23 (3): 369-72.
- Gutiérrez, E. (2011). *Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aisladas de conejos*. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.
- Harris, D. (2001). *Análisis químico cuantitativo*. (2ª ed.). España: Reverté, S. A.
- Harvey, D. (2002). *Química analítica moderna*. Madrid España: Mc GrawHill.
- Herrera, C. L., Fritz, O., Montenegro, G., Alvear, M., Del Sol, M. y Salazar, L. A. (2010). El propóleo reduce la esteatosis hepática inducida por dieta en ratones. *Int. J. Morphol*, 28(1):75-84.
- Jean, M.P. (1990). *Guía del apicultor*. Madrid España: Mundi-Prenda.
- Liu, R. (2012). Pinocembrin protects against β-amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. Recuperado el 15 de Mayo de 2013, de <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/105>.

- Londoño, A., Ávila, J. G., Canales, M. M., Hernández, C. T., Serrano, P. R., Flores, C. M, et al. (2012). Antibacterial Comparative Study Between Extracts of Mexican Propolis and of Three and Plants Wich Use Apis Mellifera for its Production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8): 1250-1254.
- Lozina, L. A., Peichoto, M. E., Acosta, O. C. y Granero, G. E. (2010). Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de 15 propóleos argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29 (1): 102-10.
- Macedo, E. M. (2009). Publicación virtual red peruana de alimentación y nutrición. Lima.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Departamento de Fisiología, Universidad de León y *Hospital de León. España*, Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278.
- Martínez, C. (2008). *Efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y el daño estructural de Candida albicans*. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga.
- Martino, V. (2000). Los Flavonoides como Promisorios Agentes Preventivos y Terapéuticos, *Acta Farnz. Bonaerense*, 19 (4): 303-8.
- Merck, S.A. industrias químicas. (2000). Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a Profesionales.
- Molyneux, P. (2003). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Recuperado el 7 de Mayo de 2013, de <http://www.aseanbiodiversity.info/Abstract/53004092.pdf>.

- Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M. y Duez, P. (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 476-481.
- Ortega, N. S., Benitez, N. y Cabezas, F. A. (2010). *Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca*. Artículos de Investigación Científica y Tecnológica.
- Palomino, L., García, C., Rojano, B. y Durango, D. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Vitae* [online], vol.16, n. 3, 389-395. Recuperado el 17 de Febrero de 2012, de:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012140042009000300013&lng=en&nrm=iso. ISSN 0121-4004.
- Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D y benvenuti S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS Methods for Metabolite Profiling of Propolis Extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (55) 934–948.
- Peña, R. C. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1): 17-26.
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 22(1):48-57.
- Pietrzyk, D. J. (1989). *Química analítica*. (2ª ed.). México: Interamericana S. A. de C. V.
- Ramamoorthy, P. K. y Bono, A. (2007). Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content of morinda citrifolia Fruit Extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* Vol. 2, No. 1 70 – 80.

- Ramírez, A. A. (2011). *Efecto inhibitorio del extracto de Propóleo en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina*. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga.
- Rice, E. C. (2003). *Flavonoids in Health and Disease*. (2^a ed.). United States of America: Marcel Dekker.
- Rojas, N. (2008). *Variabilidad biológica de los propóleos de Cuba*. Actas del XXII Seminario Americano de Apicultura. Julio 28-31 Mérida, Yucatán, 2008, 59-66.
- Root, A. I. (1990). *El ABC y XYZ de la apicultura: Enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas*. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio sur S. A.
- Rubison, F.J y Rubison, K. A. (2000). *Química analítica contemporánea*. México: Pearson Educación.
- Salamanca, G., Correa, I. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Venezuela*. ISSN: 0798-7269. Vol. 25, Núm. 2, 2007, pp. 95-102
- Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Reventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Vol. 299.
- Skoog, D. A. (1995). *Análisis Instrumental*. México: McGRAW-HILL.
- Skoog, D. A. (2005). *Fundamentos de Química analítica*. (8^a ed.). México: CENGAGE-Learning.

Sosa, U. (2011). *Validación del método analítico para el análisis de cloruro de benzalconio por HPLC en solución oftálmica*. México: UNAM, Facultad de Química.
Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.