



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDO
CAFEICO EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS EUROPEOS MEDIANTE
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

PINGOS CHOCA RUTH EVELYN
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y
ÁCIDO CAFEICO EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS EUROPEOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

PINGOS CHOCA RUTH EVELYN
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2021



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDO CAFEICO
EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS EUROPEOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

PINGOS CHOCA RUTH EVELYN
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

VALVERDE DURAN SERGIO ANDRES

MACHALA, 21 DE SEPTIEMBRE DE 2021

MACHALA
21 de septiembre de 2021

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDO CAFEICO EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS EUROPEOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

por Ruth Evelyn Pingos Choca

Fecha de entrega: 03-ago-2021 12:43p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1627389605

Nombre del archivo: PINGOS_CHOCA_RUTH_EVELYN_PT-170521_EC.pdf (122.66K)

Total de palabras: 2739

Total de caracteres: 15488

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, PINGOS CHOCA RUTH EVELYN, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDO CAFEICO EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS EUROPEOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 21 de septiembre de 2021



PINGOS CHOCA RUTH EVELYN
0706394087

RESUMEN

El propóleo europeo es un producto que posee un sin número de aplicaciones terapéuticas gracias a su compleja composición química, entre las que se destacan como compuestos mayoritarios los flavonoides y ácido cafeico; su estudio mediante técnicas cromatográficas ha permitido su identificación.

Esta revisión tuvo como objetivo evaluar la presencia de flavonoides y ácido cafeico en extractos de propóleos europeos mediante métodos cromatográficos para su identificación y cuantificación. Por lo cual nos enfocamos en considerar cuál de los distintos métodos cromatográficos era el más confiable y adecuado, tomando en cuenta la estructura de los compuestos y las ventajas del instrumento elegido.

La recopilación de información dio como resultado a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como el mejor método para la determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos en estudio, debido a que en los últimos años ha cobrado gran importancia en las industrias y laboratorios, por su gran versatilidad, estabilidad, menor tiempo de análisis, fácil reproducibilidad y alta resolución. Además, varios estudios de validación confirmaron su linealidad, selectividad, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud del método e instrumento para la determinación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en propóleos. La capacidad de adicionar al instrumento detectores o técnicas independientes acordes a las características de los compuestos que se desee estudiar, aumenta su sensibilidad y especificidad.

Palabras clave: propóleos, flavonoides, ácido cafeico, HPLC

ABSTRACT

European propolis is a product that has a number of therapeutic applications thanks to its complex chemical composition, among which flavonoids and caffeic acid are the main compounds; their study by chromatographic techniques has allowed their identification.

The aim of this review was to evaluate the presence of flavonoids and caffeic acid in European propolis extracts using chromatographic methods for their identification and quantification. Therefore, we focused on considering which of the different chromatographic methods was the most reliable and suitable, taking into account the structure of the compounds and the advantages of the chosen instrument.

The compilation of information resulted in high performance liquid chromatography (HPLC) as the best method for the qualitative and quantitative determination of the metabolites under study, because in recent years it has gained great importance in industries and laboratories, due to its great versatility, stability, shorter analysis time, easy reproducibility and high resolution. In addition, several validation studies confirmed the linearity, selectivity, repeatability, reproducibility and accuracy of the method and instrument for the determination and quantification of flavonoids and phenolic acids present in propolis. The ability to add independent detectors or techniques to the instrument according to the characteristics of the compounds to be studied increases its sensitivity and specificity.

Key words: propolis, flavonoids, caffeic acid, HPLC

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO	6
DESARROLLO	7
MARCO TEÓRICO	7
Generalidades	7
Uso tradicional de propóleos	7
Composición química de propóleos	7
Flavonoides	8
Ácido cafeico	8
Métodos cromatográficos	8
Cromatografía en placa delgada	9
Cromatografía en HPLC	9
METODOLOGÍA	10
ANÁLISIS DE CASO	10
Contexto o situación del problema:	10
Pregunta a resolver:	10
CONCLUSIÓN	14
BIBLIOGRAFÍA	15

LISTA DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

	pág.
1. Validación del método HPLC para la determinación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en muestras de propóleos	12

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un material resinoso de consistencia pegajosa obtenida por las abejas de varias fuentes vegetales, es utilizado para la construcción, adaptación de sus colmenas o sellamiento de grietas de la misma. Esta sustancia posee una mezcla de diferentes metabolitos secundarios responsables de diversas propiedades bioactivas tales como antiinflamatorias, antibacterianas, antiulcerosas, antioxidantes y antivirales (Huang et al., 2014). La amplia aplicación del propóleo en la medicina tradicional ha provocado que el estudio de su composición química sea de gran importancia.

Estudios realizados de esta sustancia evidencian que sus características organolépticas, composición química y actividad farmacológica va depender de la ubicación geográfica que fue tomada, especie de las abejas o el origen botánico que ha tenido. Los propóleos recolectados en áreas de Europa, Asia y América del Norte se caracterizan por el contenido principal de fenoles, flavonoides y ácidos aromáticos que le otorga propiedades farmacológicas para tratar o prevenir una variedad de patologías (Ani et al., 2018).

Para su análisis químico se han aplicado una variedad de técnicas y procedimientos, entre las que destaca la cromatografía; un potente método que brinda información cualitativa y cuantitativa de los metabolitos de importancia; llegando a convertirse en el principal método para la identificación, separación y determinación de especies químicas. Para este tipo de análisis se encuentra la cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ramanauskienė et al., 2009).

A pesar de que se ha caracterizado ampliamente durante años, llegando a identificarse una mezcla compleja de más de 300 flavonoides, fenoles, terpenos y derivados del ácido cinámico, aún queda un camino largo por recorrer, para estudiar completamente sus componentes químicos, actividades biológicas y métodos que sean reproducibles, eficaces y óptimos para efectuarlos (Alotaibi et al., 2019).

Es por ello que en esta investigación se pretende conocer el mejor método cromatográfico instrumental para verificar la presencia de flavonoides y ácido cafeico en un extracto de propóleos europeos. El estudio sobre estos marcadores químicos que le dan sus múltiples efectos terapéuticos, tiene una gran importancia debido a que son de provecho para la preparación de futuros medicamentos naturales que contengan el principio activo de la especie.

OBJETIVO

Establecer el mejor método cromatográfico mediante revisión bibliográfica para la identificación y cuantificación de flavonoides y ácido cafeico en extractos de propóleos europeos.

DESARROLLO

MARCO TEÓRICO

Generalidades

El término “Propóleo” etimológicamente proviene del griego que significa “defensa de la ciudad”. El propóleo llega a ser un material apícola resinoso obtenida por las abejas en su mayoría de la especie *Apis mellifera*, de brotes vegetales y combinada en la colmena con su saliva, secreciones enzimáticas y cera producidas por ellas, con el objetivo de cubrir grietas y proteger las paredes del panal, evitar la proliferación de bacterias u hongos y regular la temperatura interna de la colmena (Cauich y Segura, 2019). Organolépticamente los propóleos pueden tener una variación en su aspecto, se han llegado a identificar una diversidad de colores como, rojo, pardo, marrón claro y verde; tener una consistencia elástica o gomosa; y una textura ya sean friables o firmes. Cada una de estas características van a depender de su origen geográfico, especie de las abejas productoras y el origen botánico de su recolección; además su variación no solo será física, sino también química y terapéutica (Suarez et al., 2013).

Uso tradicional de propóleos

A lo largo de la historia existe evidencia sobre el uso de los propóleos con fines medicinales, antiguas culturas como los egipcios lo utilizaban para embalsamar cadáveres, los Incas como agente antipirético, en Grecia y Roma como antiséptico natural y cicatrizante, entre otros. En las últimas décadas, para los investigadores esta sustancia se ha convertido en un potencial recurso natural por sus múltiples propiedades biológicas y farmacológicas; se ha evidenciado estudios que rescatan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antivírico, anticáncer, antiparasitaria, antiulcerosas y además hay estudios *in vitro* sobre la actividad antioxidante (Cauich y Segura, 2019).

Composición química de propóleos

El propóleo es una sustancia compleja de naturaleza lipofílica, comúnmente los propóleos crudos están compuestas por un 45-55% de resina vegetal, 25-35% de cera, un 5-10% de aceite esencial y aromático, un 5% de polen y 5% de distintos compuestos orgánicos (Ani et al., 2018).

Varios estudios realizados confirmaron la presencia de grupos de compuestos químicos como los polifenoles entre las que destacan las flavonas en particular crisina y ácido cafeico, también sesquiterpenos e hidrocarburos triterpénicos, ácidos benzoicos y derivados, ácido cinámico y sus derivados. Además están constituidos de aminoácidos como la Vitamina B1, provitamina A, Vitamina PP y también de microelementos como el Calcio, potasio, Sodio, Magnesio, Hierro, fósforo, etc (Cauich y Segura, 2019).

Flavonoides

Los flavonoides son un grupo amplio de compuestos de naturaleza fenólica (polifenoles) de bajo peso molecular que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por átomos de carbono y su estructura general es C6-C3-C6 (Cartaya y Reynaldo, 2001). Llegan a clasificarse en subclases como flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavanonas, catequinas, entre otras. Estos metabolitos son de gran importancia para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas.

Estos conforman la mayor parte de compuestos químicos de los propóleos contribuyendo a sus propiedades farmacológicas, como antibacterianos, antivirales y antiinflamatorias (Huang et al., 2014).

Ácido cafeico

El ácido cafeico pertenece a los compuestos polifenoles, estos metabolitos se hallan como monómeros (forma simple) como ésteres de ácidos orgánicos, ésteres de azúcares, o formas complejas como dímeros, trímeros y derivados flavonoides. En la planta cumple varias funciones como inhibidor sobre el crecimiento de plagas, hongos y bacterias. Este compuesto está presente en alimentos como el café, vino y propóleo (Monteiro et al., 2019).

Terapéuticamente está asociado a propiedades antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes, convirtiéndolos en otro de los principales compuestos bioactivos (Petelinc et al., 2017).

Métodos cromatográficos

La cromatografía es un método eficaz de separación y mejoramiento de las variables experimentales para lograr un análisis cualitativo y cuantitativo eficiente. Estos métodos tienen utilidad en todas las ramas de la ciencia ya que su aplicabilidad ha ido aumentando

en los últimos años, con el tiempo se ha ido perfeccionando nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas para la caracterización, separación e identificación de componentes de una mezcla compleja (Skoog et al., 2008).

Con el desarrollo de técnicas cromatográficas líquidas de alta resolución, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases entre otros, se han identificado una diversidad de compuestos en el propóleo por primera vez, como flavonoides, fenólicos y sus ésteres, terpenos, hidrocarburos y elementos minerales (Huang et al., 2014).

Cromatografía en placa delgada

La cromatografía en capa o placa delgada es una técnica que se basa en el principio de la cromatografía de absorción, su acción recíproca entre el adsorbente y el adsorbato permite la separación de los componentes. Este método se utiliza para determinar la identidad y pureza de diversos compuestos presentes en una mezcla (Surat, 2018).

Actualmente esta técnica se ha desarrollado para ser rápida, sensible y con mejor resolución y considerando que se aplican para el desarrollo de las condiciones para las separaciones en la cromatografía líquida de alta resolución. Debido a su amplio uso en laboratorios industriales, clínicos, estudios bioquímicos y biológicos hace que siga siendo una técnica de gran importancia (Skoog et al., 2008).

Cromatografía en HPLC

La cromatografía líquida es un tipo de técnica analítica en columna, basada en la elución en gradiente y diversas interacciones químicas entre la sustancia analizada y la columna consistida en una fase estacionaria no polar, para la separación de componentes presentes en una mezcla (Toledo, 2011).

La cromatografía líquida de alta eficiencia o alta presión (HPLC), es altamente utilizada en muchos campos de la ciencia, por su alta sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas precisas, capacidad para separar especies termolábiles o no volátiles (Skoog et al., 2008).

METODOLOGÍA

Este estudio de caso al ser una investigación de tipo descriptiva se realizará el uso de información bibliográfica de artículos y libros con peso científico. La información obtenida sobre los diversos métodos cromatográficos existentes para la identificación de grupos polifenólicos entre las que se encuentran los flavonoides y ácido cafeico, permitirá realizar un análisis sobre el mejor método cromatográfico para la identificación y cuantificación de estos metabolitos, tomando en cuenta características estructurales y ventajas instrumentales.

ANÁLISIS DE CASO

Contexto o situación del problema:

Un extracto de propóleos europeo es rico en flavonoides y derivados del ácido cafeico. Ambas familias de compuestos contribuyen al valor medicinal de dicho extracto. Se desea verificar, después de un año de conservación a 25 °C, si dichos compuestos aún están presentes y cuantificar la cantidad del flavonoide crisina.

Pregunta a resolver:

¿Qué método cromatográfico instrumental usted seleccionaría para complementar lo antes señalado? Argumente su selección teniendo en cuenta las características estructurales de los flavonoides y del ácido cafeico. Considere el fundamento, características y ventajas del método instrumental.

Los flavonoides son compuestos con gran número de grupos hidroxilos por lo que tienden a ser compuestos polares al igual que el ácido cafeico, pueden ser extraídos con solventes como el metanol, etanol, agua, acetato de etilo, etc. utilizando diferentes técnicas cromatográficas como la cromatografía en capa fina o placa delgada (CCF), cromatografía en columna y especialmente la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Cartaya y Reynaldo, 2001).

La cromatografía en placa delgada llega a ser un método sencillo, rápido y requiere de pequeñas cantidades de muestra que permite el aislamiento e identificación de metabolitos de interés, a pesar de ser un método bastante útil, favorable y además económico, su análisis no es tan sensible para compuestos complejos que se necesite

estudiar de forma más precisa (Cartaya y Reynaldo, 2001). En cambio la cromatografía líquida de alta eficacia más conocida por sus siglas como HPLC, se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas, ya que presenta muchas ventajas, porque tiene la capacidad de identificar, separar y cuantificar compuestos presentes en muestras complejas que se esté realizando el estudio (Yadav y Bharkatiya, 2017). A continuación se fundamentan las razones por las cuales el HPLC es el mejor método de selección.

Entre muchas de sus ventajas este tipo de técnica tiende a ser simultáneo, estable, con buena repetibilidad, alta versatilidad, tiempo reducido de análisis y además muestra niveles mucho mayores de sensibilidad y resolución que la cromatografía de papel o de capa fina (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Como parte de la instrumentación del HPLC, se encuentra conformado también por un detector, que es una parte bastante fundamental para el equipo, por lo que su selección va a depender de la naturaleza química de los analitos, además de considerar características como la facilidad, reproducibilidad y previsibilidad (Swartz, 2010). Su introducción al HPLC mejora su sensibilidad facilitando la determinación y cuantificación de la composición en análisis.

En el caso de los metabolitos de importancia antes señalado, se han realizado estudios utilizando diferentes detectores o técnicas analíticas independientes en combinación con el método, como detectores de matriz de diodos (DAD), espectrometría de masas (MS) abriendo paso a un análisis rutinario y extenso de la identidad de los flavonoides y por último la detección UV, que ha llegado a ser la herramienta más utilizada y preferida por ser un detector específico que responde a analitos que absorben la luz UV en longitudes de onda específicas (Swartz, 2010). Por tanto los flavonoides al ser eluidos por HPLC son captados por lo general a 280 nm mientras que el ácido cafeico es captado a 290 nm, debido a que ellos se presentan un máximo de absorción UV entre 270 y 290 nm; y al ser eluidos se identifican basándose en una comparación entre la retención y el tiempo de retención del estándar de referencia (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Por último, cualquier método de análisis para ser un excelente instrumento de selección debe cumplir una variedad de requisitos para una mejor optimización como es la validación (Yadav y Bharkatiya, 2017). La validación es un procedimiento mediante el cual se miden características típicas de rendimiento de algún proceso rigiéndose en

directrices del consejo Internacional de Armonización (ICH); estas deben cumplir ciertos parámetros tales como la linealidad, selectividad, repetibilidad, exactitud, precisión, límites de detección y límites de cuantificación, etc (Shine y Sree, 2019).

En los últimos años la composición química de los propóleos sigue siendo de gran interés para los investigadores debido a su compleja composición, por lo cual se han realizado varios estudios de validación con diferentes métodos para identificar sus componentes mayoritarios, estos son los flavonoides y ácido fenólicos para su determinación y cuantificación. Muchos de los estudios se han realizado con el método cromatográfico HPLC, las cuales han sido validados para verificar la idoneidad del método para dichos metabolitos, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Validación del método HPLC para la determinación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en muestras de propóleos.

Muestras	Parámetros de Validación	Sust. Estándar	Cuantificación	Autor
Extracto Etanólicos	Linealidad: R2 0,999 RSD de precisión: $\leq 2.0\%$ Variación de repetibilidad: $<2,0\%$	Acacetina: 4,7-dimetil naringenina: 4,7-dimetil apigenina:	161,2 mg/g 3-69mg/g 2-33mg/g	(Rivero y Martínez, 2014)
Propóleo crudo	Linealidad: R2 0,999 LOD: 0,5 a 0,8 g/ml (ácidos fenólicos) y 1,2 a 3,0 g/ml (flavonoides). RSD de retención: $\leq 0,3$ y 2.2%	Ácidos fenólicos: Flavonoides totales:	5.0 a 120.8 mg/g 2.5 a 168 mg/g	(Pellati et al., 2013)
Extractos Etanólicos	Linealidad: R2 0,999 LOD: 0,74 Y 3,02 ug/ml LOQ: 2,48 y 10,07 ug/ml Repetibilidad: 11.76% RSD de precisión: 13,36 y 14,56 %	Kaempferide: 3,5-di-ácido cafeoilquínico:	19,30 mg/g 22,12 mg/g	(Machado et al., 2018)
Extractos Metanólicos	Linealidad: R2 0,99 RSD de precisión: $\leq 2.0\%$ LLOQ: 0,5 y 100ug/ml Repetibilidad: $\pm 2\%$	Artepilina: Ácido cafeico:	3.509 mg/g 0,141 mg/g	(Sun et al., 2019)
LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación, RSD: Desviación estándar				

Los siguientes estudios fueron realizados en diferentes tipos de muestras de propóleos, en forma de extractos o crudos así mismo de diverso origen geográfico, las cuales fueron sometidos a distintas evaluaciones para su validación, se utilizaron una variedad de sustancias estándares, pero se mencionan las más relevantes empleados para su cuantificación.

Rivero y Martínez (2014) en su estudio de validación de la cromatografía líquida de alto rendimiento con el complementamiento de un detector UV/ Vis, obtuvo una linealidad, precisión y variación de repetibilidad dentro de los rangos aceptables revelando que el método fue preciso, exacto y lineal para la cuantificación simultánea de los marcadores activos del extracto de propóleo. De la misma manera Pillate y colaboradores (2013) en su análisis de ácidos fenólicos y flavonoides en propóleos crudos determinó a la crisina, ácido cafeico y ácido ferúlico como más abundantes; concluyendo además que el procedimiento desarrollado con dicho método fue considerado como herramienta confiable y útil.

En los estudios de validación de Machado y colaboradores (2018), al método HPLC se acopló un detector de matriz de fotodiodos (UV/DAD), arrojando datos precisos y exactos para la cuantificación de 48 muestras de propóleos, refiriendo en la tabla los mayoritarios. Y por último la verificación metodológica del HPLC con un detector de matriz de fotodiodos realizada por Sun y demás autores en el año 2019, de acuerdo con las directrices del ICH fueron óptimas, para la cuantificación de siete ácidos fenólicos en la que se halla el ácido cafeico obteniendo un contenido total de 5.79 ± 2.2 % de ácidos fenólicos.

CONCLUSIÓN

Los propóleos son una sustancia resinosa con una variedad de actividades terapéuticas ocasionadas por su composición química. Los estudios realizados a lo largo de los años reflejan la presencia de flavonoides y ácido cafeico como compuestos mayoritarios en los propóleos de origen europeo. Su determinación y análisis ha sido posible por la aplicación de técnicas cromatográficas entre las que se destaca la cromatografía líquida de alto rendimiento como el mejor método para la identificación y cuantificación de estos metabolitos basándose en las múltiples ventajas que dicha instrumentación presenta. Además, según el análisis de los estudios de validación con esta instrumentación se pueden obtener datos precisos, específicos y exactos.

Dicha instrumentación posee una variedad de características como versatilidad, confiabilidad, alta sensibilidad y rapidez evidenciadas con la validación. Es importante aludir que para aumentar su potencia y sensibilidad para estudios de compuestos más específicos se puede acoplar a técnicas independientes y detectores en combinación para futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Alotaibi, A.; Ebiloma, G.; Williams, R.; Alenezi, S.; Donachie, A. M.; Guillaume, S.; Igoli, J. O.; Fearnley, J.; De Koning, H.P.; Watson, D. G. European propolis is highly active against trypanosomatids including *Crithidia fasciculata*. *Nature*. **2019**, 9, 11364, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47840-y>

Ani, I.A.; Zimmermann, S.; Reichling, J.; Wink, M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*. **2018**, 5, 1-17. doi:10.3390/medicines5010002

Cartaya, O.; Reynaldo, I. FLAVONOIDES: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos Tropicales*. **2001**, 22, 2, 5-14.

Cauich, R.; Segura, M. R. Bee Propolis: Properties, Chemical Composition, Applications, and Potential Health Effects. *Bioactive Compounds*. **2019**, 227- 243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00012-8>

Huang, S.; Zhang, C.P.; Wang, K.; Li, G.Q.; Hu, F.L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis . *Molecules*. **2014**, 19, 19610-19632. doi:10.3390/molecules191219610

Machado, C. S.; Finger, D.; Felsner, M. L.; Reyes, Y. In house validation of an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of specific bioactive compounds in southern Brazilian propolis. *J. Apic. Res.* **2018**, 1-10. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1501857>

Monteiro, K. M.; Ferreira, R. G.; Mosquera, L. E.; Rocha, A. C.; Machado, A. H; Bispo, A. G.; Oliveira, A. P.; Chagas, M. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Front. Oncol.* **2019**, 9, 541, 1-10. doi: 10.3389/fonc.2019.00541

Petelinc, T.; Medved, M.; Polak, T.; Jamnik, P. Caffeic Acid Esters Affect Intracellular Oxidation and Vitality of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Natural Product Communications*. **2017**, 12, 11, 1773-1776.

Pellati, F.; Pio, F.; Bertelli, D.; Benvenuti, S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, 81-82, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.003>

Ramanauskienė, K.; Savickas, A.; Inkėnienė, A.; Vitkevičius, K.; Kasparavičienė, G.; Briedis, V.; Amšiejus, A. Analysis of content of phenolic acids in Lithuanian propolis using high-performance liquid chromatography technique. *Medicina*. **2009**, 45, 9, 712-717.

Rivero, B.; Martínez, A. Development and validation of a RP-HPLC Method for the Simultaneous Quantification of Flavonoids Markers in Mexican Propolis. *Food Anal. Methods*. **2014**. DOI 10.1007/s12161-014-9908-5

Shine, S.; Sree, J. V. Review on HPLC Method Development Validation and Optimization. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2019**, 56, 2, 28-43.

Skoog, D. A.; Holler, F.J.; Crouch, S. R. Principios de análisis instrumental. Sexta Edición; Cengage Learning: Santa Fe, 2008.

Suarez, M. A.; Rosende, R. O.; Finten, S. B. Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. *Revista Facultad de Odontología*. **2013**, VI, 1, 21-26.

Surat, P. News Medical Life Sciences. 2018. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Thin-Layer-Chromatography-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Thin-Layer-Chromatography-(Spanish).aspx) (accessed Julio 22, 2021).

Sun, S.; Liu, M.; He, J.; Li, K.; Zhang, X.; Yin, G. Identification and Determination of Seven Phenolic Acids in Brazilian Green Propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules*. **2019**, 24, 1791, 2-13. doi:10.3390/molecules24091791

Swartz, M. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, 33, 9-12, 1130-1150. DOI: 10.1080/10826076.2010.484356

Toledo, F. J. *Informe sobre la utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el estudio de los Polisacáridos Mucilaginosos de Aloe vera (AVMP)*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria: Las Palmas de Gran Canaria. 2011.

Yadav, V.; Bharkatiya, M. A REVIEW ON HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. *RJLBPCS*. **2017**, 2, 6, 166-178. DOI - 10.26479/2017.0206.12