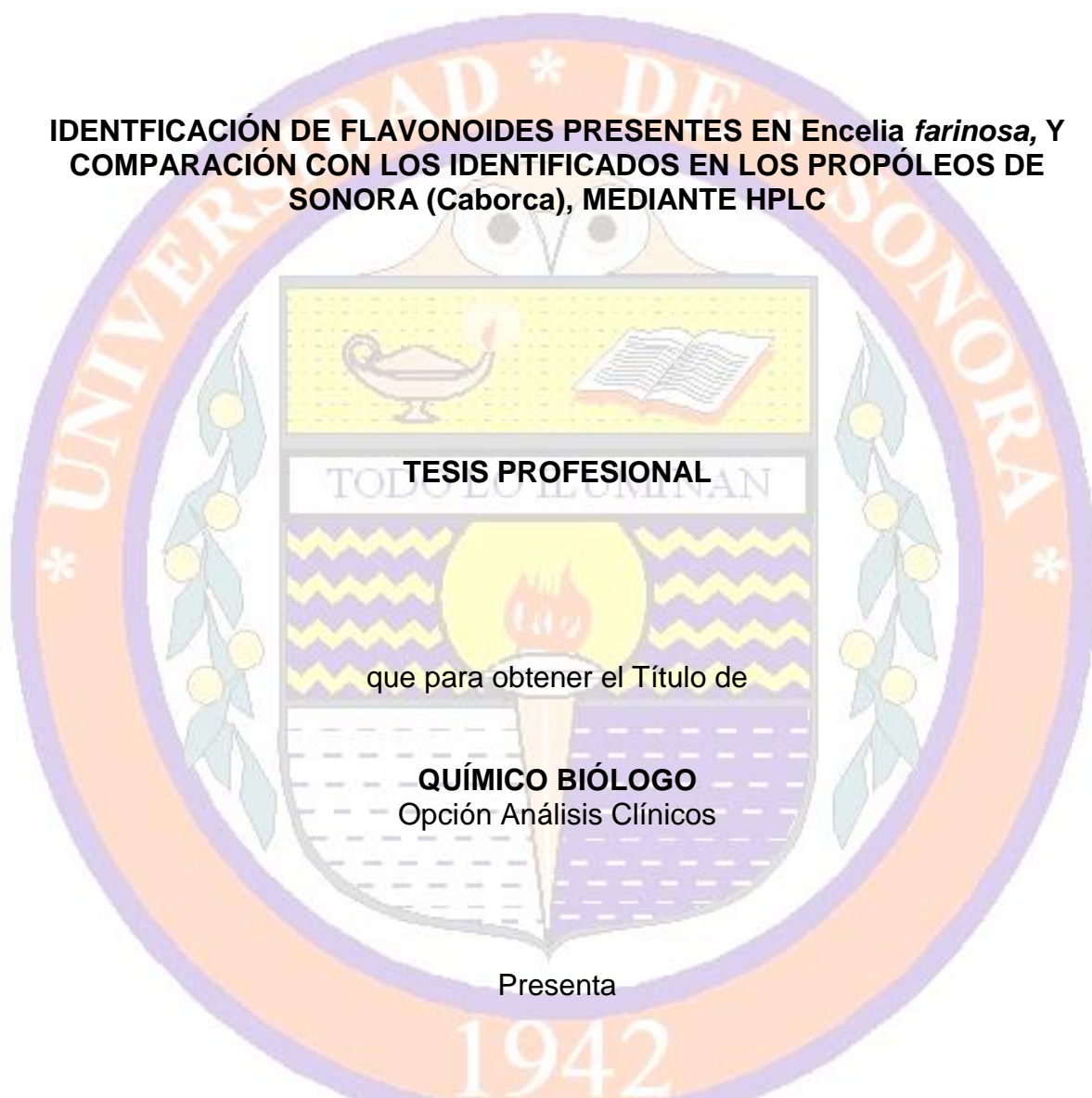


**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**

**IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES PRESENTES EN *Encelia farinosa*, Y  
COMPARACIÓN CON LOS IDENTIFICADOS EN LOS PROPÓLEOS DE  
SONORA (Caborca), MEDIANTE HPLC**



Presenta

**GEORGINA MORALES RAMÍREZ**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

	Página
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
Objetivo General	<b>3</b>
Objetivos Particulares	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
Origen de Propóleos	<b>4</b>
Composición Química	<b>4</b>
Propiedades Biológicas y Terapéuticas	<b>8</b>
Tipos de Propóleos	<b>9</b>
Propóleos de Zonas Templadas	<b>9</b>
Propóleos de Zonas Tropicales	<b>9</b>
Propóleos de Zonas Áridas y Semiáridas	<b>10</b>
Análisis de Propóleos	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
Lugar de Investigación	<b>13</b>
Materiales de Laboratorio	<b>13</b>
Reactivos Químicos	<b>14</b>
Material Biológico	<b>14</b>

Procedimiento Experimental	15
Preparación de la muestra	15
Obtención del extracto metanólico	17
Identificación de Compuestos	18
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>20</b>
Obtención del extracto metanólico	20
Identificación de flavonoides	20
Análisis de flavonoides en el extracto metanólico	22
Comparación de flavonoides en <i>Encelia</i> y <i>Propóleos</i>	28
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>31</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Principales componentes de las resinas	7
2	Diagrama de flujo del proceso para la obtención del extracto e identificación de flavonoides presentes en la planta de <i>Encelia farinosa</i>	16
3	Cromatogramas del los estándares de flavonoides obtenidos en HPLC, mostrando los tiempos de retención.	21
4	Cromatograma resultante del extracto metanólico (EM) de <i>Encelia farinosa</i> inyectado a HPLC	24

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Composición promedio de Propóleos	5
2	Principales componentes de muestras de Propóleos determinadas e identificadas por HPLC-MS	12
3	Gradientes de elusión para la separación de compuestos en HPLC	19
4	Tiempos de retención de los estándares inyectados a HPLC	23
5	Tiempos de retención resultantes del extracto metanólico, compuestos identificados y tiempos de retención de los estándares.	26
6	Comparación de flavonoides presentes en los propóleos de Caborca y en la planta de <i>Encelia farinosa</i> .	29

## RESUMEN

Las abejas del género de *Apis mellifera* elaboran el propóleo a partir de resinas y otros materiales vegetales, debido a esto la composición química de los propóleos varía dependiendo de la región de la flora.

La flora que predomina en la región de Caborca es la planta de *Encelia farinosa*, comúnmente conocida como hierba blanca. El objetivo principal de este trabajo fue identificar los flavonoides presentes en la planta de *Encelia farinosa* y posteriormente compararlos con los flavonoides presentes en los propóleos de Sonora (Caborca).

Se recolectaron muestras de *Encelia farinosa* en la región de Caborca conocida como "El Arenoso", con ella se elaboró un extracto metanólico, éste fue inyectado en un equipo de HPLC, de éste modo se pudo identificar los flavonoides presentes al usar estándares. Posteriormente se comparó con los flavonoides presentes en los propóleos de Caborca, los cuales fueron recolectados en un área no mayor a 400 m de distancia de donde se recolectó la muestra de *Encelia farinosa*.

El equipo de HPLC nos mostró un cromatograma en el que se aprecian varios picos de diferentes intensidades con sus tiempos de retención característicos e iguales a los de los estándares usados para su identificación. Los flavonoides que fueron identificados fueron: Pinocembrina, Xantomicrol, Crisina y Galangina.

Posteriormente se hizo una comparación con los flavonoides identificados en los propóleos de Sonora (Caborca) y se pudo concluir que

son los mismos, por lo que *Encelia farinosa* es la posible fuente botánica principal de los propóleos de Sonora (Caborca).



## INTRODUCCIÓN

Los propóleos son una mezcla de material resinoso que abejas del género de *Apis mellifera* recolectan de brotes y exudados de árboles y plantas. Las abejas lo utilizan para la construcción, reparación y protección de la colmena.<sup>1</sup>

La composición Química de los propóleos es muy compleja debido a que depende de las fuentes vegetales, del área de recolección, clima y temporada.<sup>1</sup>

Los propóleos se componen principalmente de resinas, aceites esenciales, ceras, polen y microelementos, son de consistencia viscosa, y son segregados por árboles y arbustos (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas) especialmente durante la primavera. El color (verde pardo, castaño, rojizo o casi negro), de esta mezcla varía según su origen botánico.<sup>2</sup>

En estudios realizados por investigadores se les ha atribuido a los propóleos más de 19 propiedades biológicas y terapéuticas.

Se han realizado diferentes estudios de propóleos denominándolos como propóleos de zonas templadas, tropicales, áridas y semiáridas.

Los propóleos correspondientes a las regiones de Sao Paulo y Minas Gerais tienen su origen botánico en las plantas de *Baccharis dracunculifolia*<sup>3</sup>.

Mientras que los orígenes botánicos de los propóleos venezolanos tienen su origen en *Clusia minor* y *C. major*<sup>4</sup>.

Aunque se conoce que los principales componentes de los propóleos son los flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres, los métodos de análisis de que se disponen en la actualidad permiten detectar un número cada vez mayor de compuestos en dichos propóleos, comprobándose que la variabilidad en la composición química es muy elevada ya que depende de las fuentes vegetales, del área de recolección, clima y temporada (primavera, verano, otoño, e invierno), por lo que se considera necesario proseguir con los estudios para un mejor conocimiento de sus componentes.<sup>2</sup>

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Identificación de flavonoides presentes en *Encelia farinosa*, y comparación con los identificados en los propóleos de Sonora (Caborca), mediante HPLC.

### Objetivos Particulares

Obtención de un extracto metanólico de la planta *Encelia farinosa*

Identificar qué tipos de flavonoides se encuentran presentes en la planta de *Encelia farinosa*.

Comparar los flavonoides presentes en la planta de *Encelia farinosa* con los que se encuentran en los propóleos de Caborca.

## **ANTECEDENTES**

### **Origen de los Propóleos**

Los propóleos se conocen desde la antigüedad, y este término proviene del griego *Propolis*: que significa *Defensa de la ciudad*, (*Pro*: antes, y *Polis*: ciudad).

Las abejas del género de *Apis mellifera* recolectan con sus mandíbulas partículas resinosas de brotes y exudados de árboles y plantas que mezclan con cera y secreciones salivares para la producción de propóleos. Las abejas lo utilizan para la construcción, reparación y protección de la colmena.<sup>1</sup>

### **Composición Química**

La composición Química de los propóleos es muy compleja debido a que depende de las fuentes vegetales, del área de recolección, clima y temporada (primavera, verano, otoño, e invierno).<sup>1</sup>

Los propóleos están compuestos de resinas, ceras, aceites esenciales, ácidos grasos, polen y otros compuestos orgánicos y minerales (Tabla 1), son de consistencia viscosa, y son segregados por árboles y arbustos (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas) especialmente durante la primavera. El color (verde

**Tabla 1:** Composición promedio de Propóleos.<sup>2</sup>

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>%</b>	<b>COMPUESTOS Y CARACTERÍSTICAS</b>
Resinas	45-55	Flavonoides, Ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55-35	Mayoría cera de abeja, también de origen animal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y de aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
Otros compuestos Orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. Cetonas Lactonas Quinonas Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas: B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> . Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen Azúcares.

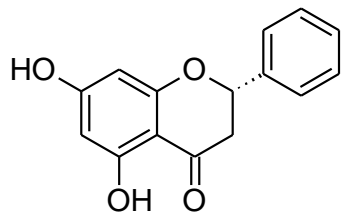
pardo, castaño, rojizo o casi negro), de esta mezcla varía según su origen botánico.<sup>2</sup>

Los principales componentes de las resinas son los flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres, de los cuales los más abundantes se muestran en la Figura 1.

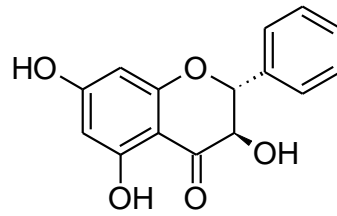
Los flavonoides son los componentes principales de los propóleos y son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido tanto por agentes oxidantes como por sustancias químicas; los podemos encontrar en hojas, semillas, tallos, flores, propóleos y miel y de forma natural en frutas (manzana, naranja, etc.), y en ciertas verduras (cebolla, brócoli, apio, repollo, zanahoria, etc.).<sup>5, 6</sup>

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en<sup>5</sup>:

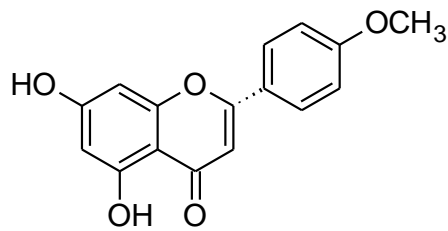
- Flavanos, como la catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, representado por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- Antocianidinas, que tienen unido el grupo –OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.



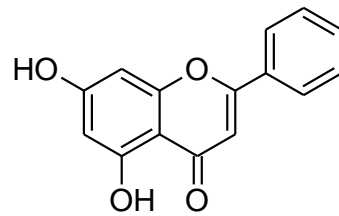
Pinocembrina



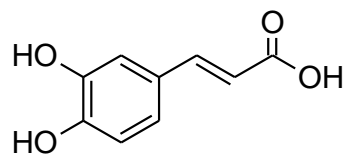
Pinobanksina



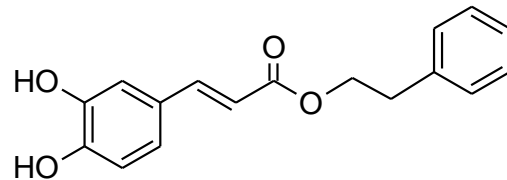
Acaecetina



Crisina



Ácido cafeico



Éster feniletílico del ácido cafeico

**Figura 1.** Principales componentes de las resinas

## Propiedades Biológicas y Terapéuticas

Pese a ser el producto más usado y más investigado de la colmena, aún no se ha concluido su estudio científico, iniciado recién en la década de los 60 en Europa del este, y aún así ya se le han detectado más de 250 elementos constitutivos y unos 50 principios biológicamente activos, lo que explica su gran cantidad de propiedades.

Los propóleos poseen una gran actividad antibacteriana<sup>7</sup> observándose que son más activos contra bacterias Gram Positivas que contra bacterias Gram Negativas, Navarro M.<sup>7</sup> reporta que los propóleos Sonorenses procedentes de las regiones de Ures y de Caborca poseen una gran actividad antibacteriana contra la bacteria de *Staphylococcus aureus*. Por otra parte Lugo<sup>8</sup> reporta que los propóleos provenientes de la región de Ures poseen una importante actividad antiproliferativa contra líneas celulares transformadas.

Los propóleos también poseen una importante actividad antioxidante<sup>6, 9</sup>: ya que minimizan la peroxidación lipídica, y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Además de las propiedades anteriormente mencionadas poseen actividades tales como: antiinflamatorio<sup>10</sup>, antiviral<sup>11,12</sup>, bactericida<sup>13</sup>,<sup>14, 15</sup>, antimicótico<sup>16</sup>, entre otras.



## Tipos de Propóleos

### **Propóleos de Zonas Templadas**

Estudios de propóleos colectados en Europa Central son denominados como propóleos de zonas templadas han mostrado que éstos tienen su origen en álamos (*Populus alba*) y sus híbridos pertenecientes al género *Populus spp.* Estudios sobre su composición química mostraron un alto contenido de flavonoides como: pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina.<sup>1</sup>

### **Propóleos de Zonas Tropicales**

En zonas tropicales como África Central, América del Sur (Brasil, Venezuela, Uruguay), México y Cuba, las abejas tienen que buscar otras fuentes de exudados y resinas para la elaboración de propóleos. Según Wollenweber y Buchmann (1997)<sup>17</sup> las abejas han tenido que diversificar sus fuentes de propóleos. Existen reportes de que han utilizado asfalto, pinturas y aceites minerales como fuentes de propóleos. Esto ha permitido a las abejas poder sobrevivir en caso de necesitarlo, ya que en estas zonas los álamos y abedules no son especies nativas. Pero estas zonas son de gran importancia para la obtención de propóleos con compuestos químicos nuevos por su gran diversidad botánica. Se ha encontrado que en Brasil los

exudados provienen de las hojas de especies de *Baccharis dracunculifolia*<sup>3</sup> mientras que en Venezuela y Cuba, de la resina floral del género *Clusia*<sup>4</sup>.

### **Propóleos de Zonas Áridas y Semiáridas**

En regiones áridas y semiáridas la vegetación que predomina son los matorrales, arbustos, árboles o plantas de hojas perennes y hierbas estacionales. El clima se caracteriza por temperaturas altas, veranos secos, inviernos fríos y con lluvia. Es por ello que los propóleos correspondientes a estas zonas son estudiados escasamente. En estudios realizados por Wollenweber y, Buchmann en 1997 sobre propóleos colectados en los alrededores del sur de Tucson, Arizona, concluyeron que las principales fuentes de estos, son las especies de *Ambrosia deltoidea* y *Encelia farinosa*<sup>17</sup>. En este estudio reportan la presencia del flavonoide xantomicrol (5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona), y (5,7,4'-trihydroxy-6,8-dimethoxy flavona). Con esta investigación Wollenweber y, Buchmann (1997), demostraron que el origen vegetal de propóleos en las zonas áridas y semiáridas es muy distinto al de las regiones tropicales y templadas.

### **Análisis de Propóleos**

Hernández y col<sup>18</sup>, realizaron un estudio de la composición química de los propóleos Sonorenses, Caborca (PC), estos propóleos fueron recolectados en la región norte de la carretera "las calabazas" (30° 35'25"

LN; 112° 09'42" LW) y una altitud de 330 m sobre el nivel medio del mar, Una vez obtenidos fueron cortados en piezas pequeñas y colocados con metanol por 24 hrs a temperatura ambiente. El extracto fue disuelto con metanol y filtrado con membrana de nylon para posteriormente someter la muestra a Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento HPLC para identificar los constituyentes presentes en esta muestra.

El análisis de los constituyentes químicos de los propóleos se llevo a cabo con un equipo marca Agilent 1100 series LC/MSD con una columna LiChrospher 100 RP-18, (125X4mm, 5mm) y detector de diodos (DAD). La columna fue eluida utilizando ácido fórmico/metanol con un flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió en A: 5% de ácido fórmico/agua y B: metanol. El gradiente de elusión fue de 30% B (0-15 min), 40% B (15-20 min), 45% B (20-30 min), 60% B (30-50 min), 80% B (50-60 min) y 100 % B (65-75 min). Los componentes de elusión fueron monitoreados a 280 y 340 nm con esto se identificaron los flavonoides que se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Principales componentes de muestras de Propóleos determinadas e identificadas por HPLC-MS.<sup>18</sup>

Pico no.	Tiempo Retención (min)	Compuesto	Propóleos		
			PU	PPA	PC
1	10.8	$\lambda$ 296, 344 nm <sup>a</sup>	-	-	+
2	13.7	$\lambda$ 290, 340 nm <sup>a</sup>	-	-	+
3	20.5	$\lambda$ 258, 292, 348 nm <sup>a</sup>	-	-	+
4	22.1	Rutin	-	+	-
5	27.2	$\lambda$ 274, 294, 324 nm <sup>a</sup>	+	-	-
6	29.8	Pinobanksina	+	+	+
7	30.9	Naringenina	-	+	-
8	33.1	Hesperetina	-	+	-
9	36.0	$\lambda$ 260, 290, 334 nm <sup>a</sup>	-	+	-
10	37.0	$\lambda$ 256, 292 nm <sup>a</sup>	-	+	-
11	42.2	3'-desmethoxysudakiitina	-	-	+
12	43.3	$\lambda$ 236, 266, 310, 346 nm <sup>a</sup>	+	-	-
13	43.9	$\lambda$ 296, 344 nm <sup>a</sup>	-	-	+
14	44.3	$\lambda$ 266, 296, 350 nm <sup>a</sup>	+	+	-
15	45.9	$\lambda$ 254, 270, 288, 356 nm <sup>a</sup>	-	+	-
16	46.7	Pinocebrina	+	+	+
17	48.6	3-acetate de Pinobanksina	+	+	+
18	52.3	CAPE	+	-	-
19	53.0	Xanthomicrol	-	+	+
20	54.0	Crisina	+	+	+
21	55.0	Galangina	+	+	+
22	57.1	Acacetina	+	+	-
23	58.2	$\lambda$ 240, 288, 226 nm <sup>a</sup>	-	+	-
24	60.2	$\lambda$ 294, 340 nm <sup>a</sup>	+	+	+
25	61.5	$\lambda$ 294, 312 nm <sup>a</sup>	+	-	+
26	66.5	$\lambda$ 292, 340 nm <sup>a</sup>	+	+	+

<sup>a</sup> Compuestos no identificados, representan solo su espectro de máxima absorción UV. Símbolos: +, presente, pero no identificado; - no detectado. éster fenético del Ácido Caféico = CAPE. PU: Propóleos de Ures; PPA: Propóleos del Pueblo de Álamos; PC: Propóleos de Caborca.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de Investigación**

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio del Área Básica del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte Campus Caborca.

### **Materiales de Laboratorio**

El material de vidrio utilizado se lavó con agua corriente y detergente, posteriormente se enjuagó con agua destilada con el fin de eliminar cualquier residuo en su superficie. Todo el material se colocó boca abajo en una estufa de secado a 110°C por 12 horas.

El cromatógrafo que se utilizó fue un equipo marca Varian Prostar 210 con un detector de UV-Visible Prostar 320, la longitud de onda de 340 nm. La columna usada fue una LiChrospher 5RP18 de 15 cm X 4.6 mm de diámetro interno. (Equipo facilitado por el Laboratorio de Bio-polímeros del Departamento de Origen Animal del CIAD, y manejado por Q.B. Karla Guadalupe Martínez Robinson). La elusión fue con: A) agua/ácido fórmico (0.5%) y B) metanol, con un flujo de 1.5 mL/min y un volumen de inyección (Loop) de 20 µL.

## **Reactivos Químicos**

Para la preparación del extracto del material biológico se utilizó metanol grado reactivo, así como hexano redestilado. Para la elusión cromatográfica se usaron metanol, agua y ácido fórmico grado HPLC con 99.99% de pureza, todos los solventes utilizados fueron de la marca ALDRICH.

Para la identificación de flavonoides se utilizaron los siguientes estándares: Xantomicrol (purificado por HPLC 98%), Pinocebrina (purificado por HPLC 98%), y Galangina (purificado por 100%), adquiridos de la casa INDOFINE Chemical y proporcionados por el Dr. Javier Hernández. El estándar de Crisina también fue proporcionado por él solo que fue aislado y purificado en su laboratorio.

## **Material Biológico**

Las muestras se colectaron en el mes de mayo del año 2006 en la región norte conocida como “El arenoso “, (30° 45’35” LN; 112° 04’32” LW) y a 338 m sobre el nivel medio del mar, en la región de H. Caborca, Son., y consiste en la identificación de flavonoides presentes en una especie nativa de esta región: *Encelia farinosa* (hierba blanca), confirmación de la especie botánica realizada por el I.A. Jesús Gonzalo Morúa Leyva. La muestra consistió de la parte aérea de dicha planta (hojas), se recolectó a las 05:00

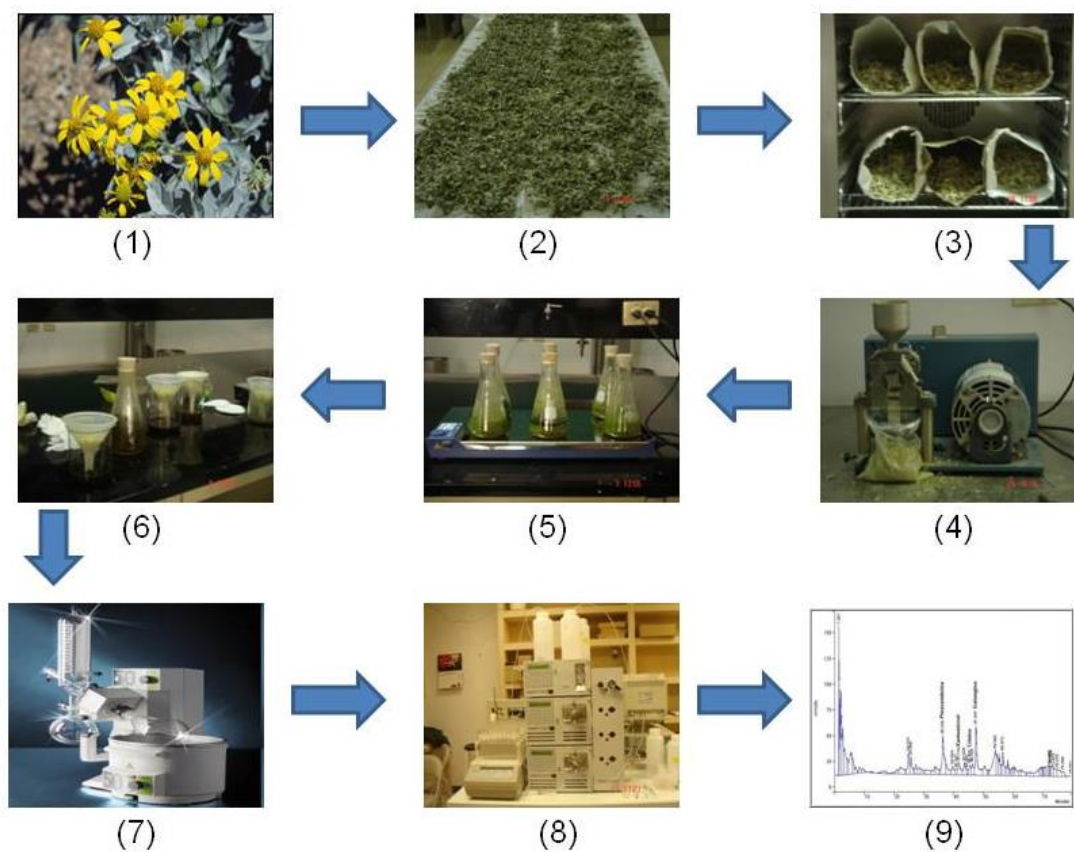
horas en el mes de mayo utilizando tijeras de poda y transportándolas en bolsas de plástico al laboratorio a temperatura ambiente.

### **Procedimiento Experimental**

El diagrama de flujo del proceso para la obtención del extracto se muestra en la Figura 2. El proceso incluye la identificación y preparación de la muestra, extracción con solvente hasta la identificación de flavonoides.

#### **Preparación de la muestra**

Las hojas fueron separadas de los tallos y lavadas con agua destilada para eliminar tierra y polvo. Posteriormente se colocaron sobre papel estroza para ser secadas al sol por 48 horas y después a las sombras por 25 días volteándolas cada 24 horas, para lograr un secado completo se introdujeron a una estufa a 50°C por 6 horas. Pasado este tiempo se procedió a triturar en un micromolino Willey (Thomas Scientific) con una malla 20 mech por dos ocasiones hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5–1 mm de diámetro. El peso final de la muestra fue de 1350 gr, dividiéndose en dos partes: 150 gr se guardaron de reserva y los 1200 restantes se utilizaron en la obtención del extracto.



**Figura 2.** Diagrama de flujo del proceso para la obtención del extracto e identificación de flavonoides presentes en la planta de *Encelia farinosa*. 1. identificación de la planta. 2. separación de hojas; 3. secado; 4. molienda; 5. extracción; 6. filtración; 7. evaporación del solvente; 8. análisis del extracto: 9. Cromatograma.



## **Obtención del Extracto Metanólico**

Se colocaron 200 gr de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se le adicionaron 250 mL de metanol grado reactivo. Se colocaron por 24 horas en una plancha con agitador magnético sin calentar, lo anterior se repitió con 5 matraces más de la misma capacidad. Después de este periodo el homogenizado se filtró con tela de lino para eliminar las partículas de mayor tamaño. Posteriormente, se llevó a cabo una segunda filtración utilizando papel Whatman No. 4.

Se evaporó el metanol en un evaporador rotatorio marca Buchi modelo R-215 con un baño maría modelo B-491 a una temperatura no mayor de 40°C aproximadamente, y a una presión de 50 mm de Hg, las revoluciones del matraz fueron de 110 rpm, recuperándose el metanol. Después se secó al alto vacío por 6 horas para obtener un sólido el cual se colocó en un matraz de 250 mL y se le adicionaron 100 mL de hexano HPLC y se dejó en agitación magnética por 24 hrs y esto es con la finalidad de eliminar lípidos, y se decantó. Con el fin de eliminar el exceso de hexano se colocó en el evaporador rotatorio bajo presión reducida a 25 mm de Hg y a una temperatura de 30°C, a 40 rpm. Para asegurar la eliminación total del solvente se sometió de nuevo al alto vacío. El sólido obtenido es el de interés, el cual se guardó en viales color ámbar recubierto con aluminio y se almacenó en el refrigerador hasta el momento de su inyección.

## Identificación de Compuestos

La identificación de los compuestos se hizo por comparación de los tiempos de retención de los estándares inyectados individualmente al equipo de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC). Para disolver la muestra y los estándares se utilizó metanol HPLC marca ALDRICH.

Se utilizó una columna LiChrospher 5RP18 (15 cm x 4.6 mm DI) con un detector de luz UV-Visible a una longitud de onda de 340 nm.

La mezcla de solventes utilizados para la elusión fueron:

A) agua/ácido fórmico (0.5%)

B) Metanol (grado HPLC).

Los solventes fueron bombeados a la columna con un flujo de 1.5 mL/min. El gradiente de elusión se describe en la Tabla 3. El volumen de inyección (Loop) utilizado fue de 20  $\mu$ L de muestra.

**Tabla 3.** Gradientes de elusión para la separación de compuestos en HPLC<sup>18</sup>.

<b>Tiempo (min.)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	70	30
15	70	30
20	60	40
30	55	45
50	40	60
52	20	80
65	20	80
70	0	100
75	0	100

A: Agua/Acido fórmico (0.5%), B: Metanol

## **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **Obtención del Extracto Metanólico**

Para la obtención del extracto se utilizó solamente la parte aérea (hojas) de *Encelia farinosa*. Antes de secarse se lavaron con agua destilada moliéndose posteriormente en un molino Willey. El material molido se colocó en un matraz Erlenmeyer y se le adicionaron 250 mL de metanol grado reactivo y se colocó en una plancha con agitación magnética por 24 horas. Pasado este tiempo se filtró y se procedió a recuperar el metanol en el evaporador rotatorio, se obtuvo un sólido de color verde que pesó 2.5 gr. Este extracto se almacenó en viales color ámbar el cual se cubrió con papel aluminio y se guardó en el refrigerador hasta el momento de su inyección.

### **Identificación de Flavonoides**

#### **Obtención de los tiempos de retención**

Para la identificación de los flavonoides, primeramente se inyectaron por separado cada uno de los estándares al equipo de HPLC. Los estándares de pinocembrina, xantomicrool y galangina, fueron adquiridos de la casa INDOFINE Chemical mientras que el estándar de crisina fue purificado en el laboratorio. Los cromatogramas de cada uno de los estándares se muestran en la Figura 3.

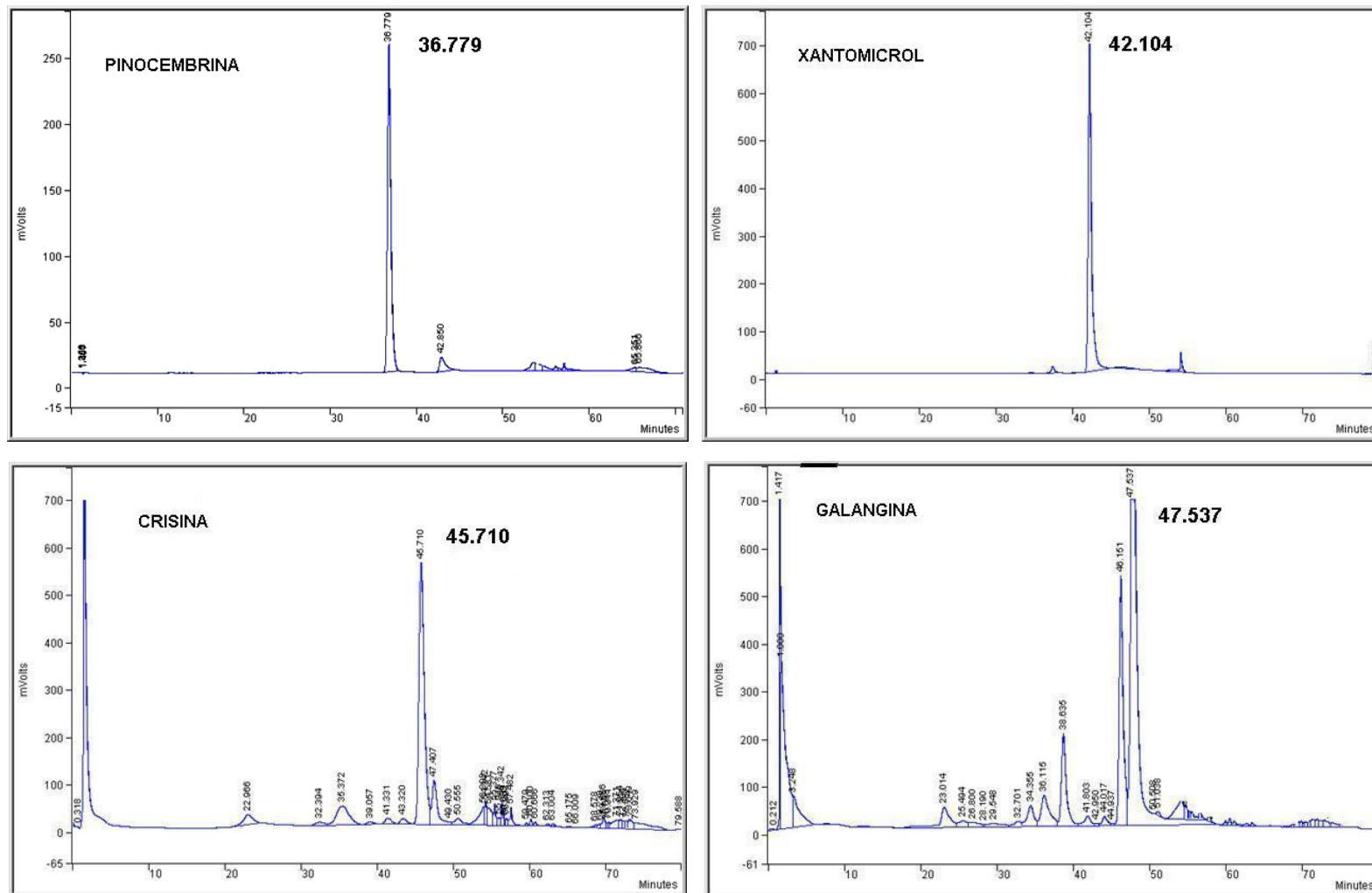


Figura 3. Cromatogramas de los estándares de flavonoides obtenidos en HPLC, mostrando los tiempos de retención.

Se puede observar que los cromatogramas para pinocembrina, xantomicol, y crisina muestran un pico de mayor área los cuales corresponden al estándar. En el caso del cromatograma para galangina, se observan varios picos. Esto es debido a que el estándar fue agregado a una muestra del extracto metabólico, con el fin de identificar a este estándar en forma mas precisa. El pico de mayor tamaño corresponde por lo tanto a galangina. Los tiempos de retención dependen de las condiciones a las cuales se realizan los análisis en cromatografía de HPLC, el tipo de columna, el flujo y proporción de los solventes, por lo que no es posible comparar con los tiempos de retención reportados en otros trabajos.

Los tiempos de retención obtenidos en este trabajo se muestran en la Tabla 4. Como puede observarse, el orden de elución en el cromatograma de una muestra serán en el siguiente orden: pinocembrina, xantomicol, crisina y galangina, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.

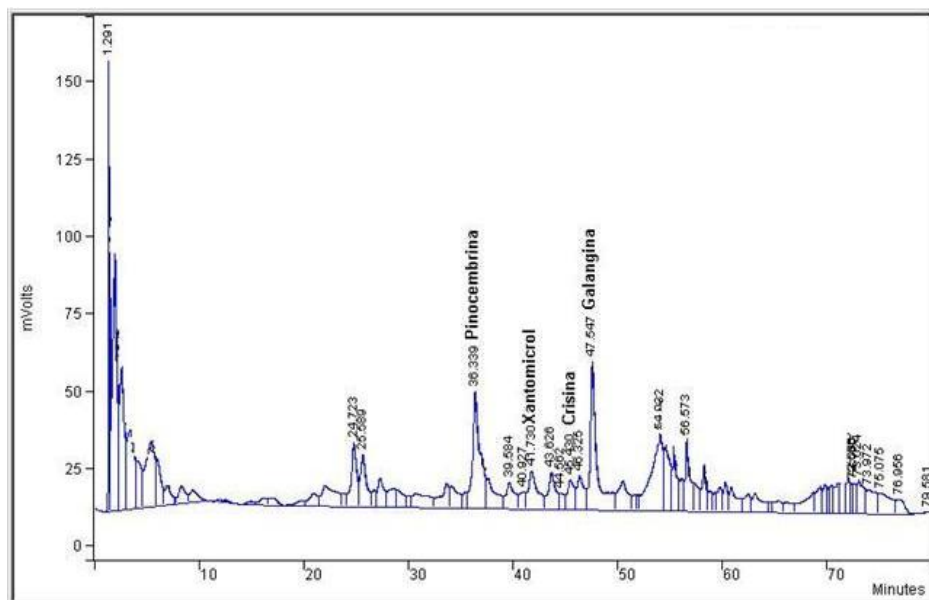
### **Análisis de Flavonoides en el Extracto Metanólico**

Una vez que fueron definidos los tiempos de retención para los distintos flavonoides, se procedió a inyectar la muestra del extracto metanólico en el equipo de HPLC. En la Figura 4 se observa el cromatograma resultante donde se aprecian varios picos los cuales presentan una buena separación entre ellos, además se observan los tiempos de retención respectivos. Al comparar los tiempos de retención de

**Tabla 4.** Tiempos de retención de los estándares inyectados a HPLC.

<b>Estándar</b>	<b>Tiempo de retención (minutos)*</b>
Pinocebrina	36.779
Xantomicrool	42.104
Crisina	45.710
Galangina	47.537

\*Utilizando una columna Lichrosphere 5RP-18 (15 cm x 4.6 mm DI), flujo 1.5 mL/min, gradiente de solventes mostrado en la Tabla 3.



**Figura 4.** Cromatograma resultante del extracto metanólico (EM) de *Encelia farinosa* inyectado a HPLC.



los estándares con los respectivos tiempos de la muestra se pudo definir la presencia de los siguientes compuestos: pinocembrina, xantomicrol, crisina y galangina. Además en esta figura se observan varios picos, los cuales no pudieron ser identificados debido a que no se contaba con los respectivos estándares. Sin embargo, para los propósitos del presente trabajo los compuestos encontrados en el extracto metanólico de *Encelia farinosa* son los que se encuentran presentes en los propóleos y que se trataban de comparar.

En la Tabla 5 se muestran los tiempos de retención de cada pico del cromatograma obtenido de la muestra de extracto metanólico de *Encelia farinosa*, comparados con los tiempos de retención de los estándares respectivos.

Pinocembrina (5,7-Dihydroxyflavanona). Esta flavonona es característica de zonas templadas y se asocia con la presencia de árboles de la especie de *Populus* (álamos) y es reportado por primera vez en propóleos producidos en el estado de Sonora por Lugo (2003)<sup>8</sup>. En la Figura 3 se muestra el cromatograma del estándar con un tiempo de retención de 36.779 min, mientras que en la muestra se observa un tiempo de retención de 36.339 min esto representa una variación de 24 seg (Tabla 5).

Xantomicrol (5,4'-Dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona). Esta flavona ha sido reportada por Wollenweber (1997)<sup>17</sup> en muestras de propóleos del área del sur de Tucson, Arizona y por Hernández y col (2007)<sup>18</sup> en muestras de propóleos de Caborca, el tiempo de retención del estándar se muestra en la

**Tabla 5.** Tiempos de retención resultantes del extracto metanólico, compuestos identificados y tiempos de retención de los estándares

<b>Tiempo de Retención (minutos)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de Retención de los Estándares</b>
1.291	N.I:	* * *
24.723	N.I:	* * *
25.589	N.I:	* * *
36.339	Pinocembrina	36.779
39.584	N.I:	* * *
40.927	N.I:	* * *
41.730	Xantomicrol	42.104
43.626	N.I:	* * *
44.562	N.I:	* * *
45.430	Crisina	45.710
46.325	N.I:	* * *
47.547	Galangina	47.537
54.032	N.I:	* * *
56.573	N.I:	* * *
72.555	N.I:	* * *
73.024	N.I:	* * *
73.972	N.I:	* * *
75.075	N.I:	* * *

N.I.= Compuesto no identificado

Figura 3 y tiene un valor de 42.104 min, mientras que en la muestra se observa un valor de 41.730 min dando una diferencia de 18 seg (Tabla 5).

Crisina (5,7-Dihidroxi-flavona). Esta flavona reportada por Lugo (2003)<sup>8</sup> en muestra de propóleos de la región de Ures, es característica al igual que pinocembrina de propóleos de zonas templadas. En la Figura 3 se muestra el cromatograma que corresponde al estándar usado en su identificación, su tiempo de retención fue de 47.710 min mientras que en la muestra se observa un valor de 45.430 min dando una diferencia de 12 seg (Tabla 5).

Galangina (3,5,7-Trihidroxi-flavona). El primer reporte que se tiene de esta flavona en propóleos de Caborca es de Hernández (2007)<sup>18</sup>. En este trabajo, el tiempo de retención fue de 47.537 minutos. La Figura 3 muestra un cromatograma del extracto metanólico al cual se le adicionó el estándar de galangina lo que trajo como consecuencia que el pico se presente truncado debido a la cantidad que se puso del estándar. En el cromatograma de la muestra se identificó galangina con un tiempo de retención de 47.547 min, dando una diferencia de 6 seg respecto al estándar (Tabla 5).

De los compuestos identificados, se puede observar que el extracto de *Encelia farinosa* obtenido en este trabajo, presenta mayor contenido de pinocembrina y galangina (Figura 4).

### **Comparación de Flavonoides en *Encelia* y Propóleo**

En la Tabla 6 se muestran los flavonoides identificados por Hernández y col. (2007)<sup>18</sup> en los propóleos de Caborca. y se hace una comparación con los que se identificaron en *Encelia farinosa*. En los propóleos de Caborca se identificaron los siguientes flavonoides: pinobanksina, 3'-desmethoxysudakiiyina, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina, xantomicrool, crisina y galangina. En el extracto metabólico de encelia farinosa se identificaron la mayoría de estos flavonoides: pinocembrina, xantomicrool, crisina y galangina. Debido a que no se contaba con otros estándares, no se pudieron identificar los otros compuestos. Hernández y col (2007)<sup>18</sup> reportaron que la concentración de los principales flavonoides presentes en propóleos de Caborca fueron pinocembrina, actato de 3-pinobanksina, crisina, xantomicrool y galangina. Comparando los principales flavonoides en el extracto de encelia y los de propóleos de Caborca se puede concluir que son los mismos.'

**Tabla 6.** Comparación de flavonoides presentes en los Propóleos de Caborca y en la planta de *Encelia farinosa*.

<b>Propóleos Caborca</b>	<b><i>Encelia farinosa</i></b>
Pinobanksina	N.I.
3'-desmethoxysudakiyyina	N.I.
Pinocembrina	Pinocembrina
3-acetato de Pinobanksina	N.I.
Xantomicrol	Xantomicrol
Crisina	Crisina
Galangina	Galangina

N.I.= No Identificado.

## CONCLUSIONES

Con las debidas precauciones de recolección y procesamiento de la planta de *Encelia farinosa* se logró obtener un extracto metanólico de dicha planta.

Gracias a la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) y a los estándares, se pudieron identificar los flavonoides: Pinocembrina, Xantomicrol, Crisina y Galangina, presentes en esta planta.

Comparando los flavonoides presentes en la planta de *Encelia farinosa* con un análisis previo a los Propóleos Sonorenses se concluye que las abejas del género de *Apis mellifera* recolectan con sus mandíbulas partículas resinosas de esta planta para la producción de los Propóleos Sonorenses.

Con la identificación de estos flavonoides podemos concluir que *Encelia farinosa* es posiblemente la principal fuente botánica de los Propóleos de la región de Caborca, Sonora.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bankova (2000), Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* vol 31, 3-15
2. Farrér R, Frasquet I, Sánchez A. (2004). El Propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 45:1, 21-43.
3. Matías de Alencar, S.; Lima de Aguiar, C.; Paredes-Guzmán, J.; Kun Park, Y. Composición química de *Baccharis dracunculifolia*, fuente botánica de los propóleos de los estados de Sao Paulo y Minas Gerais. (2005), *Ciencia rural*, v 35, no. 4, 909-915.
4. Tomas-Barberán, F.A.; García-Viguera, C.; Vit-Oliver, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, Vol 34, no. 1, 191-196.
5. S. Martínez-Flórez; J. González-Gallego; J.M. Culebras; M. J. Tuñón. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* (2002) XVII (6) 271-278.
6. Bedascarrasbure Enrique; Maldonado Luis; Alvarez Alejandro; Rodríguez Edgardo. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleo Argentino. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (3): 369-372 (2004).
7. Navarro-Moisés. Tesis de Maestría. Departamento de Origen Animal. Ciad. Ac. 2006

8. Lugo S (2003), Constituyentes de los Propóleos Sonorenses y su actividad antiproliferativa contra líneas celulares transformadas. Tesis de maestría. Ciad. A.C
9. Hagazi, Ahmed G.; Abd El Hady, Faten K. Z. *Naturforsch*, (2002), 57c, 395-402.
10. Nataranjan, K.; Singh, S.; Burke, Jr: T.R.; Grunberger, D.; Aggarwal, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1996), 93, 9090-9095.
11. Ito, J.; Chang, F-R.; Wang, H-K.; Park, Y.K.; Ikagaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K.H. *J. Nat. Prod.* (2001) 64, 1278-1281.
12. Fasen, M.R.; Khon, K.W.; Leteurtre, F.; Pommier, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90, 2399-2403.
13. Santos, F.A.; Bastos, E.M.A.; Uzeda, M.; Carvalho, M.A.R., Farias, L.M.; Moreira, E.S.A.; Braga, F.C. *J. Ethnopharmacology*. (2002), 80, 1-7.
14. Bankova, V.; Christov, R.; Kujungiev, A.; Marcucci, M.C.; Popov, S. Z. *Naturforsch*. (1995), 50 c, 167-172.
15. Bankova, V.; Marcucci, M.C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujungiev, A.; Popov, S.; *Z. Naturforsch*. (1996), 51 c, 277-280.
16. Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantes, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N. *J. Ethnopharmacology*. (2001), 74, 105-112.
17. Wollenweber E, Buchmann (1997). Feral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z Naturforsch*;52 (7-8):530-535.



18. Hernández Javier; Goycoolea Francisco M; Quintero Jael; Acosta Ana; Castañeda Marco; Robles Refugio; Vázquez-Moreno Luz; Velázquez Enrique F; Astiazaran Humberto; Lugo Efraín; Velázquez Carlos; Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines; *Planta Med* 2007; 73: 1469-1474.