



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de acacetina y 4',7-
dimetilnaringenina en diferentes formulaciones
farmacéuticas que contienen propóleo.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DAVID ACEVES VARGAS



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

- PRESIDENTE:** Profesor: María Teresa Buentello Rodríguez
- VOCAL:** Profesor: Arturo Navarro Ocaña
- SECRETARIO:** Profesor: Blanca Estela Rivero Cruz
- 1er. SUPLENTE:** Profesor: José Alberto Rivera Chávez
- 2°SUPLENTE:** Profesor: Ma. De los Dolores Campos Echeverria

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111. Conjunto E

Facultad de Química UNAM

Asesor

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Supervisor Técnico

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

David Aceves Vargas

AGRADECIMIENTOS

A la maestra Carmen Parra por enseñarme tantas cosas en su clase, y soportarme en ese periodo.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz por su asesoría y confianza que deposito en mí para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz, gracias por ayudarme a comprender los conocimientos básicos de la farmacognosia y brindarme su amistad.

A los miembros del jurado María Teresa Buentello Rodríguez y Arturo Navarro Ocaña, por la revisión del manuscrito de tesis.

A mis hermanos de la Facultad, Marlen, Herlen, Alicia, Ana Lili, Karina Margaret, Diana Dulces, Kenia, Jessica Cruz, Ana Unda, Diana Gomora, Kipsain, Jorge Zavala, Toño "Mara", Goyo, Farid, Hugo Rico, Rodrigo, Rubén "Gerber", Betito, Guillermo Valencia y Manolo por ayudarme a pasarme bien en los días de estudio, a todos los quiero mucho.

A La Familia Carmona Aceves por ayudarme en todos estos años y brindarnos un hogar en donde vivir por tanto tiempo desinteresadamente.

A la Familia Velázquez Aceves, por brindarme su apoyo en estos años y darme su cariño.

A Luis Alberto Castro Martínez, ya que me enseñó muchas cosas en la preparatoria y que es como mi hermano al cual aprecio mucho.

DEDICATORIAS

A mi madre, Elia Aceves Vargas, quien me ha apoyado a lo largo de estos años confiando en mi y teniendo la esperanza en que tendré una mejor calidad de vida. Gracias por tolerarme todo este tiempo, nunca te dejare sola y no te fallare.

A mi prima, Francia M. Velázquez Aceves, cada minuto que estuve contigo siempre me la pase bien, con tus ocurrencias y maldades, tus bromas y enseñanzas. Te extraño mucho.

A mi hermano Roberto Carlos, gracias por apoyarme en todos los años que vivimos juntos, por tus consejos “maritales”, por tu tolerancia y tu cariño que me brindaste toda tu vida, en donde estés espero que seas feliz, algún día estaré contigo para seguir conviviendo.

ÍNDICE

	Página
1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 DEFINICIÓN Y USOS DEL PROPÓLEO.....	4
2.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL PROPÓLEO.....	6
2.3 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DEL PROPÓLEO.....	9
2.4 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN.....	13
2.5 REGULACIÓN SANITARIA DE PRODUCTOS ELABORADOS CON PROPÓLEOS.....	15
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
3.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	21
3.2 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).....	22
3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TRABAJO.....	23
3.4 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.....	23
3.5 LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	24
3.6 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
4.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.....	29
4.2 CURVA DE CALIBRACION.....	30
4.3 ANÁLISIS DE DIFERENTES PRODUCTOS CON PROPÓLEO.....	33
4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	33
4.5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACACETINA Y LA 4', 7-DIMETILNARINGENINA EN LOS PRODUCTOS ANALIZADOS.....	43
5. CONCLUSIONES.....	47
6. PERSPECTIVAS.....	48
7. BIBLIOGRAFÍA.....	49
LISTA DE ABREVIATURAS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE CUADROS.....	VI



LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
UVA	Radiación ultravioleta de onda larga
UVB	Radiación ultravioleta de onda media
UVC	Radiación ultravioleta de onda corta
No.	Número
mg	Miligramo
mL	Mililitro
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CAPE	Éster fenil etílico del ácido caféico
TLR	Toll-LikeReceptors
IL	Interleucina
BALB/c	Cepa de ratón albino
kg	Kilogramo
G2/M	Fase G2 de la mitosis
HPLC-MS	High performance liquid chromatography-mass spectrometry
°C	Grados Celsius
UV-Vis	Ultravioleta-visible
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
CG	Cromatografía de gases
RMN	Resonancia magnética nuclear
FDA	Food and Drug Administration
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
MeOH	Metanol
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
µm	Micrómetro
mm	Milímetro
µL	Microlitro
TFA	Ácido trifluoroacético
min	Minuto
g	Gramo
µg	Microgramo
T	Factor de coe
NPT	Número de platos teóricos
CV	Coefficiente de variación
x	Concentración
y	Área bajo la curva



LISTA DE ABREVIATURAS (continuación).

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
β_0	Ordenada al origen
β_1	Pendiente de la recta
r^2	Coeficiente de determinación
r	Coeficiente de correlación
IC	Intervalo de confianza
ETOH	Etanol
ACN	Acetonitrilo
LGS	Ley General de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
t_R	Tiempo de retención
DF	Distrito Federal
CCF	Cromatografía en capa fina
PROFECO	Procuraduría Federal del Consumidor



LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.	Abeja de la especie <i>Apis mellifera</i> recolectando propóleo.....	5
Figura 2.	<i>Populus nigra</i> (álamo), árbol de zona templada.....	10
Figura 3.	<i>Baccharis dracunculifolia</i> , árbol de clima tropical.....	10
Figura 4.	Estructuras de las moléculas previamente aisladas en propóleos provenientes del altiplano mexicano.....	12
Figura 5.	Regiones apícolas de México.....	13
Figura 6.	Trampa de propóleo.....	14
Figura 7.	Placa cromatográfica en capa fina de diferentes productos.....	21
Figura 8.	Tres de los veinte productos adquiridos en tiendas de autoservicio analizados en este trabajo.....	22
Figura 9.	Cromatograma obtenido con el extracto etanólico del propóleo recolectado en la delegación Milpa Alta con sus respectivos tiempos de retención.....	29
Figura 10.	Gráfica que muestra la relación lineal entre las variables para la 4',7-dimetilnaringina.....	31
Figura 11.	Gráfica que muestra la relación lineal entre las variables para la acacetina.....	32
Figura 12.	Cromatograma obtenido con la coelución del jarabe marca "K" y los marcadores químicos.....	34
Figura 13.	Cromatograma obtenido con la infusión del Té de propóleo marca "O".....	35
Figura 14.	Cromatograma obtenido con el extracto de los caramelos macizos marca "B".....	35
Figura 15.	Cromatograma obtenido con el extracto del caramelo marca "H".....	35
Figura 16.	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca "D".....	36



Figura 17.	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca “C”	36
Figura 18.	Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca “T”	36
Figura 19.	Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca “F”	37
Figura 20.	Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca “E”	37
Figura 21.	Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca “A”	37
Figura 22	Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca “L”	38
Figura 23	Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca “M”	38
Figura 24	Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca “P”	38
Figura 25	Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca “R”	39
Figura 26	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca “S”	39
Figura 27	Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca “Q”	39
Figura 28	Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca “N”	40
Figura 29	Cromatograma obtenido con la solución del atomizador con propóleo marca “I”	40
Figura 30	Cromatograma obtenido con el extracto con propóleo marca “J”	40
Figura 31	Listado emitido por la COFEPRIS en el 2010 en donde se señala la aseguración de algunos productos, entre ellos la marca “J”, analizada en este trabajo (por incumplimiento de los beneficios que ofrece a los consumidores).....	46



LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1.	Diluciones empleadas para preparar las curvas de calibración (linealidad del sistema).....	24
Cuadro 2.	Resultados obtenidos para la adecuabilidad del sistema.....	30
Cuadro 3.	Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la 4',7-dimetilnaringenina.....	31
Cuadro 4.	Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la acacetina.....	32
Cuadro 5.	Condiciones cromatográficas del método analítico.....	33
Cuadro 6.	Productos herbolarios analizados, sitio de manufactura y marcadores químicos identificados.....	42
Cuadro 7.	Productos comerciales que contienen propóleo en su composición, con la cantidad de marcadores químicos y sus unidades correspondientes.....	43



1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la historia de la humanidad, el ser humano ha sufrido padecimientos, dolor y diferentes enfermedades que van desde un resfriado común, hasta el terrible cáncer. Por este motivo tuvo la necesidad de buscar la cura para sus dolencias en el medio que lo rodeaba, conformado por la vegetación, fauna y minerales. Así se fueron estableciendo las bases de la farmacología, específicamente, la farmacognosia, al utilizar recursos naturales con alguna actividad biológica.

El paso del tiempo ha traído desarrollo tecnológico en todos los aspectos, y el área de la farmacognosia no se ha quedado atrás. En el siglo XX la tendencia en formular medicamentos ha sido la de sintetizar principios activos, ya que en algunos casos el proceso es más costeable y más rápido que extraerlos y aislarlos de la fuente natural. Esa es una de las características de la medicina alopática, así como su industrialización. Pero en estos últimos años, la sociedad y la ciencia han regresado a la utilización de remedios naturales para el tratamiento de las diferentes afecciones y para prevenir padecimientos. En cuanto a los consumidores existen varios motivos tales como la falsa creencia en que las sustancias encontradas en la naturaleza carecen de toxicidad, la agresividad de las terapias alopáticas y, por supuesto, el costo del remedio ya que generalmente es más económico, por ejemplo, preparar un té de alguna planta medicinal, que comprar un medicamento para la misma dolencia. Por estas razones, en el mercado abundan productos comerciales que en su preparación incluyen plantas medicinales, minerales y sustancias provenientes de animales.

Dependiendo del tipo de producto herbal y el propósito para el cual es vendido, se pueden aplicar distintas regulaciones, pero uno de los elementos centrales es siempre la necesidad de definir apropiadamente la identidad del material inicial, así como ciertas consistencias respecto a sus especificaciones. La gran mayoría de las plantas utilizadas en los países europeos se describen en las farmacopeas



en forma de monografías; sin embargo, no sucede lo mismo con las plantas consumidas en Latinoamérica.

Así, una planta o sus derivados que sea vendida en la Unión Europea como producto medicinal, requiere pruebas de calidad, seguridad y eficacia para su aprobación; si se vende como suplemento alimenticio, las pruebas de eficacia no son necesarias. En México, la venta de productos herbales se realiza libremente, sin exigir que el producto se someta a algún tipo de análisis que, como mínimo, aseguren la autenticidad de la fuente natural.

La Secretaría de Salud en México contempla una serie de artículos incluidos en la Ley General de Salud, que regulan la venta, uso y comercialización de productos herbales; sin embargo, cuando se considera a estos productos como suplementos alimenticios y no como productos con fines terapéuticos, no se les exige control de calidad.

El desarrollo de métodos analíticos para evaluar la calidad de estos extractos (y de los productos en el mercado) es complicado. Algunos problemas de las medicinas herbales que no tienen los compuestos de síntesis para el desarrollo de métodos analíticos, son los siguientes: son mezclas complejas; en muchos casos, se desconocen los componentes activos; por lo general, no están disponibles métodos analíticos o materiales de referencia; el material herbal es químicamente variable y los distintos métodos de cosecha, secado, almacenamiento, transportación y procesado afectan su composición.

El control de calidad es un proceso múltiple que debe cubrir todas las etapas, desde el cultivo y recolección del material vegetal, hasta el control del producto terminal, y la evaluación de su estabilidad y calidad a lo largo del tiempo. En general, el control de calidad se basa en tres importantes definiciones farmacopeicas, las cuales son la identidad, la pureza y la calidad.

Por lo tanto, cada medicina herbal debería ser estandarizada, siguiendo, al menos, los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud.



La identidad se puede verificar por observaciones macro y microscópicas, en los últimos años se ha considerado importante también agregar el perfil cromatográfico y/o espectroscópico del material.

La pureza está íntimamente ligada con la seguridad de las drogas, y se refiere a la presencia de contaminantes como material extraño, diferentes impurezas, lates como metales pesados, contaminación microbiana, aflatoxinas, radiactividad y residuos de pesticidas que deben estar ausentes o por debajo de ciertos umbrales previamente establecidos.

En cuanto al contenido, es un parámetro que representa mayor dificultad para su cumplimiento, debido, en principio, a la falta de información acerca de la composición de los remedios herbales, ya que su composición química varía, dependiendo de diversos factores, como especie, parte usada, condiciones de almacenamiento, tiempo de cosecha, zona geográfica, lo cual puede dar lugar a variabilidad en cuanto a su acción farmacológica.

La estandarización se puede definir como el establecimiento de calidad farmacéutica reproducible por medio de la comparación de un producto con una referencia establecida y definiendo la cantidad mínima de uno o varios componentes o grupos de componentes que deben estar presentes. Dado que la naturaleza no provee los productos con composición consistente y estandarizada, la estandarización de un producto herbal es un proceso complicado, que comienza desde el proceso de cultivo, pasando por el de extracción, almacenaje, transportación, etcétera. La estandarización involucra ajustar la preparación vegetal a un contenido definido de uno o varios constituyentes con actividad terapéutica conocida, mezclando diversos lotes o agregando material inerte.

El uso de plantas medicinales y productos naturales se presenta en nuestro país no solamente en el medio indígena y rural, sino en las zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la considerable diversidad biológica y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos. Debido a esto, diversos grupos de trabajo, entre ellos la Secretaría de Salud, han visto la



necesidad de fomentar la regulación sanitaria y la investigación de la medicina herbolaria en México.

En este sentido, surgió en 2001 la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), que tiene como objetivo “establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de la calidad de este tipo de productos y su uso adecuado”.

La venta de productos herbales en nuestro país se realiza libremente, sin exigir que el producto se someta a algún tipo de análisis que, como mínimo, aseguren la autenticidad de la planta.

En base a estas premisas, el presente trabajo pretende proponer un método de estandarización del propóleo proveniente del altiplano mexicano, con base en el método analítico desarrollado y, que éste tenga como fin ser un parámetro en el control de calidad del recurso natural mencionado.

1. ANTECEDENTES

2.1 DEFINICIÓN Y USOS DEL PROPÓLEO

El propóleo es una mezcla compleja de sustancias naturales que la abeja recolecta a partir de las resinas, los bálsamos y los exudados de diferentes fuentes vegetales. En su estado natural es un producto resinoso de color verde, café, rojizo o hasta negro dependiendo de los vegetales que utilice la abeja para su recolección. Una vez recolectada la resina, las abejas la mezclan en la colmena con cera, enzimas y secreciones glandulares para obtener finalmente el propóleo (Peña, 2008) (Figura 1).

En la colmena, el propóleo es utilizado para recubrirla; como desinfectante; para fijar los panales de miel; sellar los agujeros; embalsamar a los cadáveres de los intrusos y para evitar la colonización de microorganismos (Bankova,



2005). Etimológicamente, la palabra propóleo se deriva de los vocablos griegos *pro* (“en defensa de”) y *polis* (“ciudad”) y significa en conjunto “en defensa de la ciudad”.



Figura 1. Abeja de la especie *Apis mellifera* recolectando propóleo.

El uso terapéutico de este importante recurso natural ha sido descrito desde tiempos antiguos. Los griegos, por ejemplo, lo utilizaban como agente cicatrizante y para tratar infecciones de la piel. Los incas, por su parte, lo utilizaban contra la fiebre y los egipcios, además de aprovechar sus propiedades antisépticas, lo utilizaban para embalsamar los cadáveres (Castaldo y Capasso., 2002). Incluso, en algunas colmenas, se han encontrado pequeños animales envueltos en propóleo en perfecto estado de conservación.

Actualmente, existen en el mercado diferentes productos que contienen propóleo y se utilizan principalmente para tratar la tos, el reumatismo y los esguinces. En la industria cosmética este recurso es incluido en algunas cremas faciales, lociones y ungüentos debido a sus propiedades antisépticas y cicatrizantes. En estudios realizados por investigadores de la Universidad de Guanajuato se demostró que el extracto etanólico del propóleo absorbe la radiación UVA, UVB y UVC;



comportándose como un filtro solar que protege los diferentes tipos de piel incluyendo las más sensibles. Esta propiedad generó el desarrollo de una patente para la formulación de una crema semisólida con amplia protección solar (Patente No. 223746, Trujillo, 2004).

Finalmente, el propóleo también ha sido utilizado en productos de higiene personal como la pasta y el enjuague bucal para tratar la gingivitis y la estomatitis debido a sus propiedades antibióticas (Sforcin y Bankova, 2011).

2.2 PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL PROPÓLEO

Desde el punto de vista biológico, la literatura científica describe las propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes, citotóxicas, antibióticas, antifúngicas, antivirales, antiprotozoarias, hepatoprotectoras, antiulcéricas y antidiabéticas de este recurso natural (Marcucci, 1995; Salatino *et al*, 2011). En los siguientes párrafos se describen algunos de los aspectos más relevantes sobre la actividad farmacológica del propóleo.

Estudios biológicos realizados *in vitro* con propóleos provenientes de diferentes regiones geográficas han permitido validar sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. En este sentido, los extractos etanólicos del propóleo inhibieron el crecimiento de 267 cepas de bacterias anaerobias incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus epidermidis* y *Escherichia coli*. De manera general, los extractos etanólicos inhibieron el crecimiento de las bacterias a una concentración de 1 mg/mL.

La actividad antibiótica del propóleo ha sido atribuida a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente a los flavonoides (quercetina, galangina, y pinocembrina, entre otros) y a los ácidos caféico, benzoico y cinámico. Dichos constituyentes probablemente actúan sobre la membrana o la pared celular de los microorganismos ocasionando daños funcionales o estructurales. También se ha demostrado la actividad antibiótica de algunos derivados prenilados del ácido *p*-cumárico; de algunos compuestos volátiles y de los ácidos diterpénicos aislados a partir del propóleo brasileño.



Algunas investigaciones realizadas con concentraciones sub-inhedorias del extracto etanólico del propóleo permitieron demostrar su efecto sinérgico con antibióticos tales como la gentamicina, la estreptomina, el ceftriaxon, la eritromicina, la vancomicina, el cloranfenicol y la ampicilina. También, se ha señalado la reducción de los factores de virulencia de la coagulasa y la lipasa asociados a las cepas de *Staphylococcus*. Cabe mencionar que, la reducción del factor de virulencia de esta última inhibe el desarrollo del biofilm por parte del microorganismo (Mirzoeva *et al.*, 1997; Scazzocchio *et al.*, 2006).

En otro estudio reciente realizado con propóleo brasileño se evaluó su actividad antibacteriana contra los patógenos orales *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. En este estudio los valores de Concentración Inhibitoria Máxima (CIM) calculados no fueron significativos con respecto a los controles positivos meropenem y penicilina G. Finalmente, los autores concluyen que a pesar de los resultados obtenidos el potencial antimicrobiano del propóleo es relevante si consideramos la resistencia desarrollada por los microorganismos a los antibióticos utilizados en la clínica (Santos *et al.*, 2002). Así, la combinación de propóleo con agentes antimicrobianos podría reducir la dosis y potencializar la terapia antimicrobiana. En el año 2009, Libéro y colaboradores publicaron una revisión de los efectos del propóleo sobre *Streptococcus mutans*. Estos estudios permitieron proponer a los investigadores el uso del propóleo o sus componentes como agentes cariostáticos en el desarrollo de productos higiénicos para combatir la caries y otras infecciones. Por otro lado, Santos (2002) refirió la eficacia clínica de un gel preparado con propóleo brasileño en pacientes diagnosticados con estomatitis dental (Sforcin, 2011). Por otra parte, los extractos etanólicos de propóleo brasileño, al 10%, inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* y *Trichophyton verrucosum*. En este sentido, el orden de sensibilidad descrito para las especies del género *Candida* fue el siguiente: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii* (Ota *et al.*, 2001). También se ha reportado el efecto inhibitorio del propóleo sobre el crecimiento de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium digitatum* (Ozcan *et al.*, 2004).



Con respecto a la actividad antioxidante es importante destacar que el propóleo, entre todos los productos de la colmena, es el que concentra la mayor capacidad para neutralizar los radicales libres (Sroka, 2006; Nagai., *et al.* 2001). Entre los compuestos con notable actividad antioxidante se encuentran el caempferol, el ácido ferúlico, la quercetina, el ácido caféico y el CAPE (éster fenil etílico del ácido caféico) (Usamiet *al.*, 2004).

La literatura científica también describe las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antitumorales de los extractos etanólicos del propóleo brasileño. En este sentido, se ha descrito que dicho propóleo activa los pasos iniciales de la respuesta inmune mediante la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4 además de la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6) por los macrófagos y las células del bazo (Sforcin, 2005; Kumazawa, 2004).

Por otro lado, la administración del propóleo brasileño al 10% y del CAPE a ratones de la cepa BALB/c incrementaron la producción de anticuerpos a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg (Sforcin, 2011, 2005).

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

Estudios *in vivo* realizados con el propóleo brasileño verde al 10% permitieron evidenciar un incremento en la actividad citotóxica de las células “natural killer” contra el linfoma murino. Por su parte, el propóleo poplar y algunos de sus compuestos polifenólicos aislados (ácido caféico, CAPE y quercetina) disminuyeron el número de nódulos tumorales de células de pulmón. Es importante mencionar que la eficacia del propóleo poplar contra la metástasis, fue



igual a la presentada por sus constituyentes individuales (Sforcin, 2011; Hernández, 2007).

También se ha reportado su actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*, ya que al administrar el extracto etanólico de propóleo a diferentes cultivos celulares infectados con el parasito inhibió su crecimiento (Higashi *et al.*, 1994).

2.3 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DEL PROPÓLEO

Estudios químicos realizados con diferentes tipos de propóleos han permitido concluir que su composición química varía dependiendo de la flora local, las razas de abejas y el clima de la zona de colecta, entre otros factores (Bankova *et al.*, 2000; Bankova, 2005).

Así, los constituyentes químicos asociados a los propóleos de clima templado son los flavonoides sin sustituyentes en el anillo B como: la pinocembrina, la pinobanksina, la galangina y la crisina. Otros constituyentes mayoritarios en los propóleos de estas zonas son los ácidos derivados del fenilpropano y sus ésteres como el CAPE. Las fuentes naturales de estos constituyentes son los exudados de los brotes apicales de las especies del género *Populus*, principalmente, *P. nigra* (Figura 2).

En contraste, los propóleos provenientes de las regiones tropicales se caracterizan por la presencia de los ácidos cafeoilquínicos y de fenilpropanoides prenilados. Ambos tipos de metabolitos secundarios derivan de la especie *Baccharis dracunculifolia* (Weinstein, 2008)(Figura 3). A su vez, los propóleos rusos llamados “Birch”, contienen mayoritariamente flavonas y flavonoles diferentes al propóleo de tipo poplar y que están presentes en la especie *Betula verrucosa*.

Por otra parte, las benzofenonas preniladas son metabolitos secundarios característicos de los propóleos de Venezuela, Cuba y Brasil (de la región norte y del Amazonas). En Cuba y Venezuela dichos componentes provienen de los



exudados de las flores del género *Clusia*. Las investigaciones químicas sugieren que probablemente sea este género la fuente vegetal de los propóleos brasileños ya que, existen numerosas especies de este género que producen resinas con benzofenonas similares.

Asimismo, las geraniiflavanonas han sido reportadas en muestras de propóleos de la región del Pacífico como Taiwan y Okinawa. Recientemente, se han reportado compuestos similares en propóleos provenientes de países africanos como Egipto y Kenia. Por otro lado, se ha encontrado que los propóleos de la zona del mediterráneo (Grecia, Creta y Turquía) contienen predominantemente diterpenos y antraquinonas. La fuente natural de los diterpenos se encuentra asociada con las especies de la Familia *Cupressaceae* mientras que, el origen botánico de las antraquinonas aún no se encuentra definido. Finalmente, el propóleo rojo de Brasil contiene los isoflavonoides y los neoflavonoides encontrados en especies del género *Dalbergia spp* (Leguminosae) (Bankova, 2005; Salatino *et al.*, 2011).



Figura 2. *Populus nigra* (álamo), árbol de zona templada.



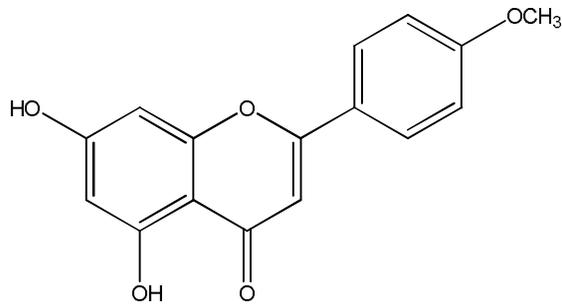
Figura 3. *Baccharis dracunculifolia*, árbol de clima tropical.



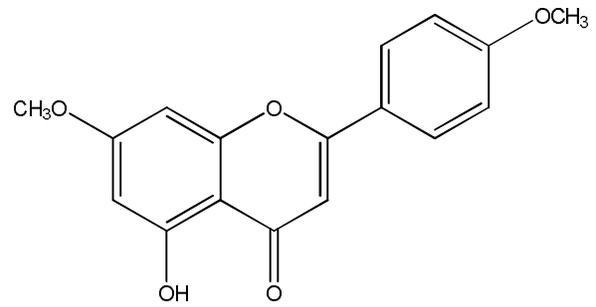
A pesar de las numerosas investigaciones realizadas sobre propóleos colectados en diferentes países con climas templados y tropicales existe un número limitado de publicaciones sobre la composición química y la actividad biológica de los propóleos provenientes de las regiones áridas o semiáridas del continente americano. En este marco de referencia en el año 2007, Hernández y colaboradores estudiaron tres propóleos del estado de Sonora, México. En esta investigación, los autores identificaron y cuantificaron a la pinocembrina, la crisina y el 3-acetato de la pinobanksina como los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los propóleos estudiados. Los mismos autores describen las propiedades antiproliferativas sobre líneas celulares de cáncer de los extractos y la identificación de 11 flavonoides (entre ellos la galangina, el xantomicrool, la rutina, la naringenina, la hesperetina y la acacetina) y del éster fenil etílico del ácido cafeico (CAPE) utilizando HPLC-MS (Hernández, 2007).

En el año 2010, Lotti y colaboradores describieron la presencia de isoflavonoides, flavanonas y pterocarpanos en una muestra de propóleo rojo recolectada en el estado de Yucatán (Lotti *et al.*, 2010). Este hallazgo se encuentra en armonía con los perfiles químicos descritos para los propóleos rojos provenientes de Cuba y Brasil. De acuerdo con los resultados obtenidos los autores sugieren que el arizonicanol y los melilotocarpanos A y D podrían representar marcadores taxonómicos apropiados para identificar el propóleo rojo de México.

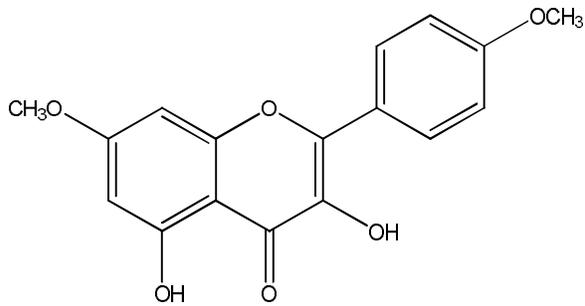
Finalmente, estudios químicos realizados por el grupo de trabajo del Dr. José Fausto Rivero Cruz con propóleos pertenecientes a la región del altiplano mexicano, permitieron aislar y caracterizar a los siguientes flavonoides que se ilustran en la figura 4.



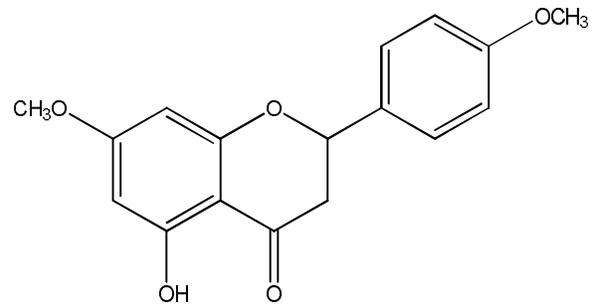
Acacetina



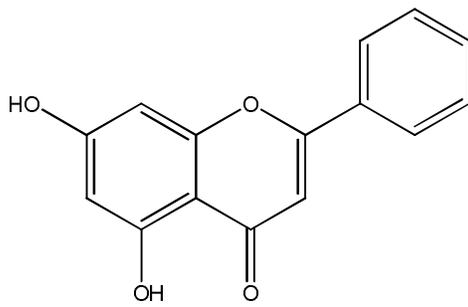
4',7-dimetilapigenina



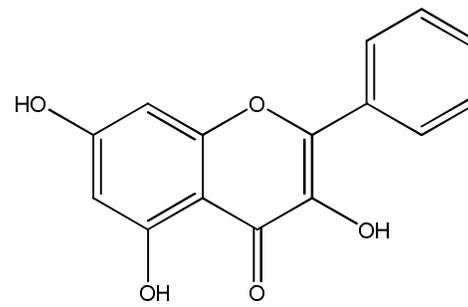
4',7-dimetilcaempferol



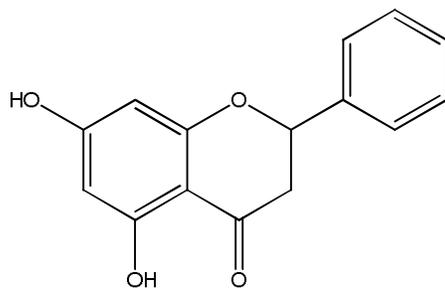
4',7-dimetilnaringenina



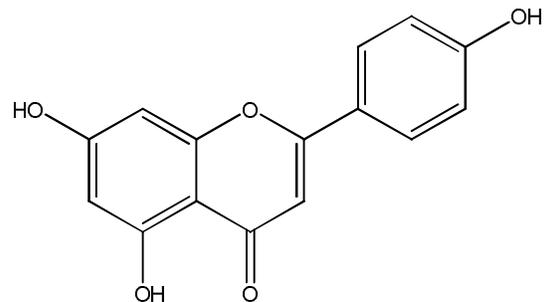
Crisina



Galangina



Pinocembrina



Quercetina

Figura 4. Flavonoides aislados de propóleos provenientes del altiplano mexicano.



La región del altiplano (Figura 5) se distingue por tener mieles ámbar y ámbar claro de gran auge en el mercado europeo. Su origen floral es la espinocilla, la acetilla, la jarilla, el toronjil morado y el acahual. Esta región comprende los estados de Tlaxcala, Puebla, México, Morelos, Distrito Federal, Guanajuato, Aguascalientes, la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y parte de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí (Hernández, 2007).

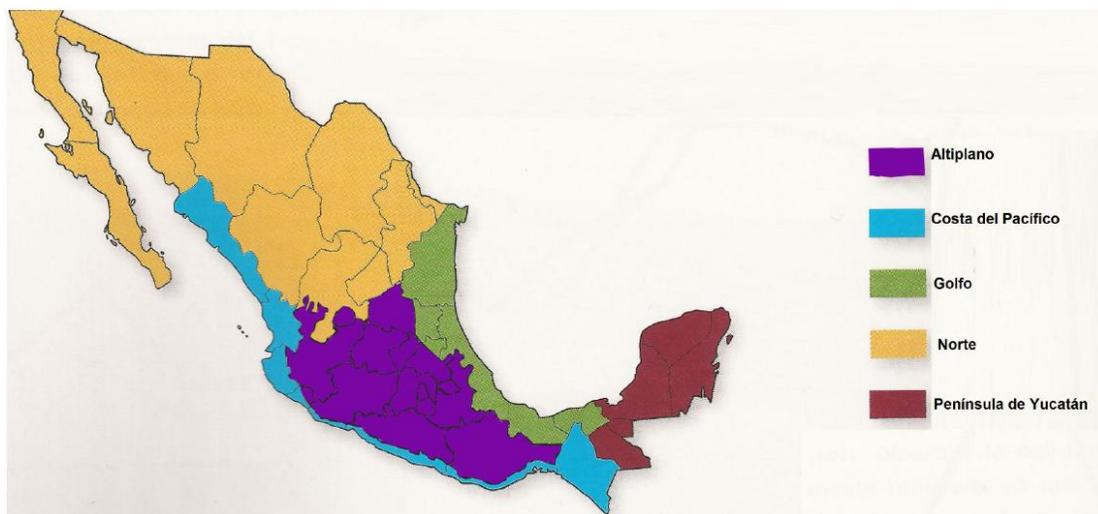


Figura 5. Regiones apícolas de México.

Se estima que la producción anual de propóleos en México es de 10 a 300 g/colmena, sin embargo, esta cantidad varía en función de la variedad de abejas (*Apis mellifera*, *Melipona colimana*, entre otras), el clima, la vegetación y el dispositivo utilizado para su recolección (López *et al.*, 2006).

2.4 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN

Para recolectar el propóleo el apicultor puede rasparlo de la colmena o colocar trampas de fácil manipulación (Figura 6). Este último método permite obtener una mayor calidad del producto ya que evita su contaminación. De manera general, la



recolección se realiza antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, al inicio de la temporada de lluvias en donde los climas son tropicales y la propolización es más activa (Farré y Sanchez, 2004; Salamanca *et al*, 2001). Antes de su comercialización el propóleo cursa por las siguientes etapas de control de calidad:

- I. Si el material contiene mucha cera se somete a un lavado con agua fría para removerla. El propóleo remanente se seca en pantallas de acero inoxidable con una corriente de aire.
- II. Posteriormente, se realiza un proceso de extracción utilizando como disolvente etanol al 95%. En esta etapa, los remanentes de cera y las partes de las abejas son removidos manualmente.
- III. Por último, se filtra la solución para eliminar cualquier otro tipo de material extraño (Burdock, 1998).



Figura 6. Trampa de propóleo (tomada de <http://dullindemetri.cl/propoleo.htm>).



2.5 REGULACIÓN SANITARIA DE PRODUCTOS ELABORADOS CON PROPÓLEOS.

Actualmente, existen diversas normativas que regulan el uso del propóleo para su distribución y venta. Entre dichas normas se encuentra la Instrucción Normativa No 3/01, en Brasil, que establece las determinaciones fisicoquímicas y la metodología analítica para el propóleo como materia prima y como extracto. Otras normas de calidad para evaluar el propóleo son: la Norma Ramal Rusa RST 317-77, la Norma Ramal Búlgara ON 25 72 483-84 y la Norma Ramal Cubana 932-88. Países como Bélgica y Grecia también poseen una normativa para productos apícolas que incluyen propóleos.

Por otro lado, en los países latinoamericanos existe un mejor control del propóleo. En Argentina, por ejemplo, en el año 2008 se publicó la Resolución Conjunta No. 357 que establece las especificaciones técnicas y las reglamentaciones de empleo del propóleo. Para su establecimiento, dicha resolución consideró, entre otros, los siguientes aspectos para este producto:

- Su amplia variedad de usos industriales, desde la industria alimentaria y cosmética, hasta la farmacéutica o química.
- El incremento en el consumo mundial de propóleo y con ello, la necesidad de evaluar sus características, propiedades y límites de seguridad.
- El aislamiento y la caracterización de flavonas, flavononas, flavonoles, terpenoides y ácidos orgánicos (ácidocaféico, ácidos diterpénicos, ácido clorogénico, quercetina y apigenina, entre otros muchos compuestos).
- La existencia de suplementos dietéticos y alimentos que contienen propóleo en su formulación y la necesidad de establecer su límite de ingesta máxima en dichos productos.
- La normativa existente en países como Brasil, Bélgica, Grecia, Rusia, Bulgaria y Cuba para el análisis de este producto apícola.
- Las propiedades alergogénicas descritas para propóleo y la obligación de incluir la advertencia en el rotulado del producto.



Con base en estos antecedentes el Código Alimentario Argentino estableció un marco normativo que les permitiera a los productores nacionales comercializar productos de calidad elaborados con propóleos. Evidentemente, todas estas medidas están destinadas a proteger la salud de la población. Asimismo, la revisión científico-técnica realizada permitió el establecimiento de las siguientes especificaciones y los límites de aceptabilidad para los propóleos.

Características organolépticas (dependiendo de su origen botánico y/o geográfico):

- Aroma: característico del producto dependiendo de si es resinoso o balsámico
- Color: amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y sus tonalidades.
- Sabor: variable; de suave y balsámico hasta fuerte y picante.
- Consistencia a temperatura ambiente: maleable o rígido.
- Aspecto: homogéneo o heterogéneo, de preferencia en trozos no comprimidos.

Características fisicoquímicas:

- Pérdida al secado (100-105°C): no más de 10 por ciento.
- Cenizas (500-550°C): no más de 5 por ciento.
- Materiales extraños: no más de 25 por ciento.
- Sustancias extraíbles en n-hexano (ceras presentes en el propóleo): no más de 40 por ciento.
- Índice de oxidación: máximo 22 segundos.
- Compuestos fenólicos expresados como equivalentes de ácido gálico: no menos de 5.0 por ciento.
- Flavonoides: no menos de 0.5 por ciento.
- Resinas solubles en etanol: no menos de 30 por ciento.
- Espectro en el UV-Vis: debe presentar un máximo de absorción entre 270 y 315 nm.



- Plomo: no más de 20 ppm.
- Arsénico: no más de 1 ppm.
- Residuos de plaguicidas y antibióticos: ausencia.

Para la recolección, manipulación, envasado y almacenamiento de los propóleos se deberán cumplir las Buenas Prácticas Apícolas. Adicionalmente, para el acondicionamiento del propóleo se debe considerar un envase bromatológicamente apto y su almacenamiento debe realizarse en un sitio fresco y oscuro. El envase tiene que conferirle al producto una protección adecuada con respecto a la humedad, la luz y la temperatura excesiva. El propóleo como materia prima no debe contener sustancias extrañas en sus procesos de producción y elaboración. No se permite la adición de aditivos.

Por otra parte, los extractos blandos de propóleos elaborados con etanol reúnen los requerimientos de aroma, color y sabor dependiendo de su origen botánico y/o geográfico. Además de reunir los criterios microbiológicos aplicables deberán cumplir con los siguientes parámetros de calidad:

- Extracto seco: no menos de 10 por ciento.
- Sustancias extraíbles en n-hexano (ceras).
- Índice de oxidación: máximo 22 segundos.
- Compuestos fenólicos expresados como equivalentes de ácido gálico: no menos de 0.25 por ciento.
- Flavonoides: no menos de 0.25 por ciento.
- Espectro en el UV-Vis: debe presentar un máximo de absorción entre 270 y 315 nm.
- Plomo: no más de 20 ppm.
- Arsénico: no más de 1 ppm.
- Residuos de plaguicidas y antibióticos: ausencia.
- Criterios microbiológicos aplicables (agentes microbiológicos a controlar, los límites microbiológicos establecidos etc.).



Finalmente, los productos que contengan propóleo estarán clasificados como caramelos, mieles (pueden contener polen y/o jalea real), propóleos en solución hidroalcohólica o con propilenglicol y suplementos dietéticos. Para su aprobación, deberá presentarse el análisis del producto final que avale la cantidad de propóleo presente en los mismos mediante el establecimiento del contenido de flavonoides. Esta normativa también establece el consumo diario de propóleo (300 mg/día y 150 mg/día para adultos y niños, respectivamente) y los requisitos para el etiquetado de los productos. Entre las leyendas que deben contener dichas etiquetas de manera obligatoria se encuentra la siguiente: “Contiene Propóleos; personas alérgicas o sensibles; niños menores de 4 años; mujeres embarazadas o en período de lactancia: no consumirlo”. Tampoco se autoriza mencionar propiedades de prevención, ni tratamiento de enfermedades en el rótulo o en la publicidad de los productos que contienen propóleos.

Indudablemente, el establecimiento de este tipo de medidas permitirá el suministro al público de productos seguros y eficaces. El caso de adulteración de propóleo más recordado en la historia ocurrió en Argentina, en 1992, por un tónico que ocasionó la muerte de 25 personas. En este caso, se utilizó dietilenglicol como disolvente para preparar el producto. Este compuesto se metaboliza en el hígado generando ácido etoxi-hidroxi-acético que, al acumularse en el organismo conlleva a la muerte celular de los hepatocitos y de los túbulos renales (Bernaus, *et al.*, 2006).

En contraste con lo descrito anteriormente, en México, no existe una normatividad aplicable para productos que contengan propóleo entre sus componentes. Así, para suministrar dichos productos los fabricantes etiquetan sus preparados bajo la figura de suplemento alimenticio. De acuerdo con los artículos 215 y 216 de la Ley General de Salud estos productos no pueden ser publicitados o promovidos como medicamentos, tampoco pueden atribírseles cualidades o efectos terapéuticos, presentándolos como una solución definitiva en el tratamiento preventivo o rehabilitatorio de un determinado padecimiento. Debido a que no son medicamentos no cuentan con un registro sanitario que avale su calidad y eficacia



terapéutica. No obstante, el control sanitario de estos productos incide en el ámbito de competencia de la COFEPRIS a pesar de que existan otras dependencias y organismos del gobierno federal que podrían realizar dicho control.

El desarrollo de toda una corriente de productos naturales medicinales ha rebasado la capacidad de las autoridades sanitarias de nuestro país debido a la falta de control sanitario y a la carencia de personal capacitado para evaluar dichos productos. Uno de los mayores riesgos asociados con el consumo de estos productos es la contaminación de los mismos, esto es, contienen microorganismos o sustancias tóxicas que rebasan los límites permisibles establecidos por la Secretaría de Salud.

Otro problema que afecta a la población son los productos adulterados. En este sentido, algunos inescrupulosos productores realizan tratamientos que encubren los defectos en sus procesos o en la calidad de las materias primas que utilizan. El objetivo principal de las adulteraciones casi siempre obedece a fines de lucro sin considerar los riesgos para la salud de la población. A través de la historia se han documentado adulteraciones en alimentos como la leche, la miel y los vinos, por tan solo mencionar algunos. Recientemente, se han descrito las adulteraciones de los suplementos alimenticios destinados a mejorar la condición física y la resistencia de los atletas.

Evaluar la calidad de estos productos es difícil debido a que representan matrices con múltiples componentes. En el siglo pasado, los métodos para detectar las adulteraciones en los insumos consistían en determinar el valor de pH, la conductividad eléctrica, el porcentaje de humedad y el contenido total de azúcares, por tan solo mencionar algunos. Sin embargo, estas determinaciones resultaban insuficientes ya que no permiten identificar de forma precisa el origen de los adulterantes. Por este motivo, hoy día se utilizan técnicas analíticas que brindan mayor precisión y exactitud en los resultados como la calorimetría diferencial de barrido, la cromatografía de gases (CG), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopía en el infrarrojo (Mondragón *et al.*, 2011). Actualmente, a nivel



mundial, existen organismos reguladores que brindan apoyo y emiten las directrices para detectar diversos tipos de adulteraciones en productos de consumo humano, como la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos de Norteamérica (2012).



3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los 20 productos herbolarios objeto de estudio fueron adquiridos en las tiendas de autoservicio UNAM y Wal-Mart (Figura 8). El jarabe “Prevent” fue comprado en España y los extractos de propóleo marca “Propolis oil” y “Proex” provienen de Guadalajara, Jalisco.

3.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina, se utilizaron placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 G₂₅₄ Merck). El sistema de elución empleado fue CH₂Cl₂/MeOH en una proporción 95:5. Una vez concluido el proceso de elución los cromatofolios se visualizaron con luz UV (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm) y se revelaron con solución de vainillina ácida (Figura 7).

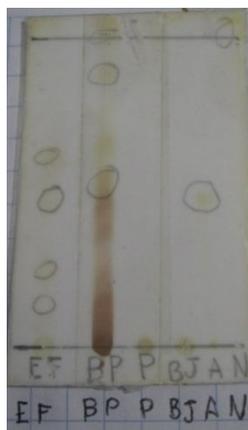


Figura 7. Ejemplo de una placa cromatográfica en capa fina con 3 diferentes productos:

EF: Solución etanólica del extracto de propóleo de marca “D”.

BP: Solución etanólica del extracto de propóleo marca “C”.

P: Extracto etanólico de propóleo.

BJ: Solución etanólica del jarabe con propóleo de marca “G”.

A: Solución estándar de acetina

N: Solución estándar de 4',7-dimetilnaringenina



Figura 8. Tres de los veinte productos adquiridos en tiendas de autoservicio analizados en este trabajo.

3.2 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) SHIMADZU acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution.

El análisis para determinar el contenido de acetina y de 4',7-dimetilnaringenina se realizó en una columna Waters C18 (BEH Technology), con un tamaño de partícula de 5 μm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). El volumen de inyección utilizado fue de 10 μL . La elución se realizó con un sistema isocrático que consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH:ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en una proporción 55:45. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.5 mL/min y la temperatura empleada para el análisis fue de 25 °C. El tiempo de corrida fue de 60 minutos y las longitudes de onda empleadas para la detección de los compuestos fueron de 254 y 290nm.



3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TRABAJO

10 g de los productos comerciales (jarabes, pastillas o caramelos) se extrajeron con 100 mL de etanol durante 30 min utilizando el ultrasonido como método de extracción. Las soluciones resultantes se filtraron y se concentraron a presión reducida para su posterior análisis en el cromatógrafo de líquidos. En el caso de los extractos etanólicos comerciales, 1 mL de la solución se diluyó a 5 mL con etanol. De cada extracto se pesaron 250 mg y se diluyeron en 5 mL de etanol. Finalmente, 2 mL de cada solución se filtraron a través de un filtro (marca PALL, GxP/GHP) de 45 μm para su análisis cromatográfico.

3.4 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Preparación de la solución estándar de acetina: 10 mg de acetina se disolvieron en 10 mL de una mezcla binaria de etanol:acetonitrilo (1:1). A continuación, se vertió en un matraz volumétrico de 5 mL una alícuota de 2.5 mL y se completó el volumen con la misma mezcla de disolventes. Esta solución contiene 500 $\mu\text{g/mL}$ de acetina.

Preparación de la solución estándar de la 4',7-dimetilnaringenina: 10 mg de 4',7-dimetilnaringenina se disolvieron en 10 mL de una mezcla binaria de etanol:acetonitrilo (1:1). A partir de la solución anterior, se preparó una dilución adicional para obtener una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ de 4',7-dimetilnaringenina.

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



3.5 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema se evaluó mediante la preparación de tres curvas de calibración (para cada compuesto), con 5 niveles de concentración y preparadas por pesadas independientes. Para ello, a partir de las soluciones estándar (inciso 3.4) de acetina y 4',7-dimetilnaringenina se realizaron las diluciones necesarias para que cada mililitro de las mismas contuvieran entre 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ y 25-200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cuadro 1). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal de las variables concentración (x) y área bajo la curva (y) para calcular la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r).

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

Concentración de la solución estándar	Nivel de concentración	Volumen de la alícuota (mL)	Aforo ⁽¹⁾	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración en % ⁽²⁾
4',7-dimetilnaringenina 1000 $\mu\text{g/mL}$	1	0.25	10	25	25
	2	0.5	10	50	50
	3	1.0	10	100	100
	4	1.5	10	150	150
	5	2.0	10	200	200
Acetina 1000 $\mu\text{g/mL}$	1	1	10	100	20
	2	2.5	10	250	50
	3	5.0	10	500	100
	4	7.5	10	750	150
	5	---	---	1000	200

(1) Con EtOH/ACN 1:1 (mL)

(2) Con respecto a la concentración nominal

Cuadro 1. Diluciones empleadas para preparar las curvas de calibración (linealidad del sistema).



3.6 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Para identificar los metabolitos secundarios presentes en los diferentes productos herbolarios se prepararon, por separado, soluciones stock que contenían 1.0 mg/mL de acacetina y de 4',7-dimetilnaringenina. Estos productos fueron previamente aislados y caracterizados en el laboratorio en estudios fitoquímicos previos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El auge de los medicamentos herbolarios en México es una actividad que ha rebasado la capacidad de la Secretaría de Salud para regular la publicidad y el mercado de dichos productos. En el caso de los productos milagro, la principal vía que utilizan los fabricantes para aumentar sus ventas son los anuncios en televisión, radio, revistas e internet. El éxito de estos productos entre el público se debe principalmente a las estrategias convincentes que utilizan dichos medios para incrementar las bondades de unos productos que en la mayoría de los casos no se encuentran debidamente autorizados.

El deterioro de las estructuras del sector salud, la insuficiencia del servicio público para atender las crecientes necesidades primarias de la población y los elevados costos de la medicina alópata son factores que han propiciado el uso de tratamientos alternativos por parte del público. Esta situación propició la emergencia de un mercado conformado no sólo por la población con graves carencias, sino también por sectores medios y altos que buscan encontrar alternativas a los tratamientos farmacológicos. El interés del público por consumir productos medicinales alternativos ha dado paso a toda una corriente de preparados elaborados con plantas o sus extractos; surgiendo en el mundo industrias novedosas de medicamentos naturales y de suplementos alimenticios. En medio de esta clasificación encontramos los denominados “productos milagro”. Estos preparados se caracterizan por exaltar cualidades terapéuticas dirigidas a erradicar enfermedades. Generalmente, son elaborados con plantas, vitaminas, minerales y otros productos que tienen un efecto farmacológico pero que no



representan un medicamento. Aún más, la publicidad de estos productos es fraudulenta ya que son presentados como artículos eficaces para el tratamiento, prevención y cura de diversas enfermedades sin que su eficacia y seguridad haya sido comprobada desde un punto de vista científico.

Actualmente, su consumo es considerado un problema de salud ya que lejos de restablecer la homeostasis pueden ocultar síntomas, generar efectos adversos de naturaleza desconocida o exacerbar la condición debido a la presencia de ingredientes nocivos. Asimismo, su publicidad induce al abandono de los tratamientos con medicamentos alopáticos agravando así, el cuadro clínico de los pacientes.

En este marco de referencia, en febrero de 2011 la COFEPRIS publicó un listado de productos asegurados a los fabricantes. Estos productos carecen de autorización sanitaria y es por ello que no se recomienda a la población su uso.

Por otro lado, otro de los problemas que enfrenta la Secretaría de Salud son los productos adulterados y falsificados. De acuerdo con el Artículo 206 de la Ley General de Salud un producto adulterado es aquel cuya naturaleza y composición no correspondan con aquellas con que se etiquete, anuncie, expendi o suministre; cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización o, cuando haya sufrido un tratamiento que disimule su alteración, se encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas. Asimismo, se considera falsificado un producto cuando se fabrique, envase o venda haciendo referencia a una autorización que no existe; se utilice una autorización legalmente otorgada a otro o, se imite al legalmente fabricado y registrado (Artículo 208 bis, LGS).

Cabe mencionar que la falsificación y adulteración de los medicamentos representa el fenómeno más amplio para la difusión de insumos que no cumplen con las normas establecidas en materia de calidad, seguridad y eficacia. Las etiquetas de estos productos incluyen, de manera deliberada, información falsa acerca de su calidad. Algunos casos de productos falsificados o adulterados



incluyen: productos que no contienen ninguno de los ingredientes activos mencionados en la etiqueta; productos que contienen ingredientes activos diferentes a los especificados en la etiqueta; productos que contienen los ingredientes activos especificados pero en concentración diferente a la declarada; productos que pueden contener diferentes impurezas o diferentes cantidades de las mismas.

En los países industrializados, la mayor parte de las ventas de medicamentos falsificados y adulterados se realiza a través de internet. Este medio representa una amenaza para todas las personas que buscan tratamientos alternativos para enfermedades crónicas o letales a menor costo. En este sentido, el trabajo de la Organización Mundial de la Salud reside en ayudar a reforzar la legislación farmacéutica de los países para asegurar la presencia de la garantía de calidad en toda la cadena de distribución de medicamentos. La propagación de medicamentos falsificados es en general más pronunciada en los países donde la fabricación, la importación, la distribución, el suministro y la venta de medicamentos están menos reglamentados.

En este marco de referencia, resulta importante destacar que la situación de los medicamentos de tipo naturista es más desestimulante. La falsificación o adulteración de estos productos es una constante debido a la tendencia dinámica actual en la producción y venta de estos productos y, en el insuficiente control legal de los medicamentos y remedios herbolarios en nuestro país. El surgimiento de toda una corriente de elaboración y venta de preparados a base de productos naturales medicinales no sólo es expresión de la dinámica búsqueda de lucro por parte de algunos inescrupulosos comerciantes; su demanda también expresa, en los hechos, un nivel de eficacia terapéutico no cuantificado. Así, la popularidad creciente de productos herbolarios como el Broncolín y sus “versiones” puede expresar también, de modo indirecto, ciertas omisiones por parte del sistema de salud oficial, en el sentido de no generar medicamentos de una accesibilidad y eficacia por lo menos similar a la de estos preparados simples. Esta situación



sugiere además la existencia de una regulación diferencial a favor de la industria químico-farmacéutica.

De manera general, la composición de los propóleos varía dependiendo de la flora local, el clima y la época de colecta, entre otros. Así, por ejemplo, los propóleos europeos contienen principalmente compuestos fenólicos que han sido reportados previamente en los exudados de los árboles del poplar (*Populus nigra*, principalmente). En contraste, la composición de los propóleos brasileños se encuentra relacionada con el contenido de metabolitos secundarios presentes en la resina de las hojas del género *Baccharis dracunculifolia*. En México, los propóleos estudiados de las zonas áridas o semiáridas se encuentran constituidos principalmente por flavonoides y compuestos aromáticos como el éster fenil-etílico del ácido caféico (CAPE). Esta variabilidad en la composición química de los propóleos ha propiciado que la estandarización de este importante recurso natural se realice con base en el contenido total de flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y fenoles totales. Sin embargo, algunos autores sugieren que la estandarización del propóleo puede realizarse con base en el contenido de sus marcadores químicos y correlacionarlo con su actividad biológica.

Durante los estudios fitoquímicos realizados con diferentes lotes de propóleos mexicanos en el laboratorio del Dr. José Fausto Rivero fue posible aislar y caracterizar como componentes constantes a la acacetina y la 4',7-dimetilnaringenina en todos los lotes. Por este motivo, y considerando que ambos metabolitos se encuentran en baja o nula concentración en otros propóleos mundialmente distribuidos, en este trabajo, se plantearon como compuestos marcadores de propóleos mexicanos característicos de la zona melífera del altiplano a la acacetina y la 4',7-dimetilnaringenina.

Con base en estas consideraciones, el presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto de investigación enfocado a identificar y cuantificar los marcadores químicos de propóleos pertenecientes a la región del altiplano mexicano en 20 productos de amplia distribución comercial en nuestro país. Para el análisis



cuantitativo de los productos se empleó una metodología analítica previamente validada en el laboratorio (Martínez, 2012).

La identificación de los flavonoides en las muestras se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención que presentaron cada uno de los estándares con las señales presentes en el cromatograma obtenido con los productos analizados. En la Figura 9 se ilustra un perfil cromatográfico del extracto etanólico del propóleo recolectado en el apiario “El Búho”, de la delegación Milpa Alta. Los tiempos de retención obtenidos para cada compuesto, bajo las condiciones de análisis, fueron los siguientes:

Flavonoide	t_R (min)
Pinocembrina	7.64
Acacetina	10.60
Galangina	12.80
4',7-dimetilnaringenina	21.34
4',7-dimetilapigenina	31.45

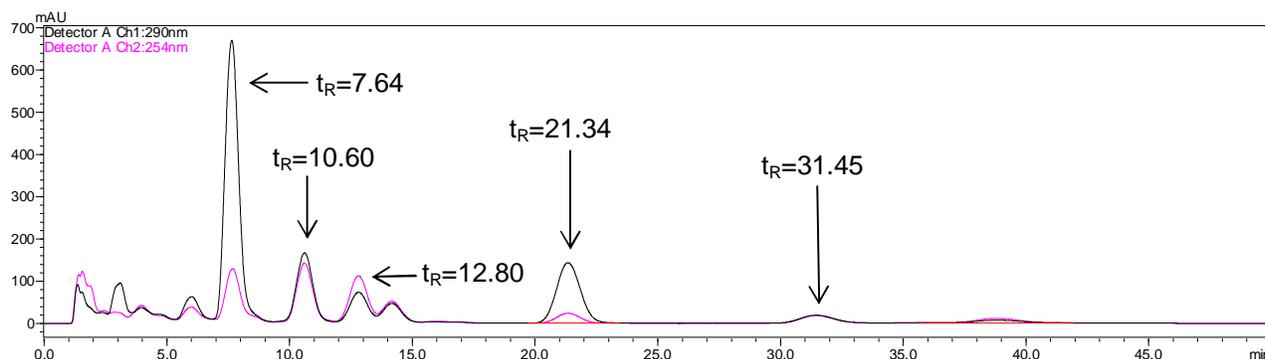


Figura 9. Cromatograma obtenido con el extracto etanólico del propóleo recolectado en la delegación Milpa Alta con sus respectivos tiempos de retención.

4.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

Este parámetro de calidad fue evaluado diariamente para la 4',7-dimetilnaringenina y para la acacetina mediante el registro del área bajo la curva de una solución de concentración conocida. En los dos casos el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2.0 % indicando, por lo tanto, que el sistema es adecuado para el análisis de los productos.



En el Cuadro 2 se resume un ejemplo con los datos obtenidos para esta característica de calidad:

	4',7-dimetilnaringenina (100 µg/mL)	Acetina (500µg/mL)
Factor de coleo	1.11	1.08
No. de platos teóricos	2197.26	1693.04
Área de la réplica 1	3552464	38224268
Área de la réplica 2	3533224	38099224
Área de la réplica 3	3501730	37639128
Área de la réplica 4	3502390	38417388
Área de la réplica 5	3526758	38448996
PROMEDIO	3523313.2	38165800.8
s	2158.99	327387.7
CV	0.61%	0.86%

Cuadro2. Resultados obtenidos para la adecuabilidad del sistema.

4.2 CURVA DE CALIBRACION.

La linealidad del sistema se evaluó de manera independiente para cada flavonoide. El análisis estadístico de los datos permitió estimar el siguiente modelo para la 4',7-dimetilnaringenina:

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

En el Cuadro 3 y en la Figura10 se resumen los parámetros estadísticos del modelo. El valor del coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 99.8% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo. Aún más, el intervalo de confianza obtenidos con un 95 % de confianza para la ordenada al origen incluye el cero mientras que para la pendiente no está incluido. Por lo tanto, la curva de calibración cumple con las especificaciones para la



linealidad del sistema y se puede utilizar para calcular la concentración de la 4',7-dimetilnaringenina en los productos comerciales.

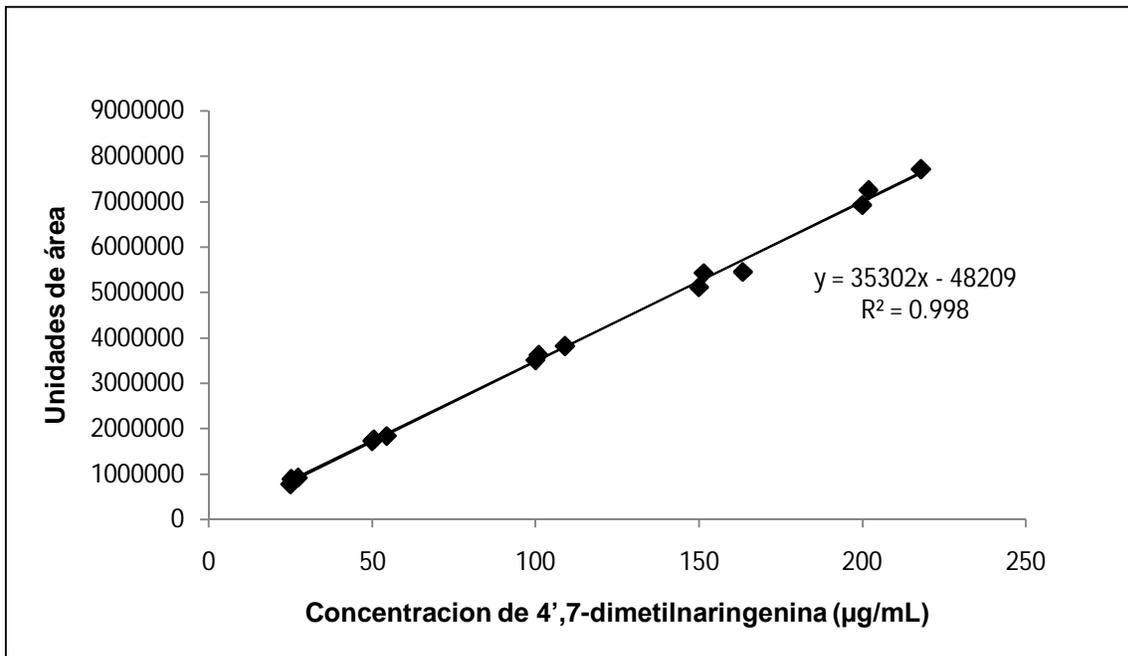


Figura 10. Gráfica que muestra la relación lineal entre las variables para la 4',7-dimetilnaringenina.

Ordenada al origen (β_0)	-48208.6	
Pendiente de la recta (β_1)	35302.3	
Coefficiente de correlación (r)	0.9989	
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9979	
INTERVALOS DE CONFIANZA		
	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
Ordenada al origen (β_0)	-169916.7	73499.5
Pendiente de la recta (β_1)	34345.3	36259.2

Cuadro3. Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la 4',7-dimetilnaringenina.

Con respecto a la acetina, el modelo de regresión lineal calculado fue:

$$\text{Área} = 47671 + 82629 * \text{Concentración}$$

En este caso, el coeficiente de determinación calculado indica que el 99.9% de la variabilidad total en la respuesta obtenida es explicada por el modelo propuesto



(Cuadro 4 y Figura11). El valor negativo y positivo de los límites inferior y superior del intervalo de confianza para la ordenada al origen indican la inclusión del cero en contraste, con el intervalo de confianza para la pendiente. Por lo tanto, el modelo cumple con las especificaciones de linealidad y puede emplearse para calcular la concentración de la acetina en los productos comerciales.

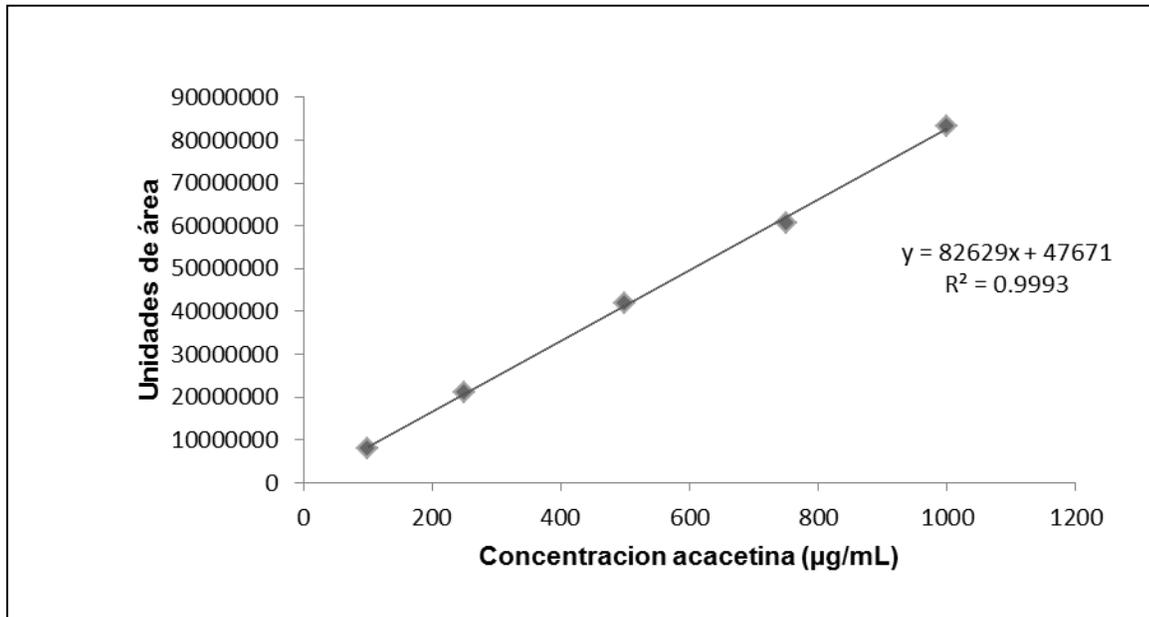


Figura 11. Gráfica que muestra la relación lineal entre las variables para la acetina.

Ordenada al origen (β_0)	47671.3	
Pendiente de la recta (β_1)	82629.3	
Coefficiente de correlación (r)	0.9996	
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9993	
INTERVALOS DE CONFIANZA		
	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
Ordenada al origen (β_0)	-748992	844334
Pendiente de la recta (β_1)	81331.7	83926.7

Cuadro 4. Resumen de la regresión lineal de la curva de calibración para la acetina.



4.3 ANÁLISIS DE DIFERENTES PRODUCTOS CON PROPÓLEO.

El análisis de cada producto comenzó con la identificación de los flavonoides utilizando para ello una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Una vez identificadas las señales correspondientes a los flavonoides (Figura 9) se inyectaron las muestras utilizando las condiciones cromatográficas con las que se validó el método (Cuadro 5).

Compuesto	4',7-dimetilnaringenina	Acacetina
Fase móvil	Metanol: Agua 0.1% TFA (55:45)	
Temperatura	25 °C	25 °C
Flujo	1 mL/min	1 mL/min
Volumen de inyección	10 µL	10 µL
Longitud de onda de detección	290 nm	340 nm

Cuadro 5. Condiciones cromatográficas del método analítico

4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Actualmente, el propóleo se utiliza en apiterapia, en preparados farmacéuticos y como aditivo de alimentos y bebidas. Diversos estudios enfocados a los métodos de extracción de propóleo han permitido demostrar que la mayor cantidad de metabolitos bioactivos se obtiene preparando los extractos con etanol al 70%. Entre los métodos utilizados para preparar los extractos a partir de la matriz sólida se encuentran la maceración, la extracción asistida con microondas y la extracción ultrasónica. Este último, mediante un efecto mecánico de la cavitación acústica incrementa los rendimientos de extracción y reduce significativamente los tiempos. Trusheva y colaboradores demostraron que el método de extracción por microondas además de presentar baja selectividad incorporaba cantidades significativas de ceras. La principal desventaja de este método residía además, en la degradación de los componentes bioactivos debido a la irradiación. En síntesis,



la extracción por ultrasonido es el método más eficiente considerando el tiempo, el rendimiento y la alta selectividad (Bankova *et al.*, 2007).

Por este motivo, la extracción de los marcadores a partir de la matriz farmacéutica se realizó utilizando la técnica de ultrasonido y etanol como disolvente. Los extractos generados se utilizaron para realizar, en primer lugar, una cromatografía de capa fina. Esta técnica permitió identificar la presencia de la acetina y la 4',7-dimetilnaringenina en los siguientes preparados comerciales: Extracto fluido "D", jarabe "F", jarabe "G", jarabe "K", jarabe "P", extracto "Q" y suplemento "M"

A pesar de ello, todos los extractos se analizaron empleando como método la cromatografía líquidos. Los cromatogramas generados se ilustran en las Figuras 12 a 30.

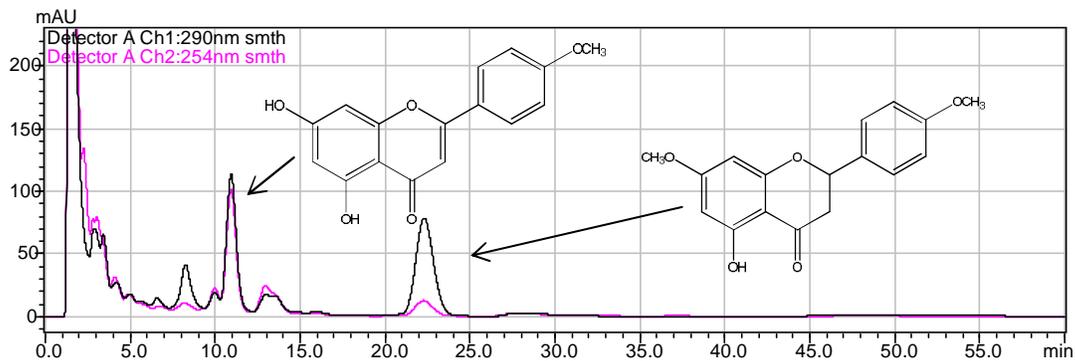


Figura 12. Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca "K".

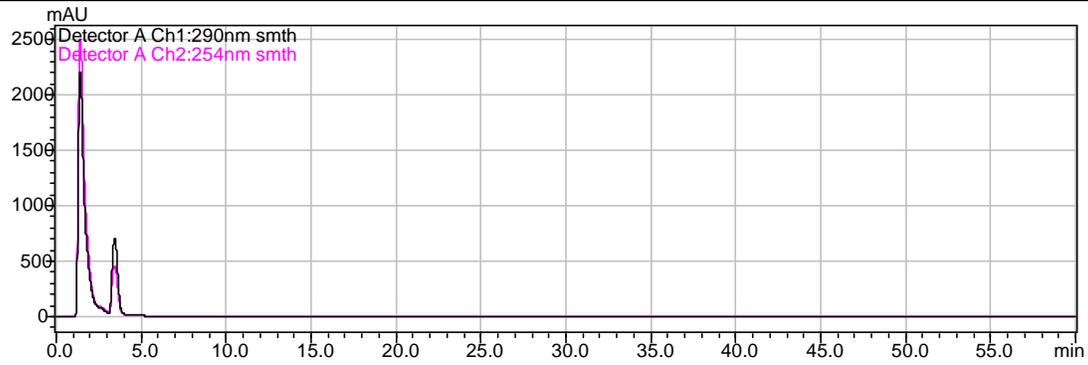


Figura 13. Cromatograma obtenido con la infusión del Té de propóleo marca “O”.

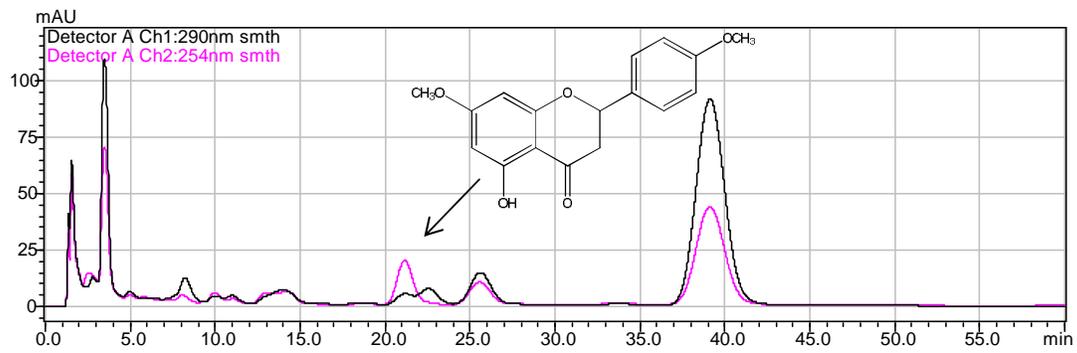


Figura 14. Cromatograma obtenido con el extracto de los caramelos macizos marca “B”.

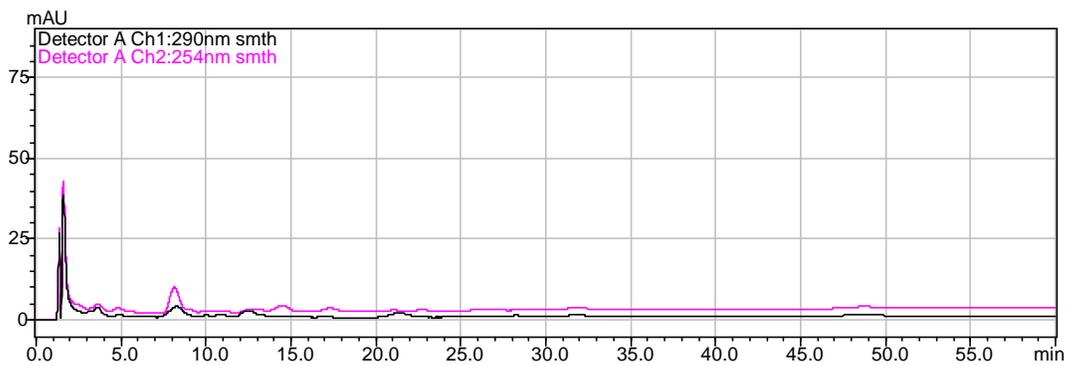


Figura 15. Cromatograma obtenido con el extracto del caramelo marca “H”.

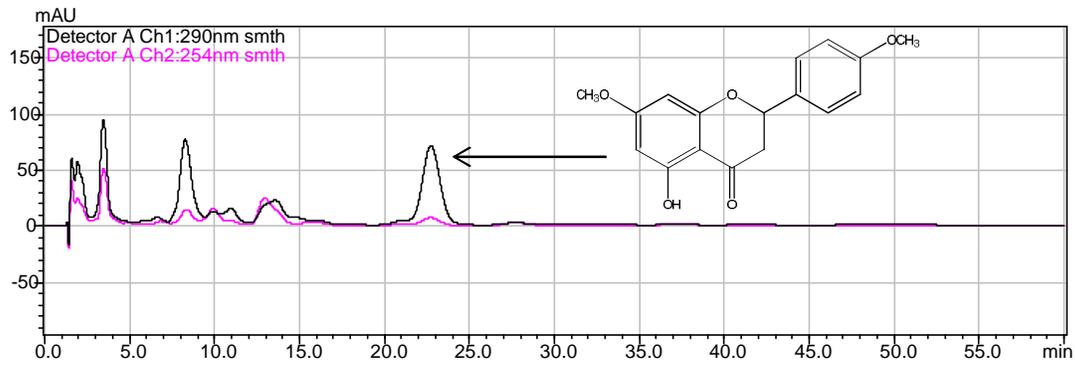


Figura 16. Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca "D"

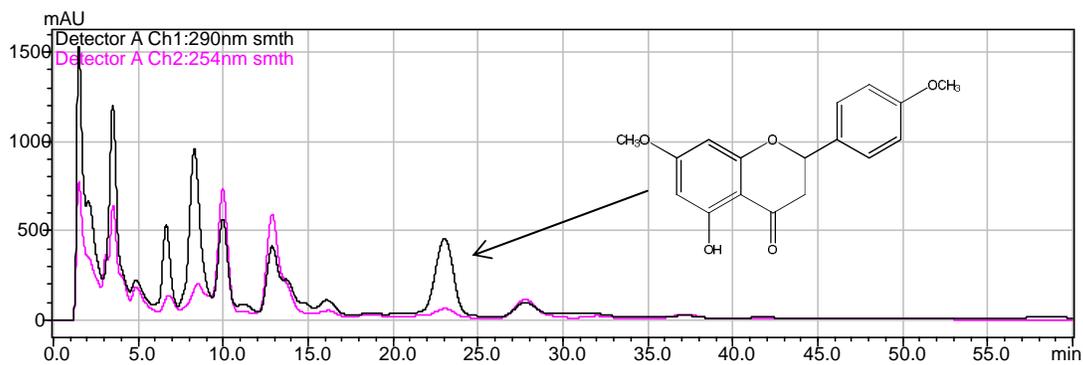


Figura 17. Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca "C".

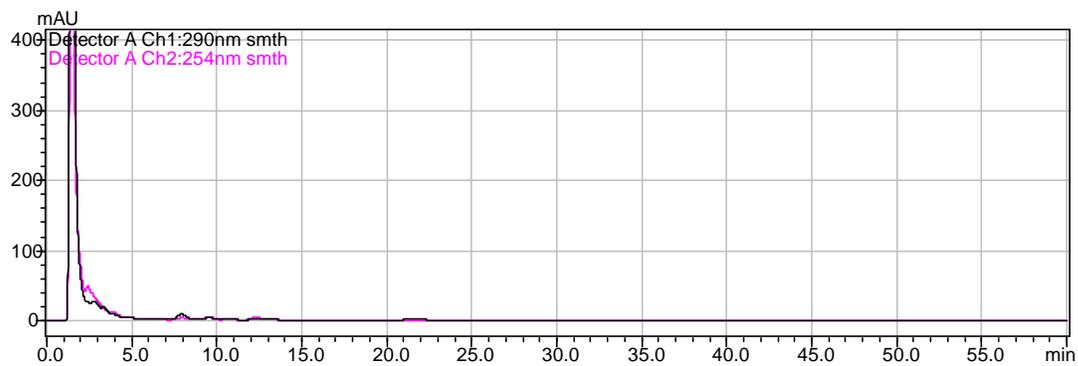


Figura 18. Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca "T".

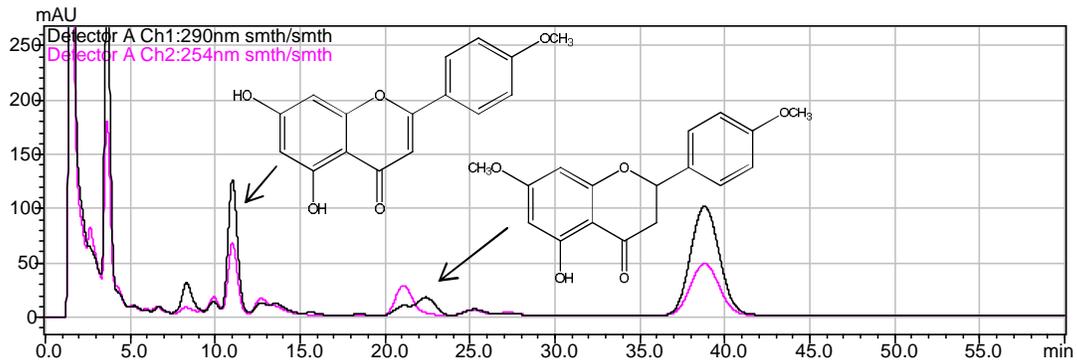


Figura 19. Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca “F”.

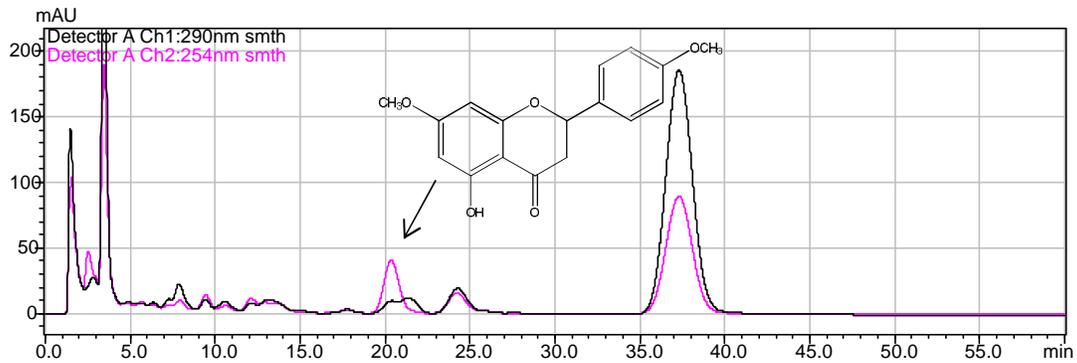


Figura 20. Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca “E”

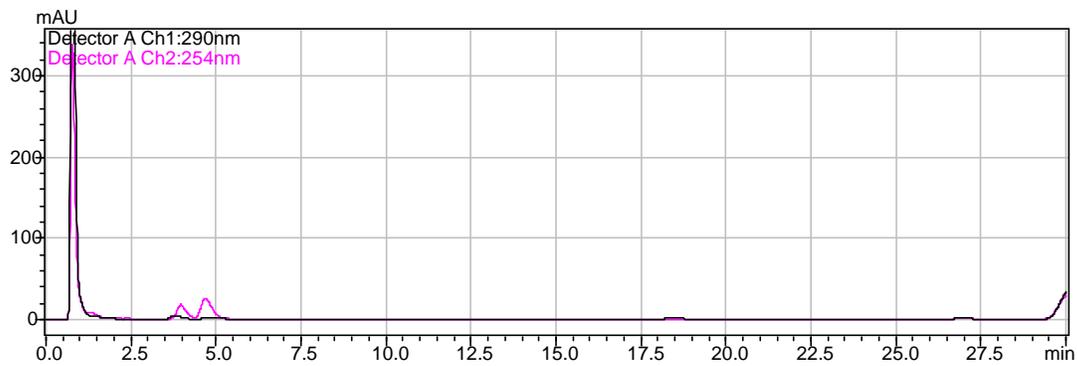


Figura 21. Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca “A”.

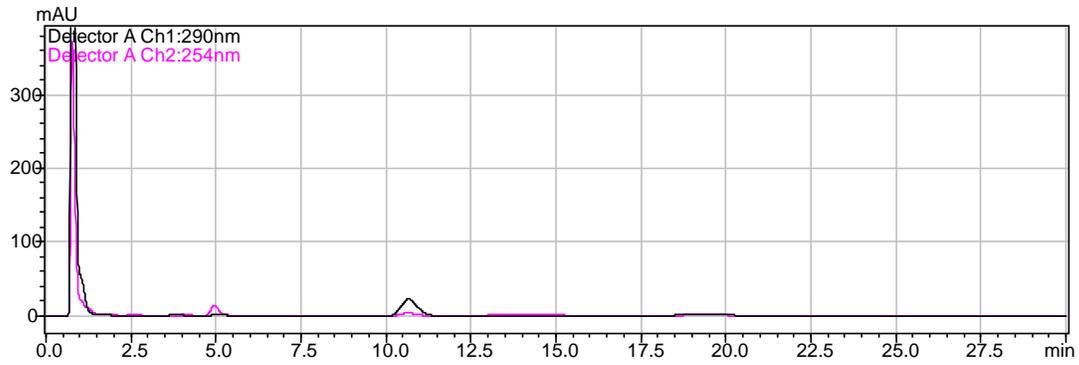


Figura 22. Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizco marca "L".

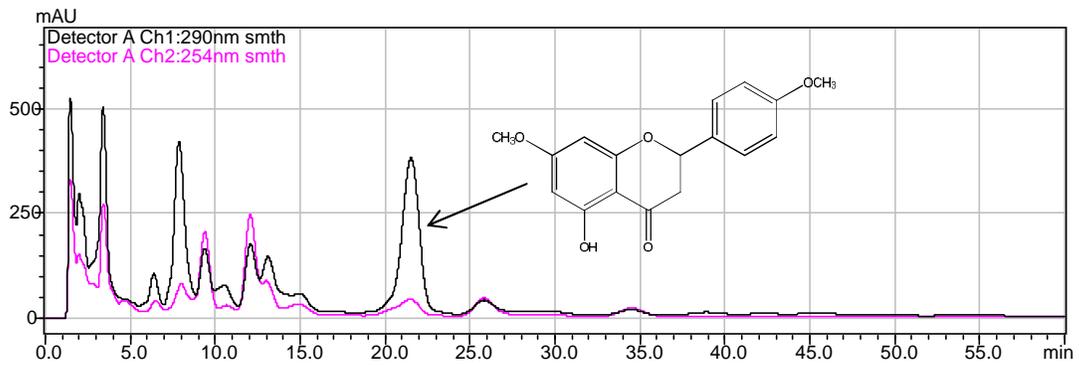


Figura 23. Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca "M".

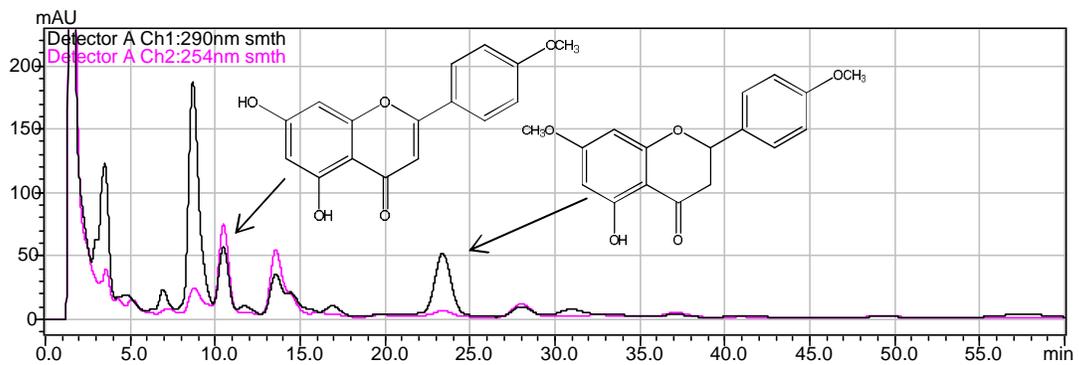


Figura 24. Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca "P"

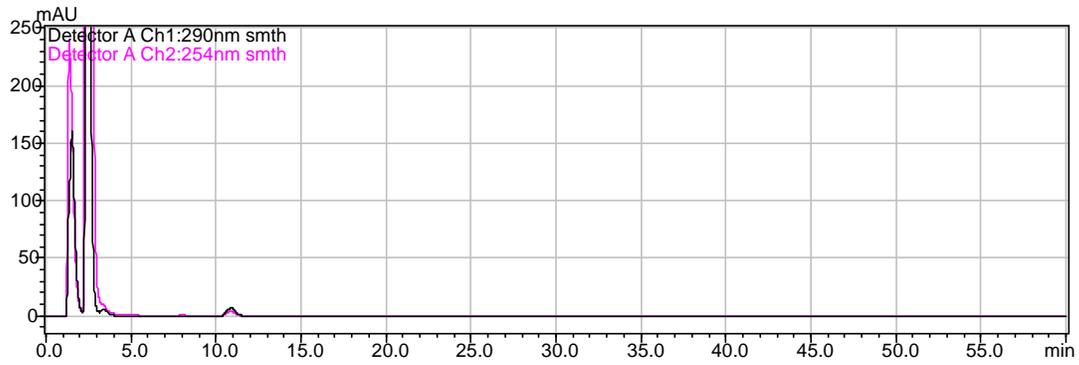


Figura 25. Cromatograma obtenido con la solución del jarabe marca "R".

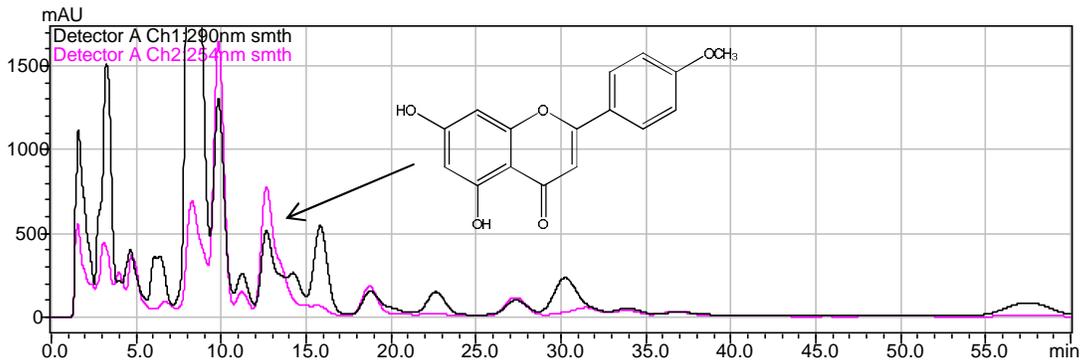


Figura 26. Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca "S".

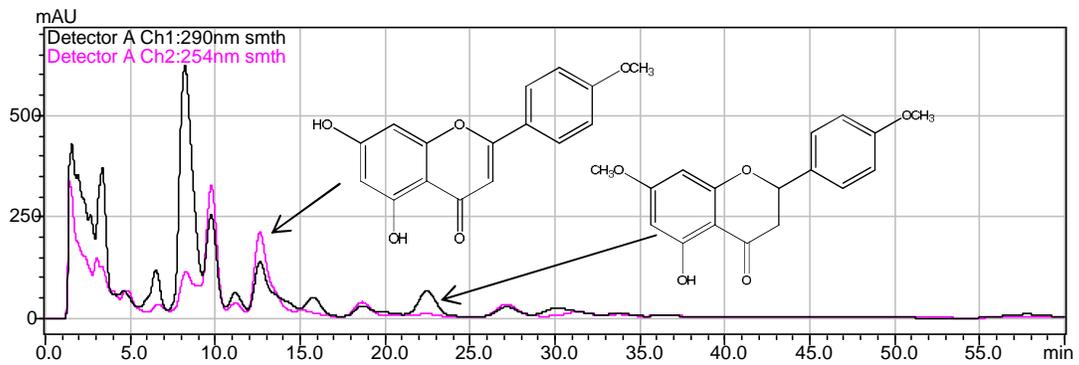


Figura 27. Cromatograma obtenido con el extracto de propóleo marca "Q".

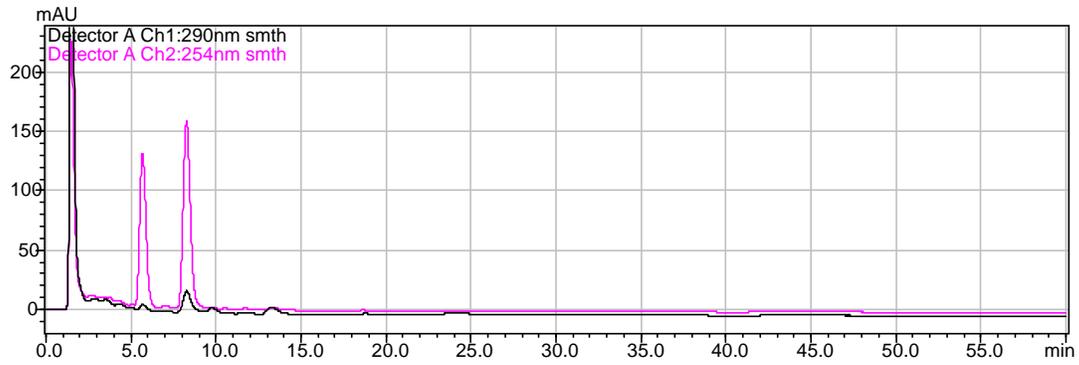


Figura 28. Cromatograma obtenido con el extracto de las paletas de caramelo macizo marca "N".

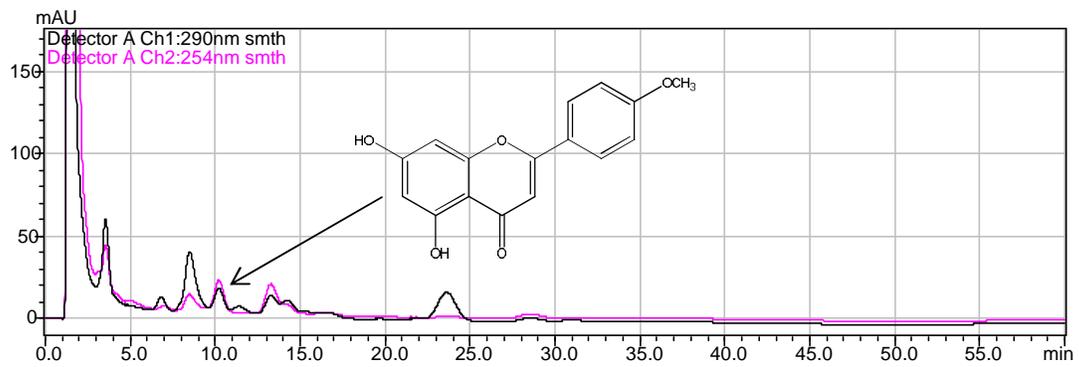


Figura 29. Cromatograma obtenido con la solución del atomizador con propóleo marca "I".

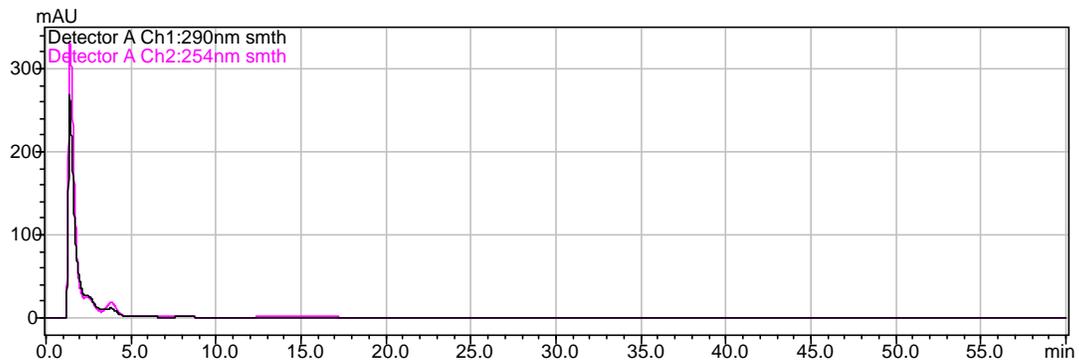


Figura 30. Cromatograma obtenido con el extracto con propóleo marca "J".



Como era de esperarse la presencia y la cantidad de los marcadores químicos varía dependiendo de la marca del producto. Aún más, los productos de un mismo fabricante varían drásticamente en el tenor de las concentraciones de los flavonoides. En algunos casos, el perfil cromatográfico corresponde con la composición química del propóleo utilizado como referencia y en otros, no es posible detectar la presencia de ningún flavonoide.

En el Cuadro 6 se resumen los resultados obtenidos durante el análisis de los diferentes productos. Dicho resumen incluye: la clave del producto, la identificación del flavonoide (donde fue posible identificarlos y cuantificarlo) y la información del sitio de elaboración contenida en el marbete.



Producto comercial con propóleo	Lugar de elaboración	Marcadores presentes
A	Guadalajara, Jalisco	Ninguno
B	México DF.	4',7-dimetilnaringenina
C	México DF.	4',7-dimetilnaringenina
D	México DF.	4',7-dimetilnaringenina y acetina
E	México DF.	4',7-dimetilnaringenina
F	México DF.	4',7-dimetilnaringenina y acetina
G	México DF.	4',7-dimetilnaringenina y acetina
H	México DF.	4',7-dimetilnaringenina y acetina
I	Zapopan, Jal. México	acetina
J	Santa Anita, Jal. México	Ninguno
K	México DF.	4',7-dimetilnaringenina y acetina
L	Jonacatepec, Morelos, México	Ninguno
M	Puebla, Puebla, México	4',7-dimetilnaringenina
N	Zapopan, Jal. México	Ninguno
O	México DF.	Ninguno
P	Guadalajara, Jalisco	4',7-dimetilnaringenina y acetina
Q	Guadalajara, Jalisco	4',7-dimetilnaringenina y acetina
R	París, Francia	Acetina
S	Guadalajara, Jalisco	Acetina
T	México DF.	Ninguno

Cuadro 6. Productos herbolarios analizados, sitio de manufactura y marcadores químicos identificados.



4.5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACACETINA Y LA 4',7-DIMETILNARINGENINA EN LOS PRODUCTOS ANALIZADOS.

Con las ecuaciones obtenidas fue posible calcular la concentración de los marcadores químicos buscados en este trabajo, mismas que se muestran en el Cuadro 7, en el cual se enlistan los productos en los cuales fue posible su cuantificación.

Producto	Cantidad del compuesto marcador	
	4',7-dimetilnaringenina	Acacetina
D	1300µg/mL	0
F	0	140 µg /g
G	170µg /g	8µg/g
I	0	8µg /g
C	9000µg/mL	0
P	2600 µg /g	300 µg /g
K	0	20µg /g
Q	1200 µg /mL	80 µg /mL
R	0	4.2 µg /g
S	3000µg /mL	0
M	5000 µg /g	0

Cuadro 7. Productos comerciales que contienen propóleo en su composición, y su cantidad de marcadores químicos.

Como se deduce del cuadro 6, seis de ellos no presentan entre sus componentes ninguno de los marcadores propuestos; en siete de ellos fue posible detectar la presencia de ambos y en siete sólo se detectó uno de ellos. Cabe mencionar que los productos elaborados por el mismo fabricante presentaron como denominador común la presencia de ambos marcadores en sus diferentes presentaciones. Sin embargo, el análisis de estos preparados es un reto difícil de abordar ya que el marbete de los mismos no indica el origen y la concentración de los extractos de



propóleos empleados para su elaboración. Como era de esperarse las concentraciones de los compuestos marcadores varían entre los diferentes preparados analizados. Este hallazgo es de vital importancia ya que la eficacia de los preparados herbolarios varía dependiendo de la concentración de sus constituyentes, por lo tanto, la calidad de diferentes lotes de producto será variable.

En este mismo Cuadro podemos confirmar que la marca comercial que contiene los marcadores buscados es Broncolín en sus diferentes presentaciones. Sus concentraciones varían debido quizás a que cada producto es elaborado con diferentes cantidades de propóleo y esto se puede deber a que para cada producto en su fabricación agregan mayor cantidad de propóleo que para otro, la época del año en que colectan el propóleo y la falta de homogeneización de la resina. Para los productos que no contienen a las moléculas marcadoras, podemos decir que el propóleo usado puede ser importado, ya que el propóleo de otras regiones del mundo como el oriental, brasileño, cubano y parte del europeo, contiene estas dos moléculas en muy bajas concentraciones, apenas cuantificables o en algún casos no las presentan, o que el propóleo mexicano adicionado a estos productos se encuentra en muy baja concentración, esté adulterado o en el peor de los casos no lo contengan. En el caso especial del extracto de propóleo marca “J”, podemos constar que en los cromatograma no presenta ninguna señal de flavonoides o moléculas que absorban al espectro UV y solo se realizó una dilución para inyectarlo en el cromatografo, por lo que se puede casi asegurar que el producto no contiene propóleo o en cantidades no detectables y revisando bibliografía se encontró un listado en el sitio web de la COFEPRIS en donde esta marca aparece mencionada como producto asegurado por dicha institución federal en el 2010 por la falta de autorización para su comercialización y porque no cuenta con base científica que sustente sus propiedades preventivas, terapéuticas y/o rehabilitadoras, por lo que solo recomiendan a la población no adquirir dichos productos (Figura 31). Así mismo, en la página web de cada marca no mencionan el origen del propóleo con el que trabajan, solo se cuenta con información muy superficial de los ingredientes si es



que la menciona. Se debe resaltar que la ausencia de los marcadores no indica que el producto no cumpla con las funciones “curativas” que promete, sino estas actividades pueden estar inducidas por otros componentes de la mezcla. Con esta investigación podemos constatar la falta de regulación en estos productos por parte de las autoridades pertinentes que en este caso podría estar escusado por el problema de la estandarización del propóleo.

En este contexto, y para formular recomendaciones especiales para los ministerios de salud se necesitan desarrollar los criterios de calidad básicos que permitan correlacionar un tipo particular de propóleo con una actividad biológica específica.



“PRODUCTOS MILAGRO”

A continuación se presenta el listado de algunos productos asegurados por COFEPRIS en el 2010 a los cuales los fabricantes les atribuyen propiedades terapéuticas, preventivas y/o rehabilitatorias, mismas que no cuentan con una base científica que lo sustente y que carecen de autorización para su comercialización por esta Autoridad Sanitaria, por lo tanto se recomienda a la población no utilizarlos.

- **JARABE DE LA TÍA TRINI**
- JARABE DE NERVIOS EL OASIS
- JARABE DE VÁRICES
- JARABE MATABICHOS
- JARABE NUTRIMEL
- KIER LU'U FLOR VNX JAMAICA ORGÁNICA
- LA DIABETES WEREQUE
- LAXISAN LIGHT
- LECITINA DE SOYA
- LESS KILOS
- LIMPIA LEX ("LIMPIEZA INTESTINA")
- LINAZA GOLDEN CANADIAN FLAXSEED LINAZA GOLDEN
- LUNA LLENA
- MAGNA VIDA REFORZADA CON UÑA DE GATO
- MEGAFORTE
- MELATONINA REFORZADA
- MENTE ÁGIL
- METABOLITO ADELGAZANTE

Monterrey 33, Col Roma, Del. Cuauhtémoc, México D.F., C.P. 06700,
Tel. 5080-5200 (Ext. 1229) · 01800-033-50-50
www.cofepris.gob.mx

Figura 31. Listado emitido por la COFEPRIS en el 2010 en donde se señala la aseguración de algunos productos, entre ellos la marca “J”, analizada en este trabajo, por incumplimiento de los beneficios que ofrece a los consumidores.



5. CONCLUSIONES

- a) Se desarrolló un método eficiente para la extracción de los compuestos marcadores del propóleo en diversos productos comerciales.
- b) El análisis de los diferentes preparados herbolarios por CLAE permitió identificar y, en algunos casos, cuantificar a la acacetina y a la 4',7-dimetilnaringenina como los constituyentes mayoritarios del propóleo proveniente de la región del altiplano mexicano.
- c) La selección de la acacetina y la 4',7-dimetilnaringenina como entidades químicas para el desarrollo y la validación del método analítico por CLAE será de utilidad para estandarizar los lotes de propóleo. Esta actividad permitirá el aseguramiento de la calidad de los productos elaborados con extractos etanólicos de propóleos provenientes de la región del altiplano.
- d) La presencia de la acacetina y la 4',7-dimetilnaringenina en los propóleos mexicanos es una característica que permitirá diferenciarlos químicamente de los propóleos provenientes de otras partes del mundo.



6. PERSPECTIVAS

- a) Aplicar el método analítico para identificar y cuantificar los flavonoides en diferentes lotes de propóleos y en los preparados farmacéuticos no estudiados de diferentes partes del altiplano mexicano. Así, se asegurara que las condiciones experimentales desarrolladas son de utilidad para diferentes matrices farmacéuticas.

- b) Promover el método de estandarización desarrollado en este trabajo, con las autoridades reguladoras, que son a COFEPRIS y la PROFECO, para asegurar la calidad de los productos en los diferentes puntos de ventas. Esto servirá para que estos preparados ya no sean incluidos en las listas de productos “milagro” y el consumidor tenga más confianza en adquirirlos, además de fomentar las ventas en los productos que cumplan con este criterio.



1. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **100**, 114-117.
2. Bankova, V., Boryana T. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 2007, **1**, 13.
3. Bankova, V., Solagne L. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 2000,**31**, 3-15.
4. Bernaus, J., Bernaus, C. Adulteración y falsificación de medicamentos. *Quorum*, 2006, 47- 61. <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/586115>
5. Burdock, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food Chemical Toxicology*, 1998,**36**, 347-363.
6. Castaldo, S. y Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002, **73 (1)**, S1-S6.
7. Codex Alimentarius, 2012, (<http://www.codexalimentarius.org/>), consultada en Julio de 2012
8. COFEPRIS, 2011, (http://www.cofepris.gob.mx/Documents/LoMasReciente/lista_PM.pdf), consultada en Julio de 2012.



9. De Castro, S., Higashi, K. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1995, **46**, 55-58.
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9ª Ed. México, Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2008, Vol II, 2427-2434.
11. Farre, R., Frasqueti., Sanchez , A. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 2004, **45(1)**, 21-43.
12. FDA, 2012
(<http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/ConsumerInformation/ucm110417.htm#what>) , consultada en Julio de 2012.
13. Garcez, F., Garcez, W., Santana, A., Alves, M., Matos, M., Scaliante, M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). *Journal Brazilian Chemical Society*, 2006, **17 (7)**, 1223-1228.
14. Hernández, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 2007, **73**, 1469-1474.
15. Higashi, K., De Castro, S. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 1994, **43(2)**, 149–155.



16. Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Liu, C.F., Lin, C.C. Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biochemical Pharmacology*, 2004a, **212**, 53-60.
17. Kumazawa, S., Tomoko, H., Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 2004, **84(3)**, 329-339.
18. Lago, J., Young, M., Reigada, J., Soares, M., Roesler, B, Kato, M. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. ihotzkyanum* (Piperaceae). *Química nova*, 2007 , **30(5)**, 1222-1224.
19. Ley general de salud, artículo 208, 215 y 216 página 108, 2006, Editorial Sista.
20. Libério, S., Pereira, A., Araújo, M., Dutra, R., Nascimento, F., Monteiro-Neto, V., Ribeiro, M. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on *S. mutans* group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, **125**, 1–9.
21. Liqin, J., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G., Wang, S. Analysis of Flavonoids in Propolis and Ginkgo biloba by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56 (24)**, 11571–11577.
22. López, V. A., Tapia, G.J. M., Macías, M. J., Chavoya M. F., Blanco, D. R., Mercado, A. J. Utilización del Geopropóleo de *Melipona colimana* (Hymenoptera: Meliponini) bajo dos tratamientos (térmico y neutral) sobre



cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *www.apitec.net*, publicación bimestral, 2006, **59**, 3-6.

23. Lotti C, Fernandez MC, Piccinelli AL, Cuesta Rubio O, Hernandez IM, De Simone F, Rastrelli L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**, 2209-2213.
24. Marcucci, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, 1995, **26**, 83-99.
25. Martinez., A, 2012, Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en propóleos mexicanos, Tesis de Licenciatura, UNAM, 26-28.
26. Min-Hsiung, P., Ching-Shu, L., Ying-Jan, W., Chi-Tang, H. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochemical pharmacology*, 2006, **72**, 1293-1303.
27. Mirzoeva, O., Grishanin, R., Calder, P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology research*, 1997, **152(3)**, 236-246.
28. Mondragon C., Ullo J. Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopia de infrarrojo. *Revista Fuente*, 2011, **3**, 6-11.



29. Nagai, T., Sakai, R., Inoue, H., Inoue, y N. Suzuki. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 2001, **75**, 237-240.
30. Noa, M., Perez, N., Diaz, G. Cromatografía de gas y líquidos de alta resolución aplicada en el análisis de alimentos. *Serie académica CBS*, UAM, 2005, **57**, 123-207.
31. Norma Ramal Búlgara ON 25 72 483-84, Norma Ramal Cubana 932-88, 2012,
(<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1197&ino=1197&io=7859>), consultada en Junio de 2012.
32. Norma rusa RST-RSFSR-317-77, (<http://www.api-guia.com.ar/propoleos/metodos-analiticos.htm>), consultada en Junio de 2012
33. Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses*, 2001, **44**, 375-375.
34. Ozcan, M., Unver, A., Ceylan, D., Yetisir, R. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2004, **48(3)**, 188-194.
35. Ozkul, Y., Silici, S., Eroglu, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine*, 2005, **12**, 742–747.



36. Peña, R.C. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación Agraria*, 2008, **35(1)**, 17-26.
37. Salamanca, G., Martínez, C., Parra, E., Martínez, T., Rubiano, L. El sistema de control y puntos críticos en la extracción y beneficio de propóleos. Colombia. 2001. (http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/puntos_criticos_propoleo.htm) , consultado en Julio de 2012.
38. Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Righi, A., Salatino, L. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Reports*, 2011, **28**, 925-936.
39. Santos, FA., Bastos, EM., Uzeda M., Carvalho, MA., Farias, LM., Moreira, ES., Braga, FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, **80**, 1-7.
40. Scazzocchio, F., Auria, F., Alessandrini, D., Pantanella, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiology research*, 2006, **101**, 327-333.
41. Sforcin, J., Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, **133**, 253-260.



-
42. Sforcin, J.M., Orsi, R.O., Bankova, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, **98**, 301–305.
43. Sroka, Z. The screening analysis of antiradical activity of some plant extracts. *Postepy Hyg. Medical Dosw*, 2006, **(en línea)** 60:563-570.
44. Trujillo, A. Filtro solar a base de propóleo, Patente No. 223746, 2004, <http://quimica.ugto.mx/revista/5/propoleo.htm>, consultada en Julio de 2012.
45. Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 2007, 1:13 (doi:10.1186/1752-153X-1-13).
46. Usami, E., Kusano, T., Takayose, H., Wachi, Y. Assessment of antioxidant activity of natural compounds by water and lipid-soluble antioxidant factor. *Yakugaku Zasshi*, 2004, **(en línea)** 124:847-850.
47. Weinstein, T. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternant Med*, 2008, **7(3)**, 307-315.