



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Evaluación del propóleo como material de partida para la preparación de partículas sólidas lipídicas**

**Yuly Ximena Correa González**

**Universidad Nacional de Colombia**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Farmacia**

**Bogotá, Colombia**

**2016**



**Evaluación del propóleos como material de partida para la preparación  
de partículas sólidas lipídicas**

**Yuly Ximena Correa González**

**Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Magíster en Ciencias Farmacéuticas**

**Directora:**

**Claudia Elizabeth Mora Huertas, PhD.**

**Profesora Asociada**

**Codirectora:**

**Maritza Adelina Rojas Cardozo, PhD.**

**Profesora Asistente**

**Grupo de Investigación:**

**Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos (GIDECA)**

**Universidad Nacional de Colombia**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Farmacia**

**Bogotá, Colombia**

**2016**



*Factores que destruyen al ser humano:*

*1) La política sin principios, 2) El placer sin compromiso, 3) La riqueza sin trabajo, 4) La sabiduría sin carácter, 5) Los negocios sin moral, 6) La ciencia sin humanidad y 7) La oración sin caridad.*

*Mahatma Gandhi*



## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios, quien siempre ha guiado y cuidado mis pasos. A mi familia, bastión y fortaleza de mi proceso académico y personal.

A la profesora Claudia Elizabeth Mora por su paciencia, orientación, sabiduría, compromiso y entusiasmo para poder culminar este trabajo de investigación. Es una bendición encontrar una persona tan comprometida con su misión docente.

Así mismo a la profesora Maritza Rojas y al Grupo de Investigación GIFFUN, por su guía y apoyo para el desarrollo del componente fitoquímico de este trabajo.

Al personal del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, quienes me dieron la oportunidad de desempeñarme como Estudiante Auxiliar durante el primer año de mi maestría y donde realicé parte del componente experimental de caracterización de los propóleos. Allí no sólo encontré compañeros de trabajo, sino también amigos que me motivaron y causaron muchas sonrisas: Andrea Nieto, John Élver Jiménez, Carlos Arturo Céspedes, Edith Mercedes Castro, Elkin Acosta, Lizeth Castro, Ruth Mary Benavides, Claudia Salazar, Angélica Benavides, Darwin Rodríguez, Andrés Martínez y demás integrantes del proyecto apícola. Gracias por todos los eventos de “compartir”.

Al Laboratorio de Control de Calidad del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, donde se me permitió realizar algunos ensayos.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, donde se me apoyó para la realización de los infrarrojos y la cromatografía de gases. Al profesor Jorge Ariel Martínez y al laboratorista Rigoberto Pedreros, por su gentil colaboración.

A los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia, donde realicé los análisis de calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría. Al laboratorista Ricardo Cortés, por su asesoría y confianza.

Al Laboratorio de Difractometría de Rayos X del Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia. A Julieth Cifuentes por su colaboración con los difractogramas.

Al profesor Ángel Miguel Ardila del Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración con las microfotografías.

A la Doctora Alba Lucía Valenzuela, por su ayuda con los ensayos para evaluar la seguridad de las dispersiones de nanotransportadores lipídicos.

Al Jardín Botánico de Medellín. A don Eivar Castillo, quien nos obsequió los propóleos para realizar parte del trabajo. Agradezco especialmente a Ana Ruby Correa y a Claudia Hernández, quienes me colaboraron con el contacto, extrajeron desinteresadamente los propóleos y me los entregaron personalmente en Bogotá.

Al Jardín Botánico de Bogotá, por su Programa Estímulos a la Investigación "Thomas van der Hammen", al permitirme divulgar parte de mis resultados de investigación en espacios académicos y darme un incentivo económico para apoyar mi proceso.

A mi amada alma máter, la Universidad Nacional de Colombia, por tantas oportunidades y acogerme durante estos años. A la Vicerrectoría de Investigación, por la financiación para



llevar a cabo el desarrollo experimental de la presente tesis. A la Dirección Académica de la Sede Bogotá, por permitirme trabajar como tutora de química.

Al Grupo de Investigación Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos (GIDECA) y a sus integrantes, en quienes siempre encontré apoyo y palabras de aliento. Ha sido un camino grandioso a su lado. A Juan Sebastián, Sergio, Gabriela, Camilo, Aldemar, Carolina, Leidy, Daniela y Maira.

A mis amigos. Especialmente a Ángela María, María Camila, Dianita.

A Jeysson, quién me ha apoyado constantemente hace tantos años, siempre dispuesto a escucharme y ayudarme desinteresadamente en todos los aspectos de comunicación a través de la imagen.



*La presente tesis de maestría fue desarrollada en el Grupo de Investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos – GIDECA, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, dentro del marco de los proyectos:*

*“Ceras de propóleos como material de partida para la preparación de partículas sólidas lipídicas de interés para las industrias farmacéutica y cosmética – Código 28405”, financiado por la Vicerrectoría de Investigación – Convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015. Modalidad 2: Nuevos proyectos de investigación, creación o innovación.*

*“Evaluación del propóleos como material de partida para la preparación de partículas sólidas lipídicas” financiado por el Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, quinto ciclo de convocatorias del Programa Estímulos a la Investigación “Thomas van der Hammen”.*



## RESUMEN

El propóleo es elaborado por las abejas a partir de los exudados vegetales que recolectan y mezclan con sus secreciones. En el ámbito científico y comercial, su valor se ha medido por la presencia de moléculas con actividad biológica, representadas en parámetros tales como los extractables en etanol (resinas) o el contenido total de flavonoides. Por su parte, un elevado porcentaje de ceras lo convierte en un producto de la colmena de baja calidad. Sobre esta base, la presente investigación se encaminó hacia el aprovechamiento del material lipídico extraído del propóleo, al emplearlo en la elaboración de nanotransportadores lipídicos por el método de emulsificación-difusión. Dichos cargadores a escala nanométrica se aplican en el campo farmacéutico y cosmético, entre otras cualidades, por su capacidad para incorporar, proteger y modificar la liberación de moléculas activas.

Con este propósito, se profundiza inicialmente en el control de calidad del propóleo; para luego extraer y caracterizar fisicoquímicamente el material lipídico, logrando una aproximación a los principales grupos funcionales. A su vez, éste se empleó en la preparación de cargadores lipídicos nanoestructurados, cuya formulación se optimizó a través de un diseño estadístico experimental de Plackett-Burman, alcanzando un tamaño de partícula promedio menor a los 300 nm y un potencial zeta negativo cercano a la neutralidad. Adicionalmente, la formulación identificada como viable se evaluó respecto a su estabilidad, citotoxicidad, capacidad para atrapar aceite del árbol de té y factibilidad para ser empleada en preparaciones tipo gel. Dentro de los resultados se destaca la obtención de partículas lipídicas estables, seguras en términos de irritación *in vitro*, promisorias para el atrapamiento de activos y sin influencia negativa sobre el comportamiento sensorial de la formulación gel de partida. En síntesis, es posible preparar

partículas lipídicas a partir de ceras de propóleos y éstas tienen potencial para el desarrollo de productos innovadores de interés farmacéutico y cosmético.

**Palabras clave:** ceras, emulsificación-difusión, nanopartículas, propóleos.

## Abstract

Propolis is made by bees using vegetable exudates, which are collected and mixed with their secretions. Its value is scientifically and commercially measured in terms of biological active molecules, they are represented by parameters such as ethanol extractable (resins) or total content of flavonoids. On the other hand, a high percentage of waxes in the propolis composition will make it a substandard beekeeping product. Based on this fact, the present research was directed towards the harnessing of the extracted lipid material of propolis, which was used in the preparation of lipid nanocarriers by emulsification-diffusion method. The carries in the nanometric scale have application in pharmaceuticals and cosmetics because of their capacity for incorporating, protecting and modifying release of active molecules.

To this end, firstly, the experimental work deepens in the quality control of propolis. Secondly, the lipid material was extracted and characterized, doing an approximation to their main functional groups. At the same time, it was used for the preparation of the nanostructured lipid carriers, whose formulation was optimized through a Plackett-Burman statistical experimental design. A particle size less than 300 nm and a negative zeta potential near to neutrality were achieved. In addition, the viable formulation was assessed regarding its stability, cytotoxicity, capacity for the entrapment of tea tree oil and the feasibility for being used in gel preparations. The results showed stable particles, safe in terms of *in vitro* irritation, promising for the entrapment of active molecules and without effect on the sensory behavior of the gel formulation. In summary, it is possible the preparation of lipid particles using waxes of propolis, having potential for the development of innovative products for the pharmaceutical and cosmetics industries.

**Keywords:** waxes, emulsification-diffusion, nanoparticles, propolis.





# CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>17</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>21</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>1 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>35</b>
1.1 Propóleos.....	35
1.1.1 Composición química del propóleos .....	36
1.1.2 Actividad biológica y uso del propóleos .....	37
1.1.3 Control de calidad del propóleos .....	39
1.2 Partículas lipídicas.....	42
1.2.1 Preparación de las partículas sólidas lipídicas.....	44
1.2.2 Caracterización de las partículas sólidas lipídicas.....	49
1.3 Propóleos como material de partida para el desarrollo de transportadores de interés farmacéutico o cosmético: estado del arte .....	51
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
2.1 Objetivo general .....	55
2.2 Objetivos específicos.....	55
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>57</b>
3.1 Materiales .....	57
3.2 Equipos.....	58
3.3 Métodos.....	59
3.3.1 Control de calidad del propóleos empleado como material de partida para la elaboración de partículas sólidas lipídicas .....	59
3.3.2 Extracción del material lipídico del propóleos .....	71
3.3.3 Caracterización del material extraído del propóleos .....	75
3.3.4 Preparación de las partículas lipídicas.....	77

---

3.3.5	Incorporación de aceite del árbol de té (TTO) en partículas lipídicas a base de material extraído de propóleos .....	83
3.3.6	Preparación de geles con inclusión de partículas lipídicas .....	84
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
4.1	Control de calidad de los propóleos .....	87
4.2	Extracción y caracterización del material lipídico a partir de propóleos .....	98
4.3	Preparación, caracterización y aproximación a la composición química de las partículas lipídicas preparadas a partir del material extraído del propóleos .....	112
4.4	Evaluación del atrapamiento de aceite del árbol de té en NLC a base de material extraído del propóleos .....	130
4.5	Formulación de geles con inclusión de transportadores lipídicos nanoestructurados .....	137
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>141</b>
5.1	Conclusiones .....	141
5.2	Recomendaciones .....	142
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>145</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>153</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de algunos nanomateriales. ....	43
Figura 3.1 Montaje del método Soxhlet .....	72
Figura 3.2 Montaje del método Goldfish.....	73
Figura 3.3 Representación esquemática del equipo utilizado para el método Randall.....	74
Figura 4.1 Seguimiento de los extractos de propóleos por TLC. Fase móvil: Cloroformo: EtAc (70:30).....	94
Figura 4.2 Espectros UV de extractos etanólicos de propóleos de diferente origen geográfico. ....	96
Figura 4.3 Cromatofolios revelados con Godin del material extraído de propóleos. ....	100
Figura 4.4 Termogramas DSC del material extraído del propóleos por el método de Randall utilizando n-hexano o EtAc como disolventes.....	102
Figura 4.5 Difracción de rayos X (XRD) del material extraído por el método Randall de PrS (A) y PrJB (B) con n-hexano (1) y EtAc (2).....	104
Figura 4.6 Espectros de infrarrojo (KBr) del material extraído del propóleos por el método Randall según el disolvente usado para la extracción.....	105
Figura 4.7 Espectros <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para material extraído de PrS (A) y PrJB (B) con n-hexano (1) y EtAc (2) para el rango de δ 0-8.5 ppm. ....	107
Figura 4.8 Espectros <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para material extraído en EtAc para PrS (A) y PrJB (B) en la región δ 3.5-8.5 ppm.....	108
Figura 4.9 Cromatogramas GC-MS de las muestras de material extraído por el método Randall en n-hexano.. ....	111
Figura 4.10 Resultados de los efectos de las diferentes variables investigadas en el diseño experimental de Plackett-Burman en la preparación de partículas lipídicas a partir de material extraído de propóleos <b>PrS</b> y <b>PrJB</b> .. ....	114
Figura 4.11 Distribución de tamaño de las partículas lipídicas PrS_EtAc_NLC preparadas con PrS_EtAc_R.. ....	118
Figura 4.12 Microfotografía de los NLC liofilizados (PrJB_EtAc_NLC) y rodeados por la matriz polimérica. ....	118
Figura 4.13 Comportamiento del potencial zeta de partículas lipídicas a base de propóleos en función del pH, según sean preparadas utilizando el material extraído en los solventes orgánicos n-hexano o EtAc.....	119

Figura 4.14 Comportamiento de las dispersiones PrJB_EtAc_NLC frente a diferentes concentraciones de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M).....	121
Figura 4.15 Comportamiento del tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad de dispersiones acuosas de partículas lipídicas (PrS_EtAc_NLC, PrJB_EtAc_NLC) sometidas a dos condiciones de temperatura: 18 °C ± 3 °C y 40 °C ± 1 °C.....	122
Figura 4.16 Termogramas DSC de los NLC preparados a partir del material extraído con EtAc de los dos tipos de propóleos.....	123
Figura 4.17 Comportamiento térmico (DSC) del material extraído del propóleo por el método Randall (PrS_EtAc_R y PrJB_H_R) y su modificación frente a la adición de CCT.....	124
Figura 4.18 Difracción de rayos X (XRD) de los NLC preparados a partir del material extraído por el método Randall con n-hexano.....	124
Figura 4.19 Espectros de infrarrojo (KBr) de los NLC preparados a partir de material extraído del propóleo.....	126
Figura 4.20 Espectros <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para los NLC liofilizados preparados a partir del material extraído del propóleo con EtAc.....	127
Figura 4.21 Comparación de los espectros <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para los NLC liofilizados preparados (B, D) respecto del material lipídico extraído (A, C).....	128
Figura 4.22 Curvas de supervivencia de las líneas celulares frente a la concentración de las dispersiones lipídicas evaluadas.....	130
Figura 4.23 Termogramas DSC y TGA de NLC secos para verificar la incorporación de TTO.....	132
Figura 4.24 TLC de fracciones extraídas de dispersiones de partículas con y sin inclusión de TTO. Fase móvil cloroformo. Revelador Godin.....	133
Figura 4.25 Cromatofolios de partículas liofilizadas conteniendo TTO (PrJB_H_NLC_TTO_Mix_15) usando dos fases móviles.....	134
Figura 4.26 Infrarrojo de PrJB_H_NLC_TTO_Mix_15 y su blanco.....	135
Figura 4.27 Termogramas DSC de partículas liofilizadas con y sin inclusión de TTO.....	135
Figura 4.28 Curvas de supervivencia de las líneas celulares frente a la concentración de la dispersión lipídica incluyendo aceite del árbol de té.....	136
Figura 4.29 Termograma DSC del calentamiento desde -20 °C hasta 80 °C de los geles de Vivapur <sup>®</sup> preparados sin y con inclusión de NLC.....	138
Figura 4.30 Panel sensorial de geles Vivapur <sup>®</sup> preparados con y sin inclusión de NLC PrJB_EtAc_NLC.....	139
Figura 4.31 Termograma DSC del calentamiento desde -20 °C hasta 80 °C de los geles de Vivapur <sup>®</sup> preparados sin y con inclusión de NLC PrJB_EtAc_MF, luego de un mes del estudio de estabilidad.....	140

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1.1 Requisitos establecidos por las legislaciones brasilera y argentina, respecto a la calidad del propóleos bruto.....	41
Tabla 3.1 Métodos de extracción evaluados.....	71
Tabla 3.2 Codificación utilizada para el material extraído por el método Randall. ....	75
Tabla 3.3 Factores evaluados en el diseño experimental Plackett-Burman.....	78
Tabla 3.4 Clasificación general de los irritantes para la prueba de captación de rojo neutro. .....	82
Tabla 4.1 Ficha de control de calidad de los propóleos en estudio.....	90
Tabla 4.2 Eficiencia de extracción del material lipídico del propóleos utilizando diferentes métodos Solvente: n-hexano. ....	99
Tabla 4.3 Resultados del análisis por DSC del material extraído por el método de Randall. .....	101
Tabla 4.4 Resultados compilados del diseño estadístico experimental de Plackett-Burman. .....	116
Tabla 4.5 Resultados de las formulaciones optimizadas a través del diseño experimental de Plackett-Burman. ....	117
Tabla 4.6 Resultados del análisis por DSC de los NLC preparados.....	123
Tabla 4.7 Resultados de los ensayos de citotoxicidad de las dispersiones de partículas lipídicas preparadas.....	129
Tabla 4.8 Resultados de los ensayos de citotoxicidad para la dispersión de partículas lipídicas preparadas con inclusión de aceite del árbol de té (PrS_EtAc_NLC_TTO_Mix_15). ....	136



# LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
AB	Antibiótico/antimicótico
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3- etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
CCT	Triglicérido cáprico/caprílico ( <i>Capric Caprylic Triglyceride</i> )
cP	Centipoises
d	Día
DLS	Dispersión de luz dinámica ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DSC	Calorimetría diferencial de barrido ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<i>e.g.</i>	Abreviatura latina de <i>exempli gratia</i> . Equivale a decir “por ejemplo”.
ESR	Resonancia de espín electrónico ( <i>Electron Spin Resonance</i> )
EtAc	Acetato de etilo ( <i>Ethyl acetate</i> )
ExH	Material extractable en n-hexano
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ( <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> )

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
GRAS	Generalmente reconocido como seguro ( <i>Generally recognized as safe</i> )
h	Horas
HTD	Dosis máxima tolerada ( <i>Highest Tolerated Dose</i> )
<sup>1</sup> H NMR	Resonancia Magnética Nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ) protónica
HPH	Homogenización de alta presión ( <i>High Pressure Homogenization</i> )
HSH	Homogenización de elevado corte ( <i>High Shear Homogenization</i> )
IC	Intervalo de confianza
ICP-OES	Plasma de acoplamiento inductivo con Espectrometría de Emisión Óptica ( <i>Inductively Coupled Plasma with Optical Emission Spectrometry</i> )
<i>i.e.</i>	Abreviatura latina para introducir una aclaración: <i>id est</i> . Equivale a decir, “esto es” o “es decir”.
IR	Espectroscopía infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem ( <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> )
LCT	Triglicéridos de cadena larga ( <i>Long Chain Triglycerides</i> )
LD	Difracción láser ( <i>Laser Diffraction</i> )
LDC	Conjugados lípido-fármaco ( <i>Lipid-drug conjugates</i> )
LP	Partícula lipídica ( <i>Lipid Particle</i> )
m	Metros



---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
MCT	Triglicéridos de cadena mediana ( <i>Medium Chain Triglycerides</i> )
mg	Miligramos
min	Minutos
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
m/z	Relación masa-carga
N	Norte
NLC	Transportadores lipídicos nanoestructurados ( <i>Nanostructured Lipid Carriers</i> )
nm	Nanometros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NP	Difenilboriloxietilamina
NP-PEG	Reactivo de productos naturales – polietilenglicol
NR	Rojo neutro ( <i>Neutral red</i> )
PCS	Espectroscopía de correlación de fotones ( <i>Photon Correlation Spectroscopy</i> )
PDI	Índice de polidispersidad ( <i>Polidispersity index</i> )
PLX	Poloxámero 188
PrJB	Propóleos recolectado en el Jardín Botánico de Medellín
PrJB_EtAc_NLC	Transportadores lipídicos nanoestructurados preparados a partir de PrJB_EtAc_R

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
PrJB_EtAc_R	Material extraído a través del método de Randall del propóleos recolectado en el Jardín Botánico de Medellín, usando como solvente acetato de etilo
PrJB_H_NLC_TTO_Mix_15	Transportadores lipídicos nanoestructurados preparados a partir de PrJB_H_R con inclusión de 15 mg de una mezcla de CCT (68 % p/p) y TTO (32 % p/p)
PrJB_H_R	Material extraído a través del método de Randall del propóleos recolectado en el Jardín Botánico de Medellín, usando como solvente n-hexano
PrS	Propóleos recolectado en Confines (Santander)
PrS_EtAc_NLC	Transportadores lipídicos nanoestructurados preparados a partir de PrS_EtAc_R
PrS_EtAc_NLC_TTO_Mix_15	Transportadores lipídicos nanoestructurados preparados a partir de PrS_EtAc_R con inclusión de 15 mg de una mezcla de CCT (68 % p/p) y TTO (32 % p/p)
PrS_EtAc_R	Material extraído a través del método de Randall del propóleos recolectado en Confines (Santander), usando como solvente acetato de etilo
PrS_H_NLC	Transportadores lipídicos nanoestructurados preparados a partir de PrS_H_R
PrS_H_NLC_TTO	Transportadores lipídicos nanoestructurados preparados a partir de PrS_H_R con inclusión de TTO
PrS_H_R	Material extraído de propóleos recolectado en Confines (Santander) a través del método de Randall, usando como solvente n-hexano
PVA	Alcohol polivinílico ( <i>Polyvinyl alcohol</i> )
R.A.	Reactivo analítico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
SEM	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
SFB	Suero fetal bovino
SR	Solución reactivo
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox ( <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> )
TGA	Análisis termogravimétrico ( <i>Thermogravimetric analysis</i> )
TLC	Cromatografía en capa delgada ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TTO	Aceite del árbol de té ( <i>Tea Tree Oil</i> )
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas ( <i>Solid Lipid Nanoparticles</i> )
UV	Ultravioleta
W	Oeste ( <i>West</i> )
XRD	Difracción de rayos X ( <i>X-Ray Diffraction</i> )



# INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha tenido un desarrollo creciente y revolucionario a través de la generación de materiales, dispositivos y sistemas que ofrecen funciones y aplicaciones diversas en sectores industriales y científicos (Ramsden, 2014; Roco et al., 2011). La escala nanométrica oscila en el rango de tamaño de 1 nm a 100 nm, pero estos límites pueden ser superados si el material o producto final es diseñado para exhibir propiedades o fenómenos químicos, físicos o biológicos que son atribuibles a dicho rango, alcanzando dimensiones de inclusive 1000 nm (FDA, 2014). La nanotecnología ha dado la posibilidad de realizar aproximaciones teóricas, modelamientos, simulaciones, mediciones, desarrollo de instrumentación y estándares; así como ha permitido la incursión de la nanoelectrónica, el nanomagnetismo, la nanotecnología ambiental, las múltiples aplicaciones en salud (incluyendo aspectos de seguridad o toxicología) y las contribuciones a la sustentabilidad del planeta (Roco et al., 2011).

En este contexto, ni la industria farmacéutica ni la cosmética son ajenas a esta tendencia. Un ejemplo es la expectativa generada por los nanomateriales en el campo cosmético, debido a sus propiedades físicas y químicas que permiten desde la modificación física para desarrollar efectos de color, hasta modificaciones químicas que dan origen a estrategias para mejorar la solubilidad de algunos compuestos o para disminuir su reactividad química (Raj et al., 2012).

Dentro de los nanomateriales de mayor interés en la industria cosmética se destacan los liposomas, las nanoemulsiones, los nanocristales, las nanocápsulas, los dendrímeros, los cubosomas, las nanopartículas poliméricas y las partículas sólidas lipídicas (Raj et al., 2012). Estas últimas, que se definen como gotas lipídicas sólidas a temperatura corporal,

son el objeto de estudio en la presente tesis, debido a su aplicación prometedora en la encapsulación de sustancias susceptibles de degradación (Cortés-Rojas et al., 2014), en la liberación controlada de activos (Gaumet et al., 2008; Müller et al., 2000), además de la ventaja que ofrecen respecto a la penetración de moléculas de interés farmacéutico y cosmético en el estrato córneo de la piel (Bose et al., 2013; Gupta y Vyas, 2012). En adición, las nanopartículas sólidas lipídicas cuando son aplicadas vía tópica, exhiben propiedades oclusivas contribuyendo a mejorar la hidratación de la piel (Golmohammadzadeh et al., 2012). Igualmente, podrían emplearse como sistema alternativo de protección UV particulado (Morabito et al., 2011; Nesseem, 2011).

Las partículas sólidas lipídicas se desarrollaron a comienzos de la década de los noventa. Para su preparación se utilizan una gran variedad de lípidos y polímeros, los que preferiblemente han de ser sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS: “*Generally Recognized as Safe*”, por sus siglas en inglés) (Müller et al., 2002). Dentro de los excipientes lipídicos disponibles están los triglicéridos, los glicéridos parciales, ésteres oleosos semi-sintéticos y ésteres de tensioactivos no iónicos (Pouton y Porter, 2008), siendo un ejemplo clásico de matriz lipídica sólida el dibehenato de glicerilo (Compritol® 888 ATO) (Jannin et al., 2008). Los principales tensioactivos usados en la preparación de partículas sólidas lipídicas son los polietoxilados no iónicos o polisorbatos (como el Tween® 80) y el poloxamer 188 (Pluronic® F68) (Jannin et al., 2008; Keck et al., 2014).

Al ser el propóleo una sustancia resinosa que contiene sustancias lipídicas, tales como ceras, y que las sustancias que se han identificado en su composición son catalogadas como de uso alimentario y sustancias GRAS (Burdock, 1998), se presenta la oportunidad de aprovechar los componentes lipídicos para a partir de ellos, elaborar nanopartículas. Con este propósito, inicialmente se trabajó en la posibilidad de separar el material lipídico presente en el propóleo utilizando metodologías basadas en la extracción con solventes, y caracterizarlo respecto a los compuestos mayoritarios presentes, empleando metodologías analíticas fundamentadas en el análisis de grupos funcionales. A partir de los materiales cerosos obtenidos se prepararon partículas lipídicas por la técnica de emulsificación-difusión, a las que se les determinó el tamaño y el potencial zeta.

---

De esta manera, se fortalece un tema de interés para el grupo de investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos GIDECA, teniendo como antecedente el trabajo realizado por Paillié (2014), en el que se adelantaron estudios preliminares para la preparación de partículas lipídicas a partir de muestras de propóleos. Se pretende ofrecer la posibilidad de un nuevo material a ser usado en formulaciones cosméticas y plantear una alternativa novedosa de utilización del propóleos, en la que se genere valor agregado a las ceras que contiene y que son catalogadas como contaminantes que afectan desfavorablemente su calidad. En efecto, una vez obtenidas las partículas y conociendo que en ensayos preliminares se consideran seguras para el uso humano, se investigó su capacidad para transportar componentes activos, eligiendo el aceite del árbol de té como modelo, teniendo en cuenta que su naturaleza lipofílica presenta afinidad química con la estructura de las partículas. Igualmente se evaluó la factibilidad de incorporarlas en un vehículo tipo gel, cuyos resultados, aún preliminares, son atractivos para la industria farmacéutica y cosmética por sus posibilidades de aplicación. Así mismo, el sector apícola puede percibir beneficios en términos del aprovechamiento de uno de los productos de la colmena, como lo es el propóleos.





## JUSTIFICACIÓN

Las partículas sólidas lipídicas están compuestas por matrices lipídicas derivadas generalmente de ésteres de glicerol de ácidos grasos; caracterizadas porque su componente lipídico tiene un punto de fusión superior a 37 °C, lo que permite que sean sólidas a temperatura corporal (Allouche, 2013). Este sistema coloidal tiene como ventajas una cinética de liberación controlada, entrega en blancos específicos, estabilidad, biocompatibilidad (debido a que la mayoría de los lípidos son biodegradables) y protección de fármacos sensibles a la luz y al pH. Esto hace de las partículas sólidas lipídicas, transportadores con potenciales aplicaciones en la entrega de fármacos y pueden ser administradas a través de diferentes rutas tales como la parenteral, la peroral, la ocular, la tópica, la transdérmica, incluso con uso en terapia génica y medicina molecular (Kumar y Randhawa, 2013; Mukherjee et al., 2009).

Por su parte, el propóleo es uno de los productos de la colmena con mayor actividad biológica y farmacológica gracias al gran número y a la diversidad de los compuestos que lo componen (Bankova et al., 2000; Lotfy, 2006). Su utilización data desde tiempos ancestrales, como ingrediente de preparaciones medicinales, caseras y productos de uso personal. Los egipcios, griegos y romanos le usaban para el tratamiento de lesiones de la piel. En la actualidad, la medicina tradicional lo reconoce como antiséptico, antimicótico, bacteriostático, anti-inflamatorio y antioxidante (Burdock, 1998; Castaldo y Capasso, 2002; Sforcin, 2007).

Los materiales a partir de los cuales las abejas elaboran su propóleo son sustancias secretadas por las plantas de su entorno próximo, dentro de las que se encuentran los exudados de las heridas de dichas plantas, que generalmente corresponden a material lipofílico, resinas, mucílagos y gomas (Bankova, 2005), que luego son enriquecidos con

secreciones salivales y enzimáticas de las abejas (Burdock, 1998). La calidad del propóleo se define en términos de las sustancias bioactivas que le dan el valor agregado a este producto de la colmena, tales como compuestos fenólicos, flavonoides y resinas (MAPA, 2001; SPReI y SAGPyA, 2008).

A su vez, es bien conocido que la concentración de materiales cerosos da origen a propóleos de baja calidad, debido a que estos no son considerados activos farmacológicamente y un elevado contenido de ceras ocasiona turbidez en extractos y tinturas de propóleos cuando se almacenan a bajas temperaturas. Otro aspecto relacionado con el contenido de ceras, es la posible adulteración que puedan hacerle al propóleo al añadir intencionalmente ceras del panal (Woisky, 1996).

De acuerdo con lo anterior, es importante propender por el aprovechamiento del contenido lipídico del propóleo a fin de crear una oportunidad para generarle un valor agregado. Así, en la presente tesis se propone una posible alternativa basada en la elaboración de partículas lipídicas mediante la técnica de emulsificación-difusión, con proyección de aplicación en productos cosméticos y sistemas de entrega de fármacos, contando como precedente con los resultados de la investigación preliminar realizada en el Grupo de investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos – GIDECA (Paillíé Jiménez, 2014). En este sentido, como hipótesis de trabajo se plantea que: “Es posible el aprovechamiento de los materiales lipídicos extraídos del propóleo para la preparación de partículas sólidas lipídicas de interés farmacéutico o cosmético.”.

# 1 MARCO TEÓRICO

Dentro de la estructura conceptual necesaria para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se expondrán tópicos relacionados con el propóleo, cubriendo los aspectos generales y los relacionados con la actividad biológica, la composición química y el control de calidad. Igualmente, se hará referencia a las partículas sólidas lipídicas, para las que es importante tener en cuenta su clasificación, los materiales empleados en su preparación y los métodos más reportados para su obtención.

## 1.1 Propóleos

El propóleo es una sustancia resinosa natural que las abejas fabrican a partir de los exudados de plantas, ceras, sustancias propias de su metabolismo tales como enzimas, y otros materiales tales como restos vegetales, con el fin de utilizarlo para construir sus nidos, protegerlos de invasores y del viento, llenar agujeros y reparar la colmena (Bankova et al., 2000; de Groot, 2013; Marcucci, 1995). Se ha reportado su actividad antimicrobiana (Ramanuskienė et al., 2009; Vardar-Ünlü et al., 2008; Yaghoubi et al., 2007), antifúngica (Finger et al., 2013; Koc et al., 2007) y antiviral (Hegazi et al., 2012; Kujumgiev et al., 1999); así como su uso para el control de la microflora de la colmena y para regular la descomposición de aquellas criaturas ajenas a ella que han sido muertas por las abejas y que éstas no pueden sacar (Bankova et al., 2000; Simone-Finstrom y Spivak, 2010).

La palabra “propóleos” viene del griego antiguo “προ” (pro: *enfrente de, a la entrada de*) y “πολις” (polis: *ciudad o comunidad*), lo que quiere decir que es el material para la defensa de la colmena (Bankova et al., 2000). La función del propóleo está

esencialmente relacionada con el mantenimiento de la homeostasis del ambiente del nido, a través de un mecanismo natural para evitar y tratar enfermedades en la propia colmena, gracias a su actividad frente a patógenos que pueden afectar la salud de las abejas (Simone-Finstrom y Spivak, 2010). Físicamente, el propóleo se describe como un material lipofílico y duro que al ser calentado se hace suave, flexible y pegajoso. Tiene un olor característico y su color varía según su origen y antigüedad, desde amarillo, verde o rojo a marrón (de Groot, 2013; Hausen et al., 1987a).

### **1.1.1 Composición química del propóleo**

En términos generales, el propóleo tiene dentro de sus componentes polen, ceras, resinas, bálsamos, aceites y materia orgánica. Debido a que los exudados y secreciones de las plantas varían según el tiempo y el lugar de recolección, la composición del propóleo depende del territorio donde esté ubicada la colmena (de Groot, 2013; Marcucci, 1995). Para que este material sea aceptado oficialmente, debe lograrse la estandarización química de su composición, lo que permite garantizar su seguridad y eficacia. Una forma de lograrlo es a través del estudio y la tipificación de las principales plantas vecinas a las colmenas, para identificar los posibles grupos de compuestos biológicamente activos y establecer marcadores químicos por región (Bankova, 2005). No obstante, aunque se puede afirmar que la ubicación geográfica es el parámetro determinante de la composición del propóleo, ésta depende también, entre otros, del periodo estacional, la iluminación, la altitud, las especies de abejas, el método de extracción del propóleo, la actividad paralela que se desarrolle en la zona y la disponibilidad de alimento (de Groot, 2013).

A la fecha, se han identificado más de 300 compuestos químicos diferentes en el propóleo, catalogados como flavonoides, ácidos fenólicos, derivados de acetofenona, lignanos, terpenos, componentes volátiles (como monoterpenos y sesquiterpenos), compuestos aromáticos, azúcares, hidrocarburos y monoésteres (Bankova et al., 2000; Kurek-Górecka et al., 2014). En términos generales, el

propóleos crudo se compone de 50 % de resina y bálsamo vegetal, el que contiene la mayoría de las sustancias biológicamente activas; 30 % a 35 % de ceras, principalmente cera de abejas; 5 % a 10 % de aceites aromáticos; aproximadamente 5 % de polen y en menos proporción, restos orgánicos. En el propóleos también se encuentran elementos tales como sodio, calcio, magnesio, zinc, potasio, silicio, azufre, hierro y aluminio (Serra Bonvehí y Orantes Bermejo, 2013) y, vitaminas como tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido ascórbico (vitamina C) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Marcucci, 1995; Moreira, 1986; Pietta et al., 2002).

### 1.1.2 Actividad biológica y uso del propóleos

El uso del propóleos es extenso, de forma que está disponible como suplemento dietario, en productos farmacéuticos (cremas, ungüentos, tabletas, cápsulas, jarabes, aerosoles, etc.) y como ingrediente en formulaciones cosméticas (champús, acondicionadores, lociones, labiales, ungüentos, cremas dentales, esmaltes, etc.) (de Groot, 2013). Adicionalmente, se reporta su empleo como aditivo preservante de alimentos (Gutiérrez Cortés, 2012) y como agente aromatizante debido a que contiene varios compuestos odoríficos (Yang et al., 2010). Otras aplicaciones incluyen el uso como barniz para la madera y otras superficies como instrumentos musicales, como adhesivo y como sustancia para sellar agujeros (de Groot, 2013).

El amplio uso del propóleos desde la antigüedad se debe a sus propiedades antimicrobianas (Kujumgiev et al., 1999; Marcucci et al., 2001; Sforcin et al., 2000), así como a sus actividades anti-inflamatoria (Paulino et al., 2008; Wang et al., 2014), anti-ulcerosa (de Barros et al., 2008, 2007), cicatrizante (regenerativos y reparativos) (Sehn et al., 2009), hepatoprotectora (Bhadauria y Nirala, 2009; Kolankaya et al., 2002; Türkez et al., 2010), inmunoestimulante (Dimov et al., 1992; Sforcin, 2007), antioxidante (Kurek-Górecka et al., 2014; Teixeira et al., 2010), citotóxica (Banskota et al., 2000; da Silva Frozza et al., 2013; Li et al., 2008) y antidiabética (Fuliang et al., 2005; Sforcin y Bankova, 2011), entre otras. Gracias a esto, el propóleos se ha incluido como material de partida en la elaboración de productos de venta libre u OTC (por su sigla en inglés, OTC, *over-*

*the-counter*) para controlar el resfriado común (Wagh, 2013), y también en algunos otros que proclaman “*proteger la salud y evitar enfermedades*” (Burdock, 1998). Su inclusión en preparaciones dermatológicas coadyuva en el tratamiento de quemaduras, úlceras, psoriasis, verrugas y tratamiento de heridas (Burdock, 1998; de Groot, 2013). Respecto a la aplicación vía peroral, se puede considerar segura, pero se ha vinculado sin relación causal clara, a convulsiones, síntomas gastrointestinales y falla renal aguda (de Groot, 2013).

Por el creciente aprovechamiento del propóleo en diferentes preparaciones de uso humano, resulta de primordial importancia su toxicidad asociada (de Groot, 2013). Dentro de los efectos adversos reportados se destacan reacciones alérgicas (Basista y Filipek, 2012; Hausen et al., 1987a), estomatitis (Garrido Fernández et al., 2004), edema labial (Budimir et al., 2012) y disnea (Bellegrandi et al., 1996). Adicionalmente, debe controlarse la presencia de metales pesados (tales como plomo, cadmio, mercurio y arsénico) por sus implicaciones en salud animal y humana (Lacerda et al., 2011; Serra Bonvehí y Orantes Bermejo, 2013).

Existen reportes que asocian el propóleo con casos de dermatitis de contacto alérgica (Basista y Filipek, 2012) y se considera como un potente sensibilizador de contacto. Prueba de ello son los reportes de reacciones alérgicas ocupacionales en apicultores (de Groot, 2013); cuyas sustancias responsables se han identificado como 1,1-dimetilalil ácido cafeico (3-metil-2-butenil cafeato), tectocrisina y los ésteres feniletil y prenil del ácido cafeico (Marcucci, 1995). Respecto al alérgeno “LB-1” (primer alérgeno identificado en el propóleo y aislado inicialmente en los brotes del álamo negro, *Populus nigra* L.) se ha reportado que es una mezcla de 3-metil-2-butenil cafeato (54 %), 3-metil-3-butenil cafeato (28 %), fenetil cafeato (8%), ácido cafeico (1 %) y bencil cafeato (1 %) (Burdock, 1998; Hausen y Wollenweber, 1988; Hausen et al., 1987a, 1987b). En síntesis, se afirma que los agentes sensibilizantes más importantes son los ésteres del ácido cafeico; relacionándose su capacidad de actuar como haptenos con la presencia de los grupos hidroxilo libres en el anillo aromático. De acuerdo con lo anterior, el

propóleos se considera clínicamente como un alérgeno y se han reconocido sus propiedades inmuno-estimulantes (Burdock, 1998).

### **1.1.3 Control de calidad del propóleos**

El creciente consumo del propóleos, así como su uso e inclusión en preparaciones diversas, ha llevado a que varios países establezcan normativas para la inspección y el control de calidad tanto del propóleos crudo como de su extracto. En Latinoamérica se destacan las disposiciones de Brasil, Argentina y Cuba.

Para el caso de Brasil, el Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) y la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), han promulgado especificaciones de calidad a través de la Instrucción Normativa N° 3 del 19 de enero de 2001 del Departamento de Inspección de Productos de Origen Animal y, la Resolución-RDC N° 132 del 29 de mayo de 2003, respectivamente. Debido a que el MAPA ejerce el control sobre el propóleos utilizado en el campo alimentario, su reglamentación ofrece pautas de identificación y los requisitos mínimos de calidad para ser comercializado nacional e internacionalmente. Por su parte, ANVISA, a través de la Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos (CATEF), establece directivas para el registro de los productos que contienen propóleos, dentro del grupo de medicamentos específicos, en la clase opoterápica (CATEF, 2005; Lins et al., 2010; MAPA, 2001).

De otro lado, Argentina reglamenta las características que debe cumplir el propóleos, a través del Código Alimentario Argentino y de la Resolución Conjunta 94/2008 y 357/2008 (SPReI y SAGPyA, 2008). Si bien en Argentina no se establece como normativa un determinado punto de fusión del propóleos, existen trabajos de investigación realizados en dicho país que miden este parámetro como parte de la caracterización fisicoquímica de los propóleos y que se considera, aporta información preliminar respecto a su composición (Chaillou et al. 2004).

En la Tabla 1.1, se hace una comparación respecto a los parámetros de calidad exigidos al propóleo bruto por las legislaciones de Brasil y de Argentina. Como se observa, la legislación argentina es más exigente que la brasilera en cuanto a la presencia de masa mecánica o cuerpos extraños (*i.e.* impurezas tales como restos de plantas, animales u otros residuos derivados del proceso de recolección del propóleo), metales pesados (arsénico y plomo) y contaminantes del tipo pesticidas y antibióticos. No obstante, la legislación de Brasil tiene límites más estrictos para parámetros fisicoquímicos tales como pérdida por secado, contenido de ceras y compuestos solubles en etanol (los que abarcan resinas y sustancias de actividad biológica).

Por su parte, el fundamento técnico de las metodologías analíticas para realizar las determinaciones es similar en las dos legislaciones; la diferencia está en los límites de los contaminantes que pueden estar presentes —donde se incluyen metales pesados, pesticidas y antibióticos—, para los cuales la legislación argentina es más exigente y, por ende, se necesitan metodologías de mayor complejidad para hacer una detección correcta (cromatografía o espectrometría de absorción atómica).

En Colombia no existe normativa que evalúe la calidad del propóleo bruto, de hecho el único producto que por ahora tiene legislación oficial para su control es la miel (Ministerio de la Protección Social, 2010). No obstante, son numerosas las investigaciones realizadas con propóleos colombianos, tal como lo recopila López Córtes (2012) en su trabajo sobre las propiedades biológicas del propóleo y su caracterización físicoquímica según la región donde se recolecten.

De acuerdo con lo anterior, el potencial de uso que tiene el propóleo es bastante amplio, gracias al elevado número y diversidad de compuestos que lo integran. Convencionalmente, la presencia de componentes lipídicos es la que le resta calidad al propóleo. Sin embargo, como un aporte para su aprovechamiento, en la presente investigación se pretende el empleo de dichos materiales lipídicos en la preparación de partículas lipídicas.



Tabla 1.1 Requisitos establecidos por las legislaciones brasilera y argentina, respecto a la calidad del propóleo bruto.

		<i>Legislación brasilera</i> (CATEF, 2005; MAPA, 2001)	<i>Legislación argentina</i> (SPReI y SAGPyA, 2008)	<i>Métodos</i>
Características organolépticas	Olor	Característico: resinoso o balsámico, según el origen botánico	Característico: resinoso o balsámico, según su origen botánico o geográfico	Organoléptico <sup>1,2</sup>
	Color	Amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y otros, variando conforme a su origen botánico	Amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y sus tonalidades, variando conforme a su origen botánico o geográfico	Organoléptico <sup>1,2</sup>
	Sabor	Característico: de suave balsámico a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico	Variable, de suave y balsámico a fuerte y picante, según su origen botánico o geográfico	Organoléptico <sup>1,2</sup>
	Consistencia a temperatura ambiente	Maleable a rígido, dependiendo de su origen botánico	Maleable o rígido, según su origen botánico o geográfico	Organoléptico <sup>1,2</sup>
	Aspecto	Granulometría heterogénea	Homogéneo o heterogéneo	Organoléptico <sup>1,2</sup>
Parámetros fisicoquímicos de calidad	Pérdida por calentamiento o secado	Máximo 8 % (p/p)	Máximo 10 % (100 °C – 105 °C)	Gravimétrico (estufa) <sup>1,2</sup>
	Cenizas	Máximo 5 % (p/p)	Máximo 5 % (500 °C – 550 °C)	Gravimétrico (mufla) <sup>1,2</sup>
	Masa mecánica o cuerpos extraños	Máximo 40 % (p/p)	Máximo 25 %	Gravimétrico; extracción por solventes <sup>1,2</sup>
	Ceras	Máximo 25 % (p/p)	Máximo 40 % (sustancias extraíbles en n-hexano)	Extracción por solventes <sup>1,2</sup>
	Índice o actividad de oxidación	Máximo 22 segundos	Máximo 22 segundos	Tiempo de decoloración de una solución de KMnO <sub>4</sub> 0.1N <sup>1,2</sup>
	Compuestos fenólicos	Mínimo 5 % (p/p)	Mínimo 5 % (expresados como ácido gálico)	Espectrofotométrico <sup>1,2</sup>
	Flavonoides	Mínimo 0.5 % (p/p)	Mínimo 0.5 %	Espectrofotométrico <sup>1,2</sup>
	Solubles en etanol; porcentaje de extracto etanólico	Mínimo 35 % (p/p)	Mínimo 30 % (resinas)	Gravimétrico; extracción por solventes <sup>1,2</sup>
	Espectro de absorción UV-VIS	Señales características de las principales clases de flavonoides entre 200 nm y 400 nm	Debe presentar un máximo de absorción entre 270 nm y 315 nm	Espectrofotométrico <sup>1,2</sup>
	Plomo	Acetato de plomo: positivo	Máximo 2.0 mg/Kg	Cualitativo <sup>1</sup> , Absorción Atómica o espectrofotométrico <sup>2</sup>
	Arsénico		Máximo 1.0 mg/Kg	Absorción atómica o espectrofotométrico <sup>2</sup>
	Hidróxido de sodio	Positivo		
Residuos de plaguicidas y antibióticos		Ausencia	Cromatográfico (Cromatografía líquida de alta eficiencia) <sup>2</sup>	
Parámetros microbiológicos	<i>Paenibacillus larvae</i>	Ausencia.		Microbiológico <sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Legislación brasilera; \*<sup>2</sup> Legislación argentina.

## 1.2 Partículas lipídicas

Como se presenta en la Figura 1.1, se han desarrollado varios transportadores coloidales para la entrega *in vivo* de fármacos, dentro de los cuales se encuentran los liposomas, los niosomas, las nanopartículas y las microemulsiones, los que tienen similitudes en tamaño, forma y vía de administración (Quintanar-Guerrero et al., 1998; Vauthier et al., 2013).

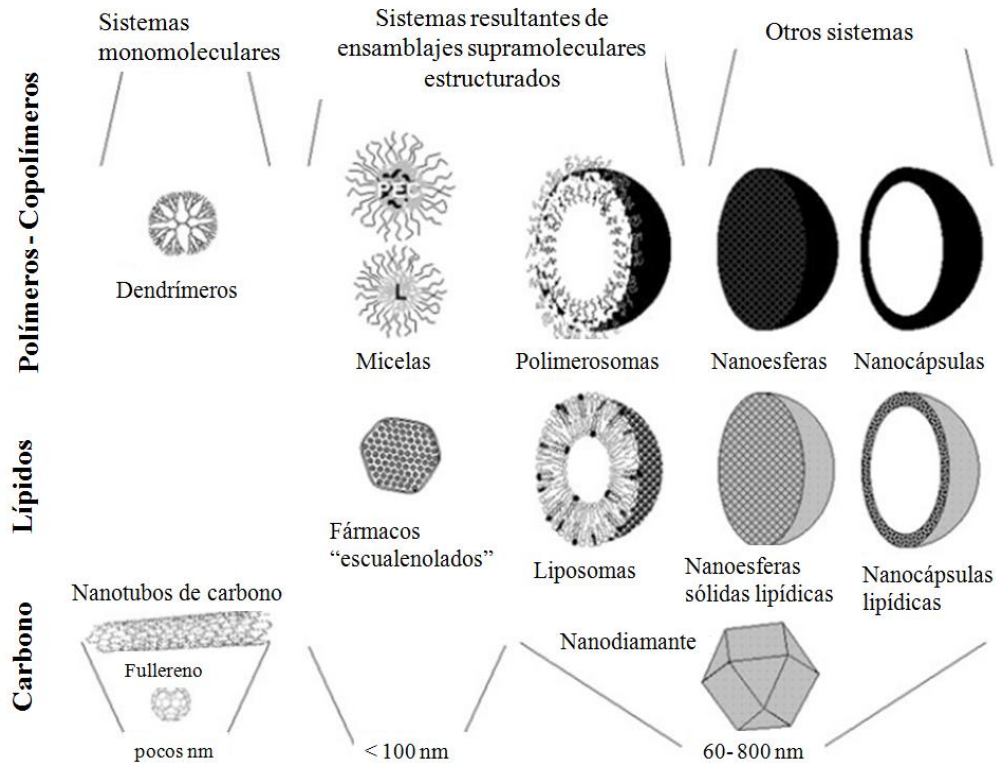
De forma general, en el campo farmacéutico se definen las nanopartículas como partículas coloidales sólidas, de tamaños que oscilan desde un límite inferior de 5 nm -10 nm hasta un límite superior de 1000 nm, siendo el rango más usual de 100 nm y los 500 nm (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Éstas se pueden dividir en dos grandes grupos: nanoesferas y nanocápsulas. Las nanocápsulas tienen una estructura típica núcleo-capa de recubrimiento (*core-shell*), caracterizadas por un reservorio en su estructura interna. Por su parte, las nanoesferas poseen una estructura homogénea en toda la partícula, conformada por una matriz densa (Battaglia y Gallarate, 2012; Quintanar-Guerrero et al., 1998).

Para el caso particular de los sistemas con estructura matricial lipídica de tamaño en la escala nanométrica, se han desarrollado las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN, *Solid Lipid Nanoparticles*), los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, *Nanostructured Lipid Carriers*), los conjugados fármaco-lípidos (LDC, *Lipid-drug conjugates*) y las nanocápsulas lipídicas (LNC, *Lipid nanocapsules*); que varían según la naturaleza de los materiales de partida, la estructura que adopta la matriz y en su eficiencia como transportadores de moléculas activas (Battaglia y Gallarate, 2012; Quintanar-Guerrero et al., 2005).

Así, las partículas sólidas lipídicas (SLN) son partículas coloidales preparadas a partir de lípidos sólidos, exhibiendo un diámetro promedio entre 10 nm y 1000 nm, que incursionaron a comienzos de 1990 (Müller et al., 2000; Quintanar-Guerrero et al., 1998). Su desarrollo consiste en reemplazar el lípido líquido de las emulsiones por un lípido sólido, lo que les permite ser sólidas a temperatura ambiente y a temperatura corporal (Rostami et al., 2014; Villafuerte et al., 2008).

De otro lado, los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) son partículas lipídicas con un núcleo constituido por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos. Su punto de fusión es inferior al punto de fusión del lípido sólido inicial utilizado para su preparación, conservando su estado sólido a la temperatura corporal. Según la composición de la mezcla de lípidos y el método de fabricación utilizado, se pueden obtener NLC de tipo imperfecto (su cristalización se altera por pequeñas cantidades de aceite), amorfo (matriz sólida, mas no cristalina) y múltiple (la matriz sólida tiene pequeños reservorios de aceite) (Battaglia y Gallarate, 2012).

Figura 1.1 Representación esquemática de algunos nanomateriales (adaptado de Vauthier et al. 2013).



Por su parte, los conjugados fármaco-lípido (LDC) fueron diseñados para facilitar la incorporación de moléculas hidrofílicas en transportadores lipídicos. Su preparación requiere de la formación de un conjugado insoluble entre el lípido y el fármaco, que se consigue bien sea a través de la generación de sales (*e.g.* con ácidos grasos), o por uniones covalentes (*e.g.* ésteres o éteres). Dichos conjugados son procesados con una solución

acuosa de tensioactivo, usando técnicas como la homogenización a alta presión, donde el producto final es una formulación de nanopartículas lipídicas (Neupane et al., 2013; Olbrich et al., 2002).

Adicionalmente, las nanocápsulas lipídicas (LNC) tienen una estructura híbrida entre las nanocápsulas poliméricas y los liposomas, debido a que su núcleo de aceite está rodeado por una membrana rígida de tensioactivo. Su rango de tamaño está entre 20 nm y 100 nm. Se preparan comúnmente a través del método de inversión de fase inducido por temperatura (Huynh et al., 2009).

Son varias las ventajas de los transportadores lipídicos, incluyendo biocompatibilidad, baja citotoxicidad y posibilidad de incorporar en su estructura compuestos activos (Battaglia y Gallarate, 2012). Como transportadores de dichos compuestos, en general, las partículas lipídicas se caracterizan por tener buena biodisponibilidad, servir como transportadores de liberación modificada para activos poco solubles en agua y proteger sustancias susceptibles a la degradación por agentes externos como la luz o el agua. La capacidad de carga de la molécula activa en el lípido está determinada por factores tales como la solubilidad del compuesto en el lípido fundido; la fácil incorporación del compuesto fundido en el lípido fundido; la estructura física y química de la matriz lipídica sólida, lo que determina la acomodación del fármaco y; el estado polimórfico del material lipídico (Müller et al., 2000). Dentro de los fenómenos de inestabilidad de los sistemas lipídicos se reportan el crecimiento de las partículas por aglomeración durante el almacenamiento, cambios en las transiciones polimórficas y la tendencia a gelificar (Villafuerte et al., 2008).

### **1.2.1 Preparación de las partículas sólidas lipídicas**

Dentro de los métodos reportados para la preparación de partículas lipídicas se encuentra la homogenización a alta presión (HPH, *High pressure homogenization*), desarrollada en la década de 1950 para la producción de emulsiones parenterales O/W (Battaglia y Gallarate, 2012) y que tiene la mayor trayectoria y uso. Igualmente se reportan métodos basados en ultrasonido, desplazamiento de solventes o aquellos basados en emulsificación.

- *Homogenización a alta presión (HPH, por sus siglas en inglés).*

La HPH se fundamenta en el uso de presiones elevadas para inducir la formación de nanopartículas. La reducción del tamaño de partícula es el resultado del esfuerzo cortante y las fuerzas de cavitación (Kumar y Randhawa, 2013). Esta técnica puede realizarse en caliente o en frío. En ambos casos, el ingrediente activo es disuelto en el lípido fundido entre 5 °C y 10 °C por encima de su punto de fusión. Para la técnica de homogenización en caliente, inicialmente se debe obtener una emulsión aceite-en-agua (O/W) a través de la dispersión por agitación de la mezcla fundida que contiene el ingrediente activo, en una solución acuosa del surfactante que ha sido calentada a la misma temperatura. Esta emulsión se pasa a través de un homogenizador de alta presión (100 bar – 1000 bar), el cual ha sido llevado previamente a la temperatura a la que se está manejando el proceso (puede ser usando recirculación de agua caliente). Durante la homogenización, la temperatura se mantiene para evitar la solidificación del lípido. Al transferirse la nanoemulsión O/W a un recipiente a temperatura ambiente, ésta se enfría, recristalizando el lípido y formándose las SLN (Kumar y Randhawa, 2013; Müller et al., 2000; Silva et al., 2011).

Para la técnica de homogenización en frío, la mezcla del lípido que contiene el ingrediente activo se enfría, permitiendo la formación de micropartículas lipídicas de tamaños que oscilan entre 50 µm y 100 µm, las que posteriormente se suspenden en una disolución fría de surfactante. Dicha suspensión se homogeniza a temperatura ambiente o menor, de tal forma que con ayuda de las fuerzas de cavitación, las micropartículas lipídicas se fragmentan dando lugar a nanopartículas sólidas lipídicas (Müller et al., 2000). Esta técnica es frecuentemente empleada para la preparación de SLN conteniendo moléculas hidrofílicas, debido a que se minimiza su probabilidad de migración hacia la fase acuosa (Kasongo et al., 2012; McClements, 2015; Müller et al., 2000).

- *Homogenización de elevado corte (HSH, por sus siglas en inglés).*

La homogenización de elevado corte se emplea como técnica dispersante para la producción de nanodispersiones de lípido sólido (Hou et al., 2003; Mehnert y Mäder, 2001). En esta técnica se dispersa el tensioactivo estabilizante en la fase acuosa caliente, mientras en paralelo se funde el componente lipídico (ambas fases se conservan a la misma temperatura). A continuación, la fase acuosa caliente es adicionada sobre la fase lipídica fundida, manteniendo la mezcla con calentamiento constante (baño maría) y bajo homogenización de elevado corte durante un tiempo previamente determinado (*e.g.* 15 min). Dicha dispersión es transferida a un baño de hielo para lograr un rápido enfriamiento y promover, por choque térmico, la formación de las partículas (Carlotti et al., 2005).

- *Emulsificación con ultrasonido.*

Por su parte, para la técnica que usa ultrasonido se reporta un calentamiento del lípido de 5 °C a 10 °C por encima de su punto de fusión, siendo luego adicionado a la mezcla de agua y tensioactivos, calentada con anterioridad a la misma temperatura. Se obtiene una emulsión primaria bajo la agitación con un Ultra-Turrax<sup>®</sup>. Luego una sonda de sonicación se ubica dentro de esta emulsión durante un periodo de tiempo dado, conduciendo al rompimiento de las gotas y a la consiguiente formación de la nanoemulsión (Oliveira et al., 2016; Silva et al., 2011) a través del fenómeno conocido como cavitación acústica (Patil y Pandit, 2007). Una vez obtenida dicha nanoemulsión O/W, ésta se enfría para producir las partículas lipídicas (Silva et al., 2011).

La ultrasonicación tiene como desventaja que puede llevar a una elevada polidispersión de las nanopartículas, así como promover reacciones químicas e incluso introducir contaminación por trazas metálicas provenientes de la sonda (Quintanar-Guerrero et al., 1998; Silva et al., 2011).

- *Emulsificación y evaporación del solvente (SEE, por sus siglas en inglés).*

En este método, el material lipofílico se disuelve en un disolvente orgánico inmiscible con agua, para luego emulsificar la mezcla en una solución acuosa. Dicha emulsión se somete a una fuente de elevada energía como ultrasonido u homogenizadores, con el fin de disminuir el tamaño del glóbulo. Posteriormente se evapora el solvente orgánico por vacío, calentamiento o los dos, obteniendo una dispersión acuosa de nanopartículas lipídicas, producto de la precipitación del lípido en el medio acuoso (Mehnert y Mäder, 2012; Sjöström y Bergenståhl, 1992; Sjöström et al., 1993).

- *Emulsificación-difusión.*

Esta técnica implica el uso de agua y de un solvente parcialmente miscible en ella, los que deben ser mutuamente saturados para asegurar el equilibrio termodinámico fundamental para la formación de una emulsión. En el solvente orgánico saturado con agua se disuelve el material lipídico formando la comúnmente denominada “fase orgánica”. En el agua saturada con solvente orgánico se disuelve un agente estabilizante, lo que se denomina “fase acuosa”. Las fases orgánica y acuosa son puestas en contacto y emulsificadas a elevada fuerza de corte. Una vez lograda la emulsión, se adiciona agua al sistema provocando la difusión del solvente orgánico hacia la fase externa acuosa, para dar lugar a la formación inmediata de nanopartículas con tamaños promedio entre 30 nm y 100 nm. Posteriormente se retira el solvente bajo presión reducida (Quintanar-Guerrero et al., 2005; Trotta et al., 2003). Si se requiere calentamiento para disolver el lípido, al inicio ambas fases se mantienen a la misma temperatura y el paso de difusión se lleva a cabo a temperatura ambiente o a la misma temperatura a la que el lípido fue disuelto (Quintanar-Guerrero et al., 2005).

- *Desplazamiento de solvente o inyección.*

Para la preparación de partículas por este método, una disolución del lípido en un solvente o mezcla de solventes miscibles en agua (acetona, etanol, metanol, isopropanol, glicerol al 85 %) se inyecta rápidamente, bajo agitación y con ayuda de una aguja, en una fase acuosa que puede contener un agente estabilizante. Esto conduce a la precipitación del lípido en forma de partículas sólidas lipídicas (Schubert y Müller-Goymann, 2003). A escala industrial se ha propuesto el uso de un contactor de membrana, en donde la fase lipídica fundida, ubicada en el interior de un cartucho de filtración de un tamaño de poro específico, se hace pasar a presión a través de la membrana, siendo recibido gota a gota en un medio acuoso externo que contiene agente estabilizante y en el que precipitan las partículas de forma inmediata (Charcosset et al., 2005).

- *Preparaciones de partículas lipídicas basadas en microemulsiones.*

Este método requiere la fusión de un lípido sólido a temperatura ambiente y la preparación de una mezcla de agua, cosurfactante<sup>1</sup> y surfactante a la misma temperatura de fusión del lípido. La fase acuosa se adiciona sobre el lípido fundido bajo agitación moderada. Si los componentes son mezclados en una proporción correcta, se formará una microemulsión transparente y termodinámicamente estable. Esta microemulsión se dispersa bajo agitación en un medio acuoso frío (2 °C a 3 °C), dando lugar a la formación de las partículas (Mojahedian et al., 2013; Müller et al., 2000; Ravanfar et al., 2016; Shah et al., 2014).

---

<sup>1</sup> *Cosurfactante*: pequeña molécula anfifílica (e.g. alcohol de cadena corta, tipo butanol o hexanol) que se localiza dentro de la monocapa interfacial formada por las moléculas de tensioactivo, incrementando la flexibilidad de dicha película (Elaissari, 2003).



### 1.2.2 Caracterización de las partículas sólidas lipídicas

En el contexto farmacéutico, la caracterización de las partículas sólidas lipídicas se realiza a partir de la medición de varios parámetros que inciden en la estabilidad del sistema particulado y la cinética de liberación de los ingredientes activos que contienen. Los siguientes, son algunos de los parámetros frecuentemente evaluados:

- *Tamaño de partícula:* este parámetro se puede medir a través de varias técnicas analíticas, dentro de las cuales se citan como las más comunes la espectroscopía de correlación de fotones (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*), también conocida como dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic light scattering*) y, la difracción láser (LD, *Laser diffraction*).

La espectroscopía de correlación de fotones (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*) mide la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada que es causada por el movimiento de las partículas. Esto permite una capacidad de medición que varía desde pocos nanómetros hasta 3  $\mu\text{m}$ . Por su parte, la difracción láser (LD, *Laser Diffraction*) se basa en la dependencia del ángulo de difracción, con el radio de la partícula (espectro de Fraunhofer). Así, las partículas más pequeñas provocan una dispersión más intensa y ángulos más grandes. Tiene como ventaja que abarca desde la escala nanométrica hasta el más bajo rango milimétrico (Garud et al., 2012; Mehnert y Mäder, 2012).

Paralelo a esto, si se requiere información adicional acerca de la forma de la partícula, ésta se puede obtener a través de microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión o microscopía de fuerza atómica. Se debe tener en cuenta que el procesamiento de la muestra típico de este tipo de análisis (*e.g.*, remoción del solvente) puede alterar las características originales de las partículas (Garud et al., 2012; Müller et al., 2000).

- *Potencial zeta:* su medición permite predecir la estabilidad de la preparación coloidal durante el almacenamiento. Generalmente, es menos probable que las partículas presenten fenómenos de agregación si tienen un elevado potencial zeta debido a la

repulsión de las partículas cargadas. Sin embargo, este supuesto no es estrictamente aplicable para sistemas que contienen estabilizantes estéricos, debido a que su mecanismo de estabilización se basa en su adsorción sobre la partícula, exhibiendo bajos valores de potencial zeta (Mehnert y Mäder, 2012; Müller et al., 2000). Adicionalmente, cuando se hace referencia a la estabilización por el efecto de cargas electrostáticas, debe tenerse en cuenta que ésta se ve afectada sensiblemente por el pH y por la presencia de electrolitos (Battaglia y Gallarate, 2012).

- *Grado de cristalinidad y modificaciones del lípido*: estos dos parámetros se relacionan estrechamente con las velocidades de incorporación y de liberación de sustancias activas (Mehnert y Mäder, 2012). Se han evidenciado cambios en la capacidad de incorporación de principios activos según si las partículas lipídicas tienen estructura cristalina o amorfa, siendo mayor en esta última (Westesen y Bunjes, 1995).

Sin embargo, no es suficiente describir el estado físico del lípido como cristalizado o no, debido a que el lípido cristalizado puede tener varias modificaciones de su red cristalina. Esto es importante porque durante el almacenamiento pueden darse rearreglos en dicha red, favoreciendo aquella configuración con mayor estabilidad termodinámica, lo que puede conducir a la eventual expulsión del principio activo. Igualmente, al hablar de modificaciones del lípido no siempre se reduce a asignar una forma  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\beta'$ ; la complejidad va más allá a causa de las muchas subespecies e interacciones del lípido con los agentes emulsificantes (Mehnert y Mäder, 2012).

Para lograr información acerca de la estructura de la matriz lipídica, su polimorfismo (comúnmente encontrado en materiales lipídicos como glicéridos y ácidos grasos) y su comportamiento de fases, pueden emplearse técnicas tales como la calorimetría diferencial de barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) y la difracción de rayos X (XRD, *X-Ray Diffraction*). Con DSC se pueden monitorear y cuantificar eventos térmicos en las muestras en función del tiempo y establecer las temperaturas a las que tales eventos ocurren. Sin embargo, para identificar la naturaleza de las transiciones térmicas se debe contar con información adicional lograda por métodos alternativos como termogravimetría, observaciones microscópicas, técnicas

espectroscópicas y la propia XRD. Esto permite determinar diferencias entre puntos de fusión, transiciones polimórficas, pérdidas de moléculas de agua de hidratación o descomposición de la sustancia (Bunjes y Unruh, 2007).

- *Coexistencia de estructuras coloidales adicionales (micelas, liposomas) y fenómenos dinámicos*: esto se puede determinar a través de técnicas de resonancia magnética como NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) y ESR (*Electron Spin Resonance*), las que ofrecen la posibilidad de realizar mediciones repetidas de la misma muestra ya que son del tipo no-destructivas. Con estos métodos de análisis se pueden investigar fenómenos dinámicos (*e.g.* cinéticas de degradación o reactividad química) y las características de posibles nanocompartimientos en dispersiones lipídicas coloidales (Mehnert y Mäder, 2012).

### **1.3 Propóleos como material de partida para el desarrollo de transportadores de interés farmacéutico o cosmético: estado del arte**

Debido a la inclusión creciente de productos apícolas en la industria farmacéutica y alimentaria, a la fecha se cuenta con trabajos de investigación en los que se pretende la incorporación de componentes del propóleos en sistemas transportadores a escalas nano y micrométrica. En este sentido se destaca la encapsulación del extracto de propóleos a través de métodos como la coacervación compleja con proteína aislada de soya y pectina (Pozippe Nori et al., 2011), el secado por aspersión o “*spray-drying*”, utilizando gelatina como encapsulante (Bruschi et al., 2006, 2003) y la emulsificación-evaporación de solvente empleando poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Durán et al., 2007). Igualmente, se reporta la incorporación de propóleos en la cavidad de  $\beta$ -ciclodextrinas (Kalogeropoulos et al., 2009).

En términos generales, los resultados de estas investigaciones han sido satisfactorios respecto a la encapsulación de los constituyentes bioactivos del extracto. Por ejemplo, en

los trabajos de Pozippe Nori et al. (2011) las microcápsulas obtenidas fueron caracterizadas respecto a su estabilidad, al contenido de flavonoides y de fenoles totales (actividad antioxidante) y a la actividad antimicrobiana. Los resultados sugieren que es posible encapsular el extracto de propóleos por el método de coacervación compleja obteniendo un polvo estable, libre de alcohol y con la posibilidad de liberarse bajo condiciones controladas en los alimentos. Así mismo, se evidencia la conservación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y flavonoides, así como la acción inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* (Pozippe Nori et al., 2011).

Sin embargo, son muy escasos los trabajos en los que se emplean sistemas lipídicos nanoparticulados para la encapsulación de componentes del propóleos. En nuestro conocimiento, Patil et al. (2015) demostraron que es posible cargar nanopartículas de plata con propóleos. Para ello se realizó la extracción de los componentes del producto apícola con el lípido Gelucire® 50/13 y dicha mezcla se utilizó en la preparación de los transportadores. Las nanopartículas obtenidas mostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y se formularon en un gel destinado al tratamiento de quemaduras en ratas. Se logró una mejora significativa en las heridas (Patil et al., 2015).

Adicionalmente, Rassu et al., 2015 reportaron la inclusión del propóleos crudo como un material lipídico para la preparación de SLN por el método HSH. Las partículas obtenidas se ensayaron como sistemas de entrega de fármacos (diclofenaco sódico), se ejecutaron estudios *in vitro* y *ex vivo*, encontrando que el fármaco y los polifenoles no atraviesan significativamente las barreras ensayadas. Estos resultados se consideraron promisorios y perfilan la aplicación de estos sistemas en el tratamiento tópico de enfermedades de la cavidad nasal, caso en el que no es deseable tener permeación transmucosal.

En adición, en el grupo de investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos – GIDECA, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, se desarrolló un trabajo exploratorio acerca de la utilización de las ceras de propóleos en la preparación de partículas sólidas lipídicas, empleando la metodología de emulsificación-difusión. Se eligió como solvente el acetato de etilo y como agente estabilizante poloxamer 188. Los resultados sugieren la utilización del propóleos como

material de partida para la preparación de este tipo de sistema nanoparticulado (Paillié Jiménez, 2014) y como una continuación de ello, la presente tesis explora una estrategia para lograr un producto de interés farmacéutico o cosmético haciendo énfasis en el control de calidad del material de partida, la extracción de los componentes lipídicos y la caracterización de las partículas obtenidas.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la aplicabilidad del componente lipídico presente en el propóleos como material de partida para la preparación de partículas sólidas lipídicas de interés farmacéutico o cosmético.

### **2.2 Objetivos específicos**

Proponer una metodología para la preparación de partículas sólidas lipídicas utilizando propóleos como material de partida.

Lograr una aproximación a la composición química de las partículas sólidas lipídicas preparadas en cumplimiento del objetivo anterior, utilizando para ello técnicas de análisis dirigidas a la identificación de grupos funcionales.





---

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Materiales

Propóleos recolectado en marzo de 2014 en apiarios del municipio de Confines (Santander, Colombia; 6° 21' 23,825" N, 73° 14' 30,634" W, altitud 1.498 m.s.n.m.), de colmenas de abejas con agujón de la especie *Apis mellifera*. En esta investigación este material se ha identificado como PrS. Propóleos donado por el Jardín Botánico de Medellín, recolectado entre noviembre de 2014 y febrero de 2015 en la ciudad de Medellín (Antioquia, Colombia; 6° 13' 55" 098N, 75° 34' 05" 752W, altitud 1.486 m.s.n.m.), en colmenas de abejas sin agujón de la especie nativa *Tetragonisca angustula*. En este trabajo este propóleos se ha identificado como PrJB. Adicionalmente fueron utilizados triglicérido cáprico/caprílico (CCT, Labrafac Lipophile WL 1349, obsequiado por Gattefossé), aceite del árbol de té (TTO, *Melaleuca alternifolia*, Lipovol® Tea Tree, obsequiado por Lipo® Colombia Ltda), aceite de ajonjolí calidad farmacéutica, poloxamer 188 (PLX, Kolliphor® P188, Basf; obsequiado por Handler Colombia), alcohol polivinílico (PVA) 31-51 kDa y 87-89 % de hidrólisis (Sigma-Aldrich), acetato de etilo (EtAc) (R.A. Tedia®), n-hexano (R.A. J.T.Baker), metanol (R.A. J.T.Baker), etanol 96 % grado farmacéutico (Chemi), cloroformo deuterado (99.8 % átomos de D, Aldrich), ácido sulfúrico (R.A. Mallinckrodt), cloruro de aluminio 6-hidrato (R.A. Panreac), quercetina dihidrato (USP Estándar de Referencia), nitrito de sodio (R.A. Merk), 2-aminoetil difenil borinato (R.A. Sigma-Aldrich), PEG 4000 (R.A. Sigma - Aldrich), sulfato de sodio anhidro (R.A. Carlo Erba), vainillina (R.A. Merck), anisaldehído (R.A. Carlo Erba), Vivapur® MCG 591P (JRS Pharma), croscarmelosa sódica NF (Ac-Di-Sol®, FMC Corporation). En todos los experimentos se utilizó agua destilada (destilador Boeco WS8000).

Para el desarrollo de la cromatografía en capa delgada (TLC, *Thin Layer Chromatography*), se utilizaron como fase estacionaria cromatofolios TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore) y como reveladores, reactivo Godin [aspersión de vainillina (R.A. Merck) etanólica al 1 %, ácido sulfúrico (R.A. Mallinckrodt) etanólico al 10 %], reactivo anisaldehído - ácido sulfúrico [0.5 mL de anisaldehído (R.A. Carlos Erba), 10 mL de ácido acético glacial (R.A. Mallinckrodt), 85 mL de metanol (R.A. J.T.Baker), 5 mL de ácido sulfúrico al 96 % (R.A. Mallinckrodt)] y reactivo de productos naturales – polietilenglicol (NP-PEG) [mezcla de difenilboriloxietilamina (NP, Sigma-Aldrich) al 1 % en metanol y polietilenglicol etanólico 4000 (PEG 4000, Sigma Aldrich) al 5 % en proporción 5:4].

## 3.2 Equipos

Mufla Hotpack; estufa de secado Heraus Instruments; estufa de secado Jouan<sup>®</sup> IG150; unidad de extracción de solventes Velp Scientifica Ser 148; unidad de calentamiento múltiple Tecnovetro<sup>®</sup>; balanza analítica PA214, Ohaus<sup>®</sup> sensibilidad 0.1 mg; espectrofotómetro Genesys<sup>®</sup> 10S UV-Vis; fusiómetro Büchi SMP-20; horno microondas Ethos One, Milestone; espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo ICP Icap 7400, Thermo Scientific<sup>®</sup>; homogenizador de alta velocidad Ultra-Turrax<sup>®</sup>T18 basic, Ika<sup>®</sup>; plancha de agitación Ika<sup>®</sup> C-Mag HS 7 Ikamag<sup>®</sup>; rotavapor Heidolph Hei-VAP Precision<sup>®</sup>; vórtex LB Pro<sup>®</sup> MX-S; ultrasonido Elma<sup>®</sup> S15H, Elmasonic; Zetasizer Nano ZS, Malvern<sup>®</sup>; microscopio electrónico de barrido Tescan<sup>®</sup> Vega 3 SB; nevera Daewoo<sup>®</sup>; liofilizador Labconco<sup>®</sup>, Freeze drying/Shell Freeze drying; equipo para calorimetría diferencial de barrido DSC 1 STAR<sup>e</sup> System – Mettler Toledo<sup>®</sup>; equipo para análisis termogravimétrico TGA 1 STAR<sup>e</sup> System – Mettler Toledo<sup>®</sup>; viscosímetro Brookfield DV-E<sup>®</sup>, modelo RVDVE; equipo para difracción de rayos X X'PertPRO PANalytical<sup>®</sup>; espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier IRAffinity-1 FTIR Shimadzu<sup>®</sup>; equipo para resonancia magnética nuclear Bruker Advance 400<sup>®</sup> y cromatógrafo de gases TRACE 1300 acoplado a espectrómetro de masas de cuadrupolo modelo ISQ QD Thermo Scientific<sup>®</sup>.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Control de calidad del propóleo empleado como material de partida para la elaboración de partículas sólidas lipídicas

Teniendo en cuenta que en Colombia no se dispone de una normativa para el control de calidad del propóleo, en el presente estudio se estructuró una ficha de control de calidad a partir de las legislaciones argentina (SPReI y SAGPyA, 2008) y brasilera (CATEF, 2005; MAPA, 2001), para establecer los valores de especificación. A continuación se describen los procedimientos seguidos para cada una de las pruebas.

- *Pérdida por calentamiento o secado*

Se pesaron 3.0 g de propóleo en una cápsula de porcelana o en una caja de Petri (previamente llevada a la estufa a 135 °C durante 1 h, enfriada en desecador y pesada). El conjunto se colocó en una estufa regulada (Heraus Instruments) a 135 °C ± 2 °C durante 4 h, se retiró y se ubicó en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Se pesó hasta lograr peso constante (AOAC, 2012a).

El porcentaje de pérdida por calentamiento se calculó a través de la siguiente expresión (Ecuación 3.1):

$$\% H = \left( 1 - \frac{C_{MS} - C_i}{P_p} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde:

- % H: porcentaje de humedad o pérdida por calentamiento.
- $C_{MS}$ : peso de la cápsula con la muestra seca (g).
- $C_i$ : peso inicial de la cápsula tarada y vacía (g).
- $P_p$ : peso de la muestra de propóleo (g).

Los resultados son reportados como el promedio de tres determinaciones independientes y el intervalo de confianza (IC) del 95 %.

### ▪ *Cenizas*

El proceso se realizó siguiendo el protocolo de la AOAC (2012b) con algunas modificaciones. Así, se pesaron alrededor de 3.0 g de muestra en un crisol de porcelana (el cual previamente se llevó a 550 °C durante 1 h, se enfrió en desecador y se pesó). Posteriormente, se realizó la pre-calcinación paulatina de la muestra en una plancha de calentamiento, luego se introdujo dentro de la mufla (Hotpack) y se permitió su calcinación a 550 °C durante 12 h o el tiempo suficiente para obtener cenizas blancas. Se retiró el conjunto de la mufla, se colocó en un desecador hasta que alcanzó temperatura ambiente y se pesó.

El cálculo de las cenizas se realizó utilizando la Ecuación 3.2:

$$\% C = \left( \frac{C_f - C_i}{P_p} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde:

- % C: porcentaje de cenizas.
- C<sub>f</sub>: peso de la cápsula de porcelana que contiene las cenizas (g).
- C<sub>i</sub>: peso de la cápsula de porcelana tarada y vacía (g).
- P<sub>p</sub>: peso de la muestra de propóleos (g).

Los resultados son reportados como el promedio de tres determinaciones independientes y el IC del 95 %.

### ▪ *Ceras o extractables en n-hexano*

Para cada réplica, se pesaron 2.0 g de propóleos y se acomodaron dentro de un papel filtro o un cartucho de celulosa seco, el que se introdujo dentro de un tubo Goldfish, que se ensambló al cuerpo de un extractor de solventes. Paralelamente, balones redondos fondo plano de 250 mL fueron tratados en una estufa (Heraus Instruments) a 80 °C durante 1 h, tiempo al cabo del cual se enfriaron en desecador para su posterior pesaje. En cada balón tarado de 250 mL se adicionaron aproximadamente 90 mL de n-hexano y se conectó al extractor. El proceso de extracción se inició permitiendo la ebullición del solvente y se

mantuvieron las condiciones durante 6 h a una velocidad de 120 gotas a 150 gotas por minuto. El remanente de la muestra se conservó para la determinación de compuestos solubles en etanol y masa mecánica. Se procedió a recuperar y retirar el solvente. El balón de 250 mL se llevó a estufa (Heraeus Instruments) a 80 °C durante 1 h, tiempo al cabo del cual se le permitió el enfriamiento en un desecador y se pesó. El proceso se repitió hasta alcanzar peso constante (Bedascarrasbure et al., 2006).

El cálculo de las ceras o extractables con n-hexano se realizó según la Ecuación 3.3:

$$\% ExH = \left( \frac{B_f - B_i}{P_p} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

donde:

- % ExH: porcentaje de extractables en n-hexano.
- B<sub>f</sub>: peso final del balón de 250 mL contiendo el material extractable en n-hexano (g).
- B<sub>i</sub>: peso inicial del balón de 250 mL (g).
- P<sub>p</sub>: peso de la muestra de propóleos (g).

Los resultados son reportados como el promedio de dos determinaciones independientes y el IC del 95 %.

▪ *Compuestos solubles en etanol o porcentaje de extracto etanólico*

La determinación de resinas se realizó según el procedimiento reportado por Bedascarrasbure et al. (2006). En breve, la muestra remanente del proceso de extracción con n-hexano se colocó en el tubo Goldfish que se ensambló al cuerpo del extractor de solventes. Alrededor de 90 mL de etanol se colocaron en el balón de 250 mL del ensamble del extractor. El proceso de extracción permitió inicialmente la ebullición del solvente y se mantuvieron esas condiciones durante 6 h, a una velocidad aproximada de 120 gotas a 150 gotas de condensado por minuto.

Se consideró el final de la extracción cuando el etanol que entra en contacto con la muestra es incoloro. Como comprobación adicional, una gota dicho alcohol se adicionó a una

solución de cloruro férrico. Si se producía un cambio de color de amarillento a verdoso, se considera evidencia de la presencia de sustancias fenólicas y por ende, se continuaba con el proceso de extracción.

Una vez se finalizó la extracción, la solución extraída se transfirió cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL y se llevó a volumen con etanol. De dicha solución se tomó una alícuota de 50 mL, a partir de la cual se destiló completamente el etanol en un baño maría a 80 °C y luego se secó a la misma temperatura en una estufa (Heraus Instruments) para evaporar los restos del solvente. Se permitió el enfriamiento de la muestra en desecador y se repitió el procedimiento de secado a 80 °C hasta obtener peso constante.

Los 50 mL restantes se almacenaron en un recipiente ámbar con capacidad para 100 mL. Como el análisis se realizó por duplicado, los 50 mL de la otra réplica se reunieron en el recipiente anterior, para obtener así 100 mL de extractos que se reservan para otras determinaciones.

La estimación de los componentes solubles en etanol se realizó según la Ecuación 3.4:

$$\% ExEtOH = \left[ \left( \frac{B_{Rf} - B_{Ri}}{P_p} \right) * 100 * \frac{V_R}{V_{R1}} \right] \quad \text{Ecuación 3.4}$$

donde:

- $B_{Rf}$ : peso del balón con el residuo seco soluble en etanol (g).
- $B_{Ri}$ : peso del balón vacío (g).
- $P_p$ : peso de propóleo (g).
- $V_R$ : volumen al cual se diluyó el extracto etanólico total (mL).
- $V_{R1}$ : volumen de la alícuota tomada para evaporar y realizar el cálculo (mL).

Los resultados se reportan como el promedio de dos determinaciones independientes y el IC del 95 %.

- *Residuo soluble en metanol (residuo seco)*

Según el procedimiento reportado por Funari y Ferro (2006), primero se obtuvieron los extractos por el método Soxhlet a partir de 10 g de muestra de propóleos, que se acondicionaron en un cartucho preparado con papel filtro. Aproximadamente 150 mL de metanol fueron agregados al balón redondo fondo plano destinado al solvente. El reflujo se mantuvo durante 8 h. El extraído se vertió en una probeta, haciendo lavados con metanol del interior del balón utilizado. Se determinó el volumen final del extraído y éste se guardó en un recipiente ámbar.

El extracto metanólico se llevó a la nevera durante 24 h y al congelador por media hora; se filtró al vacío en un embudo Büchner provisto de un papel filtro cualitativo Boeco No. 3 previamente seco y pesado. La cera depositada en el papel se lavó con metanol hasta su clarificación y se dejó en la campana de extracción hasta que se perdió el exceso de solvente. Posteriormente el conjunto papel-cera se llevó a la estufa precalentada a 105 °C (Heraus Instruments) por 2 h, transcurrido este tiempo se dejó enfriar hasta temperatura ambiente en desecador y se pesó. Éste es un método alternativo para la determinación de ceras. Sin embargo, difiere en resultados de los métodos tradicionales de extracción de ceras con solventes orgánicos tales como n-hexano.

Paralelamente, se midió el volumen del extracto metanólico libre de ceras y se guardó en un recipiente protegido de la luz y en refrigeración. Una alícuota de 5 mL de dicho extracto se transfirió a un crisol (previamente seco a 105 °C por 2 h, enfriado en desecador y pesado). El conjunto se secó en estufa a 105 °C durante 2 h, se permitió su enfriamiento en desecador y se pesó. El procedimiento se repitió hasta alcanzar peso constante.

El residuo soluble en metanol se calculó según la ecuación 3.5, teniendo en cuenta que está dado por la razón entre la masa depositada en el crisol y la masa inicial del propóleos bruto extraído, correspondiente a la alícuota de 5 mL tomada del extracto libre de ceras.

$$\% RSM = \left[ \frac{(C_r - C_i) * V_{LC}}{5 * P_p} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde:

- % RSM: residuo seco soluble en metanol.

- Cr: peso final del crisol conteniendo el residuo seco soluble en metanol (g).
- C<sub>i</sub>: peso inicial del crisol (g).
- V<sub>LC</sub>: Volumen de extracto metanólico libre de ceras (mL).
- P<sub>p</sub>: peso de la muestra de propóleos (g).
- 5: correspondiente a la alícuota de 5 mL tomada para el ensayo.

Los resultados se reportan como el promedio de seis determinaciones independientes y el IC del 95 %.

- *Masa mecánica y/o cuerpos extraños*

Una cantidad exactamente pesada de 2.0 gramos de propóleos se colocó en un dedal de papel filtro cualitativo Boeco No. 3, previamente seco y pesado, y se introdujo en el tubo Goldfish que se ensambla en el montaje extractor (Figura 3.2). En el balón de 250 mL del equipo se adicionaron entre 90 mL y 120 mL de n-hexano y se inició el proceso de extracción tal como se ha mencionado previamente, permitiendo el reflujo durante 3 h. El residuo obtenido permaneció dentro del tubo Goldfish y se extrajo de la misma forma con 90 mL a 120 mL de etanol al 96 %, conservando el reflujo durante 3 h. Por último, el dedal de papel filtro se secó en estufa (Heraeus Instruments) a 80 °C durante 1 h, se enfrió en desecador y se llevó hasta peso constante. Del mismo modo, es posible la determinación de las impurezas mecánicas con el material remanente de muestra al que se le extrajeron previamente las ceras con n-hexano y luego las resinas con etanol (Bedascarrasbure et al., 2006). El porcentaje de impurezas mecánicas fue calculado según la Ecuación 3.6:

$$\% IM = \left( \frac{P_f - P_i}{P_p} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde:

- % IM: porcentaje de impurezas mecánicas.
- P<sub>f</sub>: peso final del dedal de papel filtro seco conteniendo las impurezas mecánicas (g).
- P<sub>i</sub>: peso inicial del dedal de papel filtro (g).
- P<sub>p</sub>: peso de la muestra de propóleos (g).



Los resultados se reportan como el promedio de dos determinaciones independientes y el IC del 95 %.

- *Índice de oxidación*

Para este ensayo, 0.2 g de muestra de propóleos triturado se dispusieron en un erlenmeyer de 125 mL y se le añadieron 5 mL de etanol al 96 %, dejando en reposo durante 1 h. Pasado este tiempo se agregaron 100 mL de agua destilada, se agitó manualmente y se filtró a través de papel de filtro cualitativo Boeco No. 3. En un tubo de ensayo se colocaron 2 mL del filtrado, se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico al 20 % y se agitó en vórtex durante 1 min. Luego se adicionó una gota de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0.1 N sobre la solución acidulada de propóleos e inmediatamente se cronometró el tiempo en que ésta se decolora (Bedascarrasbure et al., 2006). Como resultado se reporta el promedio de seis determinaciones independientes y el IC del 95 %.

- *Compuestos fenólicos*

La determinación de fenoles totales se realizó siguiendo el método Folin-Ciocalteu (Kumazawa et al., 2004; Singleton y Rossi, 1965; Slinkard y Singleton, 1977). Para el procesamiento de la muestra, en un vaso de 100 mL se colocaron 0.5 g de propóleos macerado, se adicionaron 15 mL de etanol al 96 % y se agitó con una barra magnética a velocidad media (500 rpm) durante 30 min. Dicha mezcla se protegió de la luz y se almacenó a temperatura ambiente durante 24 h. El extracto obtenido se filtró, se transfirió cuantitativamente a un balón aforado de 50 mL y la solución resultante se guardó en congelación a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

La lectura de los fenoles totales se realizó sobre 500  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra, que se colocaron en un balón aforado de 50 mL, se les adicionó 500  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu y se agitó manualmente. Pasados 2 min se agregaron 2 mL de una solución de carbonato de sodio al 10 % y se aforó con agua destilada. El balón se guardó por 2 h en la oscuridad y a temperatura ambiente. La medición espectrofotométrica (espectrofotómetro Genesys) se realizó a una absorbancia de 765 nm, empleando agua destilada como blanco.

Este ensayo requirió una curva de calibración para el reactivo Folin-Ciocalteu. Para tal fin, se pesaron con exactitud 50 mg de ácido gálico, los que se disolvieron cuantitativamente en 25 mL de etanol al 96 % (solución madre de ácido gálico). A partir de dicha solución *stock*, se prepararon nuevas soluciones cuyas concentraciones variaron desde 0.02 mg/mL hasta 1.0 mg/mL y para cada una de ellas se determinó la cantidad de fenoles totales empleando el mismo procedimiento previamente indicado para los extractos.

Para el cálculo de los mg de ácido gálico por gramo de muestra se empleó la Ecuación 3.7:

$$\frac{\text{mg Ácido Gálico}}{\text{g de muestra}} = \frac{\text{mg de ácido gálico}}{\text{mL}} * \frac{V_E (\text{mL})}{P_p (\text{g})} * FD \quad \text{Ecuación 3.7}$$

donde:

- *mg de ácido gálico/mL*: Este dato se obtiene luego de interpolar la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.
- $V_E$ : volumen de extracto (mL).
- FD: factor de dilución.
- $P_p$ : peso de propóleos (g).

Los resultados se expresan como el promedio de nueve determinaciones independientes (tres para cada extracto) y el IC del 95 %.

- *Actividad antioxidante por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)*

En este ensayo se siguió la metodología sugerida por Ahm et al. (2007) con algunas modificaciones. Para la preparación del extracto etanólico se pesaron 0.5 g de propóleos y se procedió tal como se describió para cuantificación de compuestos fenólicos. El material macerado se dejó en contacto con 15 mL de etanol al 96 % durante 24 h. Dicho extracto se filtró por papel cualitativo Boeco No. 3, se diluyó cuantitativamente a 50 mL y se almacenó en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. En cubetas desechables de paso reducido se colocó 1 mL de solución de trabajo del radical ABTS<sup>+</sup> (a reaccionar) y se leyó su absorbancia a 734 nm, utilizando etanol como blanco. Inmediatamente se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto etanólico del propóleos, se agitó y se midió nuevamente la absorbancia

después de 6 min. Se tomó como resultado la diferencia de absorbancia entre el tiempo inicial (minuto cero) y transcurridos los 6 min.

Los resultados se compararon frente a la curva de calibración de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman-2-carboxílico). Para ello se pesaron 25 mg de Trolox y se diluyeron cuantitativamente a 10 mL con etanol al 96 %. A partir de dicha solución madre, se prepararon soluciones desde 0.2 mM hasta 2.0 mM, que se leyeron espectrofotométricamente, tal como se indicó para los extractos etanólicos de propóleos. Los resultados fueron expresados en mM de Trolox/g de propóleos empleando la Ecuación 3.8:

$$\frac{\text{mmol Trolox}}{\text{g propóleos}} = \text{mM Trolox} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} * \frac{V_E \text{ (mL)}}{P_p \text{ (g)}} * FD \quad \text{Ecuación 3.8}$$

donde:

- mM Trolox: interpolado en la curva de calibración.
- $V_E$ : volumen de extracto etanólico de propóleos (mL).
- FD: factor de dilución.
- $P_p$ : peso de propóleos (g).

Los resultados se reportan como el promedio de nueve determinaciones independientes (tres para cada extracto) y el IC del 95 %.

#### ▪ *Flavonoides*

Para la realización de esta prueba se empleó el procedimiento reportado por Woisky y Salatino (1998) y Bedascarrasbure et al. (2006), con algunas modificaciones. Del extracto obtenido para determinar los compuestos solubles en etanol, se tomó una alícuota de 1 mL, se agregaron 0.5 mL de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 5 % y se aforó a 10 mL con metanol. El blanco se preparó de forma similar, reemplazando la alícuota de la muestra por 1 mL de etanol al 96 %. Las soluciones permanecieron en la oscuridad durante 30 min y se determinó la absorbancia a 425 nm. El resultado se interpoló en una curva de calibración elaborada con quercetina dihidrato, a partir de una solución madre de 1 mg/mL. Para el cálculo de los flavonoides totales se utilizó la ecuación 3.9:

$$\%Ft = \frac{mg \text{ eq. de quercetina}}{mL} * \frac{V_F}{V_a} * \frac{V_E}{P_p} * \frac{1}{10} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

donde:

- %Ft: porcentaje de flavonoides en la muestra de propóleos.
- *mg eq de quercetina/mL*: valor interpolado en la curva de calibración.
- $V_F$ : volumen final al que se llevó la alícuota del extracto (mL).
- $V_a$ : volumen de la alícuota de extracto (mL).
- $V_E$ : volumen de extracto (mL).
- $P_p$ : peso de propóleos (g).

Los resultados se reportan como el promedio de nueve determinaciones independientes (tres para cada extracto) y el IC del 95 %.

- *Espectroscopía de absorción ultravioleta (UV)*

A partir del extracto obtenido para la determinación de *compuestos solubles en etanol*, se realizó una dilución de 1 a 1000 con alcohol etílico y se leyó a 290 nm (longitud de onda donde muchos tipos de propóleos absorben). Si la absorbancia es elevada, esto es 0.5 - 0.8 unidades de absorbancia, se hace un barrido en la región comprendida entre 240 nm y 420 nm. Si el valor de absorbancia es más alto o más bajo del indicado, se cambia la dilución y se realiza el barrido correspondiente. Se considera que los compuestos fenólicos están presentes si existen máximos de absorción entre 270 nm y 315 nm (Bedascarrasbure et al., 2006).

- *Rango de fusión*

El rango de fusión es una constante física común para establecer la pureza de materiales sólidos. Para su determinación en las muestras de propóleos, se empleó un fusiómetro (Büchi SMP-20) provisto de un termómetro y de un tubo capilar en el que se coloca la muestra; ambos fueron calentados en un baño de silicona. Se registró la temperatura de

inicio y de finalización de la fusión (Chaillou et al., 2004). Se reportó el resultado como el promedio de cinco medidas independientes, más o menos el IC del 95 %.

▪ *Plomo*

Se empleó el Método II de la USP 38 para la detección de plomo a través de ensayo límite, utilizando una cantidad de muestra correspondiente a 10 g, la que se calculó por la Ecuación 3.10:

$$P_p = \frac{2.0}{1000L} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

donde:

- $P_p$ : peso de propóleos (g) para ejecutar la prueba.
- $L$ : límite de metales pesados expresado como porcentaje, *i.e.*,  $2 \times 10^{-4} \%$  (2 ppm).

La muestra de propóleos pesada se transfirió a un crisol y, en campana de extracción, se adicionó suficiente ácido sulfúrico para humedecerla e incinerarla lentamente a baja temperatura, hasta que se carbonizó por completo. Luego se agregaron 2 mL de ácido nítrico y 5 gotas de ácido sulfúrico a la masa carbonizada, se calentó con un mechero Bunsen hasta que cesó la producción de humos blancos. La incineración a 500 °C - 600 °C se llevó a cabo en mufla, hasta que no quedaron restos de materia orgánica (carbón). Se permitió el enfriamiento a temperatura ambiente y se adicionaron 4 mL de ácido clorhídrico 6 N, se cubrió el crisol y se digirió en un baño de vapor durante 15 min; se removió la tapa y se dejó evaporar hasta sequedad. El residuo se humedeció con una gota de ácido clorhídrico, se agregaron 10 mL de agua caliente y nuevamente se dejó en digestión durante 2 min. Posteriormente se adicionó gota a gota hidróxido de amonio 6 N hasta que la solución fue alcalina al papel tornasol. Dicha solución fue diluida a 25 mL con agua, se ajustó a un pH entre 3 y 4 con ácido acético 1 N, se filtró a través de papel cualitativo Boeco No. 3 y se transfirió cuantitativamente con agua destilada a un tubo de comparación de color hasta 40 mL. A la solución anterior se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de acetato pH 3.5 y 1.2 mL de tioacetamida-glicerina básica SR (Solución reactivo). Se diluyó con agua hasta 50 mL. La muestra se dejó en reposo durante 2 min y se comparó contra el estándar.

Preparación de la solución estándar: se preparó una “*Solución madre de nitrato de plomo*”, disolviendo 159.8 mg de nitrato de plomo en 100 mL de agua a la que se le habrá adicionado 1 mL de ácido nítrico. Dicha solución se completó cuantitativamente con agua hasta 1 L. El día del ensayo se preparó la “*Solución estándar de plomo*”, diluyendo 10 mL de la “*Solución madre de nitrato de plomo*” hasta 100 mL; para lograr una concentración de 10 µg de plomo/mL de solución. De esta última, se tomaron 2 mL (20 µg de plomo), se vertieron en un tubo de comparación de color de 50 mL, se adicionó agua hasta aproximadamente 25 mL y se ajustó a un pH entre 3.0 y 4.0 con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N. Se procedió de manera análoga a la muestra, llevando el estándar hasta 40 mL; se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de acetato pH 3.5, 1.2 mL de tioacetamida-glicerina básica SR y se diluyó hasta 50 mL. Luego de 2 min se comparó el *estándar* frente a la *solución de la muestra*. El resultado buscado es que el color de la *solución de la muestra de propóleos* no sea más oscuro que el de la *solución del estándar*.

#### ▪ *Arsénico*

A través de un tercero contratado (Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S.) se obtuvieron los análisis correspondientes por Plasma de Acoplamiento Inductivo con Espectrometría de Emisión Óptica (ICP-OES), usando para ello el método modificado “*Standard Methods*”, 3120 A, B. Inductively Coupled Plasma (ICP)” (Rice et al., 2012). Para la evaluación de la muestra se realizó primero el tratamiento de 0.5 g de muestra con digestión ácida por horno microondas (equipo Ethos One del fabricante Milestone), llevando a un volumen final de 10 mL.

Posteriormente se realizó el análisis cuantitativo en el espectrómetro de ICP Icap 7400 (Thermo Scientific). La fuente de plasma consistió en una corriente de flujo de gas argón ionizado por un campo de radiofrecuencia. Este campo fue inductivamente acoplado al gas ionizado, por una bobina enfriada con agua que rodea una “antorcha” de cuarzo. La muestra se nebulizó en una cámara utilizando gas argón y se transportó hacia el plasma donde ocurrieron los fenómenos de atomización, ionización, excitación y decaimiento a temperaturas cercanas a 9000 K. En estas condiciones se logró la emisión atómica de

manera eficiente. Así, con la ionización de un alto porcentaje de átomos, se produjo un espectro de emisión iónica que viajó por el sistema óptico tipo policromador Echelle y llegó a un detector en estado sólido CID (*Charge Injection Device*) que tomó una fotografía digital del espectro iónico en donde se resolvieron las líneas espectrales.

Las señales de las longitudes de onda del espectro de emisión y la curva de calibración se monitorearon con el software QTEGRA del Icap 7400. La longitud de onda de análisis para el arsénico es 189.042 nm y se utilizaron procedimientos de control de calidad que aseguraron los resultados de cada corrida. Así, para ello se verificó el efecto memoria, se emplearon blancos del proceso para evaluar posibles contaminantes y se utilizaron estándares de verificación de calibración continua.

### 3.3.2 Extracción del material lipídico del propóleos

En la presente tesis se investigó una estrategia para la extracción del material lipídico presente en el propóleos, ensayando los métodos Soxhlet, Goldfish y Randall. Para los dos primeros se empleó como disolvente n-hexano, mientras que para la extracción por el método Randall se usó n-hexano y acetato de etilo. En la Tabla 3.1 se ejemplifican las principales condiciones para los métodos evaluados, esto es, duración del ensayo y cantidad de muestra requerida.

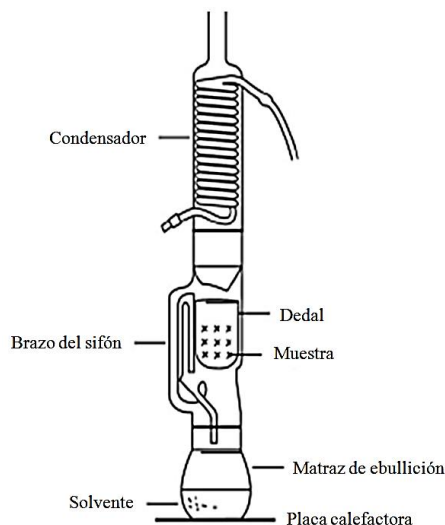
Tabla 3.1 Métodos de extracción evaluados.

Método	Tipo de extracción	Cantidad de material de partida (g)	Duración de la extracción (h)
Soxhlet	Semi-continua	2 – 3	4
Goldfish	Continua	2	4
Randall	Continua acelerada por inmersión	3	1.8

- *Método Soxhlet:* se basa en una extracción semi-continua. Así, el solvente se acumula en la cámara de extracción de 5 a 10 min, impregnando la muestra, para luego hacer un sifón y regresar al matraz de ebullición. En general, se recomienda secar la muestra antes de realizar la extracción de la materia grasa; haciendo imperativa la remoción de

humedad si la muestra contiene más del 10 % de agua (Min y Ellefson, 2010). En la Figura 3.1 se presenta el montaje usado para la extracción de los componentes del propóleo, donde se identifica el condensador, el tubo Soxhlet, el dedal, la muestra, el brazo del sifón, el matraz de ebullición, el solvente y la placa calefactora.

Figura 3.1 Montaje del método Soxhlet (adaptado de Min y Ellefson 2010).



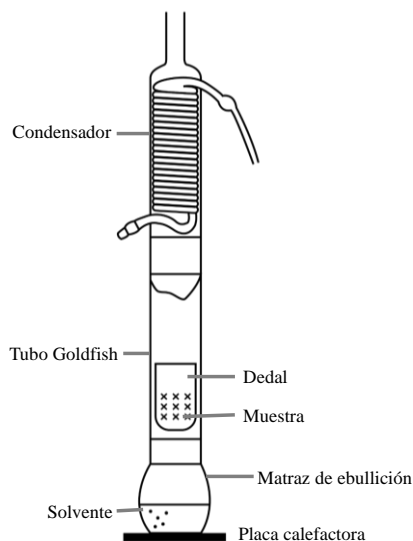
Inicialmente, el balón de fondo plano se dejó en una estufa (Heraeus Instruments) a una temperatura de 105 °C durante 1 h, después de lo cual se trasladó a un desecador y se pesó al alcanzar temperatura ambiente. En el matraz se adicionó una cantidad suficiente de disolvente para realizar tres sifones. Así mismo, se pesaron de 2.0 g a 3.0 g de propóleo en un dedal de extracción pre-secado (que permite el flujo rápido de solvente) y se ubicó dentro del tubo Soxhlet. Se ensambló el matraz de fondo plano (con el solvente), el tubo Soxhlet (con el dedal) y el condensador (ANVISA, 2010; Min y Ellefson, 2010).

La extracción se realizó en el extractor Soxhlet a una velocidad de cinco a seis gotas por segundo durante 4 h. Al terminar la extracción, se secó el matraz de fondo plano en una estufa de aire caliente a 105 °C durante 1 h, se enfrió en el desecador y se pesó (ANVISA, 2010; Min y Ellefson, 2010).



- *Método Goldfish*: corresponde a una extracción de forma continua (Figura 3.2), donde el solvente que está en el matraz entra en ebullición, se volatiliza, se condensa y fluye a través de la muestra que está dentro del dedal. El contenido lipídico de la muestra se extrae de forma análoga a la previamente descrita en el método Soxhlet. La extracción se llevó a cabo durante 4 h a una velocidad de condensación de cinco a seis gotas por min (Min y Ellefson, 2010).

Figura 3.2 Montaje del método Goldfish (adaptado a partir de la imagen que aparece en Min y Ellefson 2010).



La eficiencia de la extracción se cuantificó a través de la Ecuación 3.11:

$$\% Ex = \left( \frac{B_f - B_i}{P_p} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.11}$$

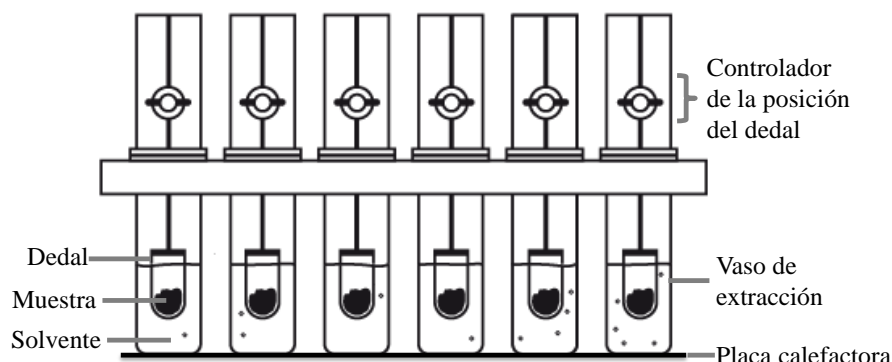
donde:

- % Ex: porcentaje de extracción.
- B<sub>f</sub>: peso final del balón de 250 mL conteniendo el material extractable (g).
- B<sub>i</sub>: peso inicial del balón de 250 mL (g).
- P<sub>p</sub>: peso de la muestra de propóleos (g).

Los resultados se reportan como el promedio de dos determinaciones independientes y el IC del 95 %.

- *Método Randall*: para la extracción del material lipídico del propóleos por este método, se utilizó la Unidad Extractora de Solventes Velp Scientifica SER 148 (la representación esquemática se presenta en la Figura 3.3), programando la temperatura para la placa de calentamiento a 130 °C para n-hexano y de 190 °C para acetato de etilo. El tiempo de inmersión programado fue 60 min, el de lavado fue de 50 min y el de recuperación de 10 min.

Figura 3.3 Representación esquemática del equipo utilizado para el método Randall.



La eficiencia de la extracción se cuantificó a través de la Ecuación 3.12:

$$\% Ex = \left( \frac{V_f - V_i}{P_p} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.12}$$

donde:

- % Ex: porcentaje de extracción.
- $V_f$ : peso final del vaso de extracción de 150 mL conteniendo el material extractable (g).
- $V_i$ : peso inicial del vaso de extracción de 150 mL (g).
- $P_p$ : peso de la muestra de propóleos (g).

Los resultados se presentan como el promedio de dos determinaciones independientes y el IC del 95 %.

Las muestras extraídas fueron codificadas a través de una abreviatura que está compuesta por tres elementos: el tipo de propóleos (PrS o PJB), el solvente con el que se hizo la extracción [n-hexano (H) o acetato de etilo (EtAc)] y una letra final que indica el método de extracción empleado, para este caso, corresponde a una letra “R” (método Randall). Considerando lo anterior, la Tabla 3.2 resume la codificación del material lipídico extraído y su significado.

Tabla 3.2 Codificación utilizada para el material extraído por el método Randall.

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
PrJB_EtAc_R	Material extraído de PrJB, usando EtAc y el método Randall
PrJB_H_R	Material extraído de PrJB, usando n-hexano y el método Randall
PrS_EtAc_R	Material extraído de PrS, usando EtAc y el método Randall
PrS_H_R	Material extraído de PrS, usando n-hexano y el método Randall

### 3.3.3 Caracterización del material extraído del propóleos

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de la tesis busca una aproximación a la caracterización, identificación y estudio de los principales grupos funcionales presentes en el material extraído del propóleos, se recurrió a técnicas de análisis tales como cromatografía en capa delgada (TLC), calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía infrarrojo, difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases acoplada a masas. El material caracterizado fue el obtenido por el método de extracción de Randall.

La *calorimetría diferencial de barrido* (DSC 1 STAR<sup>®</sup> System – Mettler Toledo) se realizó bajo atmósfera inerte (flujo de nitrógeno: 50 mL/min), usando crisoles de aluminio de 40 µL sin pin y sin agujero en la tapa. El método utilizado consistió en un segmento inicial isotérmico de -20 °C durante 2 min, seguido por el aumento de la temperatura de -20 °C a 80 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, manteniendo un segmento isotérmico de 80 °C durante 2 min y terminando con un ciclo de enfriamiento de 80 °C a -20 °C a una velocidad de 5 °C/minuto.

La *espectroscopía de infrarrojo* (IR, IRAffinity-1 FT-IR Shimadzu) se realizó preparando tabletas de bromuro de potasio (KBr). Para cada muestra se ejecutaron 45 escaneos, con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  y un barrido desde  $400\text{ cm}^{-1}$  hasta  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

La *cristalinidad* del material extraído del propóleos se evaluó a través de *difracción de rayos X* (XRD, X'PertPRO PANalytical). Se usó como fuente de radiación  $\text{CuK}_\alpha$  y las muestras fueron escaneadas de  $10^\circ$  a  $80^\circ 2\theta$ , con una velocidad angular de escaneo de  $2^\circ/\text{min}$ , un tamaño de paso de  $0.026^\circ$ , a un voltaje de operación de 45 kV y una corriente de 40 mA.

Para los análisis de las muestras por *resonancia magnética nuclear protónica* ( $^1\text{H}$  NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) se utilizó el equipo Bruker Advance 400. Se realizaron las pruebas de correlación bidimensional  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  a un enlace HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) y a larga distancia HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) para el material extraído del propóleos en EtAc por el método Randall. Para la preparación de las muestras se pesaron aproximadamente 20 mg de extracto seco, que fueron disueltos en cloroformo deuterado y transferidos a un tubo NMR.

La *cromatografía de gases acoplada a masas* (GC/MS, *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases TRACE 1300 acoplado a espectrómetro de masas de cuadrupolo simple ISQ QD Thermo Scientific, con un automuestreador automático AI 1310 Thermo Scientific. Se empleó una columna R-1 de 30 cm, 0.25 mm ID y una película de grosor  $0.25\ \mu\text{m}$ . La temperatura de inyección fue  $210^\circ\text{C}$  y la cantidad de muestra inyectada fue  $1\ \mu\text{L}$ . Se usó un *split* 1:20. El programa de temperatura para el horno fue:  $50^\circ\text{C}$  sostenidos durante 0.2 min, una rampa de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta  $300^\circ\text{C}$ , donde se mantuvo por 1 min; el programa terminó a los 26.2 min. El gas cargador (He) tuvo una velocidad de flujo constante de  $1.5\ \text{mL}/\text{min}$ . La temperatura de la línea de transferencia fue de  $310^\circ\text{C}$ . La temperatura de fuente iónica MS se estableció en  $230^\circ\text{C}$ . El modo de ionización fue por impacto electrónico. El rango de escaneo se fijó entre 50 - 600 m/z, con un tiempo de escaneo de 0.2 seg, para un tiempo total de 3.0 min. Se pesaron 15 mg de muestra y se disolvieron en EtAc. El software utilizado fue

Chromeleon™ 7.2 y para cotejar los resultados se usó la información de la base de datos NIST MSMS2.

### 3.3.4 Preparación de las partículas lipídicas

De acuerdo con las investigaciones desarrolladas previamente en el Grupo de Investigación en Diseño y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos, se realizó la preparación de las partículas lipídicas utilizando una modificación al método de emulsificación-difusión propuesto por Quintanar-Guerrero et al. (2005). Para tal fin, inicialmente se saturaron mutuamente el solvente orgánico (acetato de etilo) y el agua, durante mínimo 30 min, para alcanzar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. Como lo exige el método, se prepararon dos soluciones (fases), una orgánica y la otra acuosa. Para la fase orgánica se pesaron alrededor de 100 mg del material extraído del propóleos por el método Randall (extracción realizada con EtAc o con n-hexano) y se dispersaron en 10 mL del solvente orgánico saturado previamente en agua (Ika® C-Mag HS 7; 500 rpm, temperatura ambiente). Dicha dispersión se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 3. La fase acuosa consistió en una solución del agente estabilizante en 40 mL de agua saturada con EtAc. La fase orgánica se adicionó a la fase acuosa y se emulsificó a elevada fuerza de corte (Ultra-Turrax® T18 IKA®; 11200 rpm, 5 min). La emulsión obtenida se adicionó rápidamente bajo agitación (Ika® C-Mag HS 7, 500 rpm), a 250 mL de agua destilada. Las partículas lipídicas se formaron inmediatamente, gracias a la difusión del solvente desde la fase orgánica hacia la fase acuosa. Finalmente, el EtAc y parte del agua fueron retirados por evaporación a presión reducida (Heidolph Hei-VAP Precision, 130 rpm, 40 °C) hasta un volumen final de 80 mL.

Las condiciones más adecuadas para lograr el menor tamaño de partícula, la menor polidispersidad y el mayor porcentaje de área de la señal principal (relacionada con la obtención de distribuciones de tamaño de partícula monomodales), fueron establecidas a partir de un diseño estadístico experimental del tipo Plackett-Burman de 12 experimentos (Anexo 1); en donde se investigaron los efectos a dos niveles del agente estabilizante (PVA o PLX), de otros lípidos adicionados (CCT o aceite de ajonjolí), y del tiempo y de la

velocidad de emulsificación (Tabla 3.3). Los resultados del diseño fueron procesados empleando el software Statgraphics Centurion V17.1.02.

Tabla 3.3 Factores evaluados en el diseño experimental Plackett-Burman.

<b>Factor</b>	<b>Nivel inferior (-1)</b>	<b>Nivel superior (+1)</b>
PVA	2.5 %	5.0 %
PLX	2.5 %	5.0 %
CCT	0 mg	10 mg
Aceite de ajonjolí	0 mg	10 mg
Tiempo de emulsificación	5 min	10 min
Velocidad de emulsificación	11200 rpm	15600 rpm

Las partículas lipídicas obtenidas, luego de determinar la formulación más adecuada según el diseño estadístico experimental, fueron codificadas de forma análoga a como se explicó para el material extraído del propóleos por el método Randall (Tabla 3.2). En síntesis, la abreviatura está compuesta por tres elementos: el tipo de propóleos de partida (PrS o PJB), el solvente con el que se hizo la extracción del material proveniente del propóleos [n-hexano (H) o acetato de etilo (EtAc)], y la sigla NLC (transportadores lipídicos nanoestructurados). Así por ejemplo, si en el documento aparece la abreviatura PrJB\_EtAc\_NLC, se refiere a los NLC preparados a partir de PrJB\_EtAc\_R, *i.e.*, el material lipídico extraído por el método Randall de PrJB usando EtAc.

- *Caracterización de las partículas lipídicas*

Las partículas lipídicas obtenidas aplicando la formulación deducida del diseño estadístico experimental de Plackett-Burman fueron caracterizadas respecto a su tamaño e índice de polidispersidad (PDI) por el método de dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS, Malvern®) y con relación a su potencial zeta mediante velocimetría láser Doppler utilizando el mismo equipo.

Así, para la determinación del *tamaño de partícula e índice polidispersidad* se tomó la suspensión acuosa diluida de partículas y se programó el equipo (Zetasizer Nano ZS,

Malvern®) para hacer cinco mediciones por muestra y cinco corridas por medición, con una duración de 10 seg por corrida a una temperatura de 25 °C y un ángulo de 173°. Para la medición del *potencial zeta*, se preparó una dispersión diluida de partículas en cloruro de sodio 1 mM. Se realizaron cinco mediciones por muestra y diez corridas por medición, con una duración de 10 segundos por corrida, a una temperatura de 25 °C.

En adición, a las dispersiones de partículas lipídicas a base del material extraído con EtAc del propóleos (*i.e.* las dispersiones PrS\_EtAc\_NLC y PrJB\_EtAc\_NLC), se les evaluó la estabilidad durante 45 días, haciendo lecturas de tamaño de partícula y potencial zeta con intervalos de 15 d  $\pm$  1 d. Las muestras se almacenaron en envases de vidrio transparentes a temperatura ambiente de 18 °C  $\pm$  3 °C y en la estufa a 40 °C  $\pm$  1 °C (Jouan IG150).

Adicionalmente, a través de una metodología modificada a partir del trabajo de Avgoustakis et al. (2003), se evaluó la estabilidad coloidal de las partículas lipídicas PrJB\_EtAc\_NLC frente a la presencia de electrolitos. Para este ensayo de agregación inducida con sulfato de sodio, se tomaron 250  $\mu$ L de dispersión de partículas y se adicionaron sobre 2.5 mL de soluciones de sulfato de sodio de concentraciones diferentes desde 0 M a 1 M, incubadas a 37 °C  $\pm$  1 °C en un baño maría bajo agitación constante (100 rpm; plancha de calentamiento Ika® C-Mag HS, 2102). Transcurridos 10 minutos se determinó visualmente la concentración crítica de coagulación, *i.e.*, aquella concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que induce la agregación de las partículas y hace imposible su redispersión.

Finalmente, las partículas preparadas fueron observadas a través de *microscopía electrónica de barrido* (SEM, Tescan Vega 3), para lo cual se recubrió con oro el liofilizado correspondiente a las partículas PrJB\_EtAc\_NLC.

- *Aproximación a la composición química de las partículas lipídicas*

Complementando la evaluación realizada sobre el material de partida, se buscó la aproximación a la identificación y estudio de los principales grupos funcionales de las partículas lipídicas (PrS\_EtAc\_NLC, PrS\_H\_NLC, PrJB\_EtAc\_NLC, PrJB\_H\_NLC) y se evaluaron sus características cristalinas empleando las mismas técnicas de análisis

descritas para el material extraído del propóleos, *i.e.*, cromatografía en capa delgada, espectroscopía infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear.

Las muestras evaluadas para la caracterización fueron aquellas a las que se les eliminó el solvente de las dispersiones de las partículas lipídicas por secado (40 °C; 72 h; estufa Jouan IG150) o por liofilización. En este último caso, se retiró el disolvente EtAc a través de destilación a presión reducida (Heidolph Hei-VAP Precision, 130 rpm, 40 °C), se dispuso en frascos de vidrio la dispersión resultante y se llevó a congelación (nevera Daewoo). Las muestras congeladas se liofilizaron durante mínimo 48 h (Labconco, Freeze drying/Shell Freeze drying).

Igualmente se investigó la influencia del CCT cuando se emplea en la preparación de las partículas lipídicas a base del material lipídico extraído del propóleos. Con este fin se disolvió el material de partida en EtAc, se filtró (Whatman No. 3), se adicionaron 10 mg de CCT y se llevó a sequedad a 40 °C. Dicho material se corrió por DSC con la misma técnica descrita para el material extraído del propóleos.

Para los análisis de las muestras por  $^1\text{H}$  NMR se pesaron 20 mg del liofilizado de partículas lipídicas (PrS\_EtAc\_NLC, PrJB\_EtAc\_NLC), se dispersaron en cloroformo deuterado y el sobrenadante se transfirió a un tubo NMR.

#### ▪ *Evaluación de la citotoxicidad in vitro de las partículas lipídicas*

La seguridad de los NLC fue evaluada de forma preliminar en aquellas dispersiones de partículas lipídicas preparadas a partir de material extraído del propóleos con EtAc usando el método Randall (PrS\_EtAc\_NLC y PrJB\_EtAc\_NLC). Se realizaron los ensayos *in vitro* en líneas celulares de fibroblastos murinos y queratinocitos epidérmicos humanos en un laboratorio externo a la Universidad Nacional de Colombia (Belcorp, Colombia).



- ♦ *Citotoxicidad en fibroblastos 3T3/Balb-c medida a través de la captación del colorante rojo neutro.*

Se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento, que fueron cultivadas en el laboratorio y sembradas en placas de 96 pozos en una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células/pozo, con medio de cultivo suplementado (DMEM + 5 % SFB y 1 % AB). Se dejaron adherir en un tiempo de  $20 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ , para luego inspeccionarlas por microscopía y reemplazarles el medio por uno fresco. Posteriormente se adicionaron los tratamientos (partículas lipídicas en suspensión concentradas hasta un volumen de 30 mL), y la placa se llevó a una cámara de incubación a  $37.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , atmósfera de dióxido de carbono del 5 % y humedad relativa de  $65 \% \pm 5 \%$ . Tras  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  de incubación se observaron las células por microscopía invertida para evaluar los posibles daños o cambios en la morfología celular. A la placa se le retiraron los tratamientos, se le adicionó colorante rojo neutro y las células fueron nuevamente incubadas durante  $3 \text{ h} \pm 0.5 \text{ h}$ , bajo las condiciones previamente expuestas. A continuación se realizó la extracción del colorante remanente y se cuantificó espectrofotométricamente a 550 nm la cantidad de colorante presente fuera de la célula. Esta técnica se fundamenta en el hecho que el rojo neutro es un colorante que penetra con rapidez la membrana celular por difusión no iónica, acumulándose especialmente dentro de los lisosomas. Los cambios celulares ocasionados por los tratamientos, *e.g.* la dispersión de partículas lipídicas, hacen que las células pierdan su capacidad de incorporar y unir las moléculas de rojo neutro (Repetto et al., 2008). Para el estudio se evaluaron ocho concentraciones de colorante comprendidas en el rango entre 50 ppm y 2000 ppm.

Las absorbancias obtenidas se relacionaron con los controles de crecimiento, determinando los valores de supervivencia celular en porcentaje y construyendo una curva de porcentaje de respuesta (supervivencia) versus concentración de la formulación ensayada. Se realiza un análisis de regresión no lineal para obtener los valores de las concentraciones efectivas  $EC_{90}$  (relacionada con la potencia de actividad) y  $EC_{50}$  (define el grado de actividad sobre el sistema celular en estudio).

Para clasificar el efecto irritante de las dispersiones de partículas lipídicas se tuvieron en cuenta los parámetros definidos por laboratorios Belcorp (2012) (Tabla 3.4), adaptados de aquellos presentados en los protocolos Invitox (ECVAM, 2002, 1992). La máxima dosis tolerada (HTD, *Highest Tolerated Dose*) es un parámetro determinado a través de observación microscópica, que representa la concentración que causa solamente los mínimos cambios morfológicos comparados con los cultivos control. Por su parte, el parámetro EC<sub>90</sub> es la concentración del agente evaluado que produce el 90 % de la absorbancia del rojo neutro, comparado con los pozos control que se toman como el 100 % (Borenfreund y Puerner, 1985).

Tabla 3.4 Clasificación general de los irritantes para la prueba de captación de rojo neutro.

Valor EC <sub>90</sub> (ppm)	Valor HTD (dosis máxima tolerada) (ppm)	Clasificación
Mayor a 500 ppm	Mayor a 200 ppm	Irritante mínimo
	Menor a 200 ppm	Irritante ligero
Entre 200 ppm y 500 ppm	Mayor a 100 ppm	
	Menor a 100 ppm	Irritante ligero – moderado
Entre 100 ppm y 200 ppm	Mayor a 50 ppm	Irritante moderado
	Menor a 50 ppm	
Entre 50 ppm y 100 ppm	Mayor a 25 ppm	Irritante severo
Menor a 50 ppm	Menor a 25 ppm	

- ♦ *Citotoxicidad en líneas celulares establecidas de queratinocitos epidermales modificados humanos usando MTT (bromuro de 3 -(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).*

Esta técnica se fundamenta en la medición de la viabilidad celular a través de la reducción metabólica del sustrato MTT de color amarillo pálido, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, que produce formazán, un compuesto azul oscuro (Mosmann, 1983). Para evaluar el potencial irritante de las dispersiones de partículas lipídicas, se emplearon células en fase exponencial de crecimiento, que fueron obtenidas de los cultivos cotidianos del laboratorio y sembradas en placas de 96

pozos con una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pozo en un medio de cultivo suplementado (DMEM + 10 % SFB y 1 % AB). Se permitió su adherencia durante  $20 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ , observándolas luego por microscopía y se reemplazó el medio de cultivo por uno fresco. Los tratamientos fueron adicionados (partículas lipídicas en suspensión concentradas hasta un volumen de 30 mL), se inició el tiempo de incubación de la placa a  $37.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , atmósfera de dióxido de carbono del 5 % y humedad relativa de  $65 \% \pm 5 \%$ . Trascorridas  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  de exposición a los tratamientos, se observó por microscopía invertida para evaluar los posibles daños o cambios en la morfología celular. Los tratamientos fueron retirados, se adicionó colorante MTT y se incubaron las células durante  $2 \text{ h} \pm 0.5 \text{ h}$ , bajo las condiciones previamente expuestas. A continuación, se realizó la extracción de los cristales de formazán producidos en isopropanol y se cuantificaron por espectrofotometría a 575 nm. Se evaluaron ocho concentraciones de colorante incluidas en un rango de 50 ppm a 2000 ppm.

Las absorbancias obtenidas se relacionaron con los controles de crecimiento, determinando los valores de supervivencia celular en porcentaje, y construyendo una curva donde en la ordenada se tiene al porcentaje de respuesta (supervivencia) y en la abscisa está la concentración de la formulación ensayada. Se realiza un análisis de regresión no lineal para obtener los valores  $EC_{90}$  (relacionado con la potencia de actividad) y  $EC_{50}$  (que define el grado de actividad sobre el sistema celular en estudio).

### **3.3.5 Incorporación de aceite del árbol de té (TTO) en partículas lipídicas a base de material extraído de propóleos**

Utilizando la formulación definida previamente, se investigó la incorporación del TTO en las partículas lipídicas. Para tal fin se evaluaron diferentes concentraciones de este activo, que se adicionaron directamente a la fase orgánica o a través de la preparación de una mezcla con CCT (al 32 % p/p de TTO). En este último caso, se adicionaron 15 mg de la mezcla CCT y TTO a la fase orgánica filtrada. Las partículas obtenidas fueron caracterizadas como se ha descrito. Para su codificación, se siguió un patrón similar al expuesto para las partículas lipídicas preparadas sin inclusión de aceite. Así, la abreviatura

para las partículas con adición de TTO está compuesta por: el tipo de propóleo de partida (PrS o PrJB), el disolvente usado para la extracción [n-hexano (H) o acetato de etilo (EtAc)], la sigla NLC, la referencia a la inclusión de TTO y la indicación que se añadió determinada cantidad de una mezcla de CCT y TTO [Mix\_15 (*i.e.* 15 mg de mezcla fueron añadidos)]. Un ejemplo de la codificación para la dispersión de partículas preparadas con el material extraído de PrJB con n-hexano y con adición de 15 mg de la mezcla de CCT (68 % p/p) y TTO al (32 % p/p) es PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15.

La presencia de activo se siguió por TLC, usando como fase estacionaria cromatofolios TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore), y por IR (tabletas de KBr y ATR –Specac). Para los ensayos de TLC y de IR se eliminaron los disolventes por secado (40 °C; 72 h; estufa Jouan IG150) o por liofilización. En este último caso, se siguió el mismo procedimiento indicado para las dispersiones de partículas lipídicas. Igualmente, se hicieron ensayos de extracciones sucesivas con EtAc de las dispersiones de partículas preparadas y se siguieron a través de TLC para verificar la posible inclusión de TTO. En adición, las muestras secas se evaluaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC 1 STAR<sup>e</sup> System – Mettler Toledo) y análisis termogravimétrico (TGA 1 STAR<sup>e</sup> System – Mettler Toledo). El programa DSC fue el mismo empleado para el material lipídico en el numeral 3.3.3. Por su parte, el TGA se realizó en atmósfera inerte de nitrógeno a un flujo de 50 mL/min, programando el calentamiento desde 25 °C hasta 900°C, a una velocidad de 10 °C/min.

Adicionalmente, se realizaron las pruebas de citotoxicidad en fibroblastos 3T3/Balb-c y en queratinocitos humanos, tal como se indicó para las partículas sin adición de TTO en el apartado 3.3.4, en una dispersión de partículas preparadas utilizando el material extraído PrS\_EtAc\_R y 15 mg de la mezcla CCT (68 % p/p) y TTO al (32 % p/p). Esta muestra se codificó como PrS\_EtAc\_NLC\_TTO\_Mix\_15.

### **3.3.6 Preparación de geles con inclusión de partículas lipídicas**

Con el fin de verificar la posible aplicación de las partículas lipídicas en el diseño de productos farmacéuticos y cosméticos, se continuó con la investigación adelantada en el

grupo GIDECA –Grupo de investigación en desarrollo y calidad de productos farmacéuticos y cosméticos–, sobre estos sistemas y su formulación (Cristancho, 2014; Galeano, 2015). La estrategia investigada en esta tesis fue la preparación de geles empleando como agente gelificante un producto comercial a base de carboximetilcelulosa sódica y celulosa microcristalina (Vivapur<sup>®</sup> MCG). Igualmente se realizaron ensayos con inclusión de croscarmelosa sódica (3 %). Para tal fin, a una cantidad de 25 mL de dispersión concentrada de partículas lipídicas (PrJB\_EtAc\_NLC), se le adicionaron de forma cuantitativa y progresiva, diferentes cantidades de gelificante hasta lograr la consistencia deseada. Con el propósito de favorecer la estabilidad de las partículas dispersas en el gelificante, se exploró la posibilidad de liofilizar los geles siguiendo el mismo procedimiento indicado para las dispersiones de partículas lipídicas (Labconco, Freeze drying/Shell Freeze drying). Finalmente, se probó el tamaño de partícula de los geles a través del equipo ZetaSizer Nano ZS.

A los geles obtenidos se les hizo seguimiento visual durante un mes, con una frecuencia de observación de  $7 \text{ d} \pm 1 \text{ d}$ , buscando identificar cualquier modificación en su apariencia o evidencia de inestabilidad. Este estudio de estabilidad se desarrolló en tres condiciones distintas: refrigeración ( $4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; nevera Daewoo), temperatura ambiente ( $18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y estufa ( $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Jouan IG150). En adición, se determinó el tamaño de partícula en las dispersiones gelificadas y se caracterizaron por DSC al inicio y al final del estudio, utilizando las mismas condiciones descritas para caracterizar el material extraído del propóleos y las partículas.

Los geles preparados, con y sin inclusión de partículas, fueron sometidos a evaluación sensorial. Para estas pruebas el tipo de dispersión de partículas lipídicas empleadas como “fase acuosa” fue PrJB\_EtAc\_NLC. El panel sensorial estuvo compuesto por 20 sujetos a los que se les dieron instrucciones acerca de la prueba y los criterios de evaluación. La prueba sensorial se llevó a cabo en tres momentos: *antes*, *durante* y *después* de la

aplicación del producto. *Antes* de aplicarlo se evaluaron la pegajosidad<sup>2</sup>, el olor y la apariencia; *durante* la aplicación se midió la sensación de humedad, el esparcimiento<sup>3</sup> y la absorción<sup>4</sup>; finalmente, *tras* aplicarlo se calificó el brillo<sup>5</sup>, la pegajosidad<sup>6</sup>, el deslizamiento<sup>7</sup>, la sensación de residuo<sup>8</sup>, la suavidad<sup>9</sup>, la sensación de oleosidad<sup>10</sup>, la sensación de grasitud<sup>11</sup> y la sensación de cerosidad<sup>12</sup>. Los resultados fueron graficados en un diagrama radial y para su comparación se determinó el área correspondiente para cada formulación, a través del cálculo individual de las áreas de los triángulos que la componen, usando para ello la fórmula de Herón. Las áreas se normalizaron respecto al área de la formulación que contenía únicamente el agente gelificante.

---

<sup>2</sup> *Pegajosidad*: fuerza requerida para separar los dedos que contienen el producto.

<sup>3</sup> *Esparcimiento*: facilidad de movimiento de un producto sobre la piel.

<sup>4</sup> *Absorción*: número de movimientos a partir de los cuales se percibe que el producto ha sido absorbido.

<sup>5</sup> *Brillo*: cantidad o grado de luz reflejada por la piel.

<sup>6</sup> *Pegajosidad*: fuerza requerida para separar los dedos de la piel donde se realizó la aplicación del producto.

<sup>7</sup> *Deslizamiento*: facilidad con la que los dedos se deslizan por la piel.

<sup>8</sup> *Sensación de residuo*: estimación cualitativa de la cantidad de producto que permanece sobre la piel.

<sup>9</sup> *Suavidad*: sensación de uniformidad de la superficie de la piel.

<sup>10</sup> *Sensación de oleosidad*: sensación de líquido no húmedo que deja residuo.

<sup>11</sup> *Sensación de grasitud*: residuo de gel escurridizo.

<sup>12</sup> *Sensación de cerosidad*: residuo seco similar a ceras o partículas.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó la factibilidad de preparar sistemas particulados lipídicos a partir de material ceroso extraído de propóleos, con el propósito de darle un valor agregado a este producto de la colmena e innovar en la preparación de este tipo de transportadores, cuya aplicación e investigación en el campo farmacéutico y cosmético es de reconocido impacto (Asawale et al., 2014). De este modo, primero se efectuó el control de calidad de las dos muestras de propóleos utilizadas y se exploró la técnica más idónea para la extracción y obtención del material lipídico. Dicho material extraído fue empleado en la preparación de las partículas utilizando un diseño estadístico experimental, para encontrar la formulación y las condiciones de proceso más adecuadas. Igualmente, se probó el atrapamiento de aceite de árbol de té por parte de estos transportadores y su vehiculización en una formulación tipo gel. En adición, el trabajo desarrollado permitió avanzar en la determinación de la composición química global de los lípidos y de las partículas obtenidas a partir de ellos.

### 4.1 Control de calidad de los propóleos

En el mundo existen cerca de 25000 especies de abejas (IBRA, 2008), de las cuales se estima que cerca de 1000 producen propóleos (Pereira et al., 2003). Por su parte, Vélez-Ruiz (2009) reporta que en Colombia existen 604 especies de abejas identificadas. Durante esta investigación se trabajó con dos muestras de propóleos extraídas de colmenas de especies de abejas diferentes, *Tetragonisca angustula* y *Apis mellifera*; las que a su vez provenían de dos orígenes botánicos distintos: Jardín Botánico de Medellín (Antioquia; altitud 1.486 m.s.n.m.) y Confines (Santander; altitud 1.498 m.s.n.m), respectivamente.

En Colombia hay cerca de 120 especies de abejas sin aguijón, siendo *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) la más común (Nates-Parra y Rosso-Londoño, 2013) y de uso extendido en la meliponicultura de Latinoamérica (Cortopassi-Laurino et al., 2006). En nuestro país se conoce popularmente como abeja “angelita” y se distribuye ampliamente en el territorio nacional por debajo de los 1800 m.s.n.m. Esta especie de abeja sin aguijón utiliza para su supervivencia fuentes botánicas diversas que incluyen familias de plantas tales como Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Rubiaceae, Melastomataceae y Euphorbiaceae (Obregón et al., 2013). Las abejas sin aguijón son polinizadores naturales de la flora de la región neotropical y, dentro de las ventajas para su cría están su fácil domesticación, menor agresividad con los seres humanos, ayuda para la conservación de la biodiversidad y resistencia a plagas y enfermedades que afectan a las abejas con aguijón (Heard, 1999).

Por su parte, *Apis mellifera* es la especie de mayor aprovechamiento económico en el mundo, sobre todo para asuntos relacionados con la polinización de cultivos y la producción de miel (van Veen, 2014). Tendencia a la que Colombia no escapa, particularmente desde el proceso de africanización que atravesó el país a finales de 1970 (Salamanca Grosso, 2009), consecuencia del fenómeno iniciado en Brasil en 1956, cuando se introdujo esta especie (Gupta et al., 2014).

La composición química del propóleo depende de factores como la diversidad vegetal circundante, la época del año en que se recolecte, las especies de abejas, el método de extracción, la iluminación, la altitud y las actividades paralelas de las zonas vecinas (de Groot, 2013). De allí la importancia de conocer la procedencia del propóleo crudo, porque *a priori* es posible suponer que las dos muestras tendrán diferencias en composición.

Como se observa en la Tabla 4.1 las muestras de propóleos empleadas en la presente investigación no satisfacen los estándares de calidad definidos por las normativas de referencia (Brasil y Argentina). Sin embargo, el concepto que se emita al respecto no debe ser inflexible, porque para ello se requeriría que en Colombia existiese una normativa que considerara la diversidad biológica del país y sus condiciones geográficas particulares. En efecto, las legislaciones en este tema están basadas en los propóleos de cada región, que



son obtenidos mayoritariamente de las colmenas de abejas de mayor difusión comercial, como es el caso de *Apis mellifera* (Pereira et al., 2003). Factor que explica por qué el propóleo de Confines (Santander) cumple mejor algunas de las especificaciones requeridas (e.g. índice de oxidación).

- *Cenizas.*

El ensayo de cenizas, que para ambas muestras está dentro del límite estipulado, representa el contenido mineral del propóleo y es un criterio que puede indicar su posible adulteración, sobre todo para muestras de propóleo que se comercialicen en polvo (Woisky, 1996). Las cenizas se relacionan con el contenido de impurezas mecánicas (*i.e.* masa mecánica o cuerpos extraños), debido a que son indicadores directos de la recolección y la manipulación del propóleo.

- *Masa mecánica o cuerpos extraños.*

Los cuerpos extraños están presentes *per se* en el propóleo, porque pueden introducirse durante en la recolección de los exudados resinosos de las plantas, que las abejas humedecen con la lengua y los convierten en pellets con ayuda de las patas; dichos agregados son llevados desde la boca a través del pelo de la tibia y se depositan en la corbícula (Gençay Çelemlı, 2013). Igualmente, durante la recolección de este producto de la colmena por parte de los apicultores, se pueden incorporar elementos adicionales como tierra o restos de material vegetal. Así, los eventos básicos asociados a la elaboración y recolección del propóleo, repercuten en la calidad final del producto.

- *Compuestos fenólicos, flavonoides e índice de oxidación.*

Los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica del propóleo y comprenden flavonoides y ácidos fenólicos con sus ésteres (Bedascarrasbure et al., 2004). Para determinar el contenido de fenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu, donde el reactivo molibdotungstato fosfórico oxida los fenolatos presentes (que han sido favorecidos por el medio alcalino) y da origen a un complejo azul que es cuantificado (Singleton y Rossi, 1965; Slinkard y Singleton, 1977).

Tabla 4.1 Ficha de control de calidad de los propóleos en estudio.

Nombre de la prueba	Método de ensayo	Rango establecido como aceptable	Resultado PrS <sup>3</sup>	Resultado PrJB <sup>4</sup>
<i>Olor</i>	Organoléptico	Característico: resinoso o balsámico	Resinoso	Resinoso
<i>Color</i>	Organoléptico	Amarillo, pardo, verdoso, rojizo, marrón y otros	Marrón oscuro	Marrón oscuro
<i>Sabor</i>	Organoléptico	Característico: de suave balsámico a fuerte y picante	Ligeramente picante	Balsámico
<i>Consistencia a temperatura ambiente</i>	Organoléptico	Maleable a rígido	Rígido	Rígido
<i>Aspecto</i>	Organoléptico	Homogéneo o heterogéneo	Heterogéneo	Heterogéneo
<i>Pérdida por calentamiento</i>	Gravimétrico	Máximo 8 % <sup>1</sup> ; máximo 10% <sup>2</sup>	1.8 % ± 0.1 %	5.20 % ± 0.3 %
<i>Cenizas</i>	Gravimétrico	Máximo 5 % <sup>1,2</sup>	0.8 % ± 0.1 %	1.2 % ± 0.3 %
<i>Masa mecánica o cuerpos extraños</i>	Gravimétrico; extracción con solventes	Máximo 40 % <sup>1</sup> ; Máximo 25 % <sup>2</sup>	11.5 % ± 0.23 %	25.8 % ± 0.84 %
<i>Ceras</i>	Gravimétrico; extracción con solventes	Máximo 25 % <sup>1</sup> ; Máximo 40 % <sup>2</sup>	72.5 % ± 3.5 %	58.6 % ± 2.1 %
<i>Solubles en etanol</i>	Gravimétrico; extracción con solventes	Mínimo 35 % <sup>1</sup> ; Mínimo 30 % <sup>2</sup>	23.2 % ± 0.04 %	15.7 % ± 1.61 %
<i>Residuo soluble en metanol</i>	Gravimétrico; extracción con solventes	<sup>5</sup> Mínimo 35 % <sup>1</sup> ; <sup>5</sup> Mínimo 30 % <sup>2</sup>	27.6 % ± 2.24 %	35.9 % ± 0.81 %
<i>Índice de oxidación</i>	Tiempo de decoloración KMnO <sub>4</sub> 0.1 N	Máximo 22 segundos <sup>1,2</sup>	< 5 s	120 s ± 7 s
<i>Compuestos fenólicos</i>	Espectrofotométrico	Mínimo 5 % (expresados como ácido gálico) <sup>1,2</sup>	3.0 % ± 0.3 %	2.9 % ± 0.3 %
<i>TEAC</i>	Espectrofotométrico	Expresados como <i>mmol trolox/g de muestra</i>	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<i>Flavonoides</i>	Espectrofotométrico	Mínimo 0.5 % <sup>1,2</sup>	0.2 % ± 0.002 %	0.2 % ± 0.01 %
<i>Espectro de absorción UV-VIS</i>	Espectrofotométrico	Señales características de las principales clases de flavonoides entre 200 y 400 nm <sup>1</sup> , 270 y 315 nm <sup>2</sup>	Máximo de absorción: 284 nm	Máximo de absorción: 281 nm
<i>Rango de fusión</i>	Fusiómetro		58 °C - 64 °C	58 °C - 67 °C
<i>Plomo</i>	Ensayo límite	Máximo 2.0 mg/Kg <sup>2</sup>	< 2.0 mg/Kg	< 2.0 mg/Kg
<i>Arsénico</i>	ICP - OES	Máximo 1.0 mg/Kg <sup>2</sup>	0.1 mg/Kg	0.2 mg/Kg

<sup>1</sup>Legislación brasilera (CATEF, 2005; MAPA, 2001). <sup>2</sup>Legislación argentina (SPReI y SAGPyA, 2008). <sup>3</sup>Propóleos Santander. <sup>4</sup>Propóleos Jardín Botánico. <sup>5</sup>Límite establecido para extracciones en etanol.

La presencia de núcleos fenólicos dentro de los compuestos encontrados en el propóleo, hace que el método de Folin-Ciocalteu sea usado habitualmente para la cuantificación global de moléculas activas. Los reportes para propóleos de otras regiones indican una presencia superior al límite establecido por las legislaciones tomadas como referencia (Ahn et al., 2007; Cunha et al., 2004; Palomino, 2009); en contraposición con los hallazgos para PrS y PrJB, los cuales no alcanzan a cumplir la norma.

Paralelamente, para la medición de la actividad antioxidante se empleó el método TEAC, que se basa en el atrapamiento del radical  $ABTS^{\cdot+}$  por un compuesto donante de hidrógeno, convirtiéndolo en un producto incoloro. El grado de decoloración se relaciona con la decoloración inducida por el Trolox sobre el radical catiónico, que es empleado para la construcción de la curva de calibración (Mărghitaş et al., 2009). Este método es aplicable para cuantificar tanto antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos (Baltrušaitytė et al., 2007) y resulta poco específico porque reacciona con cualquier molécula hidroxilada, sin precisar la capacidad antioxidante o no (Roginsky y Lissi, 2005).

Ahora bien, los tipos flavonoides que se encuentran en el propóleo son diversos (Greenaway et al., 1987; Huang et al., 2014; Silici, 2010) e incluyen flavonas (Volpi y Bergonzini, 2006), flavonoles (Miguel et al., 2014), flavanonas (Bankova et al., 1983), flavanonoles (Gardana et al., 2007), chalconas (Solórzano et al., 2012), dihidrochalconas (Christov et al., 2006), isoflavonas (Piccinelli et al., 2005), isoflavanos (Piccinelli et al., 2011; Trusheva et al., 2006) y neoflavonoides (Awale et al., 2005). Para la cuantificación de flavonoides totales en la muestra, se eligió el método colorimétrico basado en la formación de complejos coloreados entre flavonas (*e.g.* luteolina, apigenina) y flavonoles (*e.g.* quercetina, kaempferol, galangina, rutina) con tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) en metanol, los cuales presentan una fuerte absorción a 425 nm y son producto de la quelación de los iones aluminio ( $Al^{3+}$ ) por los sistemas dihidroxílicos (*e.g.* catecol) de los flavonoides (Mabry et al., 1970; Woisky y Salatino, 1998). Adicionalmente, se ensayó la cuantificación a través de una modificación al método propuesto por Zhishen et al. (1999), que se fundamenta en la atracción entre los anillos aromáticos de los flavonoides y el catión  $Al^{3+}$ , dando lugar a un híbrido que interactúa con el nitrito de sodio ( $NaNO_2$ ) en

medio alcalino y forma un complejo coloreado rosa, cuya absorción se mide a 510 nm (Shanmugam et al., 2010).

Pekal y Pyrzynska (2014) presentan un estudio donde comparan ambos métodos colorimétricos para la determinación de “flavonoides totales” y hacen evidentes sus correspondientes desventajas. En este sentido, el uso de  $\text{AlCl}_3$  tiene como inconveniente que los complejos se caracterizan por diferentes máximos de absorción y en algunos casos, la cuantificación alrededor de 425 nm subestima el contenido de compuestos tales como las flavanonas y sus glicósidos; limitándose la cuantificación a las flavonas y flavonoles. Por su parte, el procedimiento que usa  $\text{NaNO}_2$  muestra menos selectividad que aquel que sólo usa  $\text{AlCl}_3$ , puesto que se forman complejos con compuestos no-flavonoides que tienen en su estructura restos catecólicos (*e.g.* ácido clorogénico). Los resultados experimentales de la presente investigación coincidieron con las conclusiones de Pekal y Pyrzynska (2014), puesto que el valor de “flavonoides totales” que se encontró por el método de Zhishen et al. (1999) es incluso diez veces mayor al encontrado con la metodología con  $\text{AlCl}_3$ , hecho que llevó a la elección del método de Woisky y Salatino (1998) y Bedascarrasbure et al. (2006), al presentar resultados más coherentes sin sobreestimar el contenido real de los flavonoides.

Los resultados de los flavonoides de los propóleos en estudio son más bajos de los reportados por algunos autores en Colombia (Palomino et al., 2009; Salamanca Grosso et al., 2007); pero concuerdan con otros estudios hechos en el país, que no han logrado cumplir con la especificación requerida por la legislación internacional (Rodríguez et al., 2012). Así, se ha observado que los niveles de estos metabolitos secundarios mejoran cuando las plantas son sometidas a una fuerte radiación UV, de manera que una explicación para dichos valores puede ser que las fuentes botánicas aledañas a la colmena no tuvieron un estímulo solar tan marcado (Corradini et al., 2011; Shirley, 1996). Relacionado con lo anterior, se debe considerar tanto la época de colecta del propóleo como el cambio en la producción de flavonoides en algunas especies vegetales, dependiendo de la hora del día (fotoperiodo y duración del día) (Jaakola y Hohtola, 2010), de la época del año (Skrzypczak-Pietraszek y Pietraszek, 2014; Zhang et al., 2013), de

estímulos medioambientales y de factores abióticos de estrés (*e.g.* sequías, inundaciones, cambios de temperatura, contaminación, entre otros) (Rodziewicz et al., 2014). Otra posibilidad que justifica los hallazgos, es que la cantidad de moléculas fenólicas tipo flavonoides, disminuyó debido a la función natural del propóleo como material destinado a la protección de la colmena frente patógenos y otros agentes (Simone-Finstrom y Spivak, 2010).

Finalmente, el índice de oxidación es un parámetro frecuentemente utilizado para predecir el tiempo transcurrido desde la colecta del propóleo, el tipo almacenamiento y la actividad antioxidante de la muestra (Bastos et al., 2011; Machado de Melo et al., 2012). Para las muestras de propóleos trabajadas, se encontró que PrS tiene un valor de índice de oxidación que cumple con el límite establecido como aceptable por ambas legislaciones (máximo 22 seg); mientras que PrJB no cumplió con este parámetro. De estos resultados se puede deducir que el contenido de compuestos antioxidantes capaces de reaccionar con el permanganato de potasio, es mayor en la muestra PrS que en PrJB.

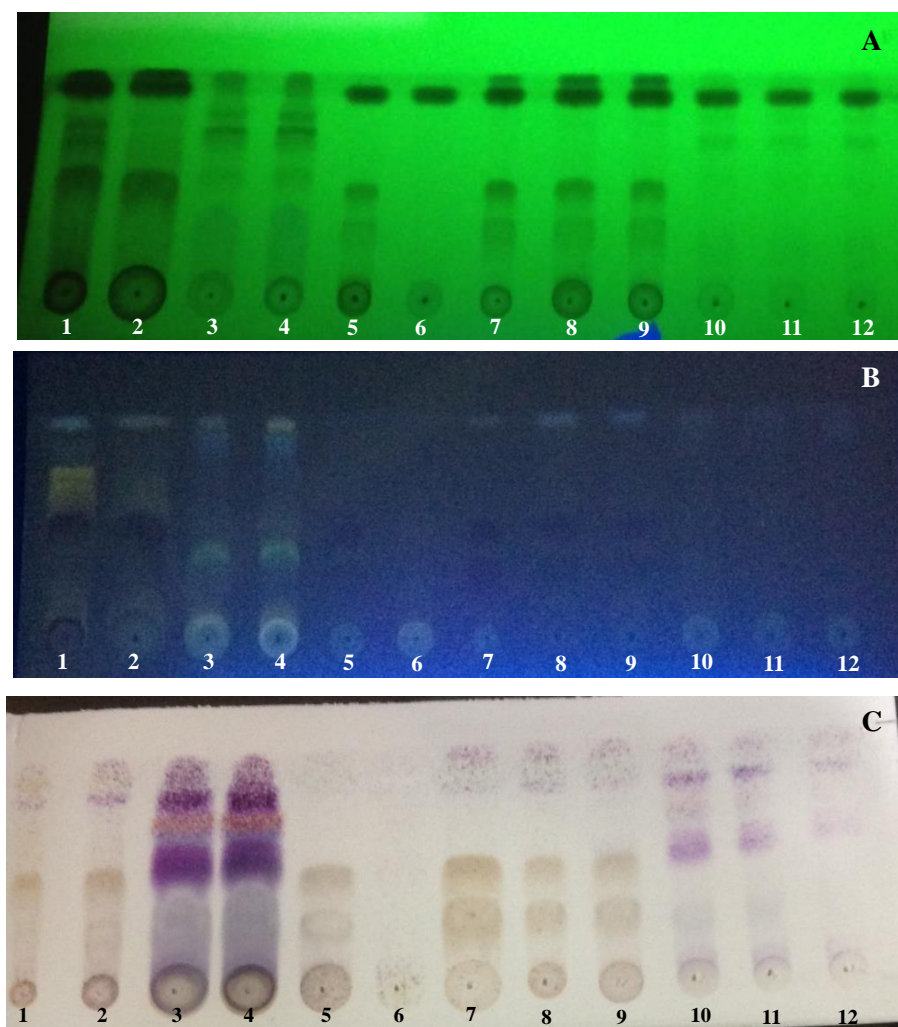
- *Comportamiento en TLC.*

Diferentes métodos de extracción de compuestos biológicamente activos han sido estudiados en el propóleo (Cunha et al., 2004; Trusheva et al., 2007), siendo el disolvente utilizado uno de los factores de mayor influencia. Se han reportado extracciones con agua - metanol (Miguel et al., 2014), etanol (Pujirahayu et al., 2014) y propilenglicol (Ramanauskiené et al., 2013). Por este motivo, los extractos del propóleo que se obtuvieron para las diferentes pruebas de control de calidad, se utilizaron para hacerles seguimiento a través de TLC (Figura 4.1). Esta técnica cromatográfica sencilla permite la separación de mezclas complejas y la detección visual de múltiples compuestos (Poole, 2003). Adicionalmente, se ha empleado como un “*screening*” rápido para componentes con actividad farmacológica (ácidos fenólicos y flavonoides) en diferentes muestras de propóleos (Jasprica et al., 2004).

En la Figura 4.1 se observa claramente la diferencia en composición entre los dos tipos de propóleos y entre los diferentes métodos usados. El cromatofolio sin revelar a UV 254 nm

(Figura 4.1 A) permite detectar la presencia de compuestos que tengan al menos un doble enlace conjugado en su estructura (Wagner y Bladt, 2001), dentro de los que se incluyen los derivados de fenilpropano, tales como los ésteres del ácido cafeico, flavonoides y aminoácidos (Volpert y Elstner, 1993). Por su parte, NP-PEG es un reactivo que permite la detección de flavonoides, intensificando su fluorescencia a UV 365 nm (Figura 4.1 B) y cuyo color depende de la estructura del compuesto.

Figura 4.1 Seguimiento de los extractos de propóleos por TLC. Fase móvil: Cloroformo: EtAc (70:30). **A)** Cromatofolio sin revelar visto a UV 254 nm. **B)** Cromatofolio revelado con NP-PEG visto a 365 nm. **C)** Cromatofolio revelado con Godin. Donde: **1-4:** Extractos metanólicos para la determinación del residuo soluble en metanol. **1 y 2:** Réplicas a partir de PrS. **3 y 4:** Réplicas a partir de PrJB. **5 y 6:** Extractos etanólicos luego de una extracción previa de ceras con n-hexano. **5:** Extracto a partir de PrS. **6:** Extracto a partir de PrJB. **7-12:** Extractos etanólicos elaborados para la determinación de fenoles totales. **7-9:** Réplicas a partir de PrS. **10-12:** Réplicas a partir de PrJB.



En el propóleo la presencia mayoritaria de flavonoides se da en forma de agliconas, debido a la hidrólisis enzimática ( $\beta$ -glicosidasa) que las abejas hacen de los conjugados glicosidados durante la recolección de resinas y la incorporación de ceras (Greenaway et al., 1987; C. P. Zhang et al., 2012). Del mismo modo, esto es consecuencia de la composición química de los exudados vegetales, puesto que en varias especies vegetales se han identificado agliconas (Wollenweber y Dietz, 1981). Lo anterior es coherente con la Figura 4.1 B, donde la fluorescencia en los puntos de aplicación de las muestras es tenue o inexistente. Igualmente, el uso del reactivo de Godin (Figura 4.1 C) evidencia la presencia de terpenoides y fenilpropanoides (Wagner y Bladt, 2001). Dichos compuestos han sido encontrados previamente en el propóleo, incluyendo derivados del ácido cinámico, ácido benzoico y ácido fenilpropanoico (Huang et al., 2014; Lee et al., 2014; Teixeira et al., 2010) e hidrocarburos volátiles  $C_{10}$  que le dan el olor característico (Gençay Çelemlı, 2013).

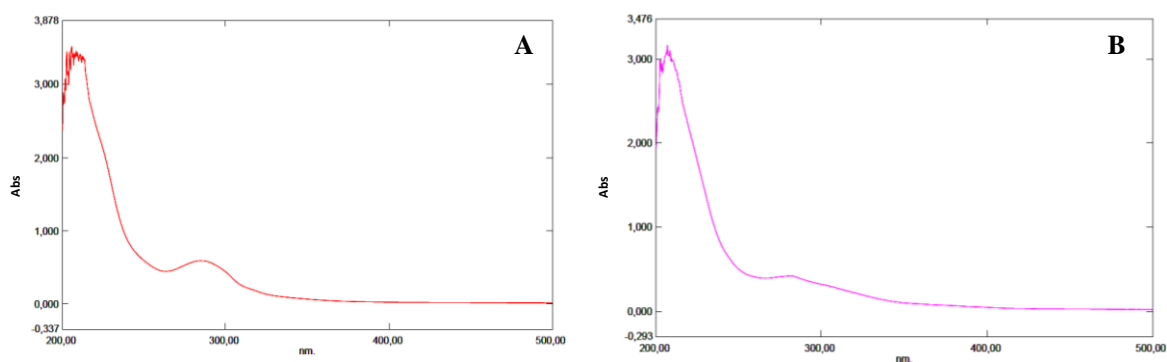
▪ *Espectros de absorción UV-VIS.*

De forma complementaria, se realizaron los espectros de absorción UV de los extractos etanólicos obtenidos luego de la remoción del material lipídico del propóleo (Figura 4.2), para lo cual se requirió hacer una dilución menor a la sugerida por Bedascarrasbure et al. (2006), siendo 1 a 50 en etanol para PrJB y 1 a 100 en etanol para PrS. Esto es indicativo del bajo contenido de compuestos fenólicos en los propóleos del presente estudio. Investigaciones previas han mostrado que este parámetro se puede utilizar como huella característica para propóleos de determinadas regiones geográficas, donde las diferencias en composición de polifenoles y flavonoides se hacen evidentes en los espectros UV, incluyendo los máximos de absorción (Bedascarrasbure et al., 2004; Kumazawa et al., 2004). Del mismo modo, la detección de flavonoides a través de espectrofotometría UV no es reciente y se explica debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura; donde la banda entre 240 nm y 280 nm se atribuye al anillo A de los flavonoides (Mabry et al., 1970).

■ *Contaminantes: plomo y arsénico.*

De otro lado, los productos de la colmena se contaminan como resultado del forrajeo que realizan las abejas [*i.e.* aquellas actividades involucradas en la búsqueda de alimento y el retorno a una localización particular (Nates-Parra y Rodríguez C., 2011)] o por las prácticas propias de la apicultura. La principal fuente de metales pesados se atribuye al medio ambiente circundante a la colmena (*i.e.* aire, plantas, suelo y agua) (Bogdanov, 2006). Uno de los metales pesados de mayor toxicidad es el plomo y se encuentra principalmente en el aire debido a la contaminación originada por las actividades del hombre. Su presencia en los propóleos es crítica (Bogdanov, 2006; Pierini et al., 2013), debido a su creciente uso en el campo médico y alimenticio, que se sustenta en su reconocida actividad biológica y farmacológica (Pereira et al., 2002). Un estudio en propóleos andaluces encontró que su contenido de plomo estaba en concentraciones entre 0.070 mg/Kg y 3.750 mg/Kg (Serra Bonvehí y Orantes Bermejo, 2013); mientras que la investigación de Pierini et al. (2013) sobre cuatro muestras de propóleos argentinos, reporta que tres no cumplían el parámetro del Código Alimentario Argentino (2.0 mg/Kg de propóleos). Por su parte, en el análisis de propóleos del sur de Polonia, llevado a cabo por Formicki et al. (2013), se encontraron valores entre 0.89 mg/Kg y 2.94 mg/Kg.

Figura 4.2 Espectros UV de extractos etanólicos de propóleos de diferente origen geográfico **A)** PrS. **B)** PrJB.



En la presente tesis se encontró que el contenido de plomo en las dos muestras estaba por debajo del máximo permitido en los ensayos límite farmacopeicos (USP 38-NF 33, 2015), utilizando un método de análisis que no es tan sofisticado como otros métodos que se han



venido reportando en la literatura científica, *e.g.* ICP (Formicki et al., 2013; Pierini et al., 2013; Serra Bonvehí y Orantes Bermejo, 2013). No obstante, la técnica puede considerarse válida y ofrece información útil para el diseño de las fichas de control de calidad.

Por su parte, el arsénico se considera otro metal tóxico proveniente de la contaminación ambiental, que se puede encontrar en rocas, suelos, vegetales y diversas fuentes acuíferas (Singh et al., 2015). En el estudio de Serra Bonvehí y Orantes Bermejo (2013) sobre propóleos andaluces, se encontró que dicho metaloide estaba presente en concentraciones que variaban entre 0.075 mg/Kg y 0.130 mg/Kg, lo que coincide con los valores bastante bajos para las muestras en estudio (Tabla 4.1). De otro lado, es importante tener en cuenta que el propóleos se ha sugerido como marcador de contaminación ambiental para las zonas aledañas a la colmena (Orsi et al., 2006), por esa razón, se pueden tomar los resultados de las pruebas de metales pesados como un indicador positivo para los lugares de procedencia de las muestras, es decir, Confines (Santander) y el Jardín Botánico de Medellín (Antioquia).

- *Componentes solubles en etanol y ceras.*

Para este estudio son de particular interés los resultados obtenidos en los ensayos de “componentes solubles en etanol” y “ceras”. El primero corresponde a la cantidad de resinas que recolectan las abejas de varias especies vegetales y que llevan a la colmena para elaborar el propóleos (Simone y Spivak, 2010). Así, a mayor contenido de resinas mayor actividad biológica, lo que a la vez guarda relación directa con los ensayos de cantidad de fenoles totales, flavonoides e índice de oxidación. De acuerdo con esto, al tener componentes solubles en etanol por debajo de la especificación, los propóleos utilizados en esta investigación son limitados en relación al contenido de sustancias activas. De otro lado, en este producto de la colmena es deseable una baja proporción de ceras, debido a la ausencia de moléculas activas en ellas (Funari y Ferro, 2006). Sin embargo, al obtener en los propóleos analizados resultados bastante elevados de tales componentes cerosos, las muestras deben ser catalogadas como de baja calidad. Sobre esta aparente desventaja, la presente tesis busca la oportunidad de darle valor agregado al

propóleos y convertirlo en materia prima para la preparación de partículas lipídicas con aplicación en el diseño de productos farmacéuticos y cosméticos.

## **4.2 Extracción y caracterización del material lipídico a partir de propóleos**

Los ensayos preliminares acerca del aprovechamiento de las ceras de propóleos en la preparación de partículas lipídicas de interés farmacéutico y cosmético (Paillié Jiménez, 2014), demostraron la conveniencia de extraer el material lipídico para disponer de un material de partida más refinado que el propóleos mismo y de esta forma permitir resultados más reproducibles, por ejemplo, de tamaño de partícula. Sobre esta base en el presente trabajo se investigó la extracción de dichos compuestos, así como su caracterización utilizando diferentes técnicas de análisis.

- *Extracción del material lipídico.*

Los métodos de extracción convencionales (*e.g.* Soxhlet, extracción asistida con ultrasonido, extracción por agitación) tienen como desventajas el prolongado tiempo de extracción, el requerimiento de una gran cantidad de disolventes costosos, la necesidad de remoción de dichos disolventes (que son en su mayoría tóxicos y de impacto ambiental), la selectividad limitada por la polaridad del disolvente y la posibilidad de degradación de compuestos termolábiles durante el calentamiento a la temperatura de ebullición del disolvente en uso (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998). Así, inicialmente se investigó la extracción del material lipídico del propóleos empleando diferentes métodos y solventes (n-hexano y EtAc).

Como se observa en la Tabla 3.1, se evaluaron tres métodos de extracción: Soxhlet, Goldfish y Randall. Sin embargo, el método Soxhlet presentó inconvenientes de orden práctico debido a que el material lipídico tiende a depositarse en el brazo del sifón dificultando la extracción, razón por la cual no fue posible alcanzar un valor confiable en

la determinación y se descarta este método para la continuidad del trabajo. Además, en términos generales, los métodos continuos (Goldfish y Randall) dan mejores resultados que los métodos semi-continuos (Soxhlet), en cuanto a rapidez y eficiencia. No obstante, tienen como desventaja la posibilidad de una extracción incompleta debido a la formación de canales en la muestra, *i.e.*, el disolvente puede preferir ciertas rutas a través de la muestra (Min y Ellefson, 2010).

Adicionalmente, en el método Randall la muestra se sumerge completamente en un disolvente orgánico en ebullición, reportándose buenos resultados con incluso 30 min de inmersión. El principio de esta técnica consiste en que el material lipídico será más soluble en solvente a la temperatura más alta, que en el solvente a temperatura ambiente (Anderson, 2004). Sobre esta base se seleccionó el método Randall, porque si bien la eficiencia de extracción es menor (Tabla 4.2), el tiempo de calentamiento del material es inferior al requerido por la técnica de Goldfish, lo que preserva la integridad del extracto.

Teniendo en cuenta que el método de preparación de las partículas lipídicas usualmente emplea EtAc como solvente orgánico, se investigó la eficiencia de extracción utilizando este solvente y el método de Randall. Los resultados indican un 63.5 %  $\pm$  1.6 % de eficiencia de extracción para PrJB y un 80.8 %  $\pm$  2.6 % para PrS, siendo en ambos casos mayor que la obtenida con n-hexano.

Tabla 4.2 Eficiencia de extracción del material lipídico del propóleos utilizando diferentes métodos Solvente: n-hexano.

<b>Método de extracción</b>	<b>Resultados</b>	
	<b>PrS</b>	<b>PrJB</b>
Goldfish	72.5 % $\pm$ 3.5 %	58.6 % $\pm$ 2.1 %
Randall	62.2 % $\pm$ 2.0 %	46.9 % $\pm$ 4.1 %

- *Caracterización del material lipídico.*

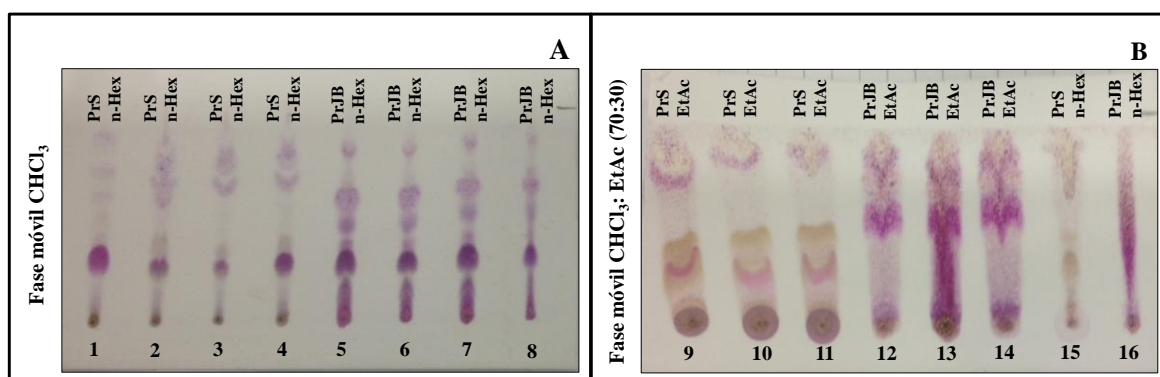
Como se mencionó en la metodología, el material extraído del propóleos por el método Randall fue caracterizado por medio de TLC, DSC, XRD e IR.

*Cromatografía en capa delgada.*

Al caracterizar por TLC los lípidos extraídos (Figura 4.3), se detecta la presencia de compuestos de carácter terpénico o fenilpropanoide (Wagner y Bladt, 2001), los que según reportes previos pueden corresponder a monoterpenos responsables del olor característico del propóleo (Gençay Çelemlı, 2013) y a derivados de los ácidos cinámico, benzoico y fenilpropanoico (Teixeira et al., 2010). Estos hallazgos coinciden con los resultados respecto a la extracción del material con actividad biológica como parte del control de calidad del propóleo (Figura 4.1), lo que sugiere la presencia de algunos compuestos fenólicos en los extractos obtenidos.

Como se observa en la Figura 4.3 B, el EtAc extrae una mayor diversidad de componentes del propóleo. No obstante, es importante mencionar que el EtAc tiene un punto de ebullición más elevado que el del n-hexano –siendo respectivamente 77.1 °C (NCBI, 2015a) y 68.7 °C, (NCBI, 2015b)–, lo que hace que la composición del material extraído en EtAc pueda estar comprometida (*i.e.* perjudicada) en cuanto a sustancias susceptibles a altas temperaturas. Finalmente, de los resultados de TLC se puede concluir que los perfiles de elución del material extraído cambian según el disolvente utilizado, el método de extracción y el origen botánico del propóleo elegido.

Figura 4.3 Cromatofolios revelados con Godin del material extraído de propóleo. **A)** Fase móvil: cloroformo. Muestras de propóleo extraídas en n-hexano. **B)** Fase móvil: Cloroformo: EtAc (70:30). **9-14:** Muestras de propóleo extraídas en EtAc. **15-16:** Muestras de propóleo extraídas en n-hexano. Donde: **1-4, 9-11, 15:** Extractos de PrS. **5-8, 12-14, 16:** Extractos de PrJB. **1, 8:** Extracción a través del método Goldfish. Las demás muestras presentadas (**2-7, 9-16**) se extrajeron a través del método Randall.



*Calorimetría diferencial de barrido.*

La Figura 4.4 presenta los resultados del análisis por DSC, observándose durante el calentamiento, amplias señales endotérmicas correspondientes a la fusión y durante el enfriamiento, anchas señales exotérmicas propias de la solidificación del material. El comportamiento de los materiales extraídos a partir de PrS resulta particular, puesto que existen dos picos durante la solidificación que se pueden explicar por los considerables rangos de cambio de fase (Tabla 4.3), evidenciando la mezcla de las sustancias presentes. Del mismo modo, Kameda y Tamada (2009) reportan el análisis DSC sobre ceras de abejas japonesas (*Apis cerana japonica*) y hacen énfasis en los dos picos previos a la fusión (36.4 °C y 49.2 °C), que se atribuyen a transiciones sólido-sólido relacionadas principalmente con n-alcanos, debido a las formas cristalográficas de estos (e.g. monoclinica, triclinica, ortorrómbica y hexagonales), que habitualmente se evidencian por cambios de temperatura (Chazhengina et al., 2003; Dorset et al., 1984; Kameda, 2004).

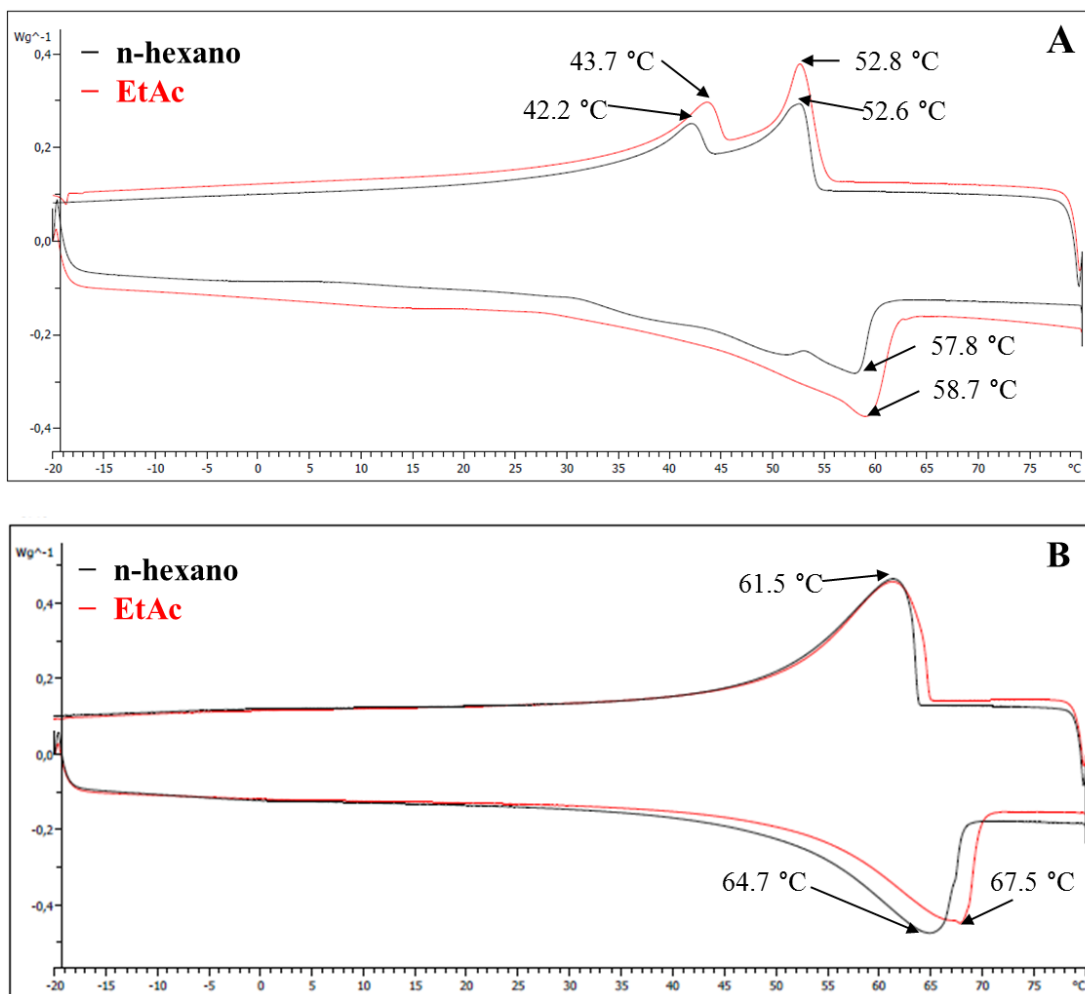
Tabla 4.3 Resultados del análisis por DSC del material extraído por el método de Randall.

Propóleos	Material extraído con:	Rango de fusión				Rango de solidificación			
		Inicio (°C)	Señal dominante de fusión (°C)	Final (°C)	$\Delta H$ de fusión (J/g)	Inicio (°C)	Señal dominante de solidif. (°C)	Final (°C)	$\Delta H$ de solidif. (J/g)
PrS	n-hexano	44.6	57.8	59.8	33.3	54.2	52.6	46.4	30.0
	EtAc	46.4	58.7	61.8	40.2	55.8	52.8	49.2	33.6
PrJB	n-hexano	50.6	64.7	68.0	44.8	63.8	61.5	49.2	-40.1
	EtAc	52.4	67.5	69.6	42.1	65.0	61.5	50.6	-36.1

Adicionalmente, los valores derivados de los análisis de DSC (Tabla 4.3) complementan la información que se obtuvo inicialmente con la determinación empleando fusiómetro, de los intervalos de fusión para los propóleos crudos PrS (58 °C – 64 °C) y PrJB (58 °C – 67 °C). Si bien el método que emplea el fusiómetro es útil para una aproximación inicial a la naturaleza del sólido, resulta insuficiente para describir el comportamiento térmico y cristalino del propóleos o sus componentes extraídos, los que por su naturaleza compleja y cambios en su estructura cristalina, presentan fenómenos de ablandamiento que hacen

difícil la observación del verdadero inicio de la fusión (Pavia et al., 2005). En cambio, el método DSC es más confiable y arroja información sobre la naturaleza de los cambios termodinámicos relacionados con la transformación de un estado físico en el otro, aunque es limitado para proporcionar datos directos sobre la composición del material extraído (R. Zhang et al., 2012).

Figura 4.4 Termogramas DSC del material extraído del propóleo por el método de Randall utilizando n-hexano o EtAc como disolventes. **A)** Material extraído de PrS. **B)** Material extraído de PrJB.



Finalmente, conviene mencionar el trabajo de Buchwald et al. (2008) que compara las propiedades térmicas de 49 ceras de subespecies de abejas pertenecientes a tres tribus de la familia Apidae (Bombini, Meliponini y Apinini), donde se sugiere que existen

determinados patrones y diferencias en los comportamientos térmicos de cada una, que se deben al uso básico que cada especie hace de la cera como material estructural en su nido. Así mismo, estos investigadores comparan el rango de fusión de las ceras de las seis especies de abejas sin aguijón evaluadas, frente a las ceras de 41 especies de abejas *Apis* spp, siendo superiores los valores de temperatura para estas últimas. Esto contrasta con los hallazgos obtenidos en el presente estudio, pero permite corroborar la hipótesis acerca de la existencia de cambios composicionales por factores críticos como el tipo de abeja y la zona geográfica.

#### *Difracción de rayos X.*

De otro lado, de acuerdo con los resultados de XRD (Figura 4.5), el material extraído de los propóleos tiene zonas cristalinas que son similares independientemente del disolvente utilizado para la extracción. Dichos hallazgos de cristalinidad están de acuerdo con lo expuesto en literatura sobre investigaciones que se han desarrollado en cera de abejas (Basson y Reynhardt, 1988; Hepburn et al., 2014; Lakshmi et al., 2012; Mellema, 2009), y cuyos difractogramas muestran picos puntiagudos e intensos que posiblemente guardan relación con compuestos que son capaces de cristalizar, como es el caso de algunos esteroides y alcanos (*e.g.* ciclohexadecano, heneicosano, tricosano, pentatriacontano).

#### *Espectroscopía infrarrojo.*

Por su parte, la espectroscopía IR es una técnica que permite obtener información cuantitativa como cualitativa de la muestra en estudio, valiéndose para ello de la interacción entre la radiación electromagnética y los enlaces del compuesto químico (García-González et al., 2013), obteniendo un acercamiento preliminar al grupo de compuestos presentes en el material extraído y por ende en las partículas lipídicas. Los resultados mostrados en la Figura 4.6 evidencian las señales características de la cera de abejas según lo reportan artículos como los escritos por Birshstein y Tul'chinskii (1977), Kajjari et al. (2014), Lakshmi et al. (2012) y, Zimnicka y Hacura (2006). Así por ejemplo,

existe una señal intensa alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1735\text{ cm}^{-1}$  atribuida a grupos carboxilo no ionizados o ésteres. La banda ancha entre  $3200\text{ cm}^{-1}$  y  $3450\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo de alcoholes y las bandas en  $2850\text{ cm}^{-1}$  y  $2920\text{ cm}^{-1}$  se presentan por las vibraciones de estiramiento de enlaces CH, complementado por la señal en  $1462\text{ cm}^{-1}$  de vibraciones de deformación CH y en  $721\text{ cm}^{-1}$  de deformaciones esqueléticas no planares de hidrocarburos de cadena larga, tal como se esperaba debido a la presencia de alcanos. La diferencia entre el material extraído de PrS y PrJB se evidencia tanto en la región inferior a  $700\text{ cm}^{-1}$  donde se encuentra la región de la huella dactilar, como en la forma e intensidad de algunas señales como las que se presentan alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , atribuidas a la presencia de alquenos o compuestos aromáticos, esto es, enlaces C=C (Pavia et al., 2005).

Figura 4.5 Difracción de rayos X (XRD) del material extraído por el método Randall de PrS (A) y PrJB (B) con n-hexano (1) y EtAc (2).

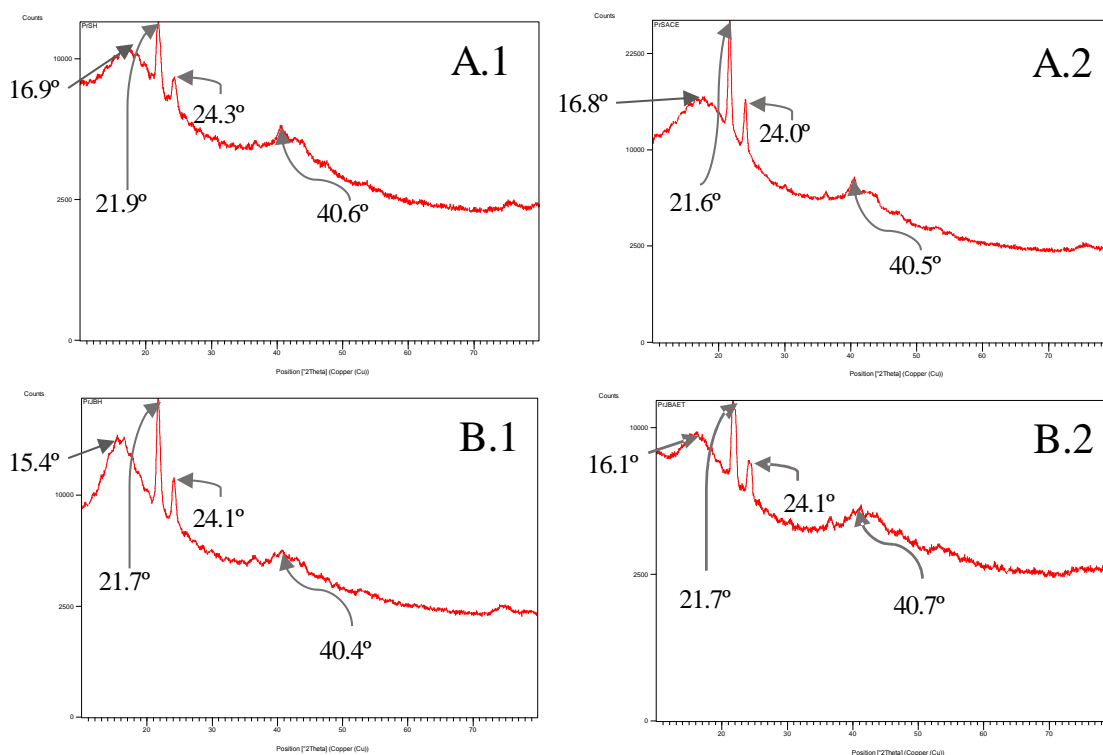
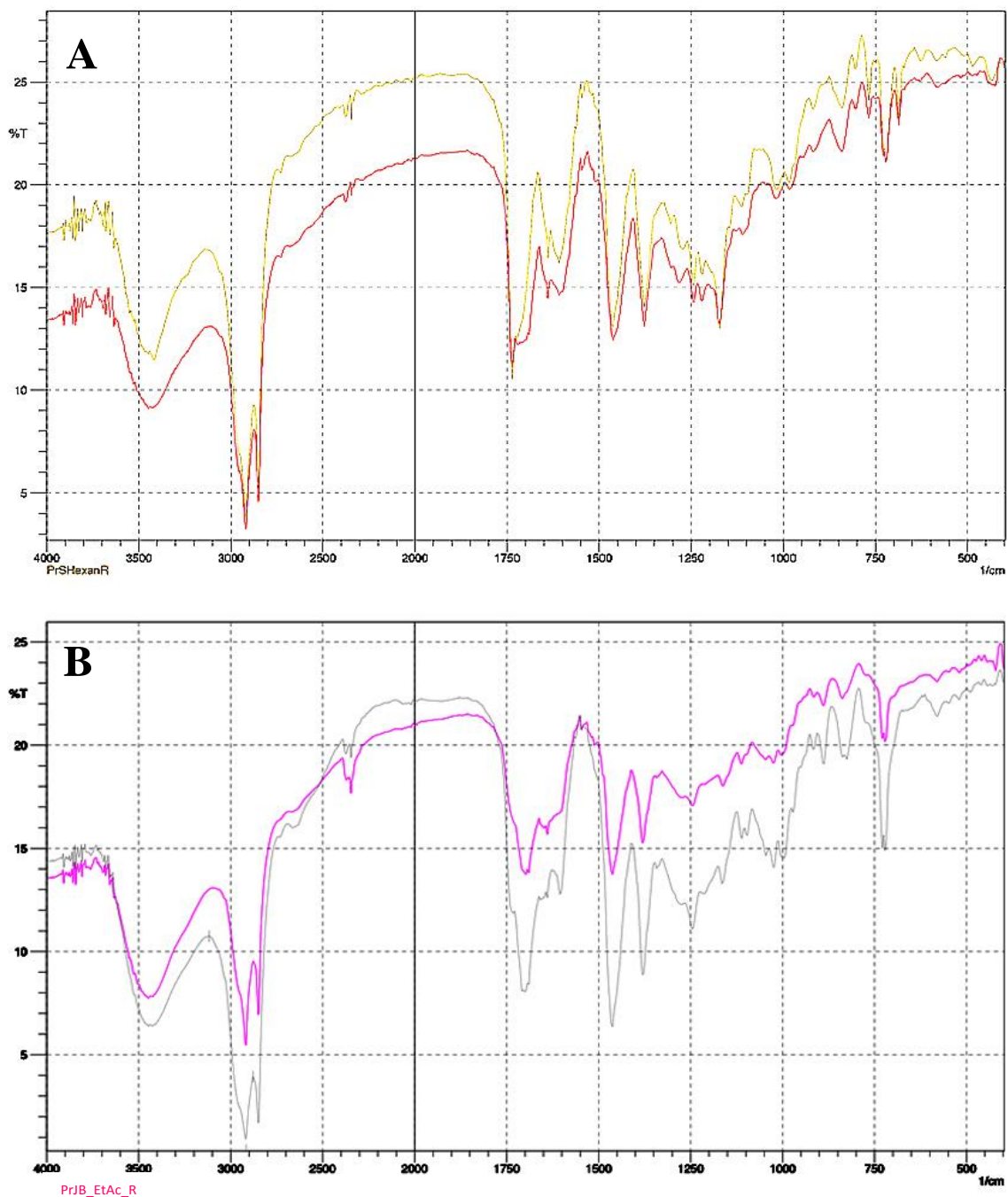




Figura 4.6 Espectros de infrarrojo (KBr) del material extraído del propóleo por el método Randall según el disolvente usado para la extracción. En rojo y rosado: material extraído en EtAc; en amarillo y gris: material extraído en n-hexano. **A) PrS.** **B) PrJB.**



*Resonancia magnética nuclear.*

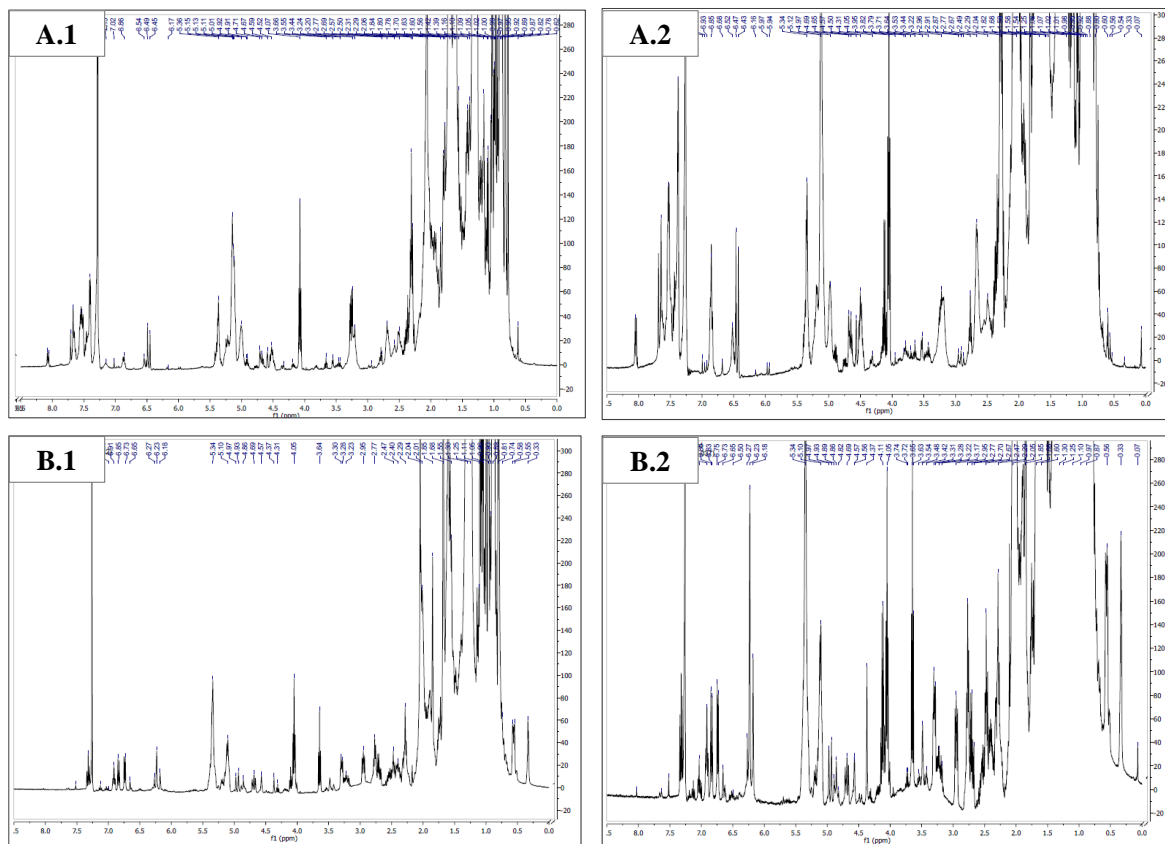
La NMR es una técnica que permite analizar la composición química y la movilidad colectiva o molecular de los componentes de la muestra bajo estudio (Mayer, 2002). Así, complementario a las técnicas de caracterización, se empleó  $^1\text{H}$  NMR debido a que distingue entre los tipos de hidrógenos presentes y la abundancia relativa de cada uno de ellos; siendo el área bajo la curva de cada pico proporcional al número total de hidrógenos que lo genera (Pavia et al., 2005). Desde finales de la década de 1950 se empleó esta técnica para la caracterización de sustancias lipídicas (*i.e.* los ácidos grasos) presentes en aceites naturales (Hopkins y Bernstein, 1959) y es conocida su aplicación en la caracterización del propóleo (Bertelli et al., 2012; Cuesta-Rubio et al., 2007; Watson et al., 2006).

Como se observa en las Figuras 4.7 y 4.8 las muestras extraídas con EtAc tienen mayor diversidad de hidrógenos que aquellas extraídas con n-hexano. Paralelamente se puede destacar que en todos los casos la mayor intensidad de los picos está entre 0.5 ppm y 2.0 ppm, lo que es coherente con la suposición de una elevada presencia de material hidrocarbonado. El desplazamiento químico de los hidrógenos ( $\delta_{\text{H}}$ ) entre 0.7 ppm y 1.3 ppm da indicios de protones de grupos metilo  $\text{R-CH}_3$ . Del mismo modo, el pico más intenso correspondiente a 1.25 ppm representa la abundancia de protones de grupos metileno  $\text{R-CH}_2\text{-R}$  en las muestras; mientras que el rango de  $\delta_{\text{H}}$  entre 1.4 ppm y 1.7 ppm representa protones de los grupos  $\text{R}_3\text{CH}$ . Los protones de los grupos acetilo aparecen cercanos a 2 ppm, existiendo posibilidades de la presencia de hidrógenos en un ambiente químico del tipo  $\text{RC(=O)CH}$ ,  $\text{HC(=O)CH}$ ,  $\text{ROC(=O)CH}$  y  $\text{HOC(=O)CH}$ .

De otro lado, los picos hidroxílicos de los alcoholes probablemente se encuentren entre  $\delta_{\text{H}}$  0.5 ppm y 4.0 ppm, teniendo en cuenta que los disolventes no polares desfavorecen los puentes de hidrógeno que se puedan formar, haciendo que aparezcan a bajas frecuencias (Silverstein et al., 2005). Respecto a hidrógenos relacionados con alquenos, existe coincidencia para los valores entre los rangos 1.6 ppm - 2.6 ppm ( $\text{R-C=C-C-H}$ ) y entre 4.5 ppm - 6.5 ppm ( $\text{R-C=C-H}$ ). Por otra parte, se detectan protones aromáticos que tienen un desplazamiento característico entre 7 ppm - 8 ppm, y protones unidos a carbonos que se

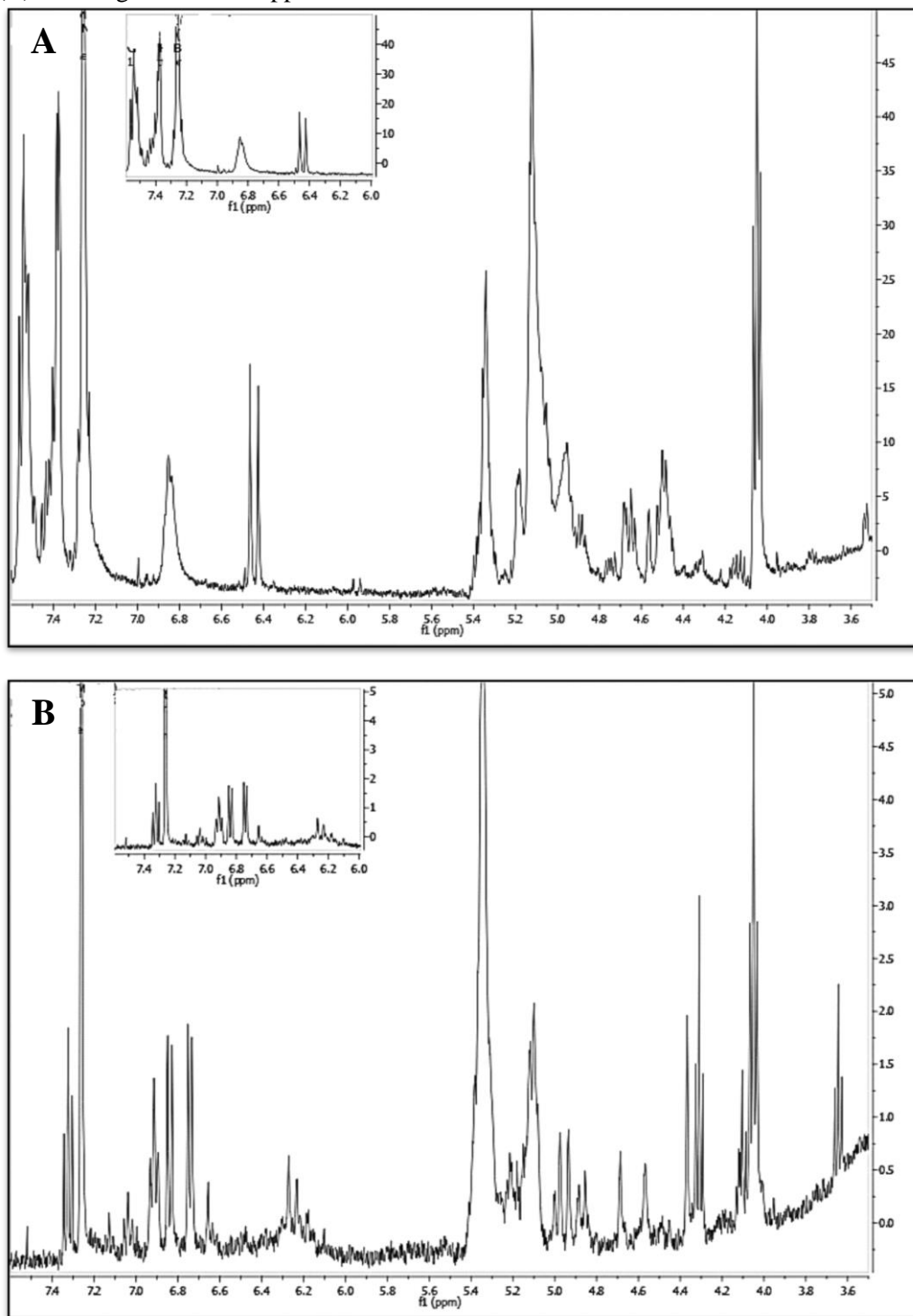
enlazan directamente a grupos fenilo  $C_6H_5-C-H$ ; dando indicios de la presencia de compuestos fenólicos propios de los propóleos.

Figura 4.7 Espectros  $^1H-NMR$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) para material extraído de PrS (A) y PrJB (B) con n-hexano (1) y EtAc (2) para el rango de  $\delta$  0-8.5 ppm.



En adición a lo observado en los materiales extraídos de ambos tipos de propóleos (Figura 4.7 y Figura 4.8), en las muestras obtenidas a partir de PrJB aparecen señales diferentes por encima de 9 ppm, que no están presentes en los materiales derivados de PrS. Así, se presentan singletes de baja intensidad entre un  $\delta_H$  de 9.0 ppm - 10.0 ppm que corresponden a hidrógenos de aldehídos  $R-C(=O)H$ , y en el rango 11.0 ppm - 12.0 ppm que coinciden con hidrógenos de ácidos orgánicos  $R-C(=O)OH$ , o que pueden manifestar la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares en estructuras aromáticas.

Figura 4.8 Espectros  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para material extraído en EtAc para PrS (A) y PrJB (B) en la región  $\delta$  3.5-8.5 ppm.



Profundizando en los constituyentes aromáticos del propóleo (Figura 4.8) se consideró la información obtenida por HMQC y HMBC (Anexo 3, Anexo 4, Anexo 5, Anexo 6). Así, en el material lipídico PrJB\_EtAc\_R se encontró un mayor número de señales de hidrógenos pertenecientes a dichos compuestos, que por su multiplicidad e integración podrían ser atribuidos a un patrón de sustitución “para” sobre el anillo aromático. Esto se justificó gracias al análisis global de los resultados, donde se destacan los dos dobletes en  $\delta_H$  6.74 ppm y 6.84 ppm con una constante de acoplamiento (J) de 7.32 Hz y 8.39 Hz, respectivamente; los que a su vez están relacionados con señales en  $^{13}C$  en los desplazamientos de 123.2 ppm y 115.8 ppm. Del mismo modo, existen dos tripletes en  $\delta_H$  6.91 ppm y 7.32 ppm con una J de 7.18 Hz y 7.86 Hz, para cada uno de ellos, que coinciden con los desplazamientos en  $^{13}C$  en 145.6 ppm y 135.5 ppm. Para la muestra del PrS\_EtAc\_R, se tienen señales importantes en  $\delta_H$  6.85 ppm, 7.37 ppm y 7.54 ppm; que sugieren la presencia de compuestos aromáticos, aunque no tienen una multiplicidad tan clara como la observada en la muestra del Jardín Botánico PrJB\_EtAc\_R.

Por último, se puede afirmar que la  $^1H$  NMR es una técnica que permite caracterizar mezclas complejas de compuestos y proporciona un perfil específico (“huella dactilar”) de cada una de ellas, sirviendo para discriminar el material obtenido a partir de propóleos de diferente origen geográfico.

#### *Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.*

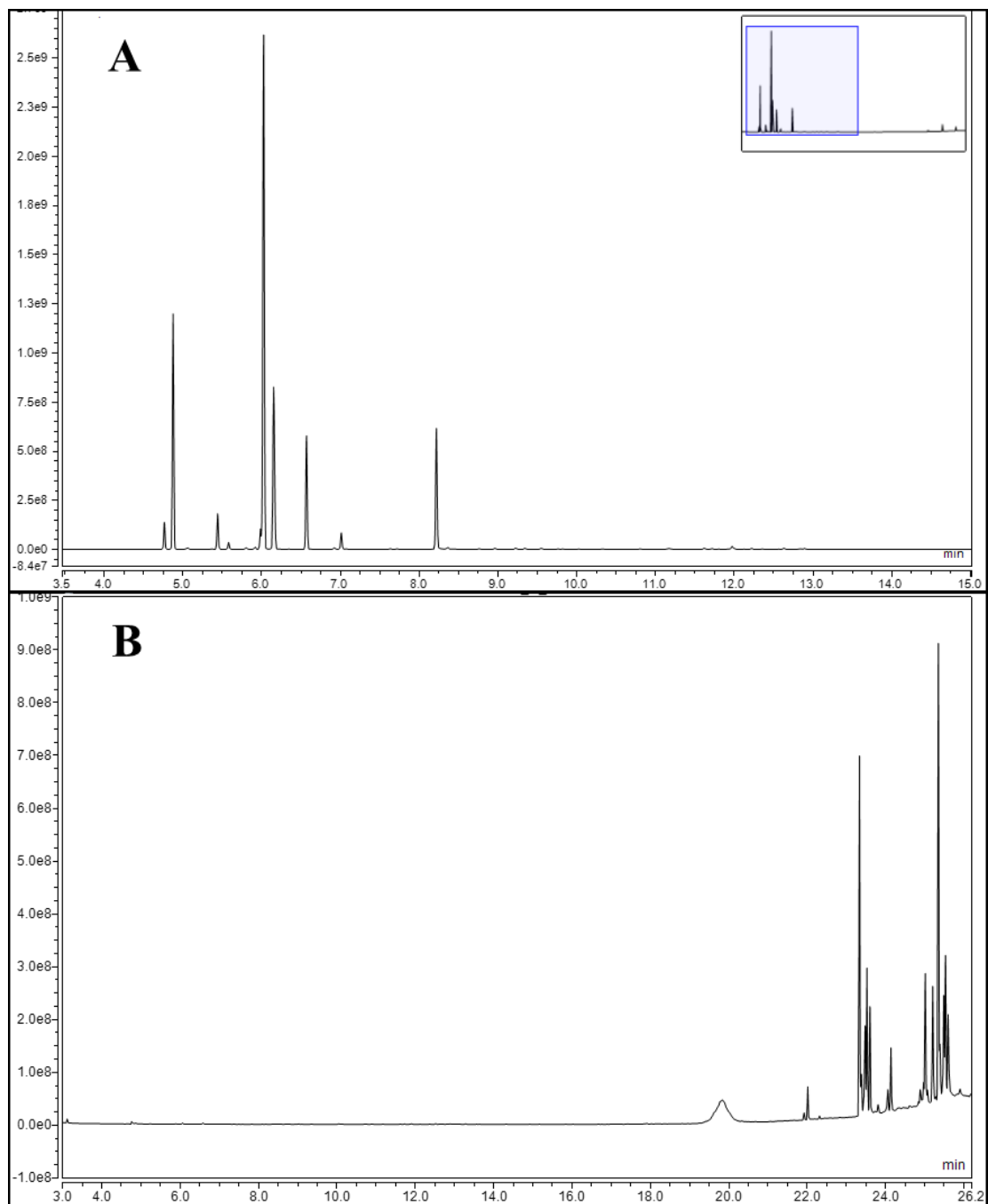
De otro lado, la GC-MS fue utilizada para la aproximación a la identificación de los compuestos que están presentes en el material extraído con n-hexano (Figura 4.9), teniendo en cuenta que esta técnica es comúnmente utilizada para la separación, caracterización e identificación de compuestos orgánicos, y es reconocido su uso en la identificación de cera de abejas (Jiménez et al., 2006; Maia y Nunes, 2013; Serra Bonvehi y Orantes Bermejo, 2012). Como se observa en los cromatogramas, existen diferencias entre las dos fuentes geográficas de material extraído de propóleos. En términos generales, los picos principales para la muestra de PrS\_H\_R aparecen a bajos tiempos de retención, por lo que podría esperarse que correspondan a moléculas de baja polaridad. Por el contrario, para el caso de PrJB\_H\_R las señales predominantes se ubican a mayores

tiempos de retención, lo que permite inferir que la polaridad de estas sustancias es superior a la encontrada en PrS\_H\_R.

Teniendo en cuenta la fragmentación m/z, los espectros de masas obtenidos se cotejaron en la base de datos NIST MSMS2 y se encontró que los compuestos que posiblemente están presentes en PrS\_H\_R son terpenoides volátiles que han sido previamente identificados en otros tipos de propóleos de diferente origen geográfico. Así, para esta muestra se detectó  $\alpha$ -felandreno (4.77 min) (Patricio et al., 2002; Pino et al., 2006),  $\alpha$ -pineno (4.87 min) (Melliou et al., 2007; Pellati et al., 2013),  $\beta$ -pineno (5.44 min) (Kaškonienė et al., 2014; Simionatto et al., 2012), p-cimeno (6.03 min) (Greenaway et al., 1989; Segueni et al., 2010), D-limoneno (6.16 min) (Silici, 2010),  $\gamma$ -terpineno (6.57 min) (Borčić et al., 1996). Para la muestra de PrJB\_H\_R no se encontraron coincidencias en la base de datos disponible. En este punto es pertinente señalar que la identificación de los compuestos terpénicos en la muestra PrS\_H\_R, coincide con la mayor actividad antioxidante del propóleo crudo de partida PrS, frente a la obtenida para PrJB (Tabla 4.1).

Adicionalmente, a partir de estos resultados se puede inferir que posiblemente se encuentren ésteres en los materiales extraídos. Esta suposición surge al considerar que no se identificaron ácidos carboxílicos o alcoholes con la metodología utilizada, por lo que se requeriría la hidrólisis preliminar de las ceras para lograr la liberación de estos componentes (Jiménez et al., 2006; Serra Bonvehi y Orantes Bermejo, 2012). Del mismo modo, la utilización de la GC-MS en el campo de los productos naturales es limitada, debido a que muchas moléculas tienen polaridad y características iónicas similares y son insuficientemente volátiles, a menos que se derivaticen. Además, la ionización en fase gaseosa es proclive a una extensiva fragmentación de los iones de analito y el excesivo calentamiento de los fragmentos ionizados podría causar la degradación térmica de los productos evaluados (Colegate y Molyneux, 2007).

Figura 4.9 Cromatogramas GC-MS de las muestras de material extraído por el método Randall en n-hexano. A) PrS\_H\_R; B) PrJB\_H\_R.



En síntesis, la caracterización de los materiales extraídos del propóleo evidenció que poseen regiones cristalinas y que su composición es diversa. Se puede confirmar la presencia de sustancias hidrocarbonadas (*e.g.* terpenos), de compuestos con grupos

carbonilo dentro de su estructura (característicos de los ésteres que se han reportado para cera de abejas) y de compuestos aromáticos (*e.g.* fenilpropanoides). Los resultados obtenidos por medio de las diferentes técnicas de caracterización, evidencian diferencias entre los orígenes botánicos de los dos propóleos de partida. Se destacan los espectros de  $^1\text{H}$  NMR, puesto que podrían considerarse una huella dactilar para cada tipo de material de partida.

### **4.3 Preparación, caracterización y aproximación a la composición química de las partículas lipídicas preparadas a partir del material extraído del propóleos**

Utilizando como método de preparación la técnica de emulsificación – difusión estandarizada en el grupo de investigación, el presente estudio se orientó al desarrollo de una formulación y a la definición de las condiciones de operación más adecuadas para obtener partículas lipídicas a partir del material extraído del propóleos. Si bien Paillié Jiménez (2014) demostró que es posible la preparación de partículas lipídicas utilizando como material de partida directamente el propóleos disuelto en EtAc, con el propósito de favorecer la incorporación de componentes activos se ensayó la preparación de transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, *Nanostructured Lipid Carriers*), lo que requiere la inclusión de un lípido líquido en la formulación.

Además, esta estrategia permite combinar las ventajas del material lipídico sólido en términos de estabilidad de las partículas, con las ventajas de los lípidos líquidos que ofrecen mayor afinidad por sustancias lipídicas factibles de encapsulación previniendo también su expulsión de la estructura de la partícula, luego de que han sido encapsuladas (Jenning et al., 2000). Dicha mezcla conlleva a que la estructura de los NLC esté provista de un mayor número de imperfecciones, que si sólo se tuviese el lípido sólido cristalizado, contribuyendo así a mantener durante el almacenamiento, la carga del activo transportado (Müller et al., 2007).



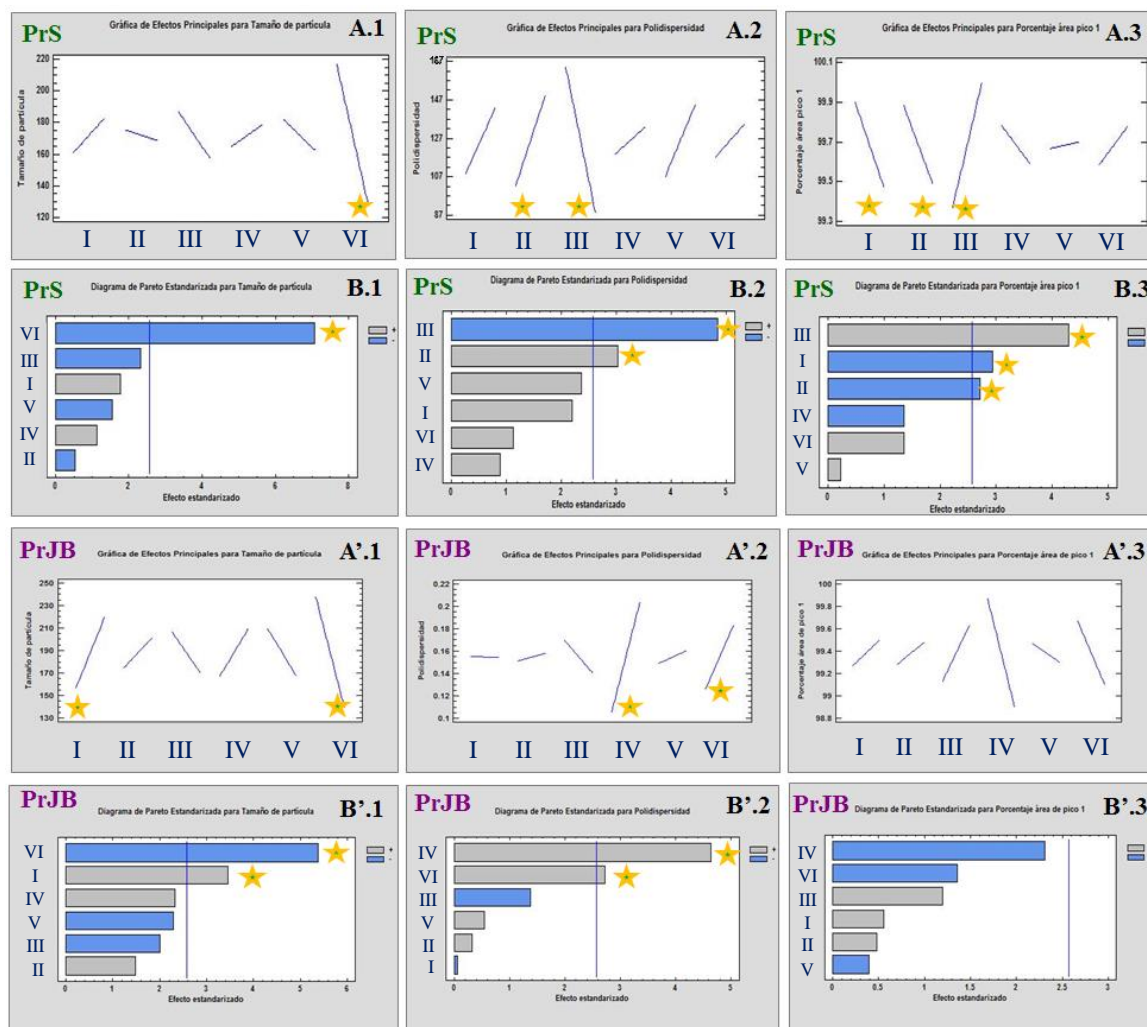
De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se seleccionaron como lípidos líquidos un aceite extraído de fuente vegetal (aceite de ajonjolí), con el propósito de explorar la posibilidad de lograr una formulación en la que predomine el aprovechamiento de los recursos naturales disponibles en Colombia, y un aceite semi-sintético, triglicérido cáprico/caprílico, reconocido por su capacidad disolvente y su resistencia a la oxidación (Hippalgaonkar et al., 2010).

Para diseñar una formulación a partir del material extraído del propóleos, se utilizó un diseño estadístico de Plackett-Burman, investigando la influencia de la naturaleza del agente estabilizante y de los lípidos líquidos, así como de algunas condiciones de proceso, sobre el tamaño de partícula, el PDI y la no formación de agregados (representada por el porcentaje de la señal principal). Los dos agentes estabilizantes (PLX y PVA) fueron seleccionados considerando los resultados obtenidos por Crespo Rodríguez (2015) en donde se identifican como las opciones más recomendables para la preparación de partículas lipídicas. Las variables de tiempo y velocidad de emulsificación fueron consideradas en este diseño, teniendo en cuenta que según el estudio sistemático realizado a este método, son las que influyen de forma significativa el tamaño de las partículas (Crespo Rodríguez, 2015).

En la Figura 4.10 se presentan los gráficos de efectos principales y los diagramas de Pareto generados al procesar los resultados de caracterización de cada una de las 12 formulaciones con el software estadístico Statgraphics Centurion V17.1.02. A modo de ejemplificar la interpretación, en la Figura 4.10 A.2 correspondiente al gráfico de efectos principales cuando se trabajó como lípido sólido el material extraído en n-hexano de propóleos Santander, se observa que la concentración de PLX empleada como agente estabilizante y la concentración de CCT utilizada como lípido líquido, influyen de forma significativa la polidispersidad de las partículas. Sin embargo, la concentración de PLX tiene un efecto directo, *i.e.*, a mayor concentración mayor PDI. Por el contrario, la concentración de CCT presenta un efecto inverso, *i.e.*, a mayor concentración menor PDI. Teniendo en cuenta que el comportamiento deseado para las partículas es un valor bajo de PDI, según este único parámetro, lo recomendable es que en la formulación de las

partículas se incluya un porcentaje de PLX al nivel inferior de esta variable y una cantidad de CCT correspondiente al nivel superior.

Figura 4.10 Resultados de los efectos de las diferentes variables investigadas en el diseño experimental de Plackett-Burman en la preparación de partículas lipídicas a partir de material extraído de propóleos **PrS** y **PrJB**. **A, A')** Gráficas de efectos principales; **B, B')** Diagramas de Pareto estandarizados: gris, nivel alto; azul, nivel bajo. Variables respuesta: **1)** Tamaño de partícula; **2)** Polidispersidad; **3)** Porcentaje de la señal principal (relacionado con la obtención de distribuciones de tamaño monomodales). En números romanos: **I:** PVA; **II:** PLX; **III:** CCT; **IV:** Aceite de ajonjolí; **V:** Tiempo de emulsificación; **VI:** Velocidad de emulsificación. Las estrellas señalan las variables con efectos significativos.



Por su parte, la Figura 4.10 B.2 presenta los diagramas de Pareto, construidos con los valores absolutos de cada uno de los efectos, pero diferenciando cuáles tienen signo positivo y cuáles negativo. La línea vertical divisoria en el gráfico establece el valor del

efecto mínimo significativo, es decir el umbral que define la significancia. Por encima de este valor se considera que el efecto de una variable de ensayo es estadísticamente significativo. Como se observa, nuevamente se identifican como tal, las variables de concentración de PLX y concentración de CCT.

Es importante tener en cuenta que el análisis anterior corresponde únicamente a una variable de ensayo (PDI) y las conclusiones obtenidas deben ser consideradas en conjunto con los análisis para las demás variables de ensayo (tamaño de partícula y porcentaje de señal principal) con el propósito de definir las condiciones más adecuadas para la preparación de las partículas. Aunque todas las variables tenían el mismo nivel de importancia en la toma de decisiones, en los casos que se observó alguna contradicción, se eligió la condición de trabajo que favoreciera en primer lugar distribuciones monodispersas y en segundo, el menor tamaño de partícula.

En la Tabla 4.4 se presenta una síntesis del análisis de toda la información obtenida en este estudio. Como se observa, el tiempo de emulsificación es una variable que no tiene mayor impacto en las características evaluadas a las partículas, lo que aparentemente contradice los resultados presentados por Crespo Rodríguez (2015). Sin embargo, en dicha investigación la variación de tamaño de partícula presenta una disminución drástica durante los primeros 3 min de emulsificación, momento a partir del cual se logra un comportamiento asintótico. Los resultados obtenidos en este trabajo con material extraído del propóleos demuestran que al introducir cambios en la formulación de partida, sigue siendo válida la conclusión acerca de que después de un tiempo de emulsificación específico (5 min), el tamaño de partícula no es afectado.

Como lípido líquido se seleccionó el triglicérido cáprico/caprílico (CCT), que es un triglicérido de cadena mediana (MTC, *medium chain triglycerides*). Al analizar los resultados del diseño estadístico experimental se recomendó no utilizar el aceite de ajonjolí. Esto puede ser debido a la composición típica de este último, en la que se incluyen el ácido linoleico, el ácido esteárico, el ácido palmítico y el ácido linolénico (Jannin et al., 2008), todos catalogados dentro del grupo de triglicéridos de cadena larga (LCT, *long chain triglycerides*) (Hippalgaonkar et al., 2010). Según Zheng et al. (2013), la

longitud de la cadena de dichos lípidos (LCT), a diferencia de la longitud del CCT, causa un aumento del tamaño de partícula que no es deseable para el diseño de este tipo de transportadores.

Tabla 4.4 Resultados compilados del diseño estadístico experimental de Plackett-Burman.

		Conc. PVA	Conc. PLX	Conc. CCT	Conc. Aceite ajonjolí	Tiempo de emulsificación	Velocidad de emulsificación
Propóleos Santander	Tamaño de partícula	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Alto	Alto
	PDI	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
	Porcent. señal principal	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Alto
Propóleos Jardín Botánico	Tamaño de partícula	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Alto
	PDI	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
	Porcent. señal principal	Alto	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo

\*En sombreado, cuando el efecto es estadísticamente significativo

De otro lado, para el caso particular de la velocidad de emulsificación, como se puede observar en la Tabla 4.4, existe conflicto en la recomendación que se deduce a partir del diseño estadístico experimental: el nivel alto de la variable favorece la obtención de tamaños de partícula pequeños y el nivel bajo distribuciones de tamaño de partícula con desviaciones estándares menores. Considerando que para este tipo de partículas se proyecta su aplicación como transportadores de moléculas activas de interés farmacéutico y cosmético, si bien el tamaño de partícula pequeño podría favorecer por ejemplo, fenómenos de permeación (Zhang et al., 2015), la distribución monomodal garantiza una menor variabilidad en la liberación del activo, lo que está directamente relacionado con la eficacia y la seguridad (Mora-Huertas et al., 2010). Sobre esta base se eligió la condición de menor velocidad de emulsificación. Además, por razones prácticas trabajar con una

menor velocidad de emulsificación disminuye el desgaste mecánico del equipo (Ultra-Turrax® T18 IKA®).

Respecto a las demás variables de ensayo, el análisis de efectos presentado en la Tabla 4.4 evidencia que en mayor o menor grado éstas influyen una o varias de las propiedades de las partículas. La interpretación en conjunto de los resultados obtenidos, en los que se busca el menor tamaño de partícula, la más baja polidispersidad y la menor posibilidad de formación de agregados, sustenta la formulación prototipo y las condiciones de trabajo a utilizar. Éstas son 100 mg de material extraído por el método Randall del propóleo (PrS y PrJB), 10 mg de CCT, 10 mL de EtAc previamente saturado con agua y 40 mL de una fase acuosa previamente saturada en EtAc que contiene como agentes estabilizantes PLX (0.5 g) y PVA (0.5 g). Como condiciones de emulsificación se prefiere una velocidad de 11200 rpm durante 5 minutos.

Los resultados para las partículas preparadas a partir de los extractos obtenidos por el método Randall, PrS\_H\_R (extracción con n-hexano), PrS\_EtAc\_R (extracción con EtAc), PrJB\_H\_R (extracción con n-hexano) y PrJB\_EtAc\_R (extracción con EtAc), utilizando la formulación deducida a partir del diseño estadístico experimental, se reportan en la Tabla 4.5 e indican un tamaño de partícula aproximado menor a 300 nm, con un índice de polidispersidad inferior de 0.1 y una distribución monomodal (Figura 4.11). Adicionalmente, la dispersión de partículas liofilizadas (PrJB\_EtAc\_NLC) y recubiertas con oro fueron observadas bajo microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 4.12), logrando ser visualizadas inmersas dentro de la matriz polimérica que las rodea.

Tabla 4.5 Resultados de las formulaciones optimizadas a través del diseño experimental de Plackett-Burman.

Material de partida	Tamaño de partícula (nm)	Polidispersidad
PrS_H_R	258 ± 8	0.08 ± 0.02
PrS_EtAc_R	214 ± 3	0.09 ± 0.02
PrJB_H_R	269 ± 7	0.07 ± 0.02
PrJB_EtAc_R	226 ± 7	0.09 ± 0.02

Figura 4.11 Distribución de tamaño de las partículas lipídicas PrS\_EtAc\_NLC preparadas con PrS\_EtAc\_R. La distribución fue simétrica y centrada alrededor de 210 nm.

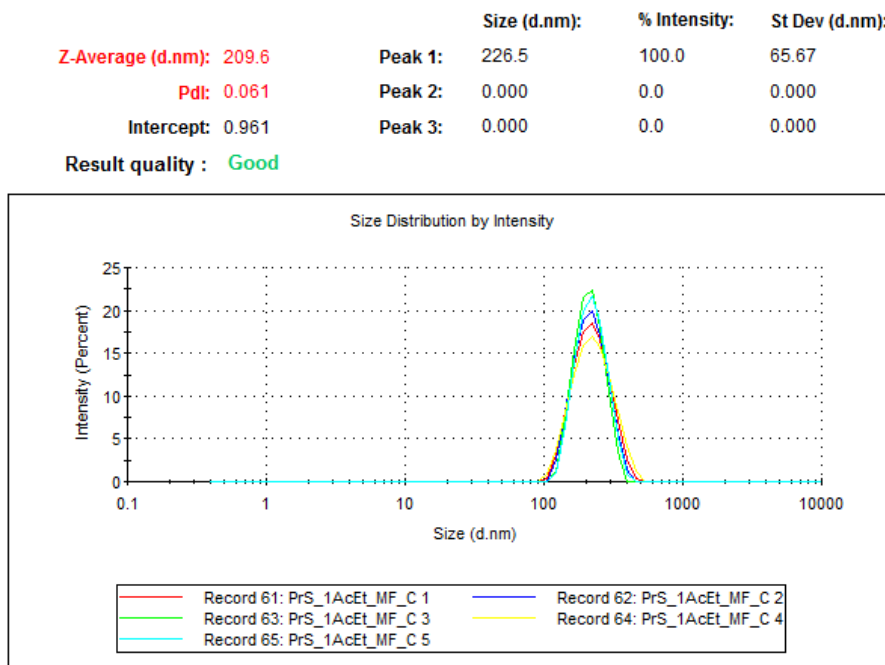
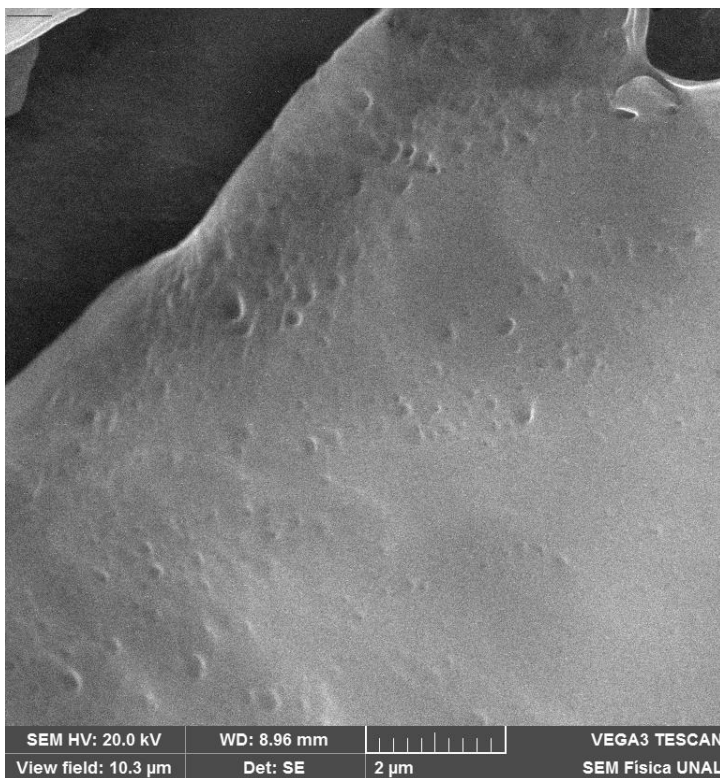


Figura 4.12 Microfotografía de los NLC liofilizados (PrJB\_EtAc\_NLC) y rodeados por la matriz polimérica.



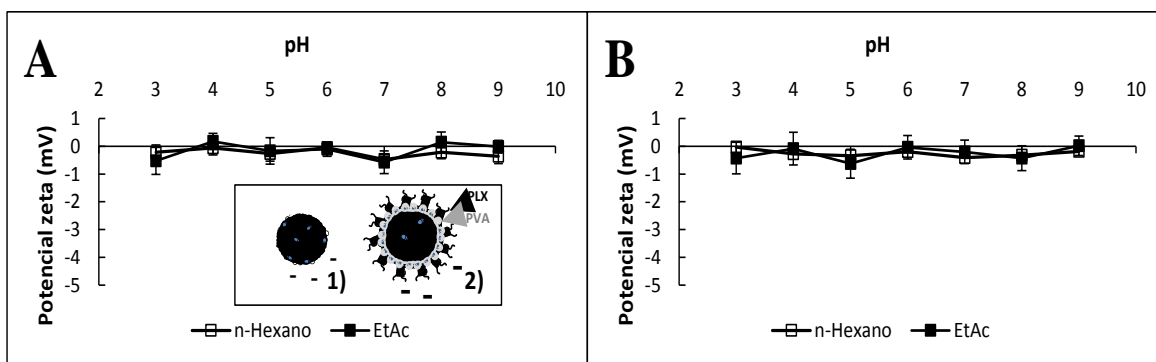
### Otros ensayos de caracterización de las partículas lipídicas.

En adición a las propiedades de tamaño y la forma de las partículas lipídicas, éstas fueron caracterizadas respecto a su potencial zeta y estabilidad. Igualmente se investigaron posibles modificaciones respecto a los lípidos de partida empleando técnicas como DSC, XRD, espectroscopía IR y  $^1\text{H}$  NMR.

#### ▪ Potencial zeta.

El potencial zeta de las partículas lipídicas preparadas a partir del material extraído de propóleos es menor a  $\pm 2$  mV y no es afectado por el pH del medio en el que se realiza la lectura (Figura 4.13). Teniendo en cuenta que los materiales extraídos a partir del propóleos incluyen las ceras, *i.e.*, ésteres de ácidos grasos con alcoholes de peso molecular elevado, es previsible que se encuentren residuales de ácidos grasos libres y alcoholes (Tulloch, 1970). Igualmente, el lípido líquido CCT puede contener impurezas de carácter ácido (por ejemplo, los requerimientos de calidad establecidos por la Farmacopea Americana definen un valor límite de 0.2 mg de KOH por g de muestra). Sobre esta base se esperaría que las partículas lipídicas obtenidas en este estudio exhibieran un valor de potencial zeta más negativo a causa de la ionización de los grupos ácidos ubicados en superficie.

Figura 4.13 Comportamiento del potencial zeta de partículas lipídicas a base de propóleos en función del pH, según sean preparadas utilizando el material extraído en los solventes orgánicos n-hexano o EtAc. A) PrS\_EtAc\_NLC; B) PrJB\_EtAc\_NLC. En el recuadro se ilustra la posible estructura de la partícula: 1) Partícula lipídica sin agente estabilizante; 2) Partícula lipídica con agentes estabilizantes.



Una explicación al bajo valor de potencial zeta obtenido podría presentarse en términos de los hallazgos de Crespo Rodríguez (2015), a partir de los cuales se sugiere que en las dispersiones preparadas, los polímeros no iónicos (PLX y PVA) ejercen un mecanismo de estabilización estérica (Lourenco et al., 1996; Napper, 1969). Así, la aproximación de unas a otras genera repulsión debido a que las interacciones solvente - segmento del polímero son más favorables que las interacciones segmento - segmento (Hunter, 2002), produciendo una solvatación efectiva de las cadenas poliméricas que rodean la partícula. De hecho, se ha reportado que el PLX se adsorbe en la superficie de la partícula considerando la posible afinidad de su bloque central de polioxipropileno con los lípidos; los bloques hidrofílicos de polioxietileno permanecen en la fase acuosa estabilizando el sistema por repulsión estérica (Musoke y Luckham, 2004). Por otro lado, considerando el tamaño de la unidad monomérica del PVA, éste podría interactuar con los lípidos ubicándose tanto en la superficie como en el interior de las partículas, ejerciendo igualmente un efecto estérico (Rosenblatt y Bunjes, 2009).

Para verificar lo anterior, se realizó un ensayo de agregación inducida de las partículas obteniendo una concentración crítica de agregación de 0.7 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , coincidiendo con resultados previos del mismo grupo de investigación (Crespo Rodríguez, 2015). Una vez agregadas las partículas es imposible su redispersión, siendo traslúcida la fase dispersante (Figura 4.14). Este fenómeno puede ser explicado a través del *punto zeta* (*punto  $\theta$* ) de las soluciones poliméricas, que representa la situación en la cual las cadenas del polímero exhiben muy poca o ninguna interacción (las fuerzas de atracción y repulsión se balancean), de modo que se interpenetran cuando se aproximan (Hunter, 2002). El punto  $\theta$  se alcanzó en este caso por la adición de una elevada concentración de sales (aunque también podría ser inducido por temperatura o por la adición de la mezcla dos solventes miscibles con diferentes afinidades por el polímero), haciendo que la barrera polimérica pierda su efectividad completamente.

- *Estabilidad de las dispersiones líquidas de partículas.*

El bajo potencial zeta de las partículas lipídicas sugiere eventuales problemas de inestabilidad de sus dispersiones. Por tal razón, las dispersiones de partículas obtenidas



según las condiciones propuestas sobre la base del diseño estadístico experimental y utilizando material extraído tanto con EtAc como con n-hexano, fueron evaluadas respecto a su estabilidad a temperatura de laboratorio  $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Como se observa en la Figura 4.15, las variaciones del diámetro hidrodinámico de las partículas en función del tiempo no superan los 40 nm, lo que en la práctica del trabajo con sistemas nanoparticulados no se considera significativo. Del mismo modo, se determinó el potencial zeta de las dispersiones sin detectar evidencias de cambios en este parámetro.

Figura 4.14 Comportamiento de las dispersiones PrJB\_EtAc\_NLC frente a diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (M).



- *Calorimetría diferencial de barrido.*

Para la caracterización por DSC, las dispersiones de partículas fueron liofilizadas. En todos los casos se encontró que el intervalo de fusión se desplaza hacia temperaturas más bajas (Figura 4.16) respecto al material de partida (Figura 4.4); tal disminución se debe a que en la formulación existe una mezcla de sustancias, es decir, además del material extraído, están presentes el CCT y los agentes estabilizantes. La Tabla 4.6 resume los hallazgos para los diferentes sistemas NLC preparados y libres de disolventes. Es pertinente mencionar que la presencia de CCT provoca que la estructura cristalina del material lipídico extraído del propóleos se vea modificada y en consecuencia se disminuyan los intervalos de fusión y solidificación (Figura 4.17). En general, la cristalización de los triacil glicerolos es afectada por factores como la temperatura, su composición, la presencia concomitante de otros lípidos y aditivos, y el tratamiento mecánico previo que reciban (*e.g.* agitación, esfuerzos cortantes); existiendo evidencia que demuestra que tras la adición de CCT se modifica el perfil térmico de sistemas lipídicos

(Pattarino et al., 2014). En adición, el trabajo de Jennings et al. (2000) evidencia que al incrementar la concentración de CCT en las nanopartículas lipídicas, se disminuye el rango de fusión en relación directa con la cantidad presente en la formulación. Igualmente, la presencia de los polímeros (PLX y PVA) dentro de la formulación, tendrán influencia en el comportamiento térmico de los sistemas particulados.

Figura 4.15 Comportamiento del tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad de dispersiones acuosas de partículas lipídicas (PrS\_EtAc\_NLC, PrJB\_EtAc\_NLC) sometidas a dos condiciones de temperatura:  $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

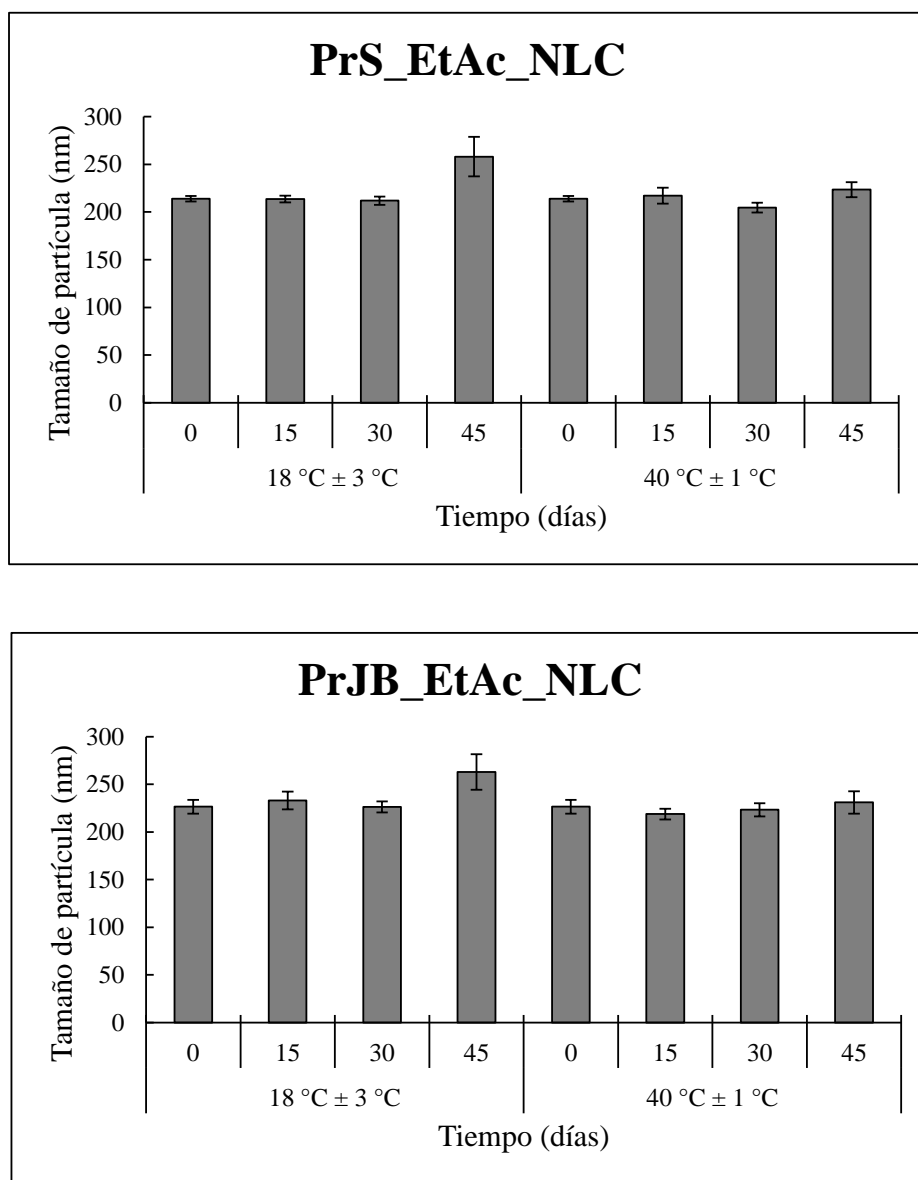


Figura 4.16 Termogramas DSC de los NLC preparados a partir del material extraído con EtAc de los dos tipos de propóleos.

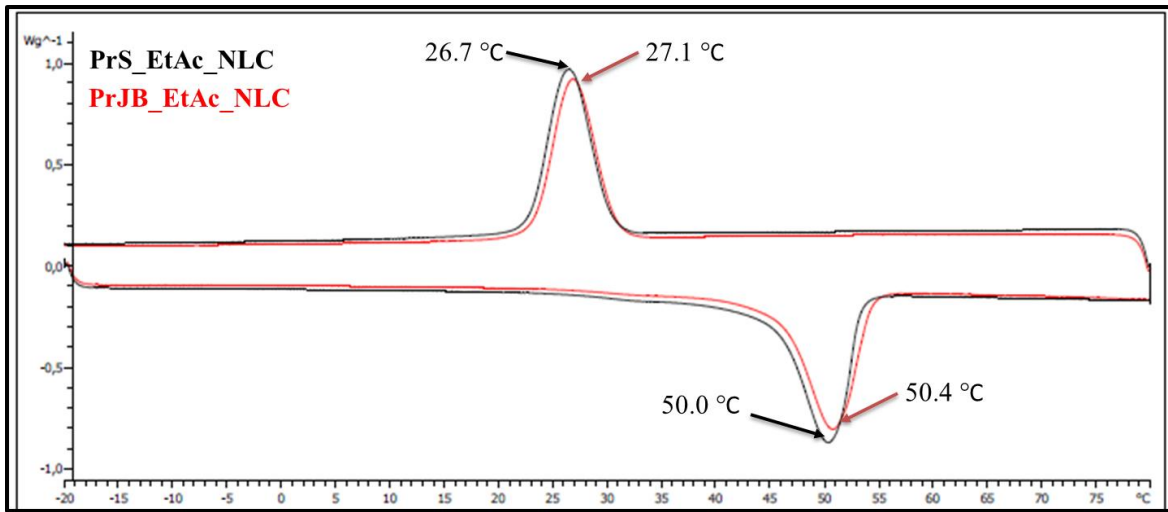


Tabla 4.6 Resultados del análisis por DSC de los NLC preparados.

NLC	Rango de fusión				Rango de cristalización			
	Inicio (°C)	Pico fusión (°C)	Final (°C)	$\Delta H$ de fusión (J/g)	Inicio (°C)	Pico cristaliz. (°C)	Final (°C)	$\Delta H$ de cristaliz (J/g)
PrS_H_NLC	46.0	49.6	52.1	55.8	27.2	24.0	20.2	-51.1
PrS_EtAc_NLC	45.3	50.0	53.2	51,6	30.4	26.7	22.9	-46.3
PrJB_H_NLC	44.1	49.2	53.2	51.2	29.7	25.7	21.9	-49.7
PrJB_EtAc_NLC	45.7	50.4	54.2	52.2	30.8	27.2	23.4	-44.4

▪ *Difracción de rayos X.*

Como se observa en los difractogramas presentados en la Figura 4.18, las muestras liofilizadas conservan regiones cristalinas, tal como se evidenció para el material de partida (Figura 4.5). Sin embargo, los comportamientos observados no son completamente equivalentes. Las señales  $2\theta$  en  $16.9^\circ$  y  $15.4^\circ$  del material lipídico extraído con n-hexano a partir de PrS y PrJB, respectivamente, desaparecen en los difractogramas de los NLC. Es importante tener en cuenta que además de los lípidos, la cristalinidad de los polímeros utilizados como agentes estabilizantes tiene implicaciones en el resultado; lo que se puede

inferir de la estructura cristalina que poseen tanto PLX (Ramadhani et al., 2014) como PVA (Bunn, 1948; Tretinnikov y Zagorskaya, 2012), y de los trabajos que exponen su influencia en la cristalinidad en diferentes preparaciones, tales como hidrogeles (Hassan y Peppas, 2000) y nanosistemas (Malaki Nik et al., 2012; Malamatarí et al., 2015).

Figura 4.17 Comportamiento térmico (DSC) del material extraído del propóleo por el método Randall (PrS\_EtAc\_R y PrJB\_H\_R) y su modificación frente a la adición de CCT.

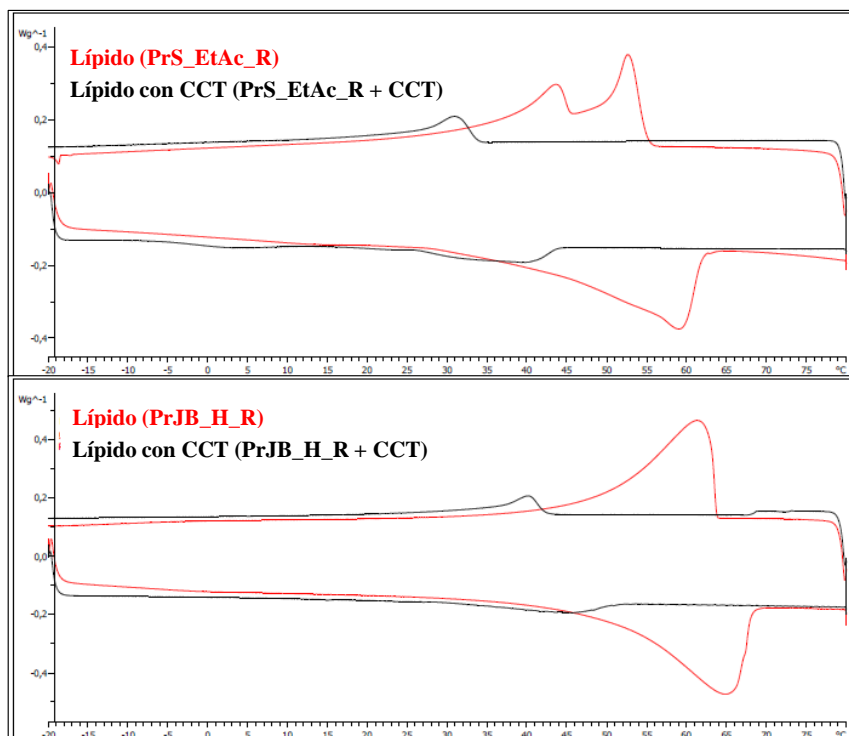
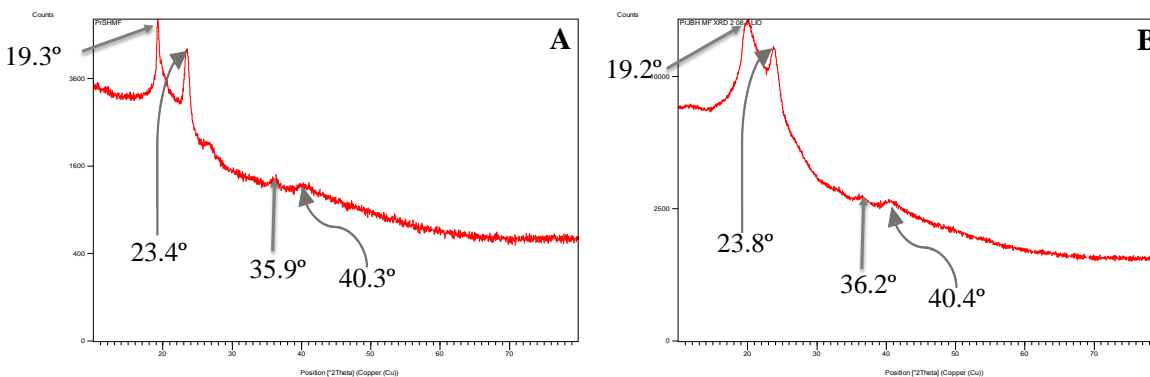


Figura 4.18 Difracción de rayos X (XRD) de los NLC preparados a partir del material extraído por el método Randall con n-hexano. A) PrS\_H\_NLC. B) PrJB\_H\_NLC.



- *Espectroscopía infrarrojo.*

Al comparar los espectros al infrarrojo obtenidos para las dispersiones NLC liofilizadas (Figura 4.19) con aquellos del material extraído utilizado en su preparación (Figura 4.6), se encuentra que las señales son menos intensas en los primeros, probablemente porque en los transportadores lipídicos, los lípidos se encuentran diluidos en una elevada proporción de agente estabilizante (lípidos – polímeros en una relación 1:9). Dentro de las señales se destaca la presente entre la región de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $2840\text{ cm}^{-1}$ , que es característica para las vibraciones de estiramiento del enlace C-H. Del mismo modo, la banda cercana a  $1465\text{ cm}^{-1}$  es común para las vibraciones de flexión de tijereteo C-H de los grupos metileno. La absorción débil del estiramiento C=C de alquenos no conjugados aparece de  $1667\text{ cm}^{-1}$  a  $1640\text{ cm}^{-1}$  en los liofilizados analizados. Paralelamente se conservan señales claves como la banda ancha entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  y  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a vibraciones de estiramiento O-H, y la absorción fuerte en  $1735\text{ cm}^{-1}$  que se puede relacionar con grupos carboxilo pertenecientes a ésteres (Silverstein et al., 2005). Las señales de los polímeros estabilizantes presentes en la formulación se hacen visibles en los espectros tomados. Ejemplo de ello es la banda de intensidad fuerte que aparece cercana a  $1110\text{ cm}^{-1}$ , la que se puede asociar con el enlace C-O de alcoholes y éteres alifáticos (Silverstein et al., 2005). Así como las bandas en  $840\text{ cm}^{-1}$  y  $948\text{ cm}^{-1}$  que aparecen en el espectro del PLX.

- *Resonancia Magnética Nuclear.*

Los espectros  $^1\text{H}$  NMR presentados en la Figura 4.20 muestran que los NLC preparados tienen diferentes tipos de hidrógenos según el material de partida utilizado para su elaboración. Al comparar frente a los lípidos extraídos inicialmente (Figura 4.7 y Figura 4.21), el número de picos en las partículas lipídicas es menor para ambos casos; lo que puede ser atribuido al procedimiento para la preparación de los NLC, donde el material lipídico se disuelve en EtAc saturado con agua y se filtra para tener una solución translúcida. Nuevamente se encuentra una región predominante alifática acíclica de protones del tipo R-CH<sub>3</sub>, R-CH<sub>2</sub>-R y R<sub>3</sub>-CH para un  $\delta_{\text{H}}$  entre 0.5 ppm y 2.0 ppm. En la región comprendida entre 2.0 ppm y 2.5 ppm se pueden encontrar protones vecinos a

dobles enlaces  $-\text{CH}_2\text{-C}=\text{C}$ ; grupos aldehído  $\text{CH}_3\text{-C(=O)H}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-C(=O)H}$ ,  $-\text{CH-C(=O)H}$ ; grupos ácidos  $\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-C(=O)OH}$ ,  $-\text{CH-C(=O)OH}$  y grupos ésteres  $\text{CH}_3\text{-C(=O)OR}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-C(=O)OR}$ ,  $-\text{CH-C(=O)OR}$ . Sin embargo, de estos últimos, se descarta la presencia de grupos ácido y aldehído, porque no aparecen las señales características para los hidrógenos  $\text{R-C(=O)H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ : 9.0 ppm – 10.0 ppm) y  $\text{R-C(=O)OH}$  ( $\delta_{\text{H}}$ : 11.0 ppm – 12.0 ppm). En cuanto a los protones de compuestos aromáticos y heteroatómicos de los NLC preparados a partir de PrS\_EtAc\_R, se puede afirmar que el número e intensidad de señales de los hidrógenos son mayores respecto a los presentes en los sistemas NLC elaborados con PrJB\_EtAc\_R ( $\delta_{\text{H}}$ : 6.0-9.0 ppm) (Pavia et al., 2005; Silverstein et al., 2005).

Figura 4.19 Espectros de infrarrojo (KBr) de los NLC preparados a partir de material extraído del propóleo. NLC preparados a partir del material extraído con n-hexano: en gris PrS\_H\_NLC, en verde PrJB\_H\_NLC. NLC preparados a partir del material extraído con EtAc: en negro PrS\_EtAc\_NLC, en rojo PrJB\_EtAc\_NLC.

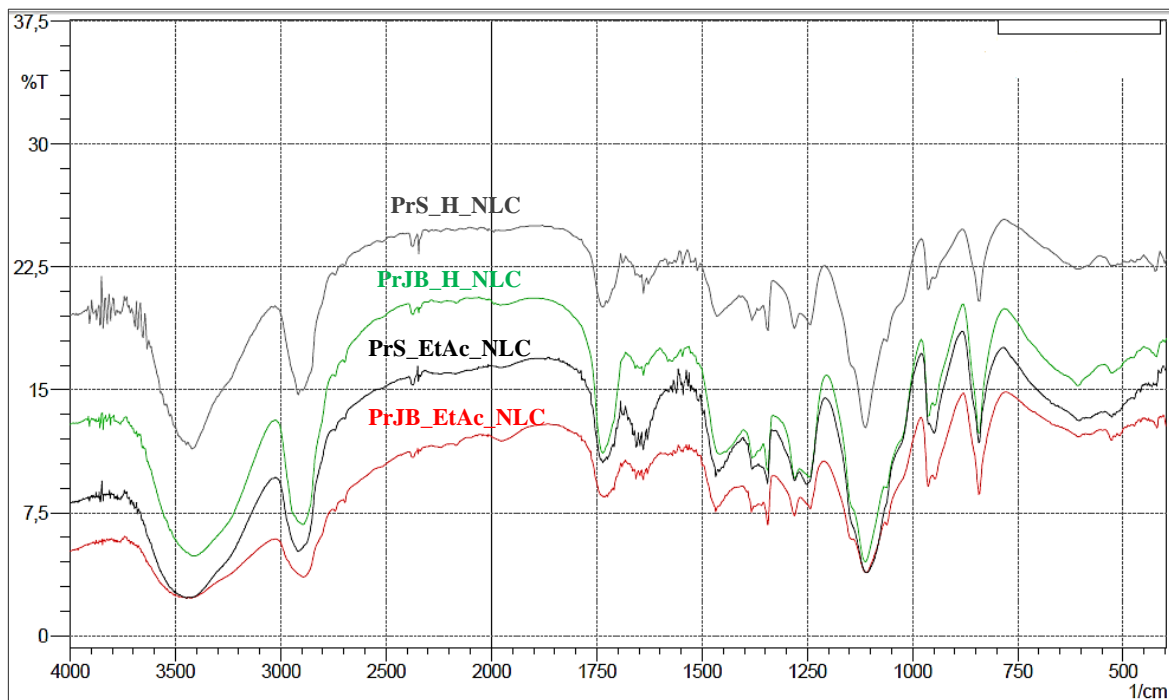
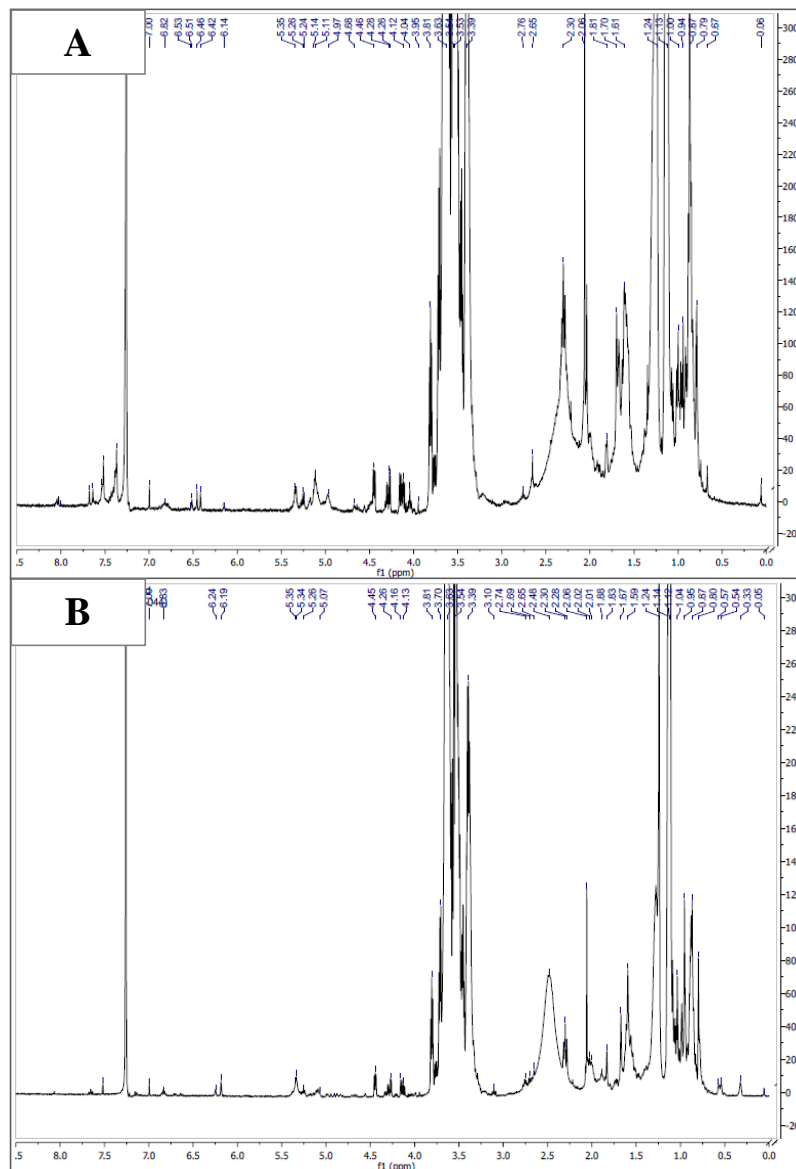


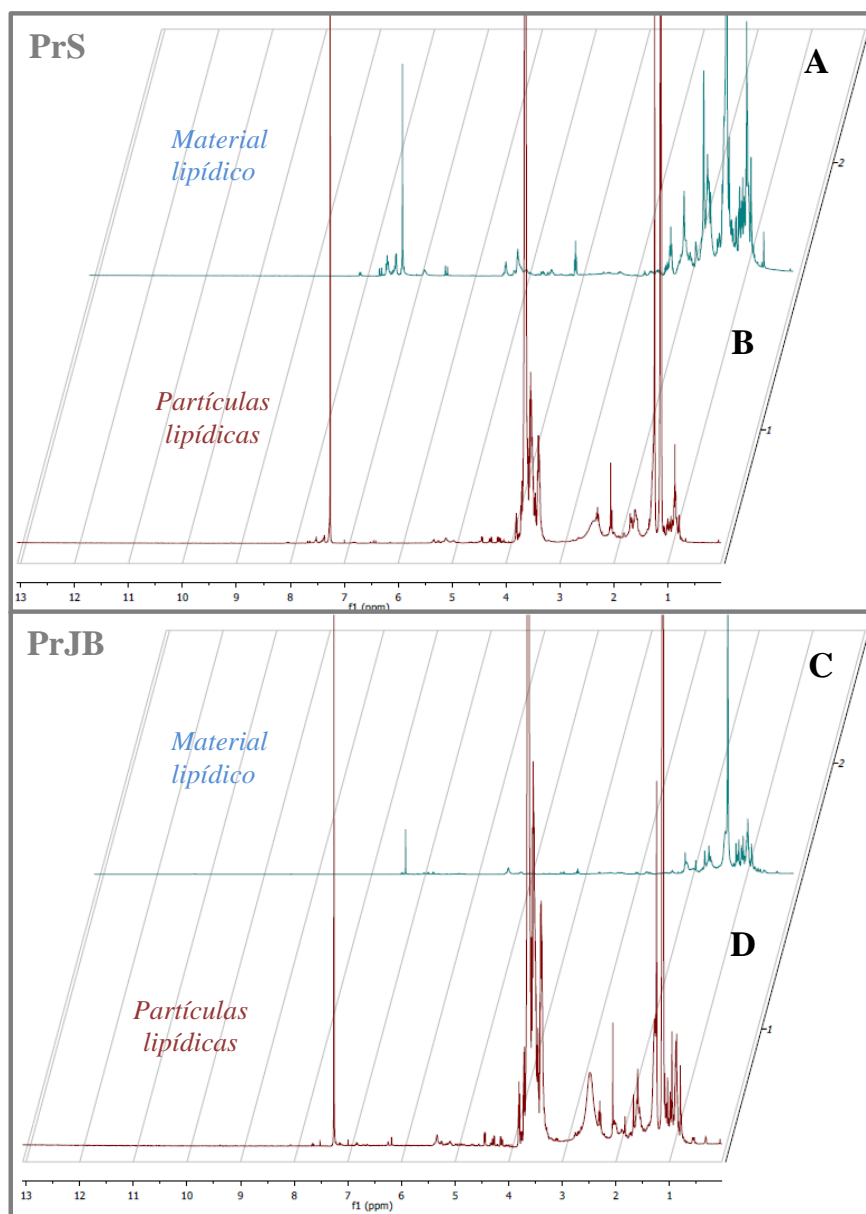
Figura 4.20 Espectros  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para los NLC liofilizados preparados a partir del material extraído del propóleos con EtAc: **A)** PrS\_EtAc\_NLC; **B)** PrJB\_EtAc\_NLC.



Finalmente, conviene hacer énfasis en el aumento de la intensidad (en ambos casos) de la señal en 3.63 ppm, respecto al material lipídico inicial (Figura 4.21). Dicha señal, podría ser un componente diferente de lo extraído del propóleos y que esté presente en la formulación de los NLC. Las señales en 3.5 ppm y 3.8 ppm se pueden atribuir a señales de hidrógenos de carbonos unidos a oxígeno, como los que se pueden encontrar en éteres, ésteres o unidos a un hidroxilo; en la muestra los primeros están presentes en el PLX y los últimos en el PVA. Referente al PVA, el trabajo de Petit y Zhu (1996) en soluciones de

PVA en agua deuterada ( $D_2O$ ), indica que en 3.9 ppm - 4.1 ppm existe una señal ancha que corresponde al **CH**, mientras que en un  $\delta_H$  cercano a 3.7 ppm se puede ubicar el hidroxilo. Igualmente, para el PLX se ha reportado que existe una señal alrededor de 3.7 ppm que se debe principalmente a los **CH<sub>2</sub>** y **CH** presentes en los tres monómeros del polímero (Forshed et al., 2005; Oxford-Instruments, 2013).

Figura 4.21 Comparación de los espectros  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ) para los NLC liofilizados preparados (B, D) respecto del material lipídico extraído (A, C). Donde: **A)** PrS\_EtAc\_R; **B)** PrS\_EtAc\_NLC; **C)** PrJB\_EtAc\_R; **D)** PrJB\_EtAc\_NLC.





- *Evaluación de la citotoxicidad in vitro de las partículas lipídicas.*

La mayoría de estudios de viabilidad celular en formulaciones de SLN y NLC se llevan a cabo con el ensayo de MTT. Sin embargo, el ensayo de captación de colorante rojo neutro es complementario al llevado a cabo con la sal de tetrazolio. De tal forma, en la práctica con frecuencia ambos métodos son usados simultáneamente, porque el principio en el que se fundamenta cada uno es diferente (Doktorovova et al., 2014). Así, el MTT es convertido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a formazán en células metabólicamente activas (Mosmann, 1983), mientras que el rojo neutro se acumula en los lisosomas de las células vivas (Repetto et al., 2008).

Tabla 4.7 Resultados de los ensayos de citotoxicidad de las dispersiones de partículas lipídicas preparadas.

Citotoxicidad en fibroblastos 3T3/Balb-c (Captación del colorante rojo neutro)				
<i>Muestra</i>	<i>Concentración empleada</i>	<i>HTD (ppm)</i>	<i>EC<sub>90</sub> (ppm)</i>	<i>Concepto final</i>
PrS_EtAc_NLC	Ocho concentraciones diferentes de 50 ppm - 2000 ppm.	> 2000	> 2000	Irritante mínimo
PrJB_EtAc_NLC		> 2000	> 2000	Irritante mínimo

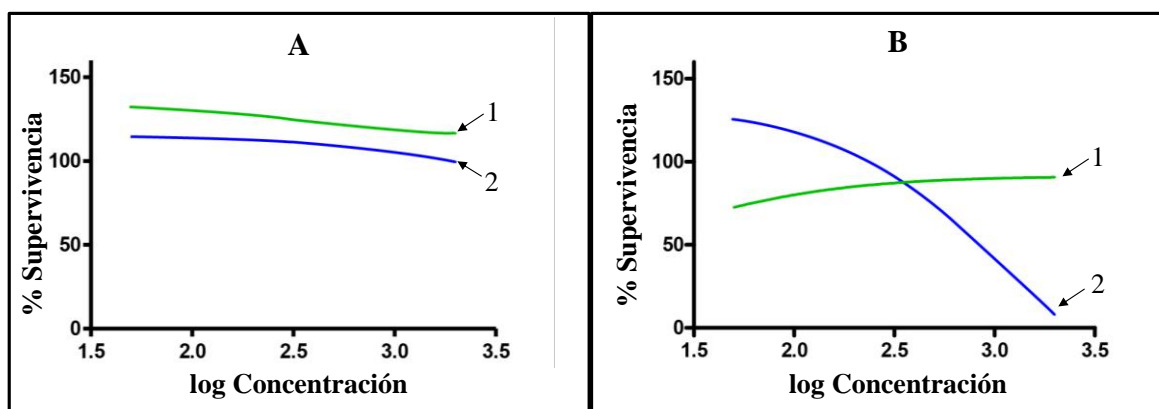
  

Citotoxicidad en queratinocitos humanos (Reducción metabólica de MTT)			
<i>Muestra</i>	<i>Concentración empleada</i>	<i>EC<sub>50</sub> (ppm)</i>	<i>EC<sub>90</sub> (ppm)</i>
PrS_EtAc_NLC	Ocho concentraciones diferentes de 50 ppm - 2000 ppm.	839.5	324.3
PrJB_EtAc_NLC		2000.3	272.3

En la presente investigación se ejecutaron las pruebas de seguridad de los NLC preparados a partir de material extraído del propóleos empleando EtAc, en las líneas celulares de fibroblastos murinos 3T3/Balb-c y queratinocitos humanos, lo que permitió evaluar su posible actividad citotóxica. Los resultados presentados en la Tabla 4.7 y en la Figura 4.22 evidencian que ninguna de las muestras evaluadas tienen efecto tóxico sobre la línea de fibroblastos murinos 3T3/Balb-c. Paralelamente, si bien la citotoxicidad sobre queratinocitos humanos fue mayor para PrS\_EtAc\_NLC que para PrJB\_EtAc\_NLC, en

ambos casos se puede catalogar como no significativamente fuerte (menor a 250 ppm) y permite su empleo en la formulación de productos destinados a aplicación tópica. No obstante, se debe tener precaución con la concentración utilizada, para evitar eventuales riesgos en la seguridad del producto.

Figura 4.22 Curvas de supervivencia de las líneas celulares frente a la concentración de las dispersiones lipídicas evaluadas. **A)** Línea celular fibroblastos 3T3/Balb-c (captación de colorante rojo neutro). **B)** Línea celular queratinocitos epidérmicos humanos (reducción metabólica de MTT). En verde (1): PrJB\_EtAc\_NLC. En azul (2): PrS\_EtAc\_NLC.



#### 4.4 Evaluación del atrapamiento de aceite del árbol de té en NLC a base de material extraído del propóleo

Con el propósito de verificar la posible aplicación de las partículas lipídicas obtenidas a partir del propóleo como transportadores de activos de interés farmacéutico o cosmético, se investigó la incorporación del TTO, un reconocido agente antifúngico y antibacterial (Carson et al., 2006). Inicialmente se ensayó la adición del aceite a la fase orgánica de la preparación de NLC: 40 mg, 50 mg y 80 mg de TTO. A las dispersiones obtenidas (PrS\_H\_NLC\_TTO) sin concentrar se les midió el tamaño de partícula, siendo éste  $188 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ ,  $188 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$  y  $194 \pm 3 \text{ nm}$ , respectivamente (todas con un PDI menor a 0.1).

Posteriormente, las dispersiones de partículas fueron concentradas por destilación a presión reducida, se tomaron 2 mL del concentrado y se extrajeron con 1 mL de n-hexano y cloroformo (1:1). El seguimiento preliminar del TTO se realizó por TLC, eluyendo las fases orgánicas obtenidas en la extracción, en cloroformo-EtAc (70:30) y revelando con Godin. En los resultados no se evidenciaron señales del atrapamiento del TTO. Esto planteó dos posibilidades, o el TTO se había evaporado durante el proceso de concentración de la muestra, o se encontraba haciendo parte de los NLC formados.

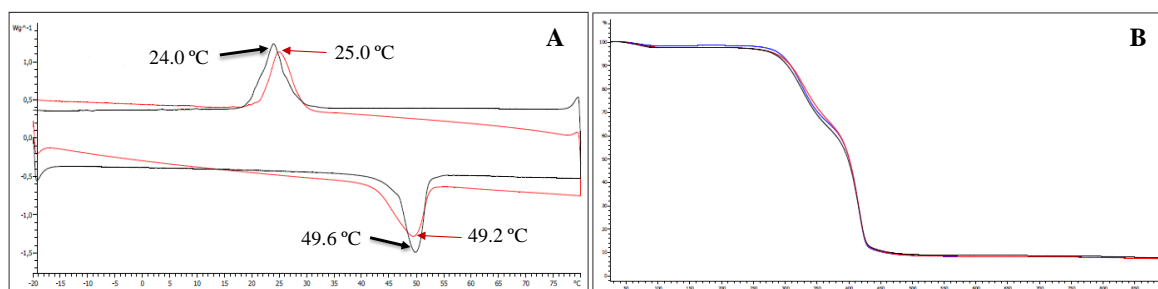
Considerando los resultados anteriores y con el propósito de verificar si el TTO había sido incorporado en la estructura de los NLC, las dispersiones concentradas de las partículas fueron secadas a  $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , se reconstituyeron de nuevo en EtAc y se analizaron por TLC. Como blanco se siguió el mismo procedimiento para dispersiones concentradas de partículas a las que no se les había incorporado el aceite. No obstante, en este caso, las señales evidenciadas en TLC no fueron contundentes.

Sobre esta base, se procedió a emplear otras técnicas de análisis para detectar la presencia del aceite, al menos indirectamente. Por esta razón, las dispersiones de partículas que previamente se habían secado se analizaron por DSC y TGA (Figura 4.23). Los resultados no revelaron diferencias entre las partículas blanco y las que contenían el aceite, ni por la técnica DSC (Figura 4.23 A) ni por TGA (Figura 4.23 B). En esta última, las curvas de las tres muestras siguen el mismo comportamiento de descomposición (note los termogramas superpuestos). Un acercamiento para la cuantificación del primer paso de pérdida de masa ( $25\text{ °C} - 200\text{ °C}$ ), muestra que PrS\_H\_NLC\_TTO presenta un descenso del 1.77 % respecto a su masa inicial, frente a un 2.56 % de pérdida calculado para PrS\_H\_NLC. Estos resultados no permiten confirmar la presencia del TTO, porque el porcentaje de pérdida es mayor para la preparación de partículas blanco que para aquellas con inclusión de aceite. Esto se atribuye a un error experimental, donde el método no logró distinguir entre una y otra formulación. Del mismo modo, queda abierta la posibilidad que si se había incluido algo del TTO, se hubiese perdido por evaporación.

Teniendo en cuenta que los resultados anteriores sugieren la no incorporación del TTO en las partículas, se llevaron algunas modificaciones al procedimiento de preparación por la

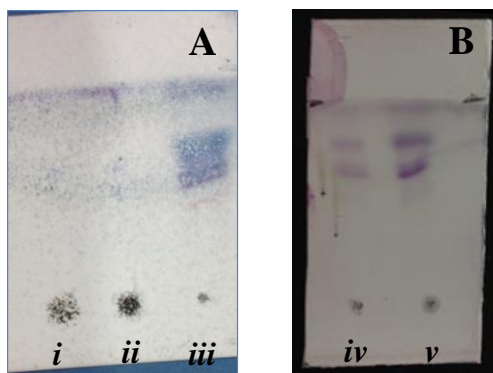
técnica de emulsificación-difusión, específicamente en lo correspondiente a la preparación de la fase orgánica. En este sentido, se disolvió el TTO en el CCT, logrando una concentración del activo al 32 % p/p. De esta mezcla se añadieron 15 mg a la fase orgánica filtrada (compuesta por el material extraído del propóleo disuelto en EtAc saturado con agua) y se homogenizó en vórtex. La fase orgánica conteniendo el TTO fue empleada para la preparación de las partículas, siguiendo el procedimiento ya descrito. Igualmente se prepararon partículas blanco utilizando este procedimiento y se obtuvieron tamaños de partícula similares a los obtenidos para las partículas preparadas por el método convencional [partículas blanco:  $198 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ ,  $\text{PDI} < 0.1$ ; partículas con TTO al 32% (15 mg):  $219 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ ,  $\text{PDI} < 0.1$ ].

Figura 4.23 Termogramas DSC y TGA de NLC secos para verificar la incorporación de TTO. **A)** DSC. En negro PrS\_H\_NLC y en rojo PrS\_H\_NLC\_TTO (formulación con 50 mg de TTO iniciales). **B)** TGA. En negro PrS\_H\_NLC, en rojo PrS\_EtAc\_NLC y en azul PrS\_H\_NLC\_TTO (formulación con 50 mg de TTO iniciales).



Una vez preparadas las dispersiones de partículas (PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15), éstas fueron extraídas con 50 mL de EtAc, el que se añadió en porciones de 10 mL al embudo de decantación que contenía el material a extraer. Se permitió la separación de las fases, y se recolectaron tres fracciones (acuosa, interfase y orgánica). La Figura 4.24 muestra que la fracción orgánica de las partículas conteniendo TTO presenta señales de color más intensas que aquellas que se tomaron como blanco. Aunque esta prueba no es concluyente, sugiere que posiblemente una fracción del TTO no se incorporó en la estructura de los NLC formados por lo que extrae con mayor facilidad.

Figura 4.24 TLC de fracciones extraídas de dispersiones de partículas con y sin inclusión de TTO. Fase móvil cloroformo. Revelador Godin. **A)** Cromatofolio de las fracciones una vez extraídas de la muestra con inclusión de TTO denominada PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15, donde: i) Fracción acuosa; ii) Interfase de las fracciones; iii) Fracción de EtAc. **B)** Cromatofolio de las fracciones de EtAc de las dispersiones de partículas: iv) Blanco PrJB\_H\_NLC (sin inclusión de TTO); v) PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15 (con inclusión de TTO).



Adicional a la modificación del procedimiento para la preparación de la fase orgánica, en un segundo experimento se ensayó la liofilización de las dispersiones de partículas en vez de su destilación a presión reducida, esto para evitar que el TTO se perdiese por exposición prolongada a las condiciones de la destilación. Para la aplicación de las muestras, se adicionaron 2 mL de diclorometano sobre el liofilizado y se sometieron a ultrasonido durante 30 min. Los resultados de la observación al ultravioleta y al revelar con anisaldehído - ácido sulfúrico (Figura 4.25), detectan terpenoides y fenilpropanoides (Wagner y Bladt, 2001) presentes en la composición tanto del propóleo como del TTO. Como se observa, la formulación con TTO que incorpora aceite es notablemente diferente de las partículas blanco. Sin embargo, por medio de esta técnica no fue posible confirmar la incorporación de TTO, debido posiblemente a la baja concentración utilizada y a la similitud en la polaridad de tanto los componentes del TTO como del material lipídico empleado para la preparación de las partículas, evidenciándose en los perfiles de elución mostrados.

De otro lado, los resultados de espectroscopía IR sugieren el atrapamiento del TTO. Como se observa en la Figura 4.26, la intensidad de la señal en  $2345\text{ cm}^{-1}$  incrementa de forma importante en el espectro de las partículas conteniendo aceite y esta misma señal se

encuentra presente en el espectro del aceite puro. Como una prueba adicional para corroborar este hallazgo, las partículas liofilizadas fueron analizadas por DSC (Figura 4.27). Los resultados evidencian una diferencia en el comportamiento de las partículas liofilizadas con inclusión de té PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15, respecto al de las partículas blanco, específicamente una disminución del máximo de fusión, lo que se considera una prueba que permite inferir que posiblemente el TTO fue incorporado en la estructura de la partícula, explicando las diferencias observadas en los termogramas.

Figura 4.25 Cromatofolios de partículas liofilizadas conteniendo TTO (PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15) usando dos fases móviles. **A)** Cromatofolios vistos a 365 nm antes de revelar. **B)** Cromatofolios revelados con anisaldehído - ácido sulfúrico. En letras minúsculas: **a)** Material extraído en n-hexano (PrJB\_H\_R); **b)** Formulación prototipo liofilizada sin inclusión de TTO (PrJB\_H\_NLC); **c)** Formulación con inclusión de TTO (PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15); **d)** TTO.

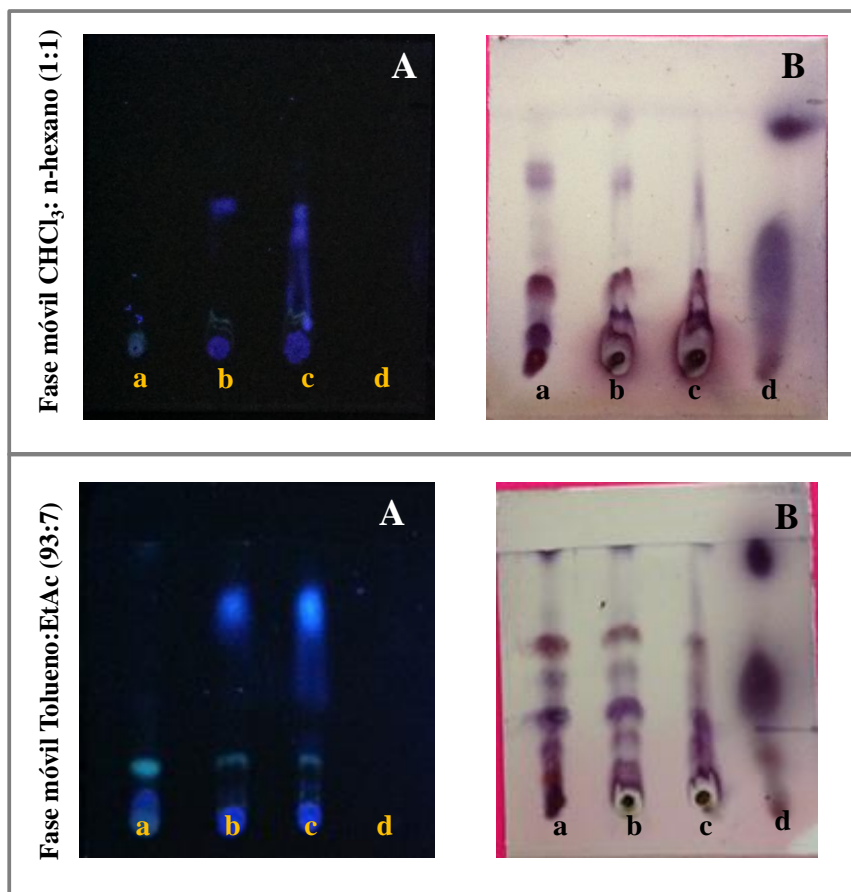


Figura 4.26 Infrarrojo de PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15 y su blanco. A) Espectros IR de partículas lipídicas liofilizadas. Arriba: conteniendo aceite del árbol de té; abajo: partículas blanco. B) Espectro IR del TTO.

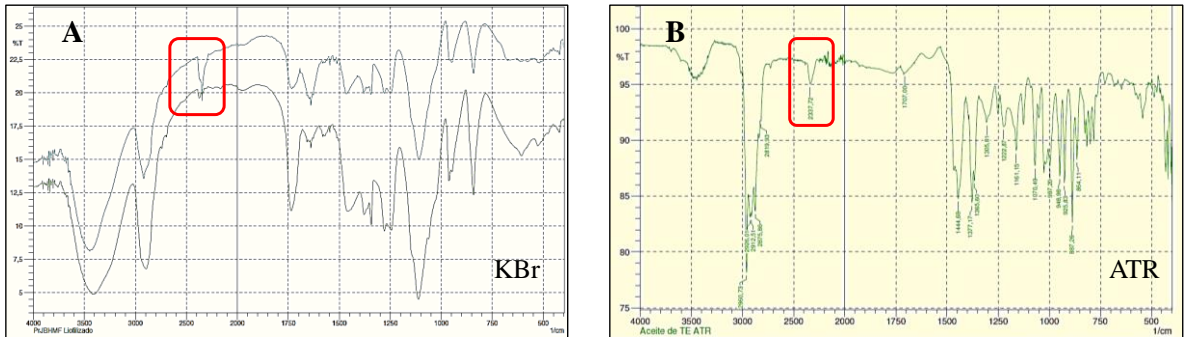
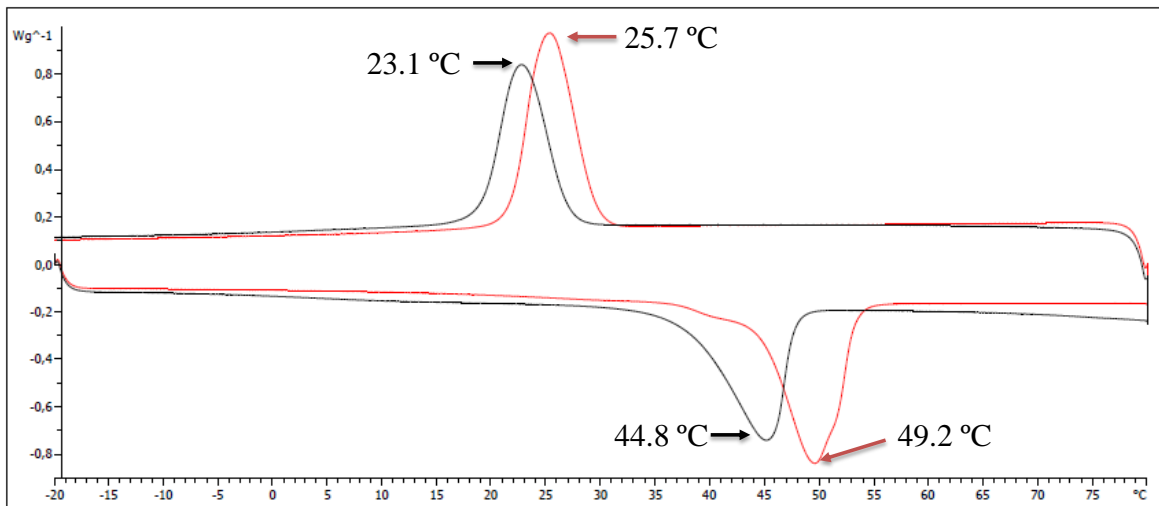


Figura 4.27 Termogramas DSC de partículas liofilizadas con y sin inclusión de TTO. En rojo NLC sin TTO (PrJB\_H\_NLC) y en negro NLC con TTO (PrJB\_H\_NLC\_TTO\_Mix\_15).



Del mismo modo, se realizaron las pruebas de seguridad para las dispersiones de partículas que incluyen TTO en la formulación (Tabla 4.8 y Figura 4.28), empleando como modelos celulares fibroblastos murinos 3T3/Balb-c y queratinocitos epidérmicos humanos. Al comparar estos resultados con los obtenidos para los NLC sin inclusión del aceite (Tabla 4.7 y Figura 4.22), se encontró que las partículas preparadas con TTO (PrS\_EtAc\_NLC\_TTO\_Mix\_15) no provocaron efectos citotóxicos sobre ninguna de las líneas celulares evaluadas. La prueba de citotoxicidad con queratinocitos humanos (reducción metabólica de MTT) proporciona un resultado interesante, porque las partículas

blanco preparadas a partir de PrS\_EtAc\_R y que no tenían incluido TTO en su formulación (Figura 4.22), presentaron una actividad citotóxica mayor que aquellas conteniendo aceite, lo que lleva a suponer que posiblemente el TTO añadido tiene un efecto protector sobre las líneas celulares. Finalmente, estas pruebas de seguridad permitirían que las formulaciones con inclusión de TTO sean utilizadas en la elaboración nuevos productos para aplicación tópica.

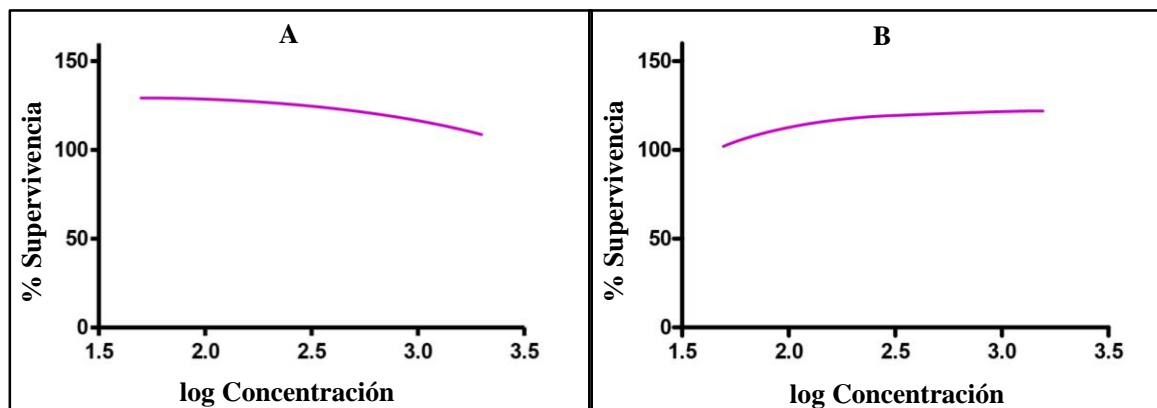
Tabla 4.8 Resultados de los ensayos de citotoxicidad para la dispersión de partículas lipídicas preparadas con inclusión de aceite del árbol de té (PrS\_EtAc\_NLC\_TTO\_Mix\_15).

Citotoxicidad en fibroblastos 3T3/Balb-c (Captación del colorante rojo neutro)				
<i>Muestra</i>	<i>Concentración empleada</i>	<i>HTD (ppm)</i>	<i>NR<sub>90</sub> (ppm)</i>	<i>Concepto final</i>
PrS_EtAc_NLC_TTO_Mix_15	8 concentraciones diferentes de 50 ppm - 2000 ppm.	> 2000	> 2000	Irritante mínimo

Citotoxicidad en queratinocitos humanos (Reducción metabólica de MTT)			
<i>Muestra</i>	<i>Concentración empleada</i>	<i>EC<sub>50</sub> (ppm)</i>	<i>EC<sub>90</sub> (ppm)</i>
PrS_EtAc_NLC_TTO_Mix_15	8 concentraciones diferentes de 50 ppm - 2000 ppm	2000.3	2000.3

Figura 4.28 Curvas de supervivencia de las líneas celulares frente a la concentración de la dispersión lipídica incluyendo aceite del árbol de té (PrS\_EtAc\_NLC\_TTO\_Mix\_15). **A)** Línea celular fibroblastos 3T3/Balb-c. **B)** Línea celular queratinocitos epidérmicos humanos.





## **4.5 Formulación de geles con inclusión de transportadores lipídicos nanoestructurados**

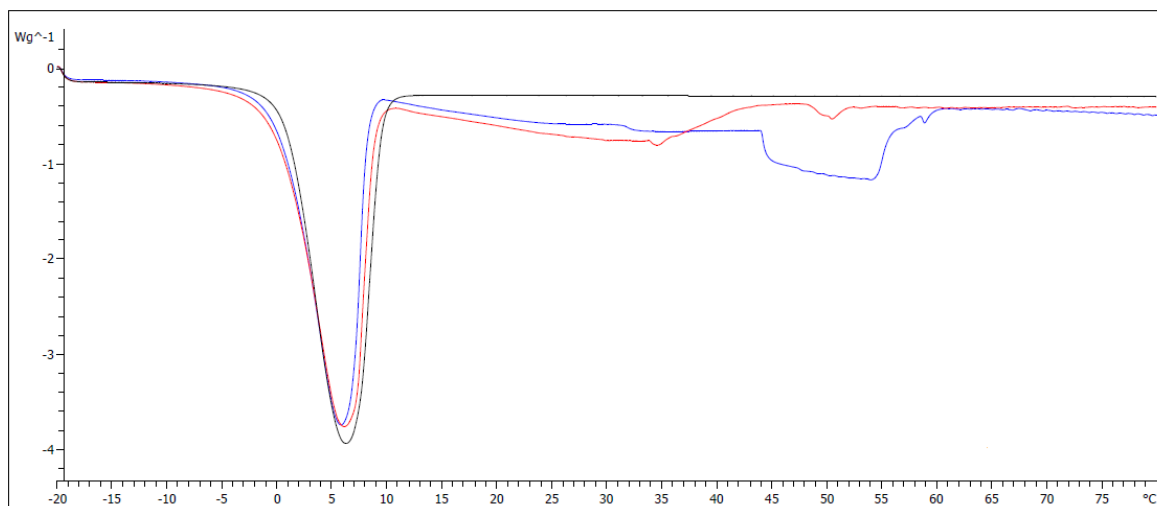
Como se mencionó en el capítulo correspondiente a la parte experimental, es el interés de las investigaciones adelantadas en el grupo de investigación GIDECA, proponer alternativas para el desarrollo de productos innovadores con proyección de transferencia al sector industrial. Para el caso de los desarrollos de sistemas lipídicos, se han realizado aproximaciones para su formulación en emulsiones (Cristancho, 2014; Galeano, 2015). Sin embargo, esta opción no ha resultado exitosa debido a características inherentes a la naturaleza de las partículas lipídicas, tales como su baja densidad, el recubrimiento hidrofílico que le proporciona el agente estabilizante y la baja densidad de carga sobre su superficie; factores que conllevan a fenómenos como la agregación de las partículas y la inestabilización por cremado de la emulsión (Cristancho, 2014).

De acuerdo con esto y aprovechando los avances de Galeano (2015) respecto al desarrollo de geles conteniendo sistemas particulados, se decidió gelificar la fase acuosa en la que se encuentran dispersas las partículas lipídicas, atrapándolas dentro de su estructura. Con este propósito se empleó Vivapur<sup>®</sup> MCG, un agente viscosante y estabilizante compuesto por celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica, que se caracteriza por su ausencia de olor y sabor, su comportamiento tixotrópico y su capacidad para producir dispersiones con apariencia homogénea (JRS PHARMA, 2015).

Los geles obtenidos (al 13.3 % de Vivapur<sup>®</sup>) tuvieron una viscosidad inicial de 12400 cP a 15300 cP. De otro lado, como se observa en la Figura 4.29 correspondiente al termograma de muestras de gel con y sin inclusión de partículas, sometidas a calentamiento desde -20 °C hasta 80 °C, luego del pico de fusión principal del gel existe un fenómeno endotérmico correspondiente a un amplio intervalo de fusión, el que se podría atribuir a la presencia de los nanotransportadores lipídicos incluidos en la formulación, según lo sugieren los trabajos de Dingler et al. (1999) en los que se propone la técnica de DSC como una herramienta para verificar la integridad de los sistemas lipídicos una vez se incorporan en formulaciones tópicas tipo crema O/W. Aplicaciones similares han hecho otros autores para partículas lipídicas incluidas en formulaciones tipo gel, empleando esta técnica para

la caracterización de dichos sistemas (Bikkad et al., 2014; Patel et al., 2012; Teeranachaideekul et al., 2008).

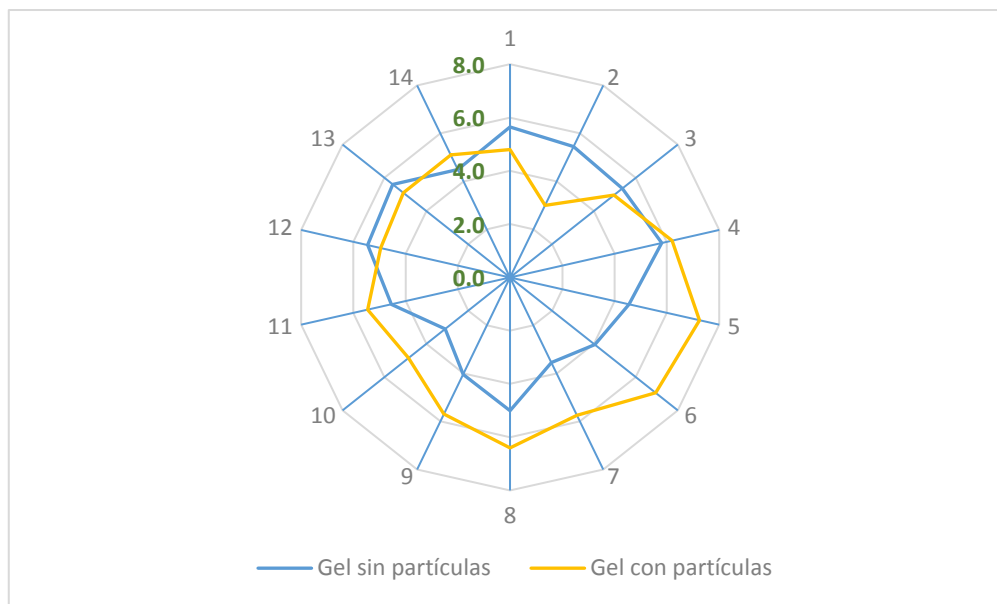
Figura 4.29 Termograma DSC del calentamiento desde  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  de los geles de Vivapur<sup>®</sup> preparados sin y con inclusión de NLC. En negro se observa el gel preparado en agua sin inclusión de cargadores lipídicos, en rojo está el gel preparado a partir de PrS\_EtAc\_NLC y en azul se tiene el gel preparado a partir de PrJB\_EtAc\_NLC.



De otro lado, al evaluar la calidad sensorial de los geles conteniendo o no partículas lipídicas (Figura 4.30), se encontró que una relación de las áreas relativas de 1:1.33 para la formulación sin partículas y para la formulación con partículas, respectivamente. Esto sugiere que la inclusión de los transportadores lipídicos en la formulación no está afectando negativamente las propiedades sensoriales del gel; hecho que es favorable en este incipiente ejercicio de formulación de un producto.

En adición, los geles conteniendo las partículas lipídicas fueron sometidos a una evaluación preliminar de su estabilidad a diferentes condiciones de temperatura en el almacenamiento ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), con el fin de observar durante un mes las posibles modificaciones del aspecto de las muestras. En aquellas formulaciones preparadas con PrJB\_EtAc\_MF y almacenadas a  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a partir del día 14 presentaron una separación de fases no superior al 4 % de la columna total de muestra. Esto indica que aún continúan los fenómenos de inestabilidad, presumiblemente ocasionados por diferencias de densidad entre los cargadores lipídicos y la matriz acuosa.

Figura 4.30 Panel sensorial de geles Vivapur® preparados con y sin inclusión de NLC PrJB\_EtAc\_NLC. Los parámetros evaluados *antes* de la aplicación: **1)** pegajosidad, **2)** olor, **3)** apariencia. *Durante* la aplicación: **4)** sensación de humedad, **5)** esparcimiento, **6)** absorción. *Después* de la aplicación: **7)** brillo, **8)** pegajosidad, **9)** deslizamiento, **10)** sensación de residuo, **11)** suavidad, **12)** sensación de oleosidad, **13)** sensación de grasitud, **14)** sensación de cerosidad.

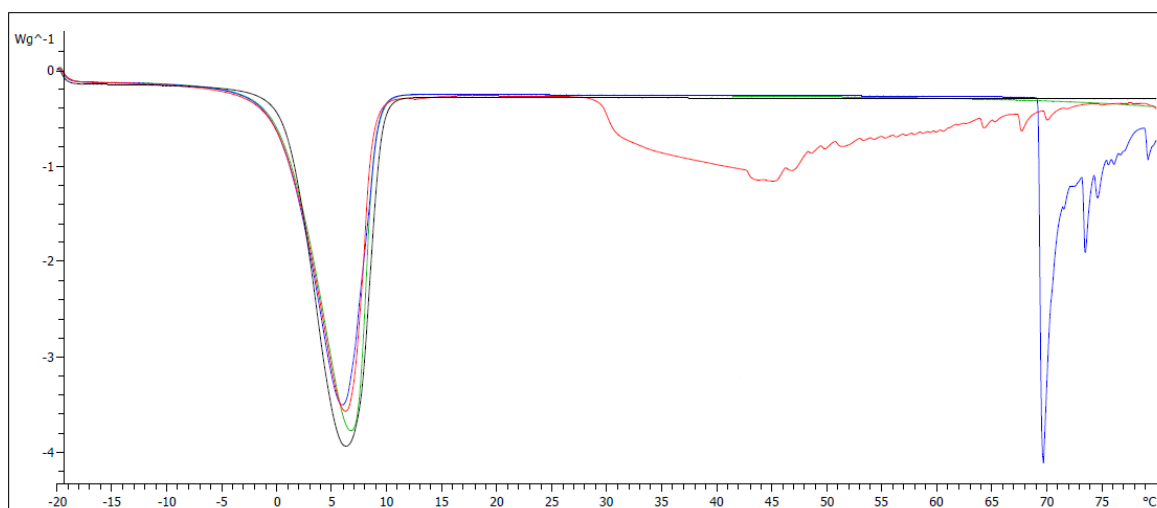


Una vez finalizado el tiempo de estudio, se realizó un análisis de las muestras por DSC y como se observa en la Figura 4.31, el comportamiento térmico de los geles es diferente. Se destaca que el gel conteniendo partículas y almacenado en nevera presenta un comportamiento térmico similar al de la formulación base sin inclusión de NLC, lo que sugiere que las partículas perdieron su estructura inicial. Este hallazgo no tiene una explicación sólida a la luz del conocimiento disponible hasta el momento en el grupo de investigación, acerca del comportamiento de las partículas en dispersión acuosa. Tampoco se encuentran elementos de apoyo para explicar el comportamiento en la información técnica proporcionada por el fabricante del agente viscosante.

La estrategia de gelificación de las dispersiones acuosas de NLC tiene como principal desventaja que cuando las partículas transporten un componente activo, este puede ser progresivamente cedido hacia el medio. Por tal razón, en la presente investigación se exploró la posibilidad de obtener un gel redispersable empleando la técnica de liofilización y la incorporación dentro de la formulación, de un agente superdesintegrante, en este caso,

croscarmelosa sódica (Hernández-Torres y Melgoza-Contreras, 2014). Los resultados en estos experimentos no fueron exitosos. Al reconstituir los geles y caracterizar su tamaño de partícula, el PDI se incrementó dramáticamente (incluso con valores de 1.0), aunque es posible observar una población de tamaño cercana a los 300 nm, que se podría atribuir a la presencia de los NLC. La adición de croscarmelosa sódica no representó ninguna ventaja para la reconstitución del producto, debido a que los geles no presentaron una apariencia homogénea al liofilizarse, separándose en dos regiones de diferente color.

Figura 4.31 Termograma DSC del calentamiento desde  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  de los geles de Vivapur<sup>®</sup> preparados sin y con inclusión de NLC PrJB\_EtAc\_MF, luego de un mes del estudio de estabilidad. En negro y verde (superpuestos): gel sin inclusión de NLC y gel con inclusión de NLC almacenado en nevera ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). En rojo: gel con NLC almacenado a temperatura ambiente ( $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). En azul: gel con NLC almacenado en estufa ( $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



Aunque en conjunto, los resultados anteriores no son contundentes para proponer la preparación de geles como una estrategia para la formulación de sistemas lipídicos, sí constituyen un avance en ese sentido aportando información acerca del comportamiento de este tipo de partículas. Indudablemente es necesario seguir trabajando para llegar a un producto que sea estable y conserve las características y ventajas de los transportadores lipídicos.

## 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

La presente investigación exploró la búsqueda de nuevos materiales de origen natural para la preparación de partículas lipídicas. Para ello se utilizaron dos propóleos de diferente fuente botánica y especie de abejas, los que inicialmente se evaluaron en términos de calidad según las disposiciones argentinas y brasileras. Los resultados evidenciaron que las muestras de propóleos colombianos evaluadas tienen un alto contenido de ceras y se aprovechó esta aparente desventaja para darles aplicabilidad. Así, los materiales extraídos del propóleo a través del método Randall se usaron en la formulación y preparación de cargadores lipídicos nanoestructurados por el método de emulsificación-difusión, alcanzando resultados de tamaño de partícula en el rango nanométrico, unimodales y con valores de PDI menores de 0.1. Adicionalmente, para las dispersiones de partículas preparadas con diferente fuente de propóleos, no se evidenciaron cambios apreciables en los valores obtenidos para cada una de estas características.

La aproximación a la identificación de los grupos funcionales presentes en el material lipídico mostró una significativa presencia de moléculas orgánicas tipo hidrocarburos, compuestas por grupos metílicos, metilénicos y metinos; así como grupos hidroxilo y éster, y compuestos aromáticos. El análisis por GC-MS no aportó resultados contundentes, debido a que no fue posible la plena identificación de las moléculas presentes. Sin embargo, en la muestra extraída a partir del propóleo de Santander con n-hexano por el método de Randall (PrS\_H\_R) se encontraron compuestos volátiles tipo terpenoides. En términos generales, la caracterización realizada sobre los materiales extraídos, mostró que existen diferencias composicionales en ambos propóleos colombianos. Los espectros  $^1\text{H}$

NMR mostraron un perfil característico para cada uno de ellos, por lo que se puede utilizar esta metodología para discriminar entre propóleos de diferente origen geográfico.

De otro lado, se logró una aproximación a la aplicación de dichos NLC en la encapsulación del aceite del árbol de té. Igualmente, las dispersiones de cargadores lipídicos a base de propóleos fueron vehiculizados en formulaciones tipo gel. Si bien el primer acercamiento a la formulación no fue exitoso (se observaron fenómenos de inestabilidad), si constituye un avance en la proyección del uso que tienen este tipo de sistemas lipídicos, teniendo en cuenta que su presencia no alteró negativamente las características organolépticas del producto.

## 5.2 Recomendaciones

Esta investigación constituye un aporte para el grupo GIDECA –Grupo de investigación en desarrollo y calidad de productos farmacéuticos y cosméticos–, puesto que fortalece la línea de investigación en nuevos materiales de origen natural con aplicación en el campo farmacéutico y cosmético. Adicionalmente, se abre la posibilidad de hacer la transferencia de los resultados obtenidos al sector industrial, con el fin de lograr un mayor impacto de este proyecto, al otorgarle un valor agregado al propóleo y al realizar un aporte a la cadena apícola en general.

Ahora bien, considerando que el material utilizado para la presente investigación es una pequeña muestra de los propóleos colombianos, conviene hacer una reflexión sobre la necesidad de tener una legislación propia para evaluar adecuadamente la calidad de este producto apícola. Esto bajo el hecho que la calidad del propóleo se afecta por diferentes variables, siendo el origen botánico un aspecto crítico.

Adicionalmente se sugiere seguir trabajando en la estandarización del proceso de extracción del material ceroso, evaluando la influencia de variables como el tiempo y la temperatura sobre las características del material extraído y de las partículas lipídicas preparadas *a posteriori*. Unido a lo anterior, se podrían definir especificaciones de calidad

para el material extraído, que incluyan parámetros como el intervalo de fusión, el contenido de un compuesto químico trazador (preferiblemente relacionado con el origen botánico del propóleo) y la presencia de disolvente orgánico residual.

Por otra parte, se puede explorar la preparación de las dispersiones de partículas a través de otros métodos como la homogenización a alta presión o la emulsificación asistida con ultrasonido. Igualmente, dentro de la formulación se puede estudiar la influencia de la inclusión de resinas extraídas del propóleo, con el fin de enriquecer en compuestos activos los NLC preparados. Esto implicaría la ejecución de más pruebas de seguridad, que garanticen que la presencia de alérgenos sea mínima en el producto final.

Para profundizar en la caracterización química de los materiales, se recomienda complementar los resultados generados en esta tesis con aquellos obtenidos por otras técnicas complementarias como la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), puesto que en casos en los que no se dispone de patrones de referencia, LC-MS/MS es clave para proveer datos para asignaciones estructurales tentativas de picos desconocidos, tal como sucedió con la muestra extraída con acetato de etilo del propóleo de Jardín Botánico (PrJB\_Et\_R).

La posibilidad de seguir trabajando en esta línea de investigación queda abierta, puesto que es necesario continuar el estudio de la encapsulación de activos por este tipo de nanotransportadores lipídicos, así como su formulación en productos de interés farmacéutico y cosmético en los que se desafíe la inclusión de los NLC y que encuentre una aplicación real. En este sentido, se hace imperativo el estudio de alternativas para la estabilización de partículas y avanzar hacia el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, aparte de las emulsiones y los geles, que conserven las ventajas de estos tipos de transportadores lipídicos y que sean comercialmente competitivas.





## ANEXOS

Anexo 1. Diseño estadístico experimental Plackett-Burman para seleccionar la mejor formulación a base de material lipídico de propóleos.

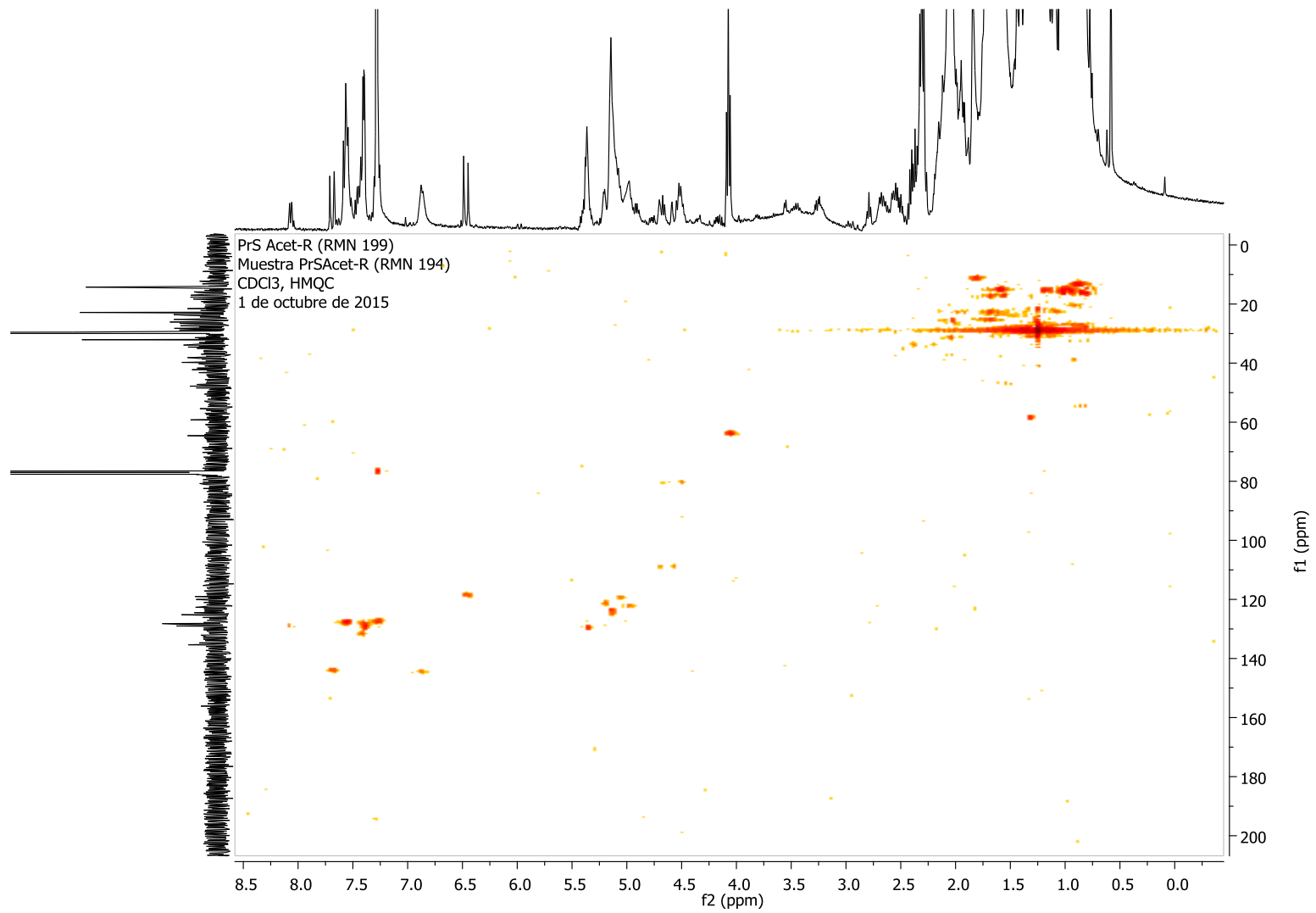
<i>Número aleatorizado para ejecutar los ensayos</i>	<i>PVA</i>	<i>PLX</i>	<i>CCT</i>	<i>Aceite de ajonjolí</i>	<i>Tiempo de emulsificación</i>	<i>Velocidad de emulsificación</i>
6	+	+	+	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-
4	+	-	+	+	-	+
3	-	+	+	-	+	-
2	+	+	-	+	-	-
1	+	-	+	-	-	-
11	-	+	-	-	-	+
10	+	-	-	-	+	+
9	-	-	-	+	+	+
8	-	-	+	+	+	-
7	-	+	+	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-

Anexo 2. Datos primarios de las formulaciones preparadas aplicando el diseño estadístico experimental Plackett-Burman.

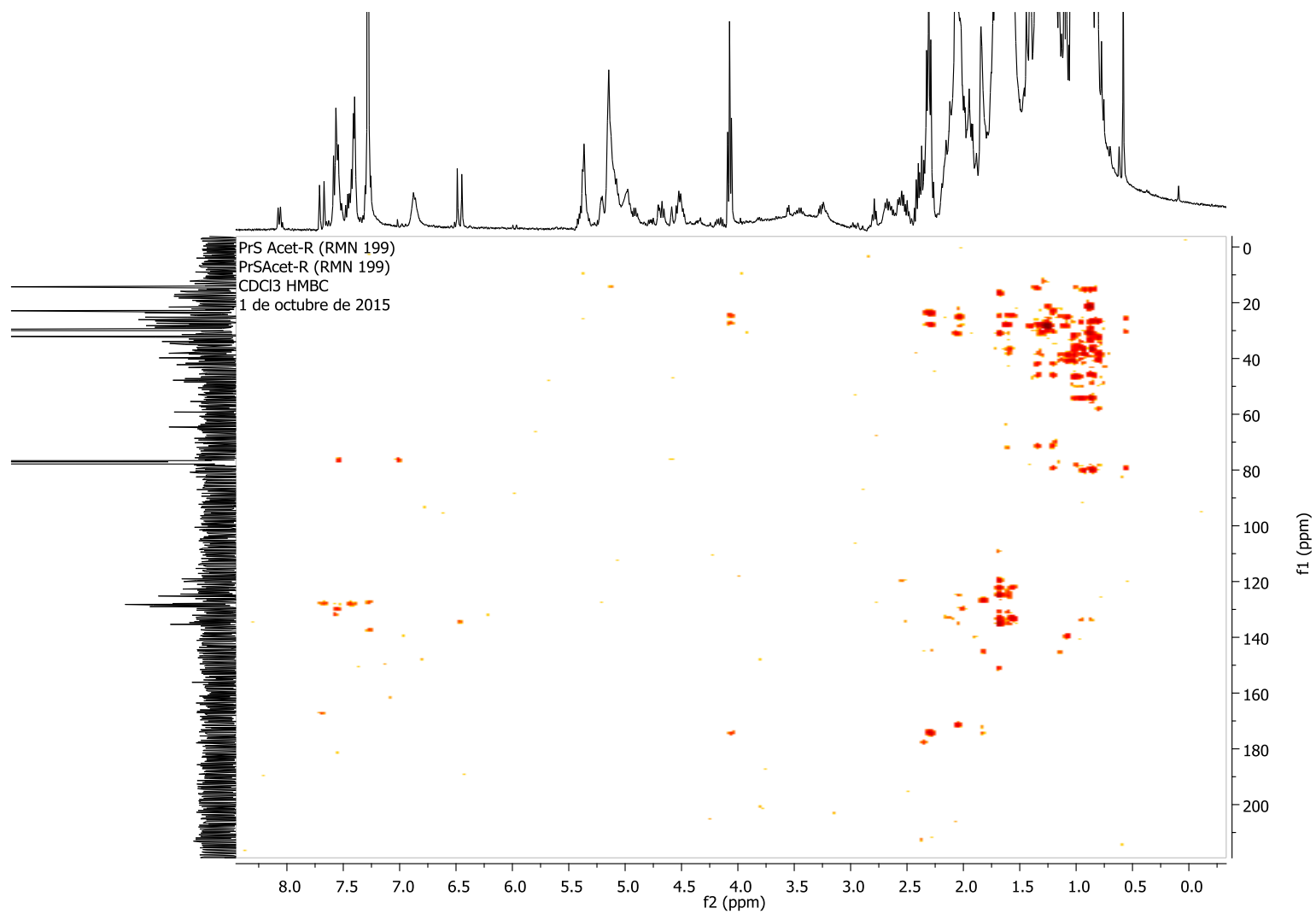
Plackett-Burman		<i>Tipo de material lipídico usado en la preparación</i>					
		PrS_H_R			PrJB_H_R		
Ensayo	Número de mediciones	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Porcentaje de la señal principal	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Porcentaje de la señal principal
1	1	249	0.094	100	258	0.092	100
	2	249	0.028	100	262	0.017	100
	3	243	0.006	100	257	0.212	100
	4	240	0.037	100	251	0.054	100
	5	242	0.064	100	252	0.047	100
2	1	243	0.171	98.7	390	0.122	100
	2	239	0.226	98.3	381	0.21	100
	3	238	0.161	100	375	0.178	100
	4	238	0.183	98.2	374	0.164	99.3
	5	234	0.185	98	369	0.225	94.1
3	1	173	0.073	100	164	0.093	100
	2	171	0.089	100	162	0.083	100
	3	171	0.015	100	163	0.063	100
	4	168	0.028	100	163	0.087	100
	5	165	0.115	100	161	0.052	100
4	1	134	0.048	100	150	0.212	97.7
	2	133	0.05	100	149	0.186	100
	3	137	0.069	100	152	0.183	100
	4	132	0.071	100	149	0.163	100
	5	132	0.057	100	149	0.166	100
5	1	268	0.212	100	273	0.214	100
	2	260	0.232	96.6	266	0.194	100
	3	252	0.229	97.8	265	0.203	98
	4	251	0.193	100	268	0.21	100
	5	244	0.246	100	267	0.203	100
6	1	97	0.168	100	129	0.14	100
	2	98	0.133	100	123	0.142	100
	3	96	0.158	100	124	0.147	100
	4	94	0.196	100	122	0.122	100
	5	97	0.151	100	123	0.085	100

Plackett-Burman		<i>Tipo de material lipídico usado en la preparación</i>					
		PrS_H_R			PrJB_H_R		
Ensayo	Número de mediciones	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Porcentaje de la señal principal	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Porcentaje de la señal principal
7	1	130	0.066	100	159	0.240	97.9
	2	127	0.119	100	157	0.248	97.9
	3	126	0.075	100	156	0.264	97.4
	4	129	0.078	100	157	0.227	100
	5	124	0.152	100	157	0.261	100
8	1	177	0.065	100	176	0.172	98.6
	2	173	0.107	100	168	0.115	100
	3	169	0.155	100	171	0.098	100
	4	170	0.104	100	171	0.122	100
	5	170	0.063	100	165	0.111	100
9	1	150	0.124	100	135	0.268	97.2
	2	152	0.148	100	137	0.323	97.4
	3	148	0.121	100	136	0.291	94.9
	4	147	0.167	100	135	0.267	96.8
	5	147	0.115	100	134	0.270	100
10	1	132	0.201	98.7	145	0.122	100
	2	129	0.184	100	146	0.147	100
	3	130	0.19	100	144	0.203	97.3
	4	133	0.16	100	143	0.160	98.9
	5	130	0.202	97.7	144	0.105	100
11	1	126	0.179	100	125	0.119	100
	2	126	0.202	98.1	121	0.106	100
	3	126	0.135	100	123	0.114	100
	4	125	0.146	100	121	0.124	100
	5	124	0.183	98.7	122	0.101	100
12	1	226	0.009	100	194	0.065	100
	2	225	0.09	100	190	0.165	100
	3	222	0.133	100	196	0.045	100
	4	219	0.122	100	191	0.078	100
	5	218	0.08	100	192	0.082	100

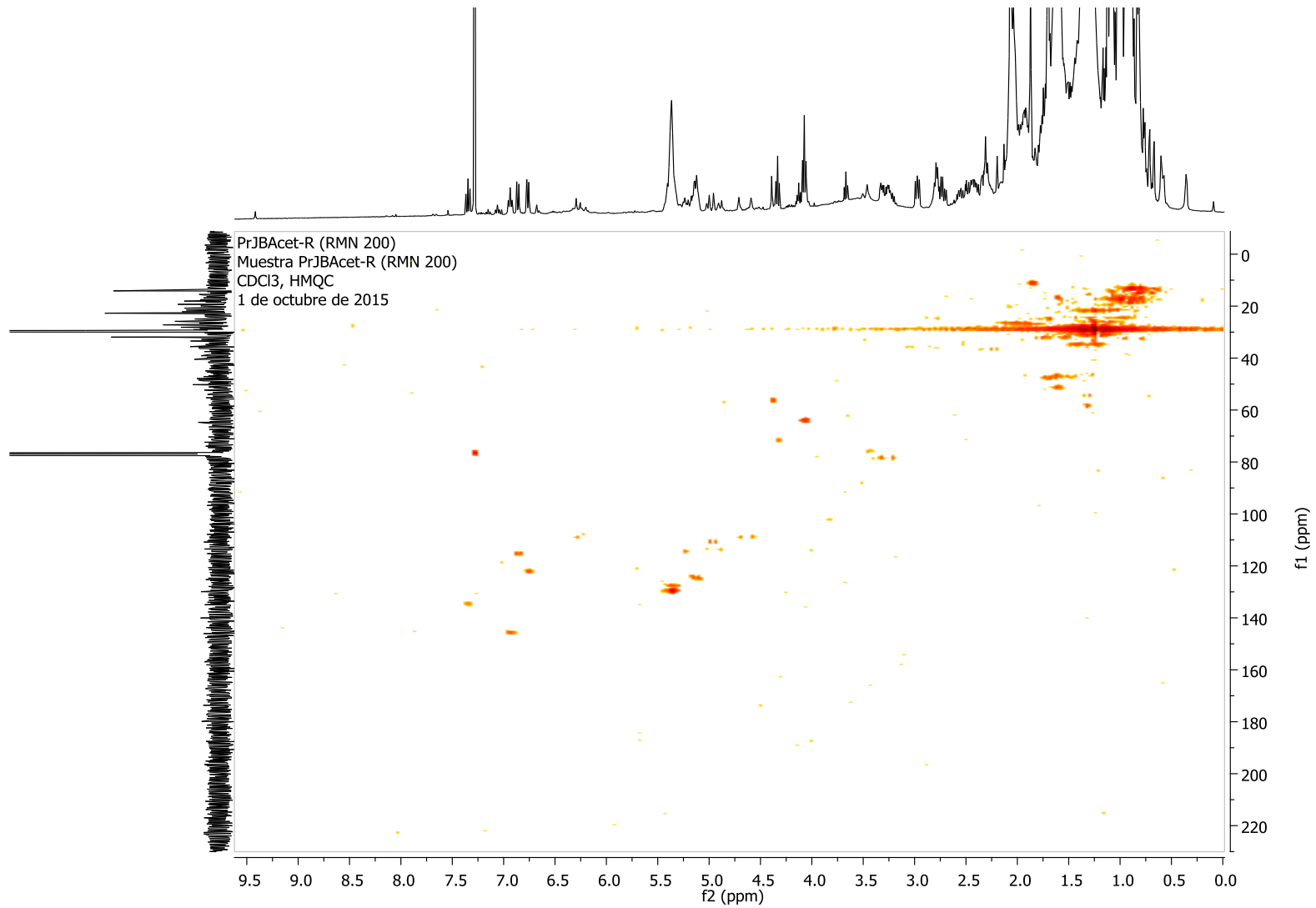
## Anexo 3. HMQC del material extraído de PrS con acetato de etilo (PrS\_EtAc\_R).



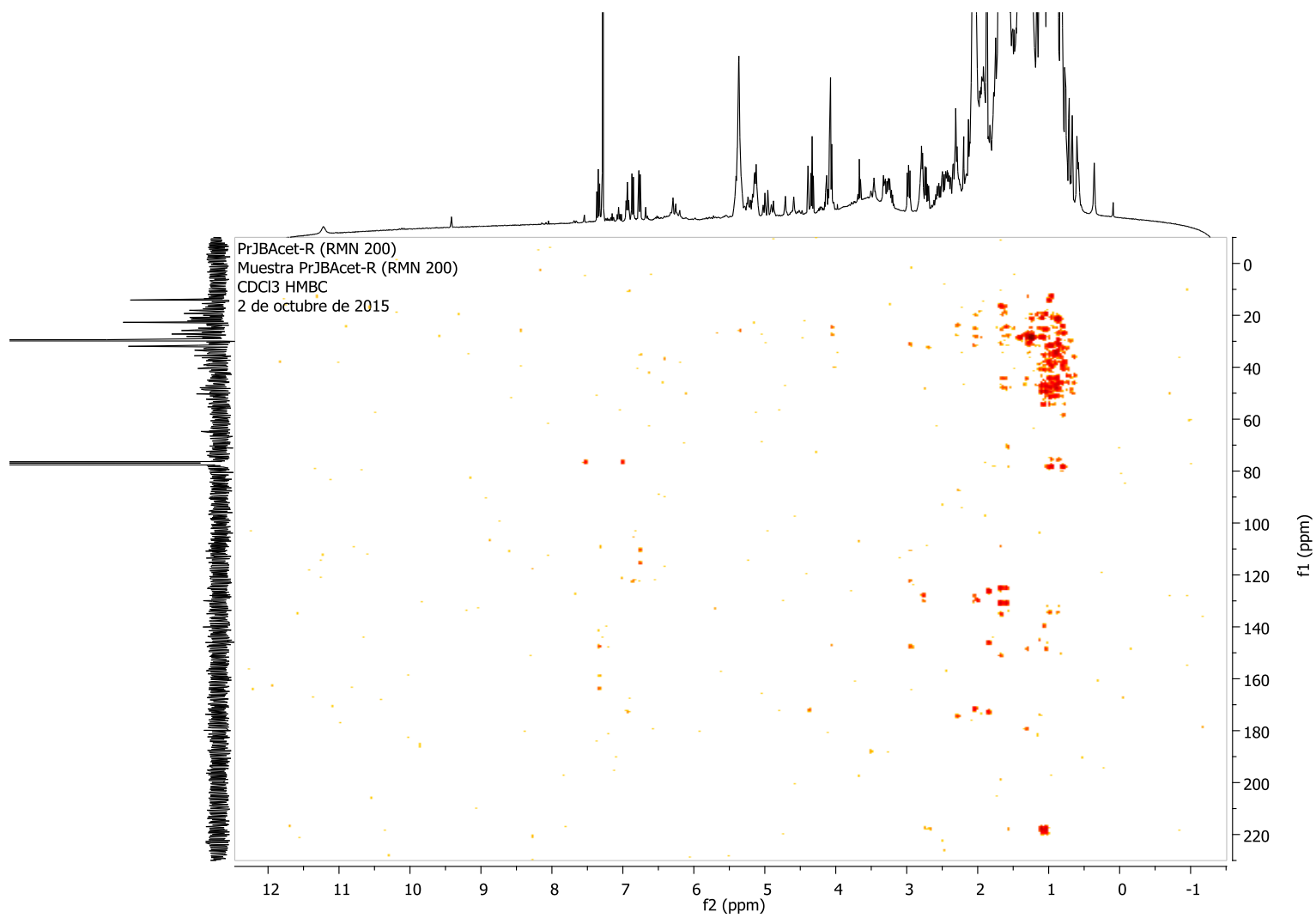
## Anexo 4. HMBC del material extraído de PrS con acetato de etilo (PrS\_EtAc\_R).



Anexo 5. HMQC del material extraído de PrJB con acetato de etilo (PrJB\_EtAc\_R).



## Anexo 6. HMBC del material extraído de PrJB con acetato de etilo (PrJB\_EtAc\_R).







---

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, M., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T., 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101, 1383–1392.
- Allouche, J., 2013. Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods, in: Brayner, R., Fiévet, F., Coradin, T. (Eds.), *Nanomaterials: A danger or a promise?* Springer London, London, pp. 29–30.
- Anderson, S., 2004. Soxtec: Its principles and applications, in: Luthria, D. (Ed.), *Oil extraction and analysis: Critical issues and competitive studies.* AOCS Press, Champaign, pp. 11–12.
- ANVISA, 2010. Determinação de óleos fixos, in: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Ed.), *Farmacopéia Brasileira.* Brasília, pp. 199–200.
- AOAC, 2012a. AOAC Official Method 930.15. Loos on drying (moisture) for feeds, in: Latimer, G.W. (Ed.), *Official Methods of AOAC INTERNATIONAL.* AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg.
- AOAC, 2012b. AOAC Official Method 923.03. Ash of flour, in: Latimer, G.W. (Ed.), *Official Methods of AOAC INTERNATIONAL.* AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg.
- Asawale, R.H., Meshram, J.H., Kumbhar, V.B., 2014. Solid lipid nanoparticle as drug delivery system: an overview. *Int. J. Compr. Pharm.* 01, 1–10.
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Livaniou, E., Evangelatos, G., Ithakissios, D.S., 2003. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, *in vitro* stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 259, 115–127.
- Awale, S., Shrestha, S.P., Tezuka, Y., Ueda, J.Y., Matsushige, K., Kadota, S., 2005. Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* 68, 858–864.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V., 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem.* 101, 502–514.
- Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114–117.

- Bankova, V., Popov, S., Marekov, N., 1983. A study on flavonoids of propolis. *J. Nat. Prod.* 46, 471–474.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3–15.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A., Kadota, S., 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol.* 72, 239–246.
- Basista, K.M., Filipek, B., 2012. Allergy to propolis in Polish beekeepers. *Adv. Dermatology Allergol.* 6, 440–445.
- Basson, I., Reynhardt, E.C., 1988. An investigation of the structures and molecular dynamics of natural waxes. I. Beeswax. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 21, 1421–1428.
- Bastos, E.M.A., Galbiati, C., Loureiro, E., Scoaris, D., 2011. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente a *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 63, 1255–1259.
- Battaglia, L., Gallarate, M., 2012. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 497–508.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Alvarez, A., Rodríguez, E., 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo Argentino. *Acta Farm. Bonaer.* 23, 369–372.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Fierro Morales, W., Álvarez, A., 2006. Metodología analítica, in: INTA (Ed.), *Propóleos: Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades*. Ediciones Magna, Tucumán, pp. 137–170.
- Belcorp, 2012. In vitro Safety screening to predict ocular irritation of cosmetic formulations. Protocol #3: Neutral red uptake cytotoxicity assay in mammalian cells (fibroblast). Tocancipá.
- Bellegrandi, S., D'Offizi, G., Ansotegui, I.J., Ferrara, R., Scala, E., Paganelli, R., 1996. Propolis allergy in an HIV-positive patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* 35, 644.
- Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G.L., Plessi, M., 2012. <sup>1</sup>H-NMR simultaneous identification of health-relevant compounds in propolis extracts. *Phytochem. Anal.* 23, 260–266.
- Bhadauria, M., Nirala, S.K., 2009. Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 17–25.
- Bikkad, M.L., Nathani, A.H., Mandlik, S.K., Shrotriya, S.N., Ranpise, N.S., 2014. Halobetasol propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *J. Liposome Res.* 24, 113–123.
- Birshtein, V.Y., Tul'chinskii, V.M., 1977. Determination of beeswax and some impurities by IR spectroscopy. *Chem. Nat. Compd.* 13, 232–235.

- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1–18.
- Borčić, I., Radonić, A., Grzunov, K., 1996. Comparison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croatia. *Flavour Fragr. J.* 11, 311–313.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Methods* 9, 7–9.
- Bose, S., Du, Y., Takhistov, P., Michniak-Kohn, B., 2013. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *Int. J. Pharm.* 441, 56–66.
- Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C., Lucchesi, M.B., Gremião, M.P.D., 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *Int. J. Pharm.* 264, 45–55.
- Bruschi, M.L., Lara, E.H.G., Martins, C.H.G., Vinholis, A.H.C., Casemiro, L.A., Panzeri, H., Gremião, M.P.D., 2006. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, 229–238.
- Buchwald, R., Breed, M.D., Greenberg, A.R., 2008. The thermal properties of beeswaxes: unexpected findings. *J. Exp. Biol.* 211, 121–127.
- Budimir, V., Brailo, V., Alajbeg, I., Boras, V.V., Budimir, J., 2012. Allergic contact cheilitis and perioral dermatitis caused by propolis: case report. *Acta Dermatovenerol Croat* 20, 187–190.
- Bunjes, H., Unruh, T., 2007. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 379–402.
- Bunn, C.W., 1948. Crystal structure of polyvinyl alcohol. *Nature* 161, 929–930.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36, 347–363.
- Carlotti, M.E., Sapino, S., Trotta, M., Battaglia, L., Vione, D., Pelizzetti, E., 2005. Photostability and stability over time of retinyl palmitate in an O/W emulsion and in SLN introduced in the emulsion. *J. Dispers. Sci. Technol.* 26, 125–138.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T. V., 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 50–62.
- Castaldo, S., Capasso, F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73 Suppl 1, S1–6.
- CATEF, 2005. Nota técnica sobre o registro de produtos contendo própolis. Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos -CATEF, Brasil.
- Chaillou, L.L., Herrera, H.A., Maidana, J.F., 2004. Estudio del propóleos de Santiago del

- Estero, Argentina. *Ciência e Tecnol. Aliment. Campinas* 24, 11–15.
- Charcosset, C., El-Harati, A., Fessi, H., 2005. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J. Control. Release* 108, 112–120.
- Chazhengina, S.Y., Kotelnikova, E.N., Filippova, I. V., Filatov, S.K., 2003. Phase transitions of n-alkanes as rotator crystals. *J. Mol. Struct.* 647, 243–257.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Bertrand, M., 2006. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* 20, 531–536.
- Colegate, S.M., Molyneux, R.J. (Eds.), 2007. *Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination*, 2nd ed. CRC Press, Broken Sound Parkway, NW.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Lagana, A., 2011. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat. Prod. Res.* 25, 469–495.
- Cortés-Rojas, D.F., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P., 2014. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. *J. Food Eng.* 127, 34–42.
- Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., Dollin, A., Heard, T., Aguilar, I., Venturieri, G.C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P., 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie* 37, 275–292.
- Crespo Rodríguez, J.F., 2015. Estudio de la emulsificación-difusión como método para la preparación de partículas lipídicas. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia.
- Cristancho, C.A., 2014. Formulación de nanopartículas sólidas lipídicas a base de quercetina en un vehículo tipo emulsión. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A.L., Fernandez, M.C., Hernández, I.M., Rosado, A., Rastrelli, L., 2007. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7502–7509.
- Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P.D.O., 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 964–970.
- da Silva Frozza, C.O., Garcia, C.S.C., Gambato, G., de Souza, M.D.O., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A.P., Roesch-Ely, M., 2013. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem. Toxicol.* 52, 137–142.
- de Barros, M.P., Barreto Sousa, J.P., Bastos, J.K., de Andrade, S.F., 2007. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 110, 567–571.

- de Barros, M.P., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Barreto Sousa, J.P., Bastos, J.K., Andrade, S.F. De, 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. *J. Ethnopharmacol.* 120, 372–377.
- de Groot, A.C., 2013. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis* 24, 263–282.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., 1992. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine* 10, 817–823.
- Dingler, A., Blum, R.P., Niehus, H., Müller, R.H., Gohla, S., 1999. Solid lipid nanoparticles (SLN/ Lipopearls) - a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *J. Microencapsul.* 16, 751–767.
- Doktorovova, S., Souto, E.B., Silva, A.M., 2014. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 1–18.
- Dorset, D.L., Moss, B., Wittmann, J.C., Lotz, B., 1984. The pre-melt phase of n-alkanes: Crystallographic evidence for a kinked chain structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1913–1917.
- Durán, N., Marcato, P.D., Buffo, C.M.S., De Azevedo, M.M.M., Esposito, E., 2007. Poly (epsilon-caprolactone)/propolis extract: microencapsulation and antibacterial activity evaluation. *Pharmazie* 62, 287–290.
- ECVAM, 1992. The neutral red cytotoxicity assay Invittox N° 64: Eye irritation.
- ECVAM, 2002. 3T3 NRU Phototoxicity assay Invittox N° 78: Phototoxicity.
- Elaissari, A. (Ed.), 2003. Colloidal polymers: Synthesis and characterization. Marcel Dekker, Inc, New York, NY.
- FDA, 2014. Food and Drug Administration - Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology, Biotechnology Law Report. New Hampshire.
- Finger, D., Schinieder Machado, C., Reyes Torres, Y., Percio Quináia, S., Godot Thomaz, A.C., Rita Gobbo, A., Chagas Monteiro, M., Ferreira, A.G., Frankland Sawaya, A.C.H., Nogueira Eberlin, M., 2013. Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis. *J. Food Qual.* 36, 291–301.
- Formicki, G., Greń, A., Stawarz, R., Zyśk, B., Gał, A., 2013. Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 99–106.
- Forshed, J., Erlandsson, B., Jacobsson, S.P., 2005. Quantification of aldehyde impurities in poloxamer by <sup>1</sup>H NMR spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 552, 160–165.
- Fuliang, H.U., Hepburn, H.R., Xuan, H., Chen, M., Daya, S., Radloff, S.E., 2005. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes

- mellitus. *Pharmacol. Res.* 51, 147–152.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., 2006. Análise de própolis. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas* 26, 171–178.
- Galeano, J.S., 2015. Estudio del comportamiento de liberación de quercetina a partir de nanopartículas sólidas lipídicas formuladas en emulsiones. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia.
- García-González, D.L., Baeten, V., Fernández Pierna, J.A., Tena, N., 2013. Infrared, raman, and fluorescence spectroscopies: methodologies and applications, in: Aparicio, R., Harwood, J. (Eds.), *Handbook of olive oil analysis and properties*. Springer Science+Business Media, New York, NY.
- Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., Simonetti, P., 2007. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 390–399.
- Garrido Fernández, S., Lasa Luaces, E., Echechipía Modaz, S., Arroabarren Alemán, E., Anda Apiñániz, M., Tabar Purroy, A.I., 2004. Allergic contact stomatitis due to therapeutic propolis. *Contact Dermatitis* 50, 321.
- Garud, A., Singh, D., Garud, N., 2012. Solid lipid nanoparticles (SLN): method, characterization and applications. *Int. Curr. Pharm. J.* 1, 384–393.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1–9.
- Gençay Çelemlı, Ö., 2013. Chemical properties of propolis collected by stingless bees, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.), *Pot-Honey*. Springer New York, New York, NY, pp. 525–537.
- Golmohammadzadeh, S., Mokhtari, M., Jaafari, M.R., 2012. Preparation, characterization and evaluation of moisturizing and UV protecting effects of topical solid lipid nanoparticles. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 48, 683–690.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., 1987. The analysis of bud exudate of *Populus X euramericana*, and of propolis, by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Proc. R. Soc. London* 232, 249–272.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., 1989. Headspace volatiles from propolis. *Flavour Fragr. J.* 4, 173–175.
- Gupta, M., Vyas, S.P., 2012. Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. *Chem. Phys. Lipids* 165, 454–461.
- Gupta, R.K., Khan, M.S., Srivastava, R.M., Goswami, V., 2014. History of beekeeping in developing world, in: Gupta, R.K., Reybroeck, W., Veen, J.W. van, Gupta, A. (Eds.), *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3–62.

- Gutiérrez Cortés, C., 2012. Evaluación del efecto de propoleos como biopreservante en chorizo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia.
- Hassan, C.M., Peppas, N.A., 2000. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Adv. Polym. Sci.* 153, 37–65.
- Hausen, B.M., Wollenweber, E., 1988. Propolis allergy (III). Sensitization studies with minor constituents. *Contact Dermatitis* 19, 296–303.
- Hausen, B.M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B., 1987a. Propolis allergy (I). Origin, properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis* 17, 163–170.
- Hausen, B.M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B., 1987b. Propolis allergy (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis* 17, 171–177.
- Heard, T.A., 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 183–206.
- Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K., Haker, K.H., Modear, N., Houcine, S., 2012. Inhibitory effect of algerian propolis on viral, microbial infection and LDL peroxidation with correlation to its chemical composition. *Mellifera* 11, 2–11.
- Hepburn, H.R., Pirk, C.W.W., Duangphakdee, O., 2014. Material properties of scale and comb wax, in: *Honeybee nests*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 273–298.
- Hernández-Torres, J.E., Melgoza-Contreras, L.M., 2014. Principales superdisgregantes sintéticos, mecanismos y factores que influyen en su actividad. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 43, 234–247.
- Hippalgaonkar, K., Majumdar, S., Kansara, V., 2010. Injectable lipid emulsions. Advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech* 11, 1526–1540.
- Hopkins, C., Bernstein, H., 1959. Applications of proton magnetic resonance spectra in fatty acid chemistry. *Can. J. Chem.* 37, 775–782.
- Hou, D., Xie, C., Huang, K., Zhu, C., 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 24, 1781–1785.
- Huang, S., Zhang, C., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F., 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19, 19610–19632.
- Hunter, R.J., 2002. *Foundations of colloid science*, 2nd ed. Oxford University Press Inc, New York, NY.
- Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *Int. J. Pharm.* 379, 201–209.
- IBRA, 2008. FAQ's - International Bee Research Association [WWW Document]. *Int. Bee Res. Assoc.* URL [http://www.ibra.org.uk/categories/faq#FAQ\\_15](http://www.ibra.org.uk/categories/faq#FAQ_15) (accessed

7.11.15).

- Jaakola, L., Hohtola, A., 2010. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell Environ.* 33, 1239–1247.
- Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D., 2008. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 734–746.
- Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., Mornar, A., Medić-Šarić, M., 2004. Investigation of the flavonoids in Croatian propolis by thin-layer chromatography. *JPC - J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* 17, 95–101.
- Jenning, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.H., 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* 199, 167–177.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Martín, M.T., Bernal, J., 2006. Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection. *J. Chromatogr. A* 1129, 262–272.
- JRS PHARMA, 2015. VIVAPUR® MCG [WWW Document]. URL [http://www.jrspharma.com/pharma\\_en/products-services/excipients/thickeners/vivapur-mcg.php](http://www.jrspharma.com/pharma_en/products-services/excipients/thickeners/vivapur-mcg.php) (accessed 10.4.15).
- Kajjari, P.B., Manjeshwar, L.S., Aminabhavi, T.M., 2014. Novel blend microspheres of cellulose triacetate and bee wax for the controlled release of nateglinide. *J. Ind. Eng. Chem.* 20, 397–404.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Mourtzinis, I., Troullidou, E., Chiou, A., Karathanos, V.T., 2009. Encapsulation of complex extracts in beta-cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. *J. Microencapsul.* 26, 603–613.
- Kameda, T., 2004. Molecular structure of crude beeswax studied by solid-state <sup>13</sup>C NMR. *J. Insect Sci.* 4, 1–5.
- Kameda, T., Tamada, Y., 2009. Variable-temperature <sup>13</sup>C solid-state NMR study of the molecular structure of honeybee wax and silk. *Int. J. Biol. Macromol.* 44, 64–69.
- Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A., Kubilienė, L., 2014. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. *Cent. Eur. J. Chem.* 12, 736–746.
- Kasongo, K.W., Müller, R.H., Walker, R.B., 2012. The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients. *Pharm. Dev. Technol.* 17, 353–362.
- Keck, C.M., Kovačević, A., Müller, R.H., Savić, S., Vuleta, G., Milić, J., 2014. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. *Int. J. Pharm.* 474, 33–41.
- Koc, A.N., Silici, S., Mutlu-Sariguzev, F., Sagdic, O., 2007. Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technol. Biotechnol.* 45, 57–61.



- Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B., 2002. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem.* 78, 213–217.
- Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64, 235–240.
- Kumar, S., Randhawa, J.K., 2013. High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 1842–1852.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84, 329–339.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Swierczek-Zieba, G., 2014. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19, 78–101.
- Lacerda, R.C.C., Tiveron, A.P., Alencar, S.M. De, 2011. Própolis e segurança alimentar. *Segurança Aliment. e Nutr.* 18, 99–106.
- Lakshmi, M., Ahmad, A., Krishna, T.R., Bellubbi, B.S., 2012. A study on composition and structure of beeswax. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 2, 2036–2043.
- Lee, I.-K., Han, M.-S., Kim, D.-W., Yun, B.-S., 2014. Phenylpropanoid acid esters from Korean propolis and their antioxidant activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 3503–3505.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5434–5440.
- Lins, A.S., Pereira da Silva, A.P., Bandeira, M.L.S. de F., Castro, M.S. de, 2010. Implantação das análises físico-químicas da própolis no laboratório da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. *Rev. Eletrônica Multidiscip. Pindorama do Inst. Fed. da Bahia – IFBA* 1, 1–20.
- López Córtes, C.J., 2012. Revisión bibliográfica: propóleos y sus perspectivas de uso. Trabajo final de la Especialización en Ciencia y Tecnología Cosmética. Universidad Nacional de Colombia.
- Lotfy, M., 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 7, 22–31.
- Lourenco, C., Teixeira, M., Simões, S., Gaspar, R., 1996. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. *Int. J. Pharm.* 138, 1–12.
- Luque de Castro, M.D., García-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* 369, 1–10.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Ultraviolet Spectra of flavones and flavonols, in: *The systematic identification of flavonoids*. Springer Berlin

- Heidelberg, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 41–45; 51–60.
- Machado de Melo, A.A., Hitomi Matsuda, A., Bicudo de Almeida-Muradian, L., 2012. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 71, 540–548.
- Maia, M., Nunes, F.M., 2013. Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chem.* 136, 961–968.
- Malaki Nik, A., Langmaid, S., Wright, A.J., 2012. Nonionic surfactant and interfacial structure impact crystallinity and stability of  $\beta$ -carotene loaded lipid nanodispersions. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4126–4135.
- Malamatari, M., Somavarapu, S., Bloxham, M., Buckton, G., 2015. Nanoparticle agglomerates of indomethacin: the role of poloxamers and matrix former on their dissolution and aerosolisation efficiency. *Int. J. Pharm.*
- MAPA, 2001. Instrução Normativa N° 3, de 19 de Janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA, Brasil.
- Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26, 83–99.
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105–112.
- Mărghitaş, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D.S., Bobiş, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, M.G., 2009. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem.* 115, 878–883.
- Mayer, C., 2002. Nuclear magnetic resonance on dispersed nanoparticles. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 40, 307–366.
- McClements, D.J., 2015. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* 219, 27–53.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2012. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 83–101.
- Mellema, M., 2009. Co-crystals of beeswax and various vegetable waxes with sterols studied by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 499–505.
- Melliou, E., Stratis, E., Chinou, I., 2007. Volatile constituents of propolis from various

- regions of Greece - Antimicrobial activity. *Food Chem.* 103, 375–380.
- Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D., 2014. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Sci. Technol.* 34, 16–23.
- Min, D.B., Ellefson, W.C., 2010. Fat analysis, in: Nielsen, S.S. (Ed.), *Food analysis*. Springer Science+Business Media, New York, NY, pp. 122–123.
- Ministerio de la Protección Social, 2010. Resolución 1057 de 2010: Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para consumo humano. Colombia.
- Mojahedian, M.M., Daneshamouz, S., Samani, S.M., Zargaran, A., 2013. A novel method to produce solid lipid nanoparticles using n-butanol as an additional co-surfactant according to the o/w microemulsion quenching technique. *Chem. Phys. Lipids* 174, 32–38.
- Morabito, K., Shapley, N.C., Steeley, K.G., Tripathi, A., 2011. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. *Int. J. Cosmet. Sci.* 33, 385–390.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113–142.
- Moreira, T.F., 1986. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 1, 12–19.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mukherjee, S., Ray, S., Thakur, R.S., 2009. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J. Pharm. Sci.* 71, 349–358.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161–177.
- Müller, R.H., Petersen, R.D., Hommoss, A., Pardeike, J., 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 522–530.
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 Suppl 1, S131–155.
- Musoke, M., Luckham, P.F., 2004. Interaction forces between polyethylene oxide-polypropylene oxide ABA copolymers adsorbed to hydrophobic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 277, 62–70.
- Napper, D.H., 1969. The steric stabilization of hydrosols by nonionic macromolecules. *J. Colloid Interface Sci.* 29, 168–170.
- Nates-Parra, G., Rodríguez C., Á., 2011. Forrajeo en colonias de *Melipona eburnea* (Hymenoptera: Apidae) en el piedemonte llanero (Meta, Colombia). *Rev. Colomb.*

- Entomol. 37, 121–127.
- Nates-Parra, G., Rosso-Londoño, J.M., 2013. Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) utilizadas en meliponicultura en Colombia. *Acta Biológica Colomb.* 18, 415–425.
- NCBI, 2015a. Ethyl Acetate, CID=8857 [WWW Document]. Natl. Cent. Biotechnol. Information. PubChem Compd. Database. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8857> (accessed 8.22.15).
- NCBI, 2015b. Hexane, CID=8058 [WWW Document]. Natl. Cent. Biotechnol. Information. PubChem Compd. Database. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8058> (accessed 8.22.15).
- Nesseem, D., 2011. Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Cosmet. Sci.* 33, 70–79.
- Neupane, Y.R., Sabir, M.D., Ahmad, N., Ali, M., Kohli, K., 2013. Lipid drug conjugate nanoparticle as a novel lipid nanocarrier for the oral delivery of decitabine: ex vivo gut permeation studies. *Nanotechnology* 24, 1–11.
- Obregón, D., Rodríguez, Á., Chamorro, F.J., Nates-Parra, G., 2013. Botanical origin of pot-honey from *Tetragonisca angustula* Latreille in Colombia, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.), *Pot-Honey*. Springer New York, New York, NY, pp. 337–346.
- Olbrich, C., Gessner, A., Kayser, O., Müller, R.H., 2002. Lipid-drug-conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediacetate. *J. Drug Target.* 10, 387–396.
- Oliveira, M.S., Mussi, S. V, Gomes, D.A., Yoshida, M.I., Frezard, F., Carregal, V.M., Ferreira, L.A.M., 2016.  $\alpha$ -Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 140, 246–253.
- Orsi, R.O., Funari, S.R.C., Barbattini, R., Giovani, C., Frilli, F., Sforcin, J.M., Bankova, V., 2006. Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 637–640.
- Oxford-Instruments, 2013. Determination of the polyoxyethylene (POE) percentage in poloxamers [WWW Document]. URL <http://www.oxford-instruments.com/OxfordInstruments/media/industrial-analysis/magnetic-resonance-pdfs/poloxamers-benchtop-nmr-pulsar-application-note-003.pdf> (accessed 9.20.15).
- Paillí Jiménez, D., 2014. Aplicación de ceras de propóleo en la preparación de partículas sólidas lipídicas. Trabajo final de la Especialización en Ciencia y Tecnología Cosmética. Universidad Nacional de Colombia.
- Palomino, L.R., 2009. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Tesis de Maestría en Ciencias Química. Universidad Nacional de Colombia.

- Palomino, L.R., García, C.M., Gil, J.H., Rojano, B.A., Durango, D.L., 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae* 16, 388–395.
- Patel, D., Dasgupta, S., Dey, S., Ramani, Y.R., Ray, S., Mazumder, B., 2012. Nanostructured lipid carriers (NLC)-based gel for the topical delivery of aceclofenac: Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation. *Sci. Pharm.* 80, 749–64.
- Patil, M.N., Pandit, A.B., 2007. Cavitation - A novel technique for making stable nano-suspensions. *Ultrason. Sonochem.* 14, 519–530.
- Patil, S., Desai, N., Mahadik, K., Paradkar, A., 2015. Can green synthesized propolis loaded silver nanoparticulate gel enhance wound healing caused by burns? *Eur. J. Integr. Med.* 7, 243–250.
- Patricio, E.F.L.R.A., Cruz-López, L., Maile, R., Tentschert, J., Jones, G.R., Morgan, E.D., 2002. The propolis of stingless bees: Terpenes from the tibia of three Frieseomelitta species. *J. Insect Physiol.* 48, 249–254.
- Pattarino, F., Bettini, R., Foglio Bonda, A., Della Bella, A., Giovannelli, L., 2014. Polymorphism and kinetic behavior of binary mixtures of triglycerides. *Int. J. Pharm.* 473, 87–94.
- Paulino, N., Lemos Abreu, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Scremin, A., Bretz, W.A., 2008. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* 587, 296–301.
- Pavia, D., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Engel, R.G., 2005. Introduction to organic laboratory techniques: a small scale approach, 2nd ed. Brooks/Cole - Thomson Learning, Belmont.
- Pekal, A., Pyrzyńska, K., 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods* 7, 1776–1782.
- Pellati, F., Prencipe, F.P., Benvenuti, S., 2013. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 84, 103–111.
- Pereira, A. dos S., Bicalho, B., Aquino Neto, F.R. de, 2003. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* 34, 291–298.
- Pereira, A. dos S., Seixas, F.R.M.S., Aquino Neto, F.R. de, 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova* 25, 321–326.
- Petit, J.-M., Zhu, X.X., 1996.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR study on local dynamics of poly(vinyl alcohol) in aqueous solutions. *Macromolecules* 29, 2075–2081.
- Piccinelli, A.L., Fernandez, M.C., Cuesta-Rubio, O., Hernández, I.M., De Simone, F., Rastrelli, L., 2005. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9010–9016.

- Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rastrelli, L., 2011. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6484–6491.
- Pierini, G.D., Granero, A.M., Di Nezio, M.S., Centurión, M.E., Zon, M.A., Fernández, H., 2013. Development of an electroanalytical method for the determination of lead in Argentina raw propolis based on bismuth electrodes. *Microchem. J.* 106, 102–106.
- Pietta, P.G., Gardana, C., Pietta, A.M., 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 Suppl 1, S7–20.
- Pino, J.A., Marbot, R., Delgado, A., Zumarraga, C., Sauri, E., 2006. Volatile constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatán. *J. Essent. Oil Res.* 18, 53–56.
- Poole, C.F., 2003. Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities. *J. Chromatogr. A* 1000, 963–984.
- Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 625–637.
- Pozippe Nori, M., Favaro-Trindade, C.S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J.C., Contreras Castillo, C.J., 2011. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 429–435.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., Uslinawaty, Z., 2014. Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 338–340.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 1113–1128.
- Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., Doelker, E., 2005. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 211–218.
- Raj, S., Jose, S., Sumod, U., Sabitha, M., 2012. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4, 186–193.
- Ramadhani, N., Shabir, M., McConville, C., 2014. Preparation and characterisation of Kolliphor® P 188 and P 237 solid dispersion oral tablets containing the poorly water soluble drug disulfiram. *Int. J. Pharm.* 475, 514–522.
- Ramanauskienė, K., Inkeniene, A.M., Petrikaite, V., Briedis, V., 2013. Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013.
- Ramanauskienė, K., Inkėniene, A.M., Savickas, A., Masteikova, R., Brusokas, V., 2009.

- Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 66, 681–688.
- Ramsden, J., 2014. What is nanotechnology?, in: *Applied nanotechnology*. William Andrew, pp. 3–12.
- Rassu, G., Cossu, M., Langasco, R., Carta, A., Cavalli, R., Giunchedi, P., Gavini, E., 2015. Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 136, 908–917.
- Ravanfar, R., Tamaddon, A.M., Niakousari, M., Moein, M.R., 2016. Preservation of anthocyanins in solid lipid nanoparticles: Optimization of a microemulsion dilution method using the Plackett-Burman and Box-Behnken designs. *Food Chem.* 199, 573–580.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131.
- Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S. (Eds.), 2012. 3120B Metals by plasma emission spectroscopy, in: *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, pp. 40–46.
- Roco, M.C., Mirkin, C.A., Hersam, M.C., 2011. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study. *J. Nanoparticle Res.* 13, 897–919.
- Rodríguez, Y., Sánchez-Catalán, F., Rojano, B., Durango, D., Gil, J., Marín-Loaiza, J., 2012. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Rev. U.D.C.A. Actual. Divulg. Científica* 15, 303–311.
- Rodziewicz, P., Swarcewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., Stobiecki, M., 2014. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1–19.
- Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92, 235–254.
- Rosenblatt, K.M., Bunjes, H., 2009. Poly(vinyl alcohol) as emulsifier stabilizes solid triglyceride drug carrier nanoparticles in the alfa-modification. *Mol. Pharm.* 6, 105–120.
- Rostami, E., Kashanian, S., Azandaryani, A.H., Faramarzi, H., Dolatabadi, J.E.N., Omidfar, K., 2014. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. *Chem. Phys. Lipids* 181, 56–61.
- Salamanca Grosso, G., 2009. Variabilidad genética del ADN mitocondrial de poblaciones de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en Colombia. *Zootec. Trop* 27, 373–382.
- Salamanca Grosso, G., Correa Carvajal, I.L., Principal, J., 2007. Perfil de flavonoides e

- índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootec. Trop.* 25, 95–102.
- Schubert, M.A., Müller-Goymann, C.C., 2003. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 125–131.
- Segueni, N., Khadraoui, F., Moussaoui, F., 2010. Volatil constituents of Algerian propolis. *Ann. Biol. Res.* 1, 103–107.
- Sehn, E., Hernandez, L., Franco, S.L., Gonçalves, C.C.M., Baesso, M.L., 2009. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Anal. Chim. Acta* 635, 115–120.
- Serra Bonvehi, J., Orantes Bermejo, F.J., 2012. Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chem.* 132, 642–648.
- Serra Bonvehí, J., Orantes Bermejo, F.J., 2013. Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environ. Monit. Assess.* 185, 6035–6047.
- Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1–14.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253–260.
- Sforcin, J.M., Fernandes Jr, A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73, 243–249.
- Shah, R.M., Malherbe, F., Eldridge, D., Palombo, E.A., Harding, I.H., 2014. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *J. Colloid Interface Sci.* 428, 286–294.
- Shanmugam, S., Sathish Kumar, T., Panneer Selvam, K., 2010. Laboratory handbook on biochemistry. PHI Learning Private Limited, New Delhi.
- Shirley, B.W., 1996. Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Sci.* 1, 377–382.
- Silici, S., 2010. Turkish propolis: chemical constituents. *Mellifera* 33, 24–33.
- Silva, A.C., González-Mira, E., García, M.L., Egea, M.A., Fonseca, J., Silva, R., Santos, D., Souto, E.B., Ferreira, D., 2011. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids surfaces B Biointerfaces* 86, 158–165.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemble, D.J., 2005. Spectrometric identification of organic compounds, 7th ed. John Wiley & Sons, INC, Hoboken, New Jersey.
- Simionatto, E., Facco, J.T., Morel, A.F., Giacomelli, S.R., Linares, C.E.B., 2012. Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. *J. Chil. Chem. Soc.* 57, 1240–1243.
- Simone-Finstrom, M., Spivak, M., 2010. Propolis and bee health: the natural history and



- significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41, 295–311.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2015. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 112, 247–270.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 3, 144–158.
- Sjöström, B., Bergenståhl, B., 1992. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm.* 88, 53–62.
- Sjöström, B., Westesen, K., Bergenståhl, B., 1993. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions: II. Characterization of cholesteryl acetate particles. *Int. J. Pharm.* 94, 89–101.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Pietraszek, J., 2014. Seasonal changes of flavonoid content in *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae). *Chem. Biodivers.* 11, 562–570.
- Slinkard, K., Singleton, V., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 49–55.
- Solórzano, E., Vera, N., Cuello, S., Ordoñez, R., Zampini, C., Maldonado, L., Bedascarrasbure, E., Isla, M.I., 2012. Chalcones in bioactive Argentine propolis collected in arid environments. *Nat. Prod. Commun.* 7, 879–882.
- SPReI, SAGPyA, 2008. Resolución Conjunta 94/2008 y 357/2008. SENASA, Argentina.
- Teeranachaideekul, V., Souto, E.B., Müller, R.H., Junyaprasert, V.B., 2008. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *J Microencapsul* 25, 111–120.
- Teixeira, É.W., Message, D., Negri, G., Salatino, A., Stringheta, P.C., 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 7, 307–315.
- Tretinnikov, O.N., Zagorskaya, S.A., 2012. Determination of the degree of crystallinity in solid-solid equilibria. *J. Appl. Spectrosc.* 79, 521–526.
- Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O., 2003. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 257, 153–160.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., da Rocha Pasin, F., Tsvetkova, I., 2006. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 3, 249–254.
- Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem. Cent. J.* 1, 1–4.

- Tulloch, A.P., 1970. The composition of beeswax and other waxes secreted by insects. *Lipids* 5, 247–258.
- Türkez, H., Yousef, M.I., Geyikoglu, F., 2010. Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2741–2746.
- USP 38-NF 33, 2015. Heavy metals, in: U.S. Pharmacopeia (Ed.), USP 38-NF 33. The United States Pharmacopeia - The National Formulary. Rockville, MD, pp. 241–243.
- van Veen, J.W., 2014. Biology of honeybees and stingless bees, in: Gupta, R.K., Reybroeck, W., Veen, J.W. van, Gupta, A. (Eds.), *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 105–123.
- Vardar-Ünlü, G., Silici, S., Ünlü, M., 2008. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1011–1017.
- Vauthier, C., Couvreur, P., Fattal, E., 2013. Nanomaterials: Applications in drug delivery, in: Brayner, R., Fiévet, F., Coradin, T. (Eds.), *Nanomaterials: A danger or a promise?* Springer London, London, p. 133.
- Vélez-Ruiz, R.I., 2009. Una aproximación a la sistemática de las abejas silvestres de Colombia. Tesis de Maestría en Ciencias Entomología. Universidad Nacional de Colombia.
- Villafuerte, L., García, B., Garzón, M. de L., Hernández, A., Vázquez, M.L., 2008. Nanopartículas lipídicas sólidas. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 39, 38–52.
- Volpert, R., Elstner, E.F., 1993. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Zeitschrift für Naturforsch. C* 48, 851–857.
- Volpi, N., Bergonzini, G., 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 354–361.
- Wagh, V.D., 2013. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013, 1–11.
- Wagner, H., Bladt, S., 2001. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*, 2nd ed. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wang, K., Zhang, J., Ping, S., Ma, Q., Chen, X., Xuan, H., Shi, J., Zhang, C., Hu, F., 2014. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus×canadensis*). *J. Ethnopharmacol.* 155, 300–311.
- Watson, D.G., Peyfoon, E., Zheng, L., Lu, D., Seidel, V., Jonhston, B., Parkinson, J.A., Fearnley, J., 2006. Application of principal components analysis to <sup>1</sup>H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochem. Anal.* 17, 323–331.
- Westesen, K., Bunjes, H., 1995. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *Int. J. Pharm.* 115, 129–131.

- Woisky, R.G., 1996. Métodos de controle químico de amostras de propólis. Tesis de Maestría en Fármacos y Medicamentos. Universidad de São Paulo.
- Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, 99–105.
- Wollenweber, E., Dietz, H.V., 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20, 869–932.
- Yaghoubi, M.J., Ghorbani, G., Soleimanian Zad, S., Satari, R., 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU* 15, 45–48.
- Yang, C., Luo, L., Zhang, H., Yang, X., Lv, Y., Song, H., 2010. Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1268–1282.
- Zhang, C.P., Liu, G., Hu, F.L., 2012. Hydrolysis of flavonoid glycosides by propolis  $\beta$ -glycosidase. *Nat. Prod. Res.* 26, 270–273.
- Zhang, Q., Su, Y., Zhang, J., 2013. Seasonal difference in antioxidant capacity and active compounds contents of *Eucommia ulmoides* oliver leaf. *Molecules* 18, 1857–1868.
- Zhang, R., Zhang, H., Zhang, Z., Zheng, H., Feng, Y., Zhang, W., 2012. Characterization of five natural resins and waxes by Differential Scanning Calorimetry (DSC). *Adv. Mater. Res.* 418-420, 643–650.
- Zhang, Y.-T., Han, M.-Q., Shen, L.-N., Zhao, J.-H., Feng, N.-P., 2015. Solid lipid nanoparticles formulated for transdermal aconitine administration and evaluated in vitro and in vivo. *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, 351–361.
- Zheng, M., Falkeborg, M., Zheng, Y., Yang, T., Xu, X., 2013. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 430, 76–84.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559.
- Zimnicka, B., Hacura, A., 2006. An investigation of molecular structure and dynamics of crude beeswax by vibrational spectroscopy. *Polish J. Environ. Stud.* 15, 4–6.