

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE
APITOXINA**

POR

Valentina Micaela RODRÍGUEZ BATISTA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección - Control y
Tecnología de los Alimentos

Modalidad: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobado por:

Presidente de mesa:



Mirel Cabrera

Segundo miembro:



Alejandra Capelli

Tercer miembro (Tutor):



Catherine Fagúndez

Cuarto miembro (Co-tutor):



Enrique Nogueira

Fecha: 23 de junio del 2022

Autor:



Valentina Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Catherine Fagúndez por su tutoría y por su dedicación a lo largo del proyecto, haciéndolo extensivo al Dr. Enrique Nogueira por su co-tutoría y apoyo.

A la Unidad Académica de Farmacología, Departamento de Clínica y Hospital Veterinario como también Unidad Académica de Nutrición Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR por brindarnos la posibilidad de utilizar los materiales necesarios, con particular énfasis en el HPLC.

A la Facultad de Veterinaria, en especial a todos los docentes y funcionarios que brindaron sus conocimientos y contribuyeron en la formación profesional. A los compañeros a lo largo de toda la carrera y en especial a los amigos que me llevó de la facultad, que, por el aliento y las horas de estudio, fueron fundamentales en la carrera.

A mi familia los cuales fueron pilares imprescindibles durante toda la carrera y a mis amigos y conocidos que contribuyeron para poder alcanzar este objetivo.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1) ANTECEDENTES	8
1. Abeja	8
1.1. <i>Apis mellifera</i>	8
1.2. Biología de la abeja	10
1.3. Productos de la abeja	12
2. Apitoxina	14
2.1. Definición de apitoxina	14
2.2. Aparato del veneno	15
2.3. Características del veneno de abeja	16
2.4. Componentes de la apitoxina	17
2.5. Métodos de extracción de apitoxina	20
3. Usos del veneno de abeja	22
3.1. Aplicación terapéutica de la apitoxina	22
3.2. Fines terapéuticos de la apitoxina	24
3.3. Actividades biológicas de sus componentes	26
3.4. Importancia de conocer la calidad de Apitoxina	28
4. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC y el análisis de la apitoxina ..	29
4.1. Antecedentes de métodos para Apitoxina	29
4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de apitoxina	30
4.3. Optimización de métodos de HPLC	31
2) HIPÓTESIS	35
3) OBJETIVOS	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
4) MATERIALES Y MÉTODOS	36
a) Materiales y equipos	36
b) Método de análisis de partida	36
a) Optimización del método	37
b) Validación del método	37
5) RESULTADOS	39
a) Optimización del método	39
b) Validación del método	43
1. Linealidad	43
2. Límite de detección y límite de cuantificación	47
Cálculo de la concentración de los componentes	50

6) DISCUSIÓN	51
7) CONCLUSIONES	52
8) BIBLIOGRAFÍA.....	53
9) ANEXOS.....	58

RESUMEN

La abeja sintetiza, entre otros productos, veneno o también conocido como apitoxina, compuesta químicamente por una compleja mezcla de sustancias bioactivas en la cual su mayor componente es el agua, pero en su base seca presenta una composición mayoritaria de péptidos, proteínas y enzimas, entre otros componentes. La síntesis del veneno es realizada solamente por las abejas hembra, dentro de las cuales quienes presentan un sistema morfo-funcional más desarrollado son las abejas obreras, que por su función recolectora en busca de alimentos, lo producen como defensa ante amenazas.

La cantidad de factores condicionantes para la síntesis y composición del veneno de abeja abarcan desde su genética hasta factores ambientales donde encontramos las variaciones climáticas y por ende la disponibilidad del alimento a lo largo del año. También importa la edad de las abejas, presentando etapas de producción y posteriormente el método y manejo de la extracción del veneno.

El veneno es de gran interés principalmente por sus usos en la industria farmacéutica y cosmética. Desde la antigüedad este producto ha sido empleado para el tratamiento de diferentes enfermedades, por lo que a lo largo del tiempo se ha profundizado en su investigación, llegando a resultados comprobados para el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide y el dolor. No obstante, se reportan líneas de investigación que se encuentran en diferentes etapas experimentales con resultados prometedores para otras patologías.

Para el uso en las industrias farmacéutica y cosmética, es muy importante conocer la calidad que presenta este principio activo, por lo que se han desarrollado diversos métodos de identificación y cuantificación de los principales componentes de esta mezcla, encontrando en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) uno de los métodos de elección por su buena relación costo-calidad. En Uruguay no hay reportes de dichos estudios, pero para la comercialización de este cotizado producto debería empezar a implementarse. En los métodos ya descritos por HPLC se establecen tiempos de análisis de 30-50 minutos, los cuales requieren de una inversión de tiempo significativa, relevante cuando hay grandes cantidades de muestras a procesar.

Por lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos el desarrollo de un método analítico para cuali-cuantificar muestras de apitoxina con un tiempo menor a lo reportado anteriormente, en el que además se buscó conservar la buena resolución entre los picos referidos a los principales componentes de la apitoxina, como son la melitina, la fosfolipasa A2 y la apamina. Es así que, en este trabajo se reporta el desarrollo de un método con tiempo final de 24 minutos, cumpliendo además con la premisa de conservar la buena resolución entre los picos. Además, se determinaron la linealidad en los rangos de concentración utilizados para estándares de apamina y melitina, y estableciendo también los límites de detección y cuantificación para ambos compuestos, con proyección de continuar evaluando otros parámetros de adecuabilidad del sistema.

SUMMARY

Bee venom, one of the products synthesized by this insect, is chemically composed of a complex mixture of bioactive substances, mostly water, but its dry base has a majority composition of peptides, proteins and enzymes, among other components. The synthesis of bee venom is carried out only by female bees, within which worker bees have a more developed morphofunctional system, due to their defense function of the hive. The synthesis and final composition of bee venom is determined by various factors that range from its genetics to environmental conditions where we find climatic variations and therefore the availability of food throughout the year. The age of the bees also matters, as well as the method and handling of venom extraction. This product is very important for its uses in the pharmaceutical and cosmetic industry. Since ancient times, this product has been used to treat different diseases, so over time its research has deepened, reaching proven results for the treatment of diseases such as rheumatoid arthritis and pain. However, lines of research are reported that are in different experimental stages with promising results for other pathologies. For use in the pharmaceutical and cosmetic industries, it is very important to know the quality of this active ingredient, which is why various methods of identification and quantification of the main components of this mixture have been developed, finding in high performance liquid chromatography (HPLC) one of the methods of choice for its good cost-quality ratio. There are no reports of such studies in Uruguay, but for the commercialization of this product it should be implemented. In the HPLC methods described previously, analysis times of 30-50 minutes are reported, which require a significant investment of time, relevant when there are large amounts of samples to be processed. Therefore, this work proposes the development of an analytical method to quali-quantify samples of bee venom with a shorter time than previously reported, seeking to preserve the good resolution between the peaks referred to the main components such as melittin, phospholipase A2 and apamin. We report the development of a method with a final time of 24 minutes, with good resolution between the different compounds of the mixture. In addition, the linearity in the concentration ranges used for the apamin and melittin standards was determined, and the detection and quantification limits for both compounds are also proposed, with the projection of continuing to evaluate other system suitability parameters.

1) ANTECEDENTES

1. Abeja

1.1. *Apis mellifera*

Las abejas melíferas pertenecen a la clase Insecta al orden Himenóptero caracterizadas por realizar metamorfosis completa. En cuanto a su morfología, cuentan con un metatórax soldado al primer segmento abdominal y presentan dos pares de alas membranosas con nervaduras formando patrones característicos. Dicho orden engloba a la familia Apidae y dentro de esta, a la subfamilia Apinae donde encontramos las abejas del género *Apis*. Las abejas de la especie *Apis mellifera*, son moderadamente vellosas, variando entre 9 y 19 milímetros de longitud, Figura 1 (Le Conte, 2012).



Figura 1. *Apis mellifera* (Montenegro, 2016)

La abeja, *Apis mellifera*, es nativa de África extendiéndose inicialmente por Europa y Asia y luego en la época colonial por el resto del planeta excepto la Antártida. Esta especie a su vez está dividida en subespecies que presentan diferentes características evolutivas determinadas por la adaptación al entorno donde se desarrollan. Es así que podemos encontrar diferencias entre las abejas que viven en climas cálidos la mayor parte del año y las que viven en climas templados con variaciones estacionales, presentando una oferta de alimentos diferentes (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2021).

La demanda poblacional, la infraestructura edilicia y el impacto de la contaminación son otros condicionantes en estos insectos, existiendo una gran variedad de factores que influyen en el desarrollo de la abeja, por lo que la consideración de estos es fundamental para su productividad (FAO, 2021).

En Uruguay la introducción de las primeras colmenas se remonta a inicios del siglo XIX por Bernadino Rivadavia en Colonia del Sacramento (Cordara, 2005). En ese momento se introdujeron abejas europeas que se fueron adaptando a las características climáticas y geográficas del país, por lo que hoy día se las conoce como abejas criollas. Estas abejas han sufrido un proceso de africanización desde la década del 70, que actualmente es casi de un 80% en el interior del país, Figura 2 (Branchiccela, *et al.*, 2014).

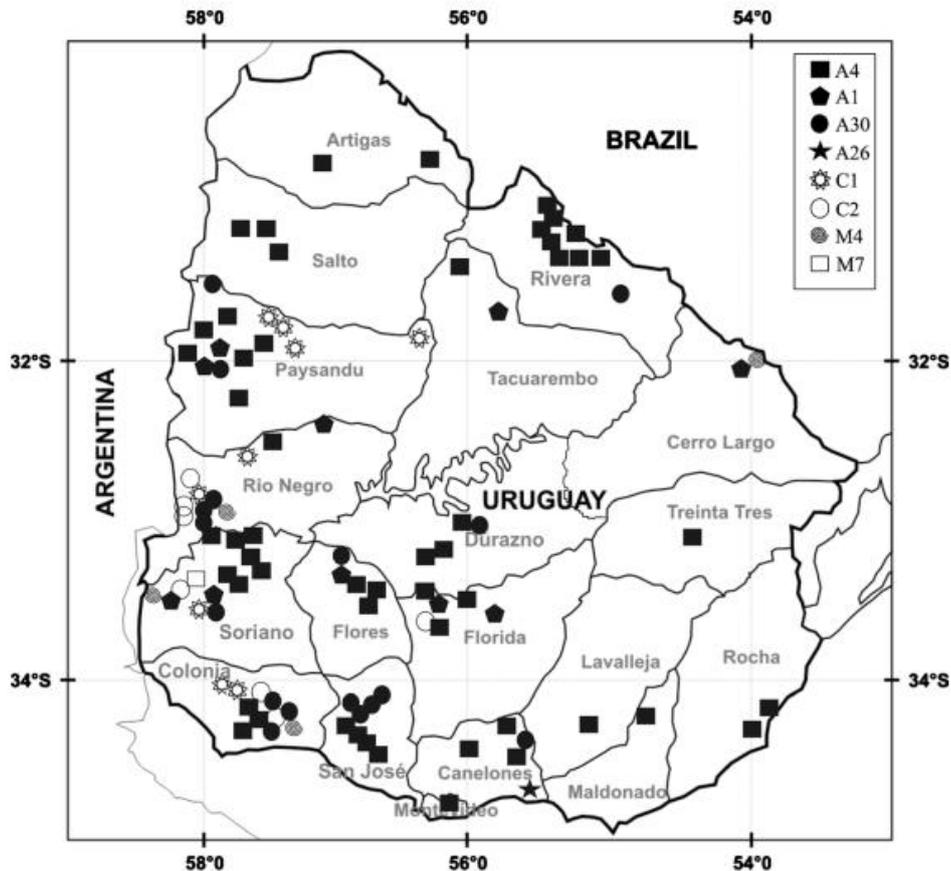


Figura 2. Distribución geográfica de abejas en territorio uruguayo. A4, A1, A30, A26 refiere a abejas africanizadas, mientras que C1, C2, M4 y M7 refiere a abejas típicamente europeas (Branchiccela, *et al.*, 2014).

1.2. Biología de la abeja

Las abejas melíferas son insectos eusociales, que se definen por adultos que viven en grupos, hay cuidado cooperativo de las crías, definen labores en castas, presentan varias generaciones solapadas en la misma colonia y en muchos casos se da la construcción cooperativa de un nido común conocido como panal (Miranda, Palmera y Sepúlveda, 2014). Dentro de este se desarrollan las formas inmaduras que transcurren por las diferentes fases metamórficas, desde huevo, luego larva y pupa hasta alcanzar el estadio adulto (Figura 3).

Las abejas adultas se dividen en reinas, obreras y zánganos. La reina es la hembra fértil que tiene como función principal la reproducción y los zánganos son los machos de la colonia, donde solo algunos de estos últimos en época de apareo, logran depositar su esperma en la espermateca de la reina, desencadenando entonces la producción de huevos que posteriormente serán depositados en las celdas de su colmena. Estos huevos pueden ser fecundados o no, dando lugar a los zánganos a partir de este último caso, los que serán alimentados en la etapa larvaria de mezcla de miel y polen. Por otro lado, los huevos fecundados pueden dar lugar a reinas u obreras, diferenciándose por su alimentación en el estadio larvario, donde las abejas reinas reciben exclusivamente jalea real y las obreras reciben en los primeros 3 días jalea real y luego son alimentadas por una mezcla de miel y polen (Montenegro, 2016).

Las abejas obreras a pesar de ser hembras, tienen su aparato reproductor atrofiado, pero realizan otras funciones indispensables para la colmena. Presentan 3 etapas de desarrollo, la primera va desde su nacimiento hasta el día 12, la segunda del día 13 al 21, y por último del día 22 en adelante. Durante la primera etapa, las nodrizas alimentan a las larvas, las limpiadoras se encargan de quitar larvas y abejas muertas, y las ventiladoras mantienen estable los parámetros de temperatura y humedad de la colmena. En la segunda etapa, se dedican a la construcción de panales. Posteriormente en la tercera etapa, pasan a trabajar en el exterior de la colonia como abejas recolectoras, tomando recursos como el néctar y polen de flores, resinas de árboles, agua y otros recursos del ambiente, para el cual presentan morfológicamente un aparato especializado con fines de optimizar la tarea (Le Conte, 2012). No obstante, cuando la colmena necesita el desempeño de otra tarea, pueden realizar cambios en su función. En el caso de escasez o abundancia de alimento, en el ambiente pueden enlentecer o acelerar las tareas de la colonia (Montenegro, 2016).

Las abejas adultas dependen de la oferta floral, la cual es su alimentación, de forma que la diversidad de plantas y la cantidad de oferta a lo largo del año repercuten en forma directa sobre la síntesis de sus productos, por lo que en meses invernales su metabolismo disminuye en comparación con meses más cálidos (Montenegro, 2016). Para poder llevar adelante este tipo de organización, la comunicación entre ellas es fundamental. Se reportan dos tipos de medios de comunicación, las danzas o “bailes” y las feromonas (Dini y Bedascarrasbure, 2011).

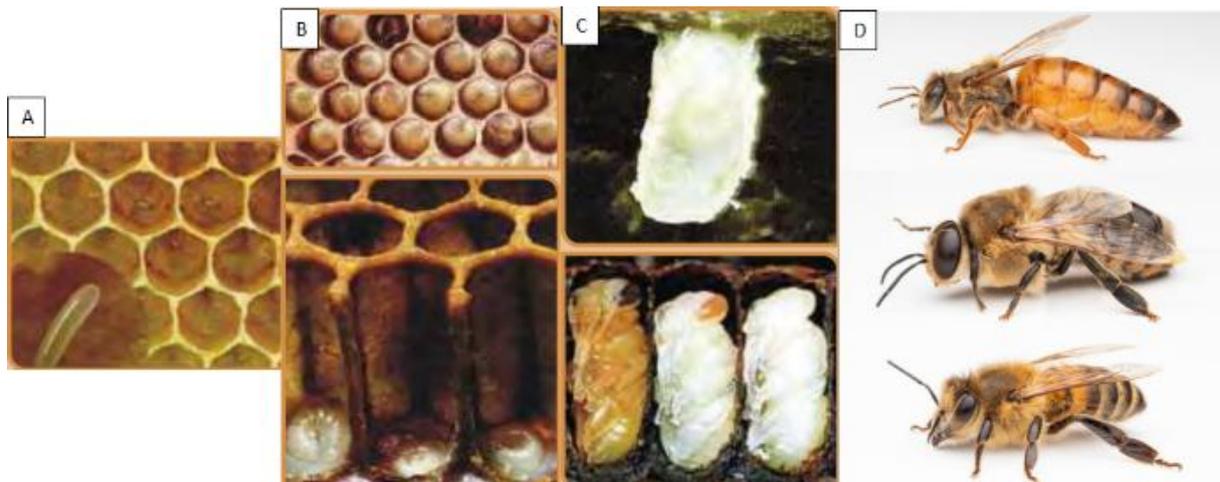


Figura 3. Desarrollo de la abeja: huevo (A), larva (B), pupa (C) y abeja adulta (D). (Dini y Bedascarrasbure, 2011; University of Guelph. Honey Bee Research Centre, s.f.).

1.3. Productos de la abeja

La abeja melífera es reconocida por los beneficios que brindan sus productos como son la miel, el polen, la cera y la apitoxina. Como resultado de su crianza se han obtenido beneficios que son fundamentales para el ser humano, tal es que se cree que la primera sustancia endulzante de alimentos fue la miel, además de su importante impacto ambiental como agentes polinizadores el cual es fundamental en la producción de alimentos y en el mantenimiento de los ecosistemas (Alarcón, Mestanza y Vásquez, 2016).

Algunos de los productos sintetizados en especial por la casta obrera son: la cera, la jalea real y el veneno.

La cera de abejas es producida por las glándulas ceríperas. Su consistencia plástica y su bajo punto de fusión la hace moldeable haciendo posible la construcción de las celdas del panal, Figura 4, A (Vit, 2005).

La jalea real es producida por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de abejas jóvenes y es un producto de elevado valor nutricional por su composición de proteínas, lípidos y vitaminas. Es utilizada para alimentar a las larvas y a la reina Figura 4, B.

El veneno, también conocido como apitoxina (del latín *Apis*, que significa abeja y del griego *toxikon* que significa veneno), es secretado por dos glándulas, una alcalina y otra ácida y posteriormente almacenado en el saco del veneno, utilizado por ellas para defenderse, Figura 4, C (Vit, 2005). Las reinas ya nacen con el saco del veneno completo y las obreras lo van completando durante las primeras 2 a 3 semanas, mientras que los zánganos no presentan aparato del veneno (Crane, 1990).

Además, las abejas obreras recogen el néctar de las flores y otras sustancias azucaradas disponibles en el ambiente, que son transportadas a través de su denominado estomago social, hasta la colmena. Es así que producen la miel, que luego es almacenada en los panales y sufre un proceso de evaporación y enzimático para alcanzar las condiciones en que es conservada, siendo la principal fuente energética para las abejas obreras, Figura 4, D.

El polen apícola (Figura 4, E) es el resultado de compactar el polen de las flores con néctar y sustancias salivares de las abejas obreras. Es depositado cerca de las crías para su alimentación, siendo una fuente de proteínas y lípidos (Brasil, 2000, octubre 10).

Por último, los propóleos son sustancias resinosas que recogen las abejas de flores, yemas, exudados de plantas y se complementan con secreciones salivares, cera o polen (Brasil, 2000, octubre 10) para realizar diferentes funciones como: barnizar las paredes de las cavidades que van a ocupar, tapar agujeros y así construir o evitar su putrefacción, Figura 4, F (Vit, 2004).

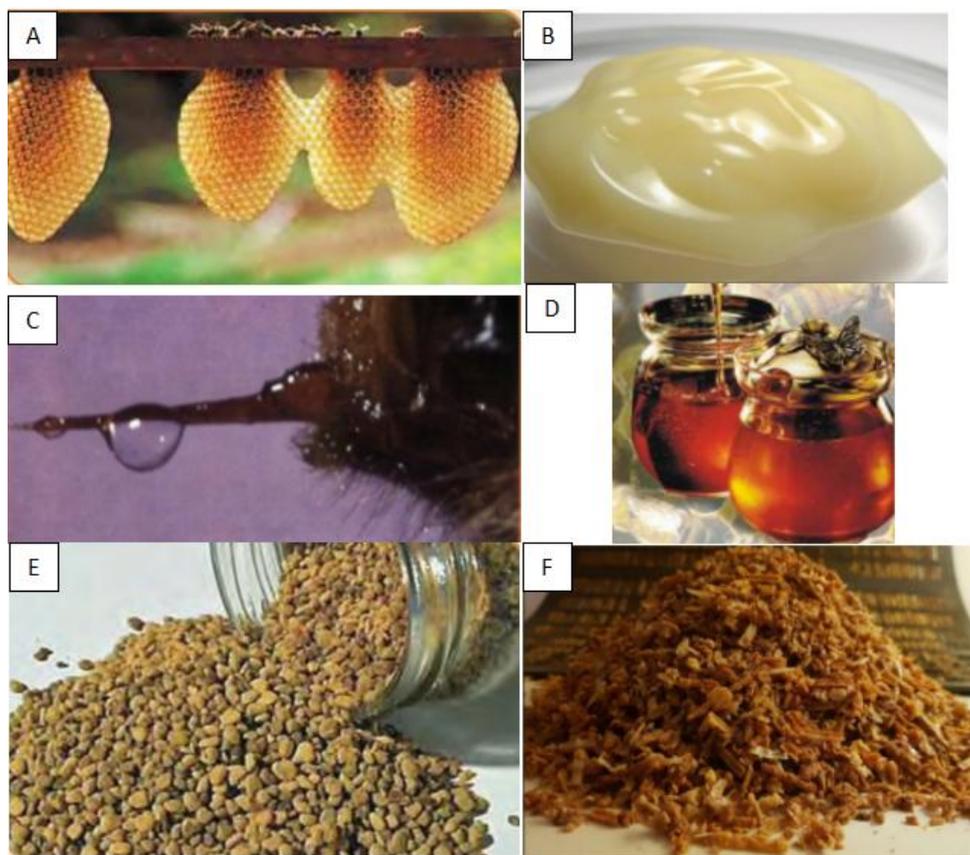


Figura 4. A) Cera de abeja, formando panal de abejas (Dini y Bedascarrasbure, 2011). B) Jalea real (FAO, 2021). C) Descarga del veneno desde el aguijón (Oarquivo. Ciencia y Tecnología (s.f.). D) Miel de abeja, industrializada (Dini y Bedascarrasbure, 2011). E) Polen de abeja multifloral y seco (Dini y Bedascarrasbure, 2011). F) Propóleos frescos y rotos (FAO, 2021).

2. Apitoxina

2.1. Definición de apitoxina

El veneno de abejas ha sido utilizado con fines medicinales y cosméticos en diferentes partes del mundo desde la antigüedad, referenciado en diferentes textos religiosos como el Corán o la Biblia, escritos hace cientos de años (Demolin y Leite, 2005).

El veneno de abeja es producido con el fin principal de defensa ante otras especies, o en el caso particular de las abejas reinas es utilizado contra sus pares. Es producido en un complejo sistema morfo-funcional, y es secretado y liberado a través de un aparato del veneno. El veneno es una compleja mezcla de diferentes sustancias bioactivas en solución (Banks y Shipolini, 1986), adquiriendo el nombre de apitoxina luego de que los compuestos volátiles del veneno de abeja se evaporan en el aire (FAO, 2021).

2.2. Aparato del veneno

El aparato del veneno (Figura 5) es una estructura que presentan de forma desarrollada las abejas obreras y reinas, no así los zánganos. Este aparato se encuentra compuesto por diferentes estructuras que están contenidas dentro de una cavidad en el extremo posterior del abdomen de las abejas.

El aguijón es una estructura constituida por 4 segmentos los cuales se estrechan entre sí para finalizar en una punta hueca y afilada. Normalmente se encuentra retraído hacia el abdomen y al momento de picar sale del mismo por un conjunto de músculos. Este presenta una serie de válvulas, una de ellas forma la lanceta del aguijón la cual se fusiona con la segunda válvula y el estilete para dar lugar al canal, el cual se agranda en un bulbo contra el abdomen donde descarga el contenido producido por la glándula ácida. Por su parte, el saco del veneno es un reservorio grueso, cuticular y laminado que se encuentra asociado a la glándula de Dufour o alcalina (Dotimas y Hider, 1987).

Cuando es activado el mecanismo defensivo del veneno, el aparato inoculador toma el protagonismo y pone en funcionamiento su accionar. En primer lugar, las dos lancetas se deslizan hacia adelante y atrás repetidas veces, las púas de la parte inferior de la lanceta impiden que salgan de la herida una vez que aguijoneó, generando que sea más profunda, hasta aproximadamente la mitad del mismo. En simultáneo, el veneno que estaba inicialmente en su saco, comienza a circular desde el bulbo hasta el canal del veneno exteriorizando a éste en la víctima (Dotimas y Hider, 1987; Martin, Dils y Billen, 2005).

El ataque de la abeja es un tipo de defensa significativo, ya que dejan clavado el aguijón con su glándula tras la picadura, arrancando de este modo el abdomen y llevandola a su muerte, (De Roodt *et al.*, 2005) aunque hay veces en las que la abeja puede en el momento de la picadura retirar el eje del aguijón sin tener que sufrir su muerte (Dotimas y Hider, 1987).

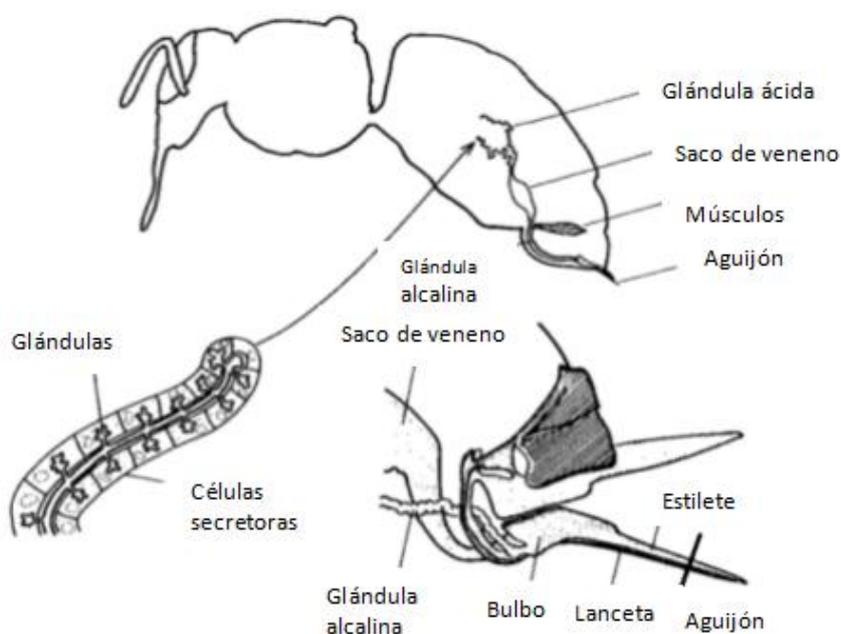


Figura 5. Esquema del aparato del veneno de la abeja y sus componentes. (Dotimas y Hider, 1987)

2.3. Características del veneno de abeja

El veneno de abeja es un líquido incoloro o transparente, de olor aromático y sabor picante-amargo. Presenta un pH ácido que varía entre 4,5 a 5,5, pero la solución acuosa del veneno no conserva el valor de este parámetro, lo que hace indicar que los compuestos volátiles son los responsables de obtener la característica ácida. Es soluble en el agua, no en el alcohol y es precipitado en medios alcalinos como el amonio (FAO, 2021).

Para obtener el veneno seco se expone a temperatura ambiente y en menos de veinte minutos, el mismo llega a perder entre un 65-70% de su peso original. Este resiste a temperaturas bajas o altas, tal es así que no habría repercusiones en la disminución de su potencia si es congelado. El mismo ya no mantiene su transparencia (Figura 6, A) sino que presenta una coloración amarillenta que puede llegar a ser marrón en algunos casos, Figura 6, B (FAO, 2021).

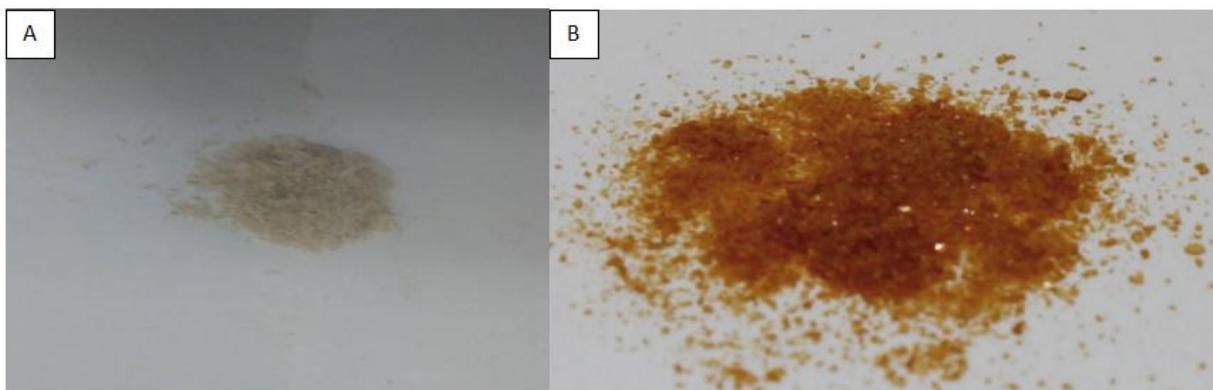


Figura 6. A) Veneno seco luego de perder su transparencia. B) Veneno seco con color marrón (Kim, 2013).

2.4. Componentes de la apitoxina

La apitoxina es una mezcla compleja de compuestos nitrogenados, la mayoría de los cuales son péptidos representados por melitina, fosfolipasa A2, apamina, adolapina, hialuronidasa y péptido degranulador de mastocitos (MCD), entre otros (Demolin y Leite, 2005) (Tabla 1).

La composición cualitativa del veneno en las diferentes especies de *Apis* parece no cambiar, pero sí presentan grandes variaciones con respecto a las cantidades de cada uno de sus componentes (Soares, 2006). En diversos estudios se halló que el agua se encuentra entre 80-88% (Owen, Plaff, Reisman y Wypych, 1990). En cuanto a los péptidos encontramos melitina, melitina-F, apamina, péptido MCD, secapina, tertiapina, adolapina, inhibidor de la proteasa, promina A, B, minimina y cardiopéptido. Además, podemos encontrar: enzimas como Fosfolipasa A2, hialuronidasa, ácido fosfomonoesterasa (fosfatasa ácida), glucosidasa y lisofosfolipasa; aminas biógenas como histamina, dopamina, noradrenalina y leucotrienos; seis fosfolípidos; carbohidratos como glucosa y fructosa, y aminoácidos como ácido aminobutírico y ácido aminoisobutírico.

Principales componentes del veneno:

- Melitina: es un péptido alcalino compuesto por 26 aminoácidos, representa el principal componente del veneno seco, estando presente entre un 40-60% aproximadamente del peso seco, con una masa molecular cercana a los 3 kDa. La melitina adopta una forma cilíndrica helicoidal y en el centro de esta se encuentra una articulación entre las 2 hélices, una polar y la otra es apolar. Este péptido presenta la capacidad de cambiar su conformación de acuerdo al medio en el que se encuentre, Figura 7 (FAO, 2021; Dotimas y Hider, 1987).

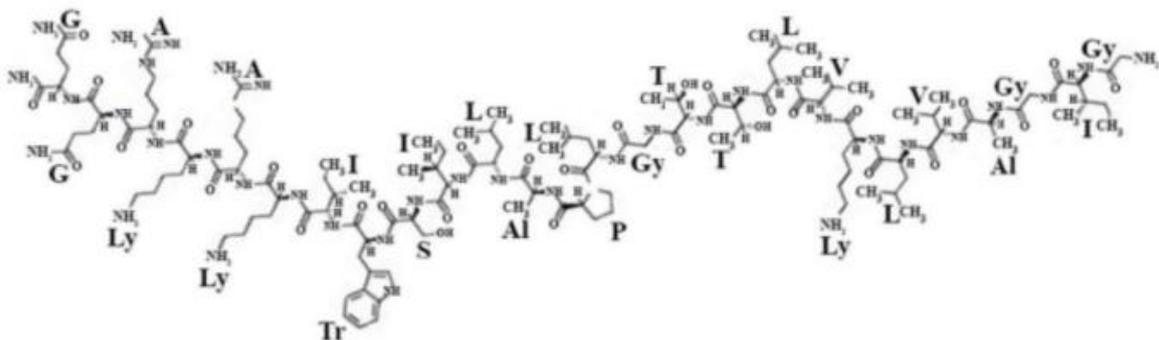


Figura 7. Estructura de la molécula de melitina (Rady, Siddiqui, Rady y Mukhta, 2017).

- Apamina: péptido globular constituido por 18 aminoácidos con dos enlaces disulfuro en su estructura generando una molécula bastante rígida. Se encuentra entre un 2-3% del peso seco de veneno de abeja (FAO, 2021).
- Péptido degranulador de mastocitos (MCD): estructuralmente está formado por 22 aminoácidos con dos puentes disulfuros, por lo que posee entonces una estructura similar a la apamina (FAO, 2021).

- d) Fosfolipasa A2: es una enzima con un peso molecular de 40 kDa, compuesta por 166 aminoácidos de los cuales 93 de ellos tienen características polares y 73 presentan carácter no polar generando como molécula el compuesto con mayor polaridad de la apitoxina. Las fosfolipasas representan un 40% del total de las enzimas presentes en el veneno de abejas, que son entre un 10-12% de la totalidad del veneno seco (Peña *et al.*, 2006).
- e) Hialuronidasa: es una enzima constituida por 349 aminoácidos que presenta un puente disulfuro que le da estabilidad a la molécula. Además, presentan tres sitios para la N-glicosilación y carbohidratos adjuntos. Representa en el veneno de abeja entre un 1 y 2 % (Abd El-Wahed *et al.*, 2018).
- f) Otros componentes: también se encuentran sustancias biógenas como la histamina, serotonina, dopamina, noradrenalina, bradiquinina y sustancia de reacción lenta que se encuentran en pequeñas cantidades. A su vez, hay otros péptidos presentes en el veneno de la abeja, pero no son identificados en todas las pruebas cualitativas que se llevan a cabo luego de la extracción del veneno, por lo que estos varían entre las subespecies o cepas existentes de las *Apis mellifera*, como son secaparina y procamina. La secaparina por su parte está constituida por 25 aminoácidos y puede estar presente hasta en un 2%. Por otro lado, la tetriapina es formada por 21 aminoácidos y cuenta con dos puentes disulfuros los cuales pueden estar posicionados en una estructura similar con la apamina y el péptido degranulador de mastocitos. Entre las aminas encontramos acetilcolina, histamina, serotonina y catecolaminas, compuestos con propiedades inflamatorias y vasoactivas que contribuyen a la reacción local de la inoculación del veneno (Habermehl, 1981), a su vez acelera la absorción del mismo (De Roodt *et al.*, 2005; Dotimas y Hider, 1987; Habermehl, 1981; Peña *et al.*, 2006).

Tabla 1. Composición promedio del veneno de abeja (Rady, *et. al.*, 2017).

Grupo químico	Compuesto	% en el peso seco del veneno
Enzimas	Fosfolipasa A2	10,0-12,0
	Fosfolipasa B	1,0
	Hialuronidasa	1,5-2,0
	Fosfomonoestearasa ácida	1,0
	α -Glucosidasa	0,6
	Fosfatasa	1,0
	Lisofosfolipasa	1,0
	Péptidos	Melitina
Melitina F		0,01
Apamina		2,0-3,0
Péptido MCD		2,0-3,0
Secapina		0,5-2,0
Pamina		1,0-3,0
Minimina		2,0-3,0
Adolapina		1,0
Procamina A, B		1,4
Inhibidor de proteasa		$\leq 0,8$
Tertiapina		0,1
Cardiopéptido		$\leq 0,7$
Fosfolípidos	Totales	1,0-3,0
Aminas	Histamina	1,5
	Dopamina	0,1-1,0
	Noradrenalina	0,1-0,7
	Neurotransmisores	0,1-1,0
Aminoácidos	α -aminoácidos	0,1-0,7
	γ -aminobutírico ácidos	0,1-1,0
Carbohidratos	Fructosa	
	Glucosa	2,0-4,0
Feromonas	Totales	4,0-8,0

2.5. Métodos de extracción de apitoxina

En condiciones normales las abejas que inoculan su veneno mueren, es por eso que se desarrollaron diversos procesos apuntando a maximizar la cantidad y calidad extraída sin la muerte del insecto.

Las técnicas son la inducción a la narcosis entre las abejas, extracción manual y a través de la utilización de dispositivos eléctricos especiales colocados dentro o fuera de la colmena.

La narcosis es la alteración reversible del estado de conciencia sobre abejas retiradas de su colmena y colocadas en un recipiente de vidrio cubierto por un papel que previamente fue empapado en éter. Las abejas depositan su veneno en las paredes del recipiente, el cual es tratado para recuperarlo a través de lavados y filtraciones, también es utilizada la técnica de evaporación, finalmente se obtiene en forma de precipitado. Una vez que las abejas se recuperan de la narcosis son colocadas nuevamente en su colmena, a través de este método de recolección de veneno cada 1000 abejas se recuperan entre 5-57 mg (FAO, 2021).

Para la extracción manual del veneno, se utilizan pinzas de punta fina y se extrae el aparato de veneno de cada insecto (Figura 8, A). El aguijón se debe sumergir en una solución buffer apta para la muestra, al mismo tiempo se debe ejercer presión con dos dedos suavemente sobre el saco del veneno para que circule por el canal inoculador hasta exteriorizarse, esta última maniobra debe realizarse con guantes estériles. El veneno es estabilizado al entrar en contacto con el buffer (De Graaf *et. al.*, 2020). Una de las desventajas que presenta este método son las impurezas presentes en el resultado final, las cuales pueden provenir de tejidos dañados, el contenido intestinal que se dio por fugas accidentales y otros contaminantes que se pueden haber liberado al momento de la extracción manual (Ferreira Junior *et. al.*, 2010).

El método utilizado a nivel comercial se basa en el pasaje de corriente eléctrica a través de una rejilla que está apoyada en uno o más vidrios (Figura 8, B) de forma que cuando la abeja cierra el circuito, recibe una descarga y aguijonea el vidrio, quedando el veneno depositado en este sin que la abeja muera. Los equipos están conformados por un aparato que emite la corriente y por bandejas que tienen una rejilla y vidrios, se puede disponer este dispositivo en diferentes lugares de la colmena, en el interior o en la entrada Figura 8, C.

Una vez que el veneno es depositado sobre el vidrio se cristaliza al contacto con el aire. Transcurridas 12 horas luego de la extracción a temperatura y humedad ambiente, se desprende el vidrio para obtener la apitoxina, en este caso ya seca (en forma de polvo), a través del raspado del vidrio. Es almacenado en un frasco ámbar hermético y conservado en un lugar seco y fresco. A través de este método se logra obtener aproximadamente en promedio 60 mg de apitoxina por colmena. La frecuencia con la que se puede hacer la extracción en una colmena puede ser cada 15 a 21 días, no obstante, a través de experimentaciones se han sometido a las colmenas en una frecuencia superior, pero se cosecha menos (FAO, 2021; Montoya, Argueta, Aldana y Castellanos, 2019).



Figura 8. A) Método manual de extracción de veneno (De Graaf, *et. al.* 2020). B) Equipo estimulador eléctrico, celdas eléctricas, vidrios requeridos para realizar extracción de veneno por método de estimulación eléctrica. C) Celdas eléctricas requeridas para realizar extracción de veneno por método de estimulación eléctrica.

3. Usos del veneno de abeja

3.1. Aplicación terapéutica de la apitoxina

La apiterapia es la utilización de diversos productos apícolas con fines terapéuticos, siendo la apitoxina una de las más estudiadas (Altintaş y Bektaş, 2019). Cuando nos referimos a la apiterapia moderna, encontramos que es la terapia a través de las picaduras de abejas, utilizando directamente a la abeja para que por medio de su aguijón inocule el veneno (Figura 9, A) o terapias con veneno de abeja mediante la inyección de veneno el cual previamente fue extraído de la abeja, Figura 9, B, cuidando la colmena para que pueda seguir su normal funcionamiento. No obstante, se desarrollaron nuevas formas farmacéuticas para la terapia con veneno de abeja como los ungüentos, comprimidos sublinguales, entre otros (Kim, 2013). La picadura de abejas es aquella donde las abejas son guiadas con pinzas y ubicadas específicamente en el lugar seleccionado, pican con microdosis de su veneno, generando en el destinatario efectos terapéuticos en dosis controladas. Este método debe ser aplicado por médicos autorizados (Bohórquez, Cabrera y Vélez, 2010; Kim, 2013).

El otro método de aplicación es por inyectables intradérmicos o subcutáneos a partir de apitoxina previamente obtenida con concentraciones diferentes en la solución. Estas pueden ser aplicadas combinadas con acupuntura, las cuales deben realizarse con personal capacitado. También se han desarrollado formas de uso tópico mediante ungüentos o cremas que pueden tener fines cosméticos, o comprimidos y parches aunque presentan menos eficacia que las inyecciones intradérmicas (Kim, 2013).

Es importante que la aplicación de productos principalmente inyectables, sea bajo supervisión de personal capacitado, ya que se pueden producir una reacción local con síntomas que se instauran puntualmente en la zona de la picadura y provocan inflamación inmediata y eritema, que puede perdurar por horas o días, pero también puede generar una reacción a nivel sistémico con la aparición de un sarpullido generalizado, alteración en la respiración, náuseas y vómitos, hasta puede provocar el desmayo. Por último, la reacción de tipo anafiláctica es la más grave generando dificultad respiratoria, vómitos, pérdida de conciencia y puede llevar a un desenlace fatal como la muerte por problemas circulatorios y respiratorios (De Roodt *et al.*, 2005; Ferreira Junior *et al.*, 2018).

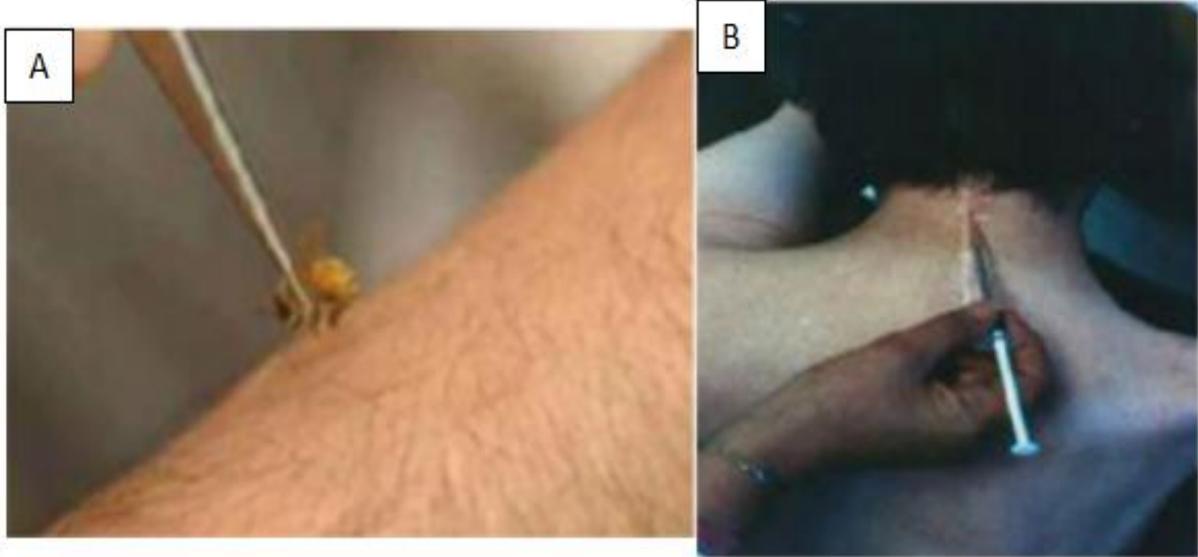


Figura 9. Técnicas de aplicación terapéutica de la apitoxina. A) Técnica de picaduras de abejas directa (Kim, 2013). B) Técnica de inyección a través de la vía intradérmica (Kim, 2013).

3.2. Fines terapéuticos de la apitoxina

La apitoxina es utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades tales como la artritis, la terapia del dolor (Son *et al.*, 2007), en la dermatitis atópica (An *et al.*, 2018) además de ser utilizado para enfermedades neurodegenerativas (Silva *et al.*, 2015) o como agente antitumoral (Son *et al.*, 2007), no obstante las investigaciones se siguen llevando a cabo y pueden surgir nuevas aplicaciones a futuro. Uno de sus usos específicos es para el tratamiento de la artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune inflamatoria que provoca la activación de la cascada de inflamación y reacciones inmunológicas que terminan generando destrucción celular en las articulaciones y el hueso (Bessis *et. al.* 2002). La implementación de la apiterapia para el tratamiento de dicha patología se ha demostrado de forma experimental en ratas generando la supresión del desarrollo del edema, mediante una administración vía subcutánea. Posteriormente se reportaron ensayos clínicos en humanos a través de la inyección de apitoxina por el método de acupuntura, mediante los cuales se logran exitosos beneficios aún más cuando son suministrados en sitios específicos de acupuntura, aliviando el dolor (Son *et. al.* 2007). Fue demostrado que el veneno de abeja utilizado para la acción antiartrítica genera cambios en la respuesta inmune (Chang y Bliven, 1979). En relación a la dermatitis atópica, una enfermedad inflamatoria de tipo alérgica, crónica y recidivante, en la cual factores ambientales, genéticos, inmunológicos y estrés son los encargados de desencadenar el inicio y la progresión de la enfermedad (Bieber y Bruijnzeel, 1990; Kim, Park y Lee, 2019; Novak y Bieber, 2005). An y sus colaboradores en el 2018, llevaron adelante una investigación en ratones con preparados tópicos de apitoxina, en el cual se estudió el efecto específicamente de la melitina con respecto a los mecanismos de acción en esta enfermedad, que por el momento siguen siendo desconocidos. Pero sí llegaron a la conclusión de que la melitina y el veneno de abeja presentan proteínas anti-atópicas y efectos en la actividad inmunomoduladora, generando mejoras en las lesiones cutáneas cuando es aplicado en este tipo de enfermedades (An *et. al.*, 2018). Por otro lado, se llevan adelante estudios en ratas para la utilización de la apitoxina en cosméticos para el tratamiento del acné vulgar donde se señala que se obtuvieron resultados con disminución de la cantidad de microorganismos productores de desencadenar dicha infección y generando una menor inflamación (Kim, *et. al.*, 2015). Para la cicatrización de heridas se utiliza por su potencialidad de ser un agente antiinflamatorio y con capacidad antimicrobiana, entre otros. Otro de sus usos, es para las arrugas faciales en el cual se combinan cosméticos con medicamento donde se reporta disminución clínica de ellas con la aplicación de sueros que presentan veneno de abeja (Abd El-Wahed, *et. al.*, 2021; Han *et. al.*, 2015).

Se ha reportado también actividad anti-neuroinflamatoria, ya que el veneno de abeja actúa en enfermedades que presentan actividad microglial (Cho *et. al.*, 2012), las cuales son células del cerebro que cumplen funciones de defensa inmunológica y fagocitan tejidos en el sistema nervioso central (Kim y Vellis, 2005). En la enfermedad de Parkinson de tipo idiopática, se realizaron estudios *in vitro*, *in vivo* y hasta ensayos clínicos con resultados prometedores para el enlentecimiento de la progresión cuando la apitoxina es aplicada por acupuntura al activar la microglia y el efecto neuroprotector (Cho *et. al.*, 2012). Además, se encuentra en estudio *in vivo* la utilización de este producto en diversas formas farmacéuticas y dosis para otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral

amiotrófica (Silva *et. al.*, 2015). Con respecto a la utilización del veneno de abeja en la terapia de diferentes tipos de cáncer, encontramos que es una de las más prometedoras líneas de investigación y aunque aún no se tengan evidencias claras podría ser utilizada para paliar este tipo de enfermedades. Desjardins en 1859 y Yoannovitch y Chahovitch en 1932, reportaron la evaluación de este producto mediante la picadura de abejas sobre tumores de piel inducidos en ambas orejas de conejo, donde observaron que los tumores se ablandaron, sus bases disminuyeron y hasta perdieron algunas partes para luego generar una cicatriz. Además, como una de las principales conclusiones, se obtuvo que actuó en forma sistémica, ya que se hallaron modificaciones en la oreja que no fue picada. Se continúan investigaciones en esta temática con diferentes líneas de cáncer, aunque no se ha llegado a un tratamiento final. Las repercusiones que arrojan las investigaciones son por lo pronto teóricamente muy auspiciosas ya que este producto y sus componentes tienen propiedades apoptóticas. La melitina particularmente llega a provocar necrosis, detención del ciclo celular e inhibición de la metástasis, genera un efecto inhibitorio sobre la expresión de la ciclooxigenasa y la prostaglandina E2 y también la inhibición de angio marcadores de tipo invasores o de génesis los cuales están involucrados en el desarrollo de algunos cánceres. Es indispensable seguir con el análisis de este potencial uso, por todos los beneficios que puede aportar, pero falta mucha experimentación y pruebas científicas para poder aseverar que es extrapolable a otros animales o al ser humano (Kim, 2013; Rady, *et. al.*, 2017).

3.3. Actividades biológicas de sus componentes

Ha sido estudiado algunas de las actividades biológicas que presentan cada componente del veneno por separado, pero la sinergia en sus efectos que generan en la apitoxina, es más importante que lo que contribuye cada uno de ellos por separado.

La melitina presenta reportes de ser la responsable de la acción antiinflamatoria. No es causada por un solo mecanismo de acción, pero uno de ellos es a través de la inhibición de la producción del anión superóxido. Los neutrófilos presentes en el sitio de la inflamación son los encargados de estimular la producción del anión superóxido desencadenando procesos destructivos, por lo que muchas veces se busca sintetizar análogos de la molécula de melitina que conservan esta propiedad y que carezcan de la acción lítica de la molécula nativa (Dotimas y Hider, 1987). Además, si bien se encuentra por el momento en desarrollo el estudio de algunas líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, se han descrito algunos resultados relacionados a ser partícipe en mecanismos de la inducción de la apoptosis final en algunos casos (Carpena, Nuñez-Estevez, Soria-Lopez y Simal-Gandara, 2020). Con respecto a la respuesta alérgica, la melitina produce la lisis celular de los tejidos, esta molécula disuelve las membranas celulares en contacto con ellas, interrumpiendo su normal funcionamiento. De tal forma genera una disrupción que a raíz de la lisis celular puede desencadenar la liberación de otros componentes nocivos, los cuales a su vez generan daños mayores en el sistema como el mecanismo de dolor en el paciente. La melitina es la única sustancia que produce dolor porque activa a las células nociceptivas primarias de forma directa o indirectamente (Chen, Guan, Sun y Fu, 2015). Este componente lítico puede afectar los glóbulos rojos, las células musculares, los fibroblastos y los hepatocitos. Los efectos de la melitina, son potenciados por la presencia de fosfolipasa A2, actuando en forma sinérgica para producir la lisis celular. La fosfolipasa A2 actúa específicamente sobre los fosfolípidos, componentes fundamentales de la membrana celular, evitando así su normal empaquetamiento y llevando a la aparición de poros, causando lisis celular (Dotimas y Hider, 1987). Esta enzima junto a la histamina es responsable de desencadenar la respuesta inflamatoria (FAO, 2021; Dotimas y Hider, 1987). La enzima hialuronidasa es un compuesto importante del veneno que cataliza la degradación del ácido hialurónico. El ácido hialurónico es una sustancia intersticial fundamental de los tejidos animales, presentando propiedades adhesivas que generan que las células se mantengan juntas, ya que químicamente es un polisacárido que produce una solución altamente viscosa entre las células tisulares. Cuando este ácido es destruido por la enzima hialuronidasa comienzan a quedar espacios entre las células lo que facilita la penetración de otros componentes del veneno.

Los componentes de alto peso molecular presentes en el veneno de abeja como son las enzimas fosfolipasa A2 y la hialuronidasa, son capaces de provocar una respuesta inmune, pero a su vez también en algunos casos son las responsables de desencadenar la hipersensibilidad al veneno. La apamina es una neurotoxina que ejerce influencia tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Como neurotoxina que es, se une con alta afinidad a los receptores del calcio (Ca^{2+}) dependientes de canales de potasio (K^+) en los tejidos nerviosos. De esta forma actúa bloqueando selectivamente los canales de potasio y genera el bloqueo de efectos inhibitorios de la hiperpolarización, brindando

la posibilidad de ser empleados en enfermedades del sistema nervioso central (Gu, Han, Park, 2020). El péptido degranulador de mastocitos, como su nombre lo indica es capaz de desgranular mastocitos en bajas concentraciones. Los mastocitos son células presentes en la sangre y en tejidos perfundidos por sangre, generando la liberación de histamina, lo que desencadena una respuesta alérgica. En cuanto a los otros péptidos presentes en el veneno de abeja, la secapina y tertiapina no presentan una toxicidad significativa en los mamíferos. Por lo que se cree que este tipo de péptidos presenta acción de repeler quizás en artrópodos o en otros insectos. Cuando hablamos de las aminas biógenas presentes en el veneno de abeja, la histamina es una de las principales, pero en comparación con otros componentes se encuentra en baja proporción. No obstante, la acción de los otros componentes en las células como ser la lisis celular producida por la **melitina** o la **fosfolipasa A2** o la degranulación de los mastocitos inducida por el MDP, generan liberación de histamina de sus propias células. Además, la histamina produce dilatación y genera el aumento de la permeabilidad de los capilares en los tejidos sanguíneos, facilitando de este modo que los otros componentes del veneno penetren el sistema, siendo este un factor de difusión. Esto mismo es lo que genera otra amina biógena como la serotonina, en cuanto a la presencia de otras de su mismo grupo se hallan en tan bajas cantidades que no llegan a desencadenar ninguna reacción específica en los animales (Dotimas y Hider, 1987).

3.4. Importancia de conocer la calidad de Apitoxina

La apitoxina puede ser empleada para desarrollar diferentes fórmulas para sus usos comprobados en la medicina y cosmética quedando abierta la puerta al estudio e innovación, por lo cual conocer la composición del veneno de abeja que es utilizado para los diferentes fines, es fundamental. La apitoxina tiene la particularidad de presentar una base natural, por lo que su composición puede variar según diferentes factores, pero los componentes principales que son tomados como punto de calidad son la **melitina**, la **apamina**, el **péptido MCD** y la **fosfolipasa A2**. Para tener una noción clara de la calidad de la muestra, con el fin de inferir en la optimización de su producción y conseguir mejores resultados hay que remontarse a toda la cadena productiva de la abeja, teniendo presentes los posibles factores que terminan siendo de importancia en el resultado final. Estos factores pueden ir desde la genética que presenta la abeja, el ambiente donde se desarrolló incluyendo el clima, la disponibilidad y la riqueza del alimento natural, si la colmena tuvo algún tipo de enfermedad colectivo o parasitosis que puede haber comprometido su desarrollo, las etapas de trabajo que llevó adelante la abeja, la edad de la colmena, (ya que la producción de veneno presenta fases definidas por la edad y luego se desarrolla la declinación de la síntesis por la avanzada edad) y la incidencia humana en estos procesos. También el método y momento de extracción del veneno como las condiciones de procesado y almacenamiento influyen en la composición, calidad y rendimiento, encontrando mejores resultados cuando es más fructífera la abeja (FAO, 2021; Ferreira Junior *et. al.*, 2010; Nowar, 2016).

Por todo lo mencionado anteriormente, si se desea comercializar este producto y aplicarlo a la industria farmacéutica, es necesario su análisis cuali-cuantitativo, por lo que se han desarrollado los métodos analíticos que permiten la separación, identificación y cuantificación de los principales componentes y así monitorear la calidad de la apitoxina obtenida como ser la cromatografía líquida de alta resolución, o HPLC por su sigla en inglés, High performance liquid chromatography. A pesar de la importancia que tiene conocer la composición del veneno, en Uruguay no hay reportes de que se realice, por lo que debería comenzar a implementarse para, por ejemplo, poder influir positivamente en los factores que condicionan la síntesis de este valioso producto, teniendo luego la posibilidad de comercializarlo, ya que es un producto muy bien cotizado en el mercado.

4. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC y el análisis de la apitoxina

4.1. Antecedentes de métodos para Apitoxina

A lo largo del tiempo en la investigación del veneno de abeja, se desarrollaron diferentes métodos para su caracterización, en los cuales se describen pruebas biológicas, enfoques químicos con base en reacciones típicas de proteínas y técnicas de separación, técnicas donde se involucra la filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, entre otros, pero lo que ocurre es que se debe invertir mucho tiempo en ellos para obtener resultados.

Otro de los métodos utilizados para la separación de los componentes del veneno de la abeja es la cromatografía de exclusión por tamaño que es llevado adelante con geles hidrofílicos blandos, pero son lentos y poco eficientes para realizar análisis cuantitativos (Pacifikovfi *et. al.* 1995).

El método de electroforesis capilar, a pesar de ser conocido y validado en la separación y cuantificación de péptidos y proteínas, siendo estos últimos los principales componentes y los más presentes en el veneno de abeja, no es de los métodos más utilizados en la práctica. Es por ello que desde un tiempo a esta parte se comenzaron a sustituir por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), método que presenta no sólo una disminución en la cantidad de tiempo empleada para el análisis, sino que también ofrece una alta eficiencia de separación de los componentes, Figura 10. Luego de realizar un estudio comparativo entre la electroforesis capilar y un método por HPLC se llegó a la conclusión que por ambos son efectivos, alcanzando en la electroforesis capilar una mejor resolución peptídica permitiendo su cuantificación, pero la ventaja del HPLC son los tiempos de análisis y el resultado es muy eficiente con costos muy por debajo que la otra posibilidad (Pacifikovfi *et. al.* 1995).



Figura 10. Cromatógrafo (HPLC Dionex, Ultimate 3000, con bomba LPG 3400 estándar, autosampler WPS 3000 PL, detector (DAD) 3000, loops de 50µl y de 250µl) para la realización de la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography), de la Unidad Académica de Farmacología, Departamento de Clínica y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de apitoxina

Anteriormente vimos que la composición de la apitoxina es muy compleja por la cantidad de sustancias que la componen, pero la **melitina**, la **apamina** y la **fosfolipasa A2** son de los componentes principales y por ello al momento de aplicar un método de análisis por HPLC son de mayor interés, sumado que los costos de utilización de más estándares haría inaccesibles estos análisis.

Las columnas cromatográficas de fase reversa como las C18 y aquellas que presentan un tamaño de poro de 180 Å o menor son las que arrojaron mejores resultados de separación de los componentes mencionados, mediante el uso de gradientes de solventes con pH regulado como fases móviles (Rybak-Chmielewska y Szczêsna, 2004). Se han reportado varios métodos de análisis por esta tecnología que presentan como desventaja los tiempos de análisis largos, entre 35-50 minutos por muestra, lo que conlleva a una gran carga horaria para realizar estos estudios cuando se tiene una gran cantidad de muestras. Por lo que desarrollar un método que siga conservando la buena resolución entre los picos y que pueda disminuir el tiempo empleado, es el objetivo de este trabajo.

- Método Rybak-Chmielewska & Szczêsna: gradiente lineal: 5-80% B (solución A: TFA 0,1% en agua, solución B: TFA 0,1 % en MeCN: agua (80:20)) durante 40 min, a un flujo de 2,0 mL/min y a temperatura de 25°C. Tiempo total de 45 min.
- Método Ferreira Junior *et. al.*: gradiente lineal: 10–100% B (solución A - 0,1% TFA en agua, solución B: TFA al 0,1 %, MeCN: agua (90:10)) durante 31 min, a un flujo de 0,2 mL/min. Tiempo total de 36 min.

Además, cuando se lleva adelante el desarrollo de un nuevo método se debe validar el mismo mediante la determinación de parámetros de adecuabilidad del sistema como son la selectividad, la precisión, la exactitud, linealidad, el rango operativo, detección del límite y el límite de cuantificación (Ionete, Dinca, Tamaian y Geana, 2013), es así que, una vez optimizado el método de trabajo, se debe proceder a su validación.

La selectividad mide la capacidad del método para identificar o cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, en una muestra en las condiciones del método. La precisión mide el grado entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. Refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. La exactitud mide la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio (Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito, UNODC, 2010; International Conference on Harmonisation, ICH, (junio, 2014)). Un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración del analito en un determinado rango de trabajo. El límite de detección es la concentración mínima de un analito que puede ser detectada por un método con un determinado grado de certidumbre y el límite de cuantificación es el menor contenido de analito que puede determinarse cuantitativamente con un grado razonable de certidumbre (ICH, junio, 2014; UNODC, 2010).

4.3. Optimización de métodos de HPLC

La optimización de un método es el proceso por el cual se procura adecuar los diferentes parámetros de un sistema cromatográfico con el fin de alcanzar los objetivos deseados. Esto implica que el método permite una buena separación entre los diferentes componentes del tipo de muestras a analizar, picos con buena simetría y finos, y además cortos tiempos de análisis.

El parámetro que permite determinar si dos compuestos presentan una separación suficiente y adecuada es la resolución, la cual indica la calidad de la separación, como una medida numérica entre la separación de dos componentes, (Hernandez, 2005) y se define en la figura 11:

$$R_s = \frac{V_2 - V_1}{1/2(W_1 + W_2)}$$

Donde (V_i) es el volumen de retención de cada compuesto y (W) la anchura de cada pico

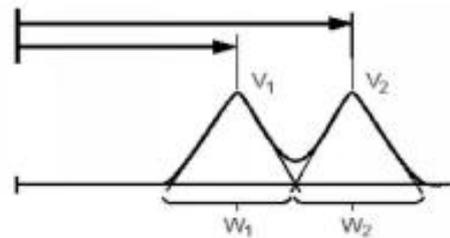


Figura 11. Fórmula para el cálculo de la resolución entre los picos en un análisis cromatográfico (Hernandez, 2005).

En donde además el volumen de retención (V_i) es el volumen de elución de la fase móvil en la que sale el compuesto de interés y este volumen de retención es característico de cada compuesto (Hernandez, 2005).

En un sistema de HPLC se pueden variar diferentes parámetros para lograr el objetivo de optimizar el método con los requisitos anteriormente mencionados, pero cada cambio en los parámetros trae consigo posibles compromisos en otros de ellos, a los que hay que buscar un equilibrio para alcanzar el desarrollo de un método con el fin deseado.

Parámetros a variar:

- Flujo
- Composición de fase móvil
- Forma del gradiente

- **Variación del flujo**

Cuando se parte un método que presenta un determinado flujo, por las interacciones químicas y la elución de sus componentes los picos correspondientes a los componentes detectados en el HPLC, en el cromatograma se pueden distribuir de la siguiente manera, figura 12, A.

Pero si nosotros aumentamos el flujo, esperamos que los compuestos realicen su elución en menor tiempo. En un cromatograma podemos ver esta variación del flujo con la disminución del tiempo en la aparición de los picos que se corresponden a los componentes, pero se compromete la resolución entre los picos, figura 12, B (Hernandez, 2005).

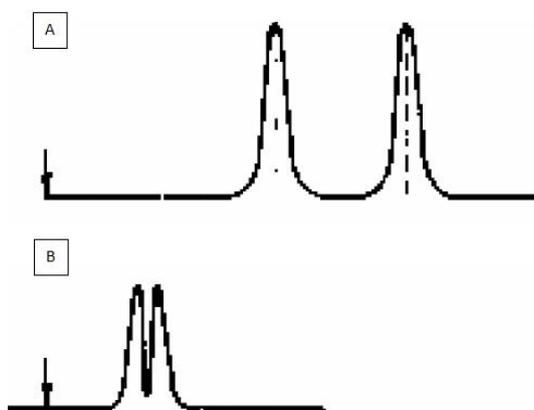


Figura 12. Esquema de la distribución de los picos en un cromatograma cuando se hace variación en el flujo (Gomis, 2008).

- **Variación de la composición de fase móvil**

Con respecto a este parámetro la modificación de la liberación de las diferentes fases móvil que son las que disuelven a la muestra que contiene los componentes que queremos separar y luego estos últimos son los que interactúan con la fase estacionaria a través de las reacciones químicas. En el caso de un sistema de fase inversa cuando se utiliza como fase móvil disolventes polares el cual normalmente se utiliza agua como base y es combinado con disolvente orgánico polar (acetonitrilo o metanol), en contacto con la fase estacionaria que por las cadena de carbono (C18) que se encuentran recubiertas a las microesferas de sílice, genera un fase estacionaria no polar, los analitos no polares interactúan y permanecen más tiempo con esta fase estacionaria abandonando la columna más tarde que los compuestos polares. Es por ello que por ejemplo cuando nosotros partimos de un método con 30% de acetonitrilo y 70% de agua, las interacciones descritas presentan una distribución de los picos como podemos ver en la figura 13 A, pero cuando aumentamos la liberación de la fase que contiene el acetonitrilo y la misma pasa a ser de un 41% y con respecto a la del agua la disminuimos a un 59%, figura 13 B, es decir que la concentración de la fase con acetonitrilo que llega a la fase estacionaria también aumenta genera que se disminuyan los tiempos de retención de los

componentes y se acorta el tiempo de corrida, pero disminuye la resolución de los picos (Hernandez, 2005 ; Theory labster, 2021). Donde el tiempo de retención (t_R) es el tiempo transcurrido desde que el compuesto es inyectado hasta que alcanza el detector (Hernandez, 2005).

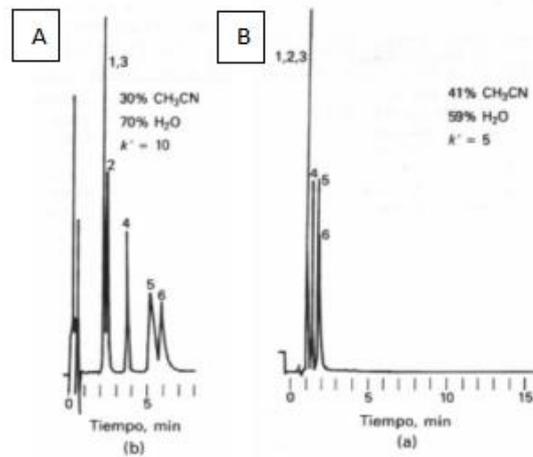


Figura 13. Esquema de la distribución de los picos en un cromatograma cuando se hace variación en la composición de la fase móvil, (Gomis, 2008).

- **Variación en la forma del gradiente**

Las modificaciones que se realizaron con respecto a este parámetro, están vinculadas y se hicieron en conjunto a las variaciones mencionadas anteriormente en relación a la fase que contenga el modificador orgánico utilizado como el acetonitrilo. Pero en este caso se debe tener en consideración la pendiente del gradiente. El mismo es cuando pasamos de una baja concentración de una fase a una mayor concentración en determinado tiempo. Por ejemplo en la figura 14 en el gráfico de la concentración de la fase B cuando pasamos de 5% a 90% en 15 minutos, generamos una pendiente mayor que cuando pasamos de 5% a 70% en los mismo 15 minutos, figura 15. Lo que repercute en una pendiente más grande es en la línea de base del cromatograma siendo más inclinada con respecto al eje del tiempo y cuanto más inclinada esta línea se condiciona la cuantificación posterior de los componentes a través de los picos obtenidos (Hernandez, 2005).

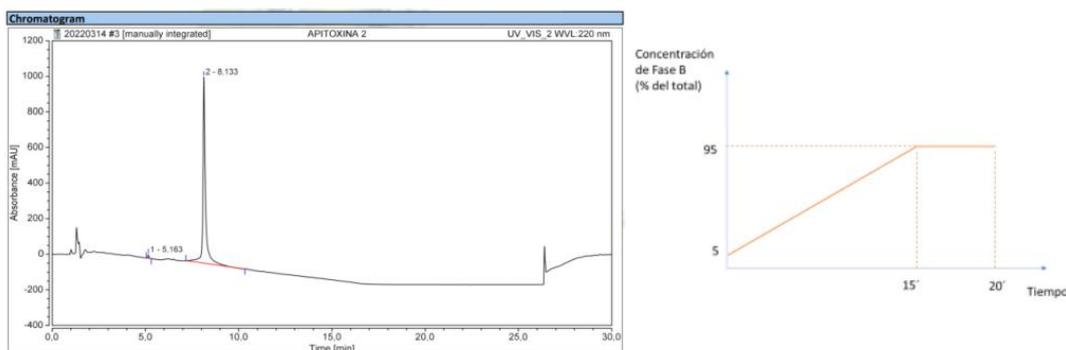


Figura 14. Cromatograma de una muestra de apitoxina y gráfico de la concentración de la fase B en función del tiempo.

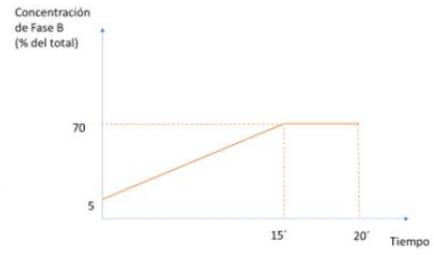
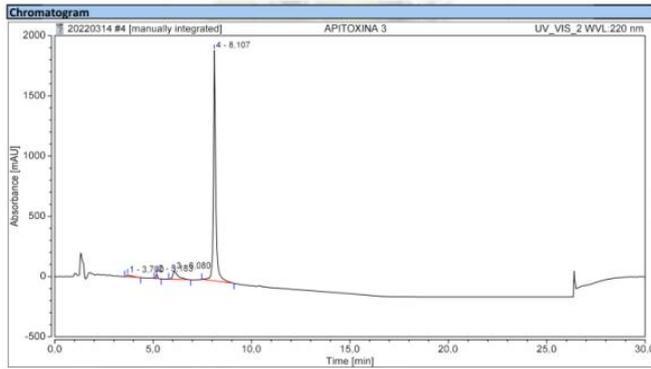


Figura 15. Cromatograma de una muestra de apitoxina y gráfico de la concentración de la fase B en función del tiempo.

2) HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un método analítico por HPLC con condiciones óptimas para determinar la composición de Apitoxina, utilizando sus principales componentes como estándares de referencia.

3) OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para determinar la composición de apitoxina producida en Uruguay.

Objetivos específicos

- Desarrollo de un método analítico por HPLC para determinar la composición cuali-cuantitativa utilizando estándares de melitina y apamina, buscando los menores tiempos de análisis y buenas resoluciones de los picos.
- Aplicabilidad del método desarrollado a la determinación cuali-cuantitativa a diferentes muestras de apitoxina, hacia la validación del método analítico.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se desarrolló un método analítico por HPLC y se comenzó con su validación con el fin de determinar la composición en base a los principales componentes de las muestras de apitoxina.

Se utilizaron métodos por HPLC reportados en literatura como punto de partida para este estudio (Ferreira Junior, *et al.* 2010, Nowar, 2016, Rybak-Chmielewska y Szczêsna), los cuales tienen tiempos de análisis de entre 35 y 50 minutos, que son tiempos elevados cuando se desean analizar muchas muestras. Por tal motivo, se planteó realizar ajustes en los diferentes parámetros de estos métodos para lograr buenas resoluciones y los menores tiempos de análisis posibles. Además, mediante el uso de estándares de algunos de los componentes de la misma, se podrán identificar y cuantificar, lo que permitirá tener una aproximación a la composición del problema.

a) *Materiales y equipos*

Para la realización de la técnica se utilizaron los siguientes solventes para la preparación de las fases móviles acetonitrilo, metanol y agua aptos para cromatografía líquida de alta resolución, marca Carlo Erba. Para el buffer de la fase móvil se utilizó ácido trifluoroacético Carlo Erba ppa.. Como materiales de laboratorio se emplearon para la preparación de las fases móviles sistema de filtración de fases móviles, filtros, botellas reservorios, probetas y bomba de vacío. También se necesitaron muestras de apitoxina y ácido fórmico en agua para su solubilización. Para la preparación de las muestras de apitoxina eppendorf, tubos Falcon®, viales para muestras de cromatografía líquida de alta resolución, filtros de jeringas, jeringas y vortex.

Los estándares fueron melitina de abeja con una potencia mayor o igual al 85% y el estándar de apamina de abeja con una potencia mayor o igual al 95%, fueron adquiridos mediante Sigma-Aldrich.

Los análisis correspondientes se realizaron en un HPLC Dionex, Ultimate 3000, con bomba LPG 3400 estándar, autosampler WPS 3000 PL, detector (DAD) 3000, loops de 50µl y de 250µl), de la Unidad Académica de Farmacología, Departamento de Clínica y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR y columna cromatográfica C18, Hibar® 5 µm,, 150 x 4.6 mm, Purospher STAR, Merk. fase reversa, disponible en la Unidad Académica de Farmacología, Departamento de Clínica y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

b) *Método de análisis de partida*

Como método de partida para la puesta a punto del análisis se tomó como método inicial el descrito por Ferreira Junior *et al.*. Para el cual se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución para la separación de los principales componentes de muestras de apitoxina. Se comenzó con la preparación de la apitoxina que estaba seca, partiendo de aproximadamente 21 mg de ella se solubilizó en 25 mL de ácido fórmico al 0,1% en agua. Se cargaron en viales de 1-1,5 mL los cuales fueron colocados para ser analizadas en el HPLC con una columna C18 fase reversa 5 µm (4.6 x 150 mm) en un sistema de dos disolventes donde la fase A era ácido trifluoroacético 0.1% en H₂O y la fase B ácido

trifluoroacético 0.1% en MeCN. La columna se eluye a un flujo de 1 mL/min con un gradiente de 10 a 100% de la fase B durante 31 minutos, después de una elución isocrática de 5 minutos con B al 10% en una temperatura de 25°C.

a) Optimización del método

El primer objetivo particular propuesto es el desarrollo de un método optimizado con el fin de disminuir los tiempos de análisis, pero conservando la buena resolución de los picos. Para alcanzar dicho objetivo se realizaron variaciones en los parámetros del flujo, composición de la fase móvil y forma del gradiente. Los cambios se fueron realizando a partir del cromatograma del método de partida y luego fueron monitoreados a través de los sucesivos cromatogramas obtenidos de los métodos desarrollados buscando los requisitos propuestos. En relación a la variación del flujo, el método utilizado como método de partida presentaba un flujo de 1 mL/min, el cual se aumentó a 1,5 mL/min en el primer desarrollo del método y luego se mantuvo en 1,5 mL/min en los sucesivos métodos desarrollados esperando que los compuestos también realicen su elución en menor tiempo cuando se aumentó este parámetro. Las variaciones que se realizaron en la composición de la fase móvil en las diferentes pruebas, fue en la concentración del modificador orgánico utilizado en la fase B como es el Acetonitrilo (MeCN). Se realizaron variaciones en las composiciones relativas de ambos solventes (Fase A y Fase B) a lo largo del tiempo con diferentes pendientes para el gradiente de concentración de B. Esto genera variaciones en los tiempos de elución de cada componente de la muestra, tal que cuanto mayor sea la concentración en B menos son los tiempos de retención de cada compuesto.

b) Validación del método

Una vez llegado a un método adecuado, se hicieron ensayos destinados a determinar la linealidad, límite de detección y límite de cuantificación. Para lo cual se utilizaron estándares de melitina y apamina, se comenzó realizando para cada uno de ellos 3 soluciones con concentración inicial conocida y por cada solución de ellas se realizaron análisis en el método desarrollado por triplicado a dos longitudes de onda $\lambda = 220 \text{ nm}$ y 280 nm . A partir de los cromatogramas obtenidos por cada corrida, se tomaron las áreas de los picos, los cuales fueron analizados posteriormente.

Para cada estándar y cada longitud de onda estudiada se realizó una tabla con sus áreas correspondientes y luego por cada una de las soluciones se hizo su promedio y su desviación estándar. También se graficó las áreas promedios en función de la concentración inicial del estándar y se tomó los valores que arroja la misma de R^2 siendo el coeficiente de correlación y la pendiente de esta curva de calibración como datos para determinar los parámetros de validación del método estudiados. (Todos los cálculos informados son en base al peso neto de estándar medido para realizar las soluciones). Se puso en práctica el método desarrollado para evaluar una muestra de apitoxina, con el fin de determinar la concentración de la melitina y la apamina, a través del

área de los picos detectados en el cromatograma, en los cuales se contempla la potencia correspondiente a cada estándar utilizado.

Concentración inicial del estándar:

Melitina: estándar de melitina de abeja. Potencia $\geq 85\%$

Solución	Concentración (mg/mL)
1	0,84
3	0,168
4	0,084

Apamina: estándar de apamina de abeja. Potencia $\geq 95\%$

Solución	Concentración (mg/mL)
1	0,2
3	0,04
4	0,02

5) RESULTADOS

a) Optimización del método

En este trabajo se desarrolló un método analítico por HPLC y se comenzó con su validación con el fin de determinar la composición en base a los principales componentes de las muestras de apitoxina.

- **HPLC** con detector de arreglo de diodos ($\lambda=220$ nm y 280 nm).
- **Columna cromatográfica:** C18 fase reversa, 5 μ m (4.6 x 150 mm)
- **Fase móvil:** gradiente lineal de 10-100% en fase B por 31 minutos, flujo 1 mL/min, a 25°C.

Fase A: ácido trifluoroacético 0.1% en H₂O

Fase B: ácido trifluoroacético 0.1% en MeCN

- **Muestras:** el veneno seco se solubilizó en una solución de ácido fórmico 0.1% en H₂O.

Desarrollo de los métodos:

Los componentes y parámetros que se mantuvieron constantes fueron:

T°: 25° C

Fase A: H₂O / 0.1% TFA

Fase B: MeCN / 0.1% TFA

$\lambda = 220$ nm y 280 nm.

Volumen de inyección 100 μ L

Cambios realizados en las condiciones cromatográficas

Método 1: Flujo 1mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
30	100
33	100
33.01	5
38	5

Método 2: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
30	100
33	100
33.01	5
38	5

Método 3: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
15	80
20	80
25	100
30	100
30,01	5
35	5

Método 4: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
15	100
30	100
30.01	5
35	5

Método 5: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	10
15	95
25	95
25,01	10
30	10

Método 6: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
20	80
20,01	5
25	5

Método 7: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
15	70
15,1	5
20	5

Método 8: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
15	60
15,1	5
20	5

Método 9: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	2,5
15	70
15,1	5
20	5

Método 10: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	10
15	70
15,1	10
20	10

Método 11: Flujo 1,5mL/min

Tiempo (min)	Concentración Fase B (%)
0	5
15	70
20	70
20,01	5
24	5

El método 11 es el elegido, ya que cumple con los requisitos planteados de disminuir el tiempo final de corrida, conservando la buena resolución entre los picos. (Figura 16).

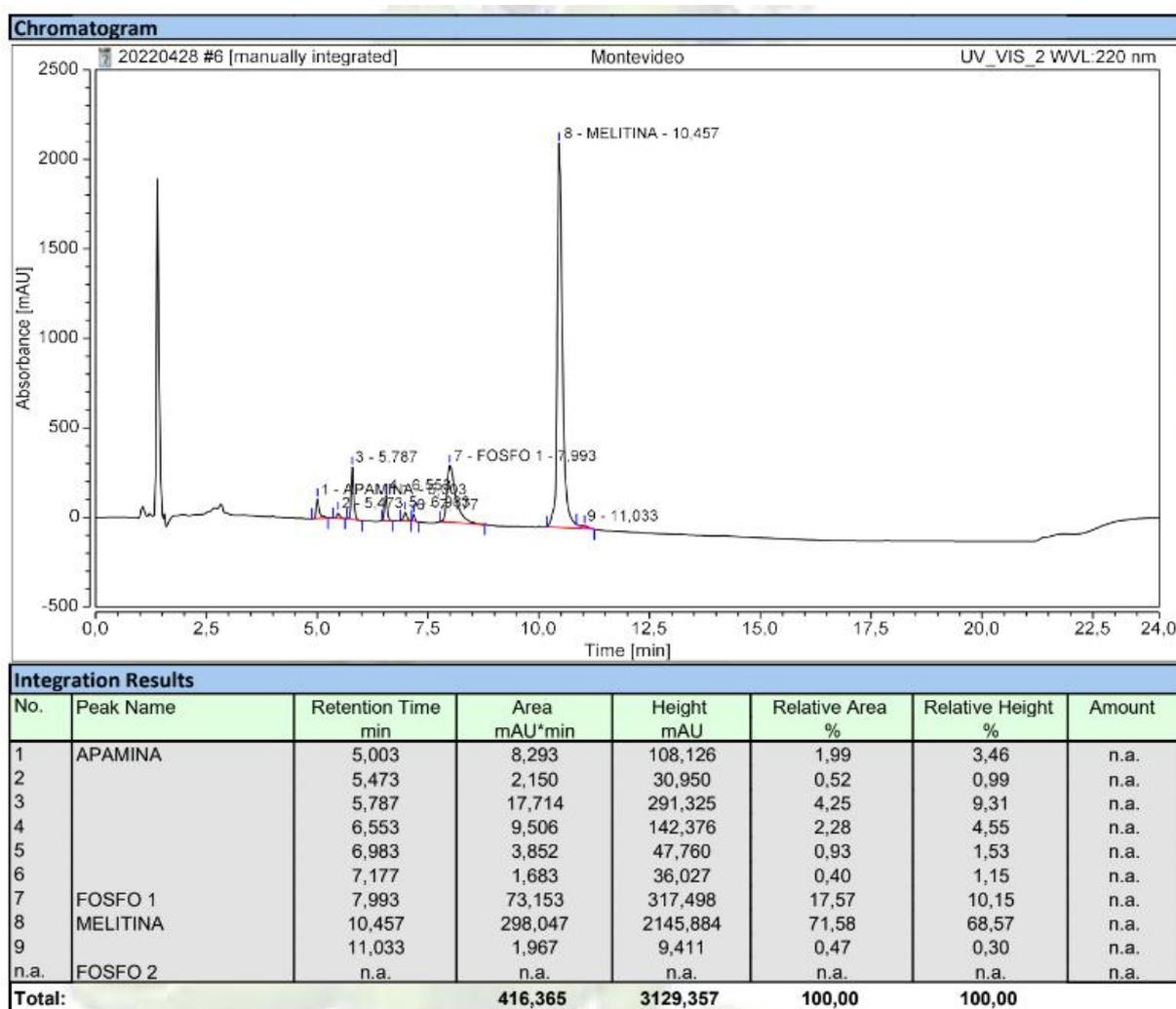


Figura 16. Cromatograma del método desarrollado número 11 a una longitud de onda $\lambda = 220$ nm para una muestra de veneno de abeja.

Para llevar adelante el método 11, se utilizó un equipo de HPLC con detector de diodos a dos longitudes de onda como son $\lambda=220$ nm y 280 nm, la columna cromatográfica que se empleó fue la C18 fase reversa, 5 μ m (4.6 x 150 mm).

La fase móviles utilizadas fueron, fase A ácido trifluoroacético 0,1% en agua, mientras que la fase B ácido trifluoroacético 0,1% en acetonitrilo, a un gradiente lineal de 5 - 70% de fase B por 15 minutos, de 15 a 20 minutos se mantiene un flujo isocrático con una composición 70% de fase B a un flujo de 1,5 mL/min, después una elución isocrática de 4 minutos con B al 5% como tiempo de estabilización para la próxima corrida. Este análisis se realizó a una temperatura de 25 °C. Las muestras de veneno seco se solubilizan en una solución de ácido fórmico al 0,1% en agua y el volumen de inyección es de 100µL.

b) Validación del método

Para la validación del método 11, se realizó el análisis por triplicado de diferentes soluciones con concentración inicial conocida de estándares de **melitina** y **apamina** para determinar la linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, a dos longitudes de onda ($\lambda = 220 \text{ nm}$ y 280 nm).

Todos los cálculos informados son en base al peso neto de estándar medido para realizar las soluciones. Para los cálculos de concentración final en muestras analizadas, se debe realizar la corrección correspondiente a la potencia de cada estándar.

Concentración inicial del estándar:

- **Melitina: estándar de melitina de abeja.**
Potencia $\geq 85\%$

Solución	Concentración (mg/mL)
1	0,84
3	0,168
4	0,084

- **Apamina: estándar de apamina de abeja.**
Potencia $\geq 95\%$

Solución	Concentración (mg/mL)
1	0,2
3	0,04
4	0,02

1. Linealidad

Para evaluar la linealidad del método desarrollado se determinó el coeficiente de correlación (R^2), entre el promedio de las áreas de los picos obtenidos en cada cromatograma para cada solución y la concentración conocida de la dilución del estándar, para ambas longitudes de onda (Kokot, Matysiak, Urbaniak, 2011;).

- **Melitina:**

Para $\lambda = 220 \text{ nm}$

Concentración (mg/mL)	Área promedio
0,84	340592,6667
0,168	57353
0,084	24896



Gráfico 1: Concentración en función del área promedio de los picos, con una longitud de onda de 220 nm.

Para $\lambda = 280 \text{ nm}$

Concentración (mg/mL)	Área promedio
0,84	45316
0,168	6860
0,084	3180



Gráfico 2: Concentración en función del área promedio de los picos, en una longitud de onda de 280 nm.

- Apamina:

Para $\lambda = 220 \text{ nm}$

Concentración (mg/mL)	Área promedio
0,2	143089
0,04	27024,33333
0,02	11797,33333



Gráfico 3: Concentración en función del área promedio de los picos, en una longitud de onda de 220 nm.

Para $\lambda = 280 \text{ nm}$

Concentración (mg/mL)	Área promedio 280
0,2	2134
0,04	435
0,02	164,6666667

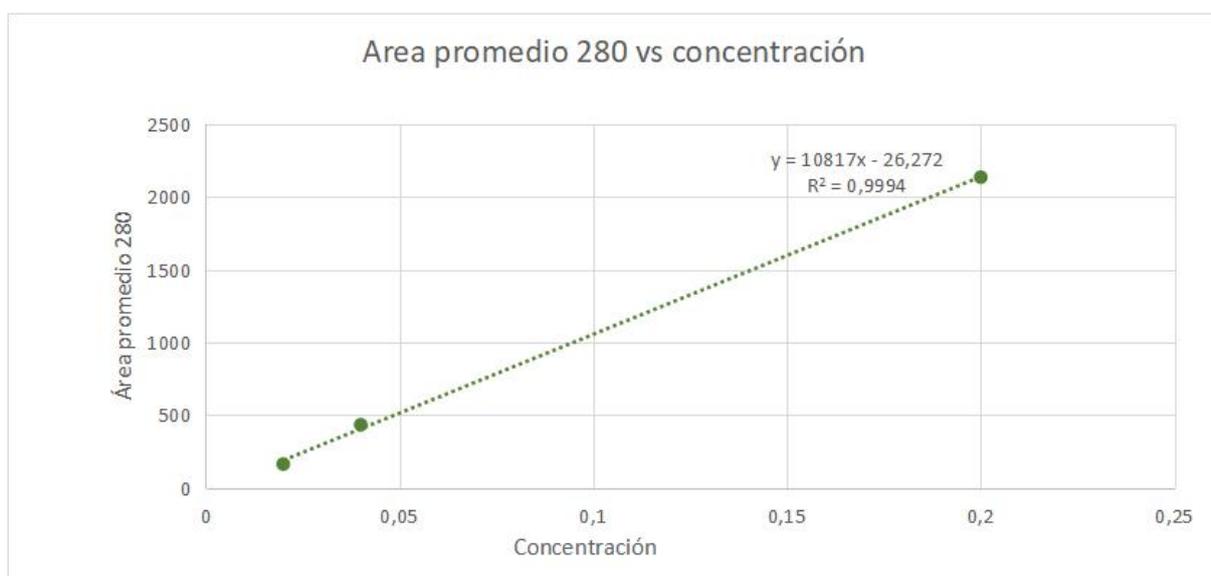


Gráfico 4: Concentración en función del área promedio de los picos, en una longitud de onda de 280 nm.

Linealidad para melitina:

$\lambda = 220 \text{ nm}$	$R^2 = 0.999$
$\lambda = 280 \text{ nm}$	$R^2 = 0.999$

Linealidad para apamina:

$\lambda = 220 \text{ nm}$	$R^2 = 1$
$\lambda = 280 \text{ nm}$	$R^2 = 0.999$

2. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron determinados utilizando la curva de calibración según se muestra a continuación.

Límite de detección (LOD) = $3.3\sigma/S$

Límite de cuantificación (LOQ) = $10\sigma/S$

Donde σ es la desviación estándar de las áreas de los picos para cada nivel de concentración de estándar estudiada más baja y S es la pendiente del gráfico de curva de calibración.

- **Melitina:**

Para $\lambda = 220 \text{ nm}$

Solución	Área	Área promedio	Desviación estándar (σ)
1	356.845	340.593	14331,58308
1	342.954		
1	321.979		
3	59.135	57.353	2520,128568
3	59.135		
3	53.789		
4	24.621	24.896	222,9215109
4	25.167		
4	24.900		

Para $\lambda = 280 \text{ nm}$

Solución	Área	Área promedio	Desviación estándar (σ)
1	47.513	45.316	1946,067316
1	45.653		
1	42.782		
3	7.250	6.860	288,3100183
3	6.768		
3	6.562		
4	3.188	3.180	17,2819752
4	3.196		
4	3.156		

Límite de detección (LOD) para melitina:

$\lambda = 220 \text{ nm}$	LOD= 0.00178 mg/mL
$\lambda = 280 \text{ nm}$	LOD= 0.00101 mg/mL

Límite de cuantificación (LOQ) para melitina:

$\lambda = 220 \text{ nm}$	LOQ= 0.00541 mg/mL
$\lambda = 280 \text{ nm}$	LOQ= 0.0031 mg/mL

- Apamina:

Para $\lambda = 220 \text{ nm}$

Solución	Área	Área promedio	Desviación estándar (σ)
1	142.452	143.089	1350,646018
1	141.848		
1	144.967		
3	26.815	27.024	158,0913941
3	27.061		
3	27.197		
4	12.085	11.797	251,6695364
4	11.835		
4	11.472		

Para $\lambda = 280 \text{ nm}$

Solución	Área	Área promedio	Desviación estándar (σ)
1	2.132	2.134	10,70825227
1	2.122		
1	2.148		
3	443	435	6,976149845
3	426		
3	436		
4	156	165	6,18241233
4	168		
4	170		

Límite de detección (LOD) para apamina:

$\lambda = 220 \text{ nm}$	LOD= 0.00117 mg/mL
$\lambda = 280 \text{ nm}$	LOD= 0.00189 mg/mL

Límite de cuantificación (LOQ) para apamina:

$\lambda = 220 \text{ nm}$	LOQ= 0.00353 mg/mL
$\lambda = 280 \text{ nm}$	LOQ= 0.00571 mg/mL

Cálculo de la concentración de los componentes

Como ejemplo de la realización del cálculo de concentración de los componentes estudiados se tomaron 21,3 mg de una muestra de apitoxina y se solubilizan en 25 mL de la solución del ácido fórmico 0,1% en agua. Se realizó por duplicado la corrida cromatográfica por el método 11 a una longitud de onda de 220 nm y se obtuvo el cromatograma correspondiente, figura 16.

Por otra parte se utilizó el estándar de melitina con una potencia de $\geq 85\%$ y el de apamina con una potencia $\geq 95\%$ para obtener sus tiempos de retención con el método 11 con el fin de luego reconocer de los componentes a través de los picos del cromatograma en la muestra de apitoxina.

Luego de identificados los picos de melitina y apamina en el cromatograma de la figura 16, a partir del área que arroja el cromatograma y como a la muestra se le hizo el análisis por duplicado se obtuvo el área del otro cromatograma para luego hacer su promedio y la desviación estándar. Posteriormente a partir de la curva de calibración para cada componente y la longitud de onda estudiada se obtuvo la concentración con su intervalo de confianza, a la cual se le contempló la potencia del estándar del que se partió.

Ejemplo del cálculo de la **concentración** de la **melitina** para una muestra de apitoxina, a 220 nm.

Área de muestra de apitoxina 1= 298.047

Área de muestra de apitoxina 2= 300.425

Promedio de las áreas = 299.236

Ecuación de la curva de calibración para el estándar de melitina con una potencia de $\geq 85\%$, a una longitud de onda de 220 nm, $y=412.159x -6.891$

Concentración de melitina 0.6313 ± 0.018 mg/mL, el cual ya está contemplada la potencia del estándar de partida, la cual corresponde al 73,9 % del total de los componentes de la apitoxina en esta muestra.

Ejemplo del cálculo de la **concentración** de la **apamina** para una muestra de apitoxina, a 220 nm.

Área de muestra de apitoxina 1= 8.061

Área de muestra de apitoxina 2= 8.293

Promedio de las áreas = 8.177

Ecuación de la curva de calibración para el estándar de melitina con una potencia de $\geq 95\%$, a una longitud de onda de 220 nm, $y=727.866x -2.444,8$

Concentración de apamina $0,01386 \pm 0,0034$ mg/mL, el cual ya está contemplada la potencia del estándar de partida, la cual corresponde al 1,6 % del total de los componentes de la apitoxina en esta muestra.

6) DISCUSIÓN

Con el objetivo de contar con un método que permita una resolución adecuada entre los componentes de la mezcla y tiempos de análisis cortos, se realizó la optimización de las condiciones reportadas por Ferreira Junior *et. al.* y Rybak-Chmielewska y Szczêsna. Donde la resolución (R) es el parámetro que indica la calidad de una separación, como una medida numérica de la separación entre dos compuestos y tomando como aceptable ($R \geq 2$).

Los parámetros que se variaron fueron el **flujo**, el **gradiente** y la **composición de la fase móvil**, según se explica en la sección de materiales y métodos. Mediante estas variaciones se llegó al método desarrollado 11, el cual es un método de análisis con una duración final de 24 minutos, conservando la buena resolución de los **picos** en el cromatograma correspondientes a los diferentes componentes de la muestra.

Dentro de estos, el aumento del flujo en un análisis cromatográfico, genera que los diferentes componentes de la mezcla que se inyecta, eluyan con tiempos menores acortando el tiempo de corrida, pero con el posible compromiso de la resolución de los picos. Por eso también se debe complementar estos ajustes con la variación de los gradientes de fase móvil.

Por otro lado, una mayor concentración del modificador orgánico en la fase móvil utilizada (MeCN), genera una elución más rápida de los componentes de la mezcla. Esto al igual que el aumento en su flujo, disminuyen la resolución entre los picos, generando un compromiso entre estas variaciones y la separación de los componentes, determinando los tiempos de análisis.

Por lo que, mediante una modificación del gradiente, buscando disminuir los tiempos de retención por un incremento de la proporción de acetonitrilo, tratando de acercarnos a composiciones isocráticas de la fase móvil, se logró llegar a un gradiente que permite la elución de todos los componentes de la mezcla en un tiempo de 20 minutos, requiriendo 4 minutos para la estabilización del método a las condiciones iniciales para comenzar con la siguiente corrida.

Para iniciar a evaluar la del método optimizado, analizamos la linealidad para la cual se establece un valor aceptable de $R^2 \geq 0,995$. En nuestro método tanto para el estándar de melitina, como el de apamina se tomaron dos longitudes de onda $\lambda = 220$ nm y $\lambda = 280$ nm, obteniendo resultados superiores a lo esperado, por lo que cumple con el parámetro de la linealidad.

En el caso del límite de detección estudiado para el estándar de melitina y de apamina con las dos longitudes de onda evaluadas, el método arrojó resultados que hay que tener en cuenta cuando se realiza una corrida con una muestra problema, para no confundir con ruido y asegurar que los picos detectados corresponden a estos componentes de la apitoxina.

En cuanto a los límites de cuantificación obtenidos para los estándares de melitina y apamina que fueron analizados para las longitudes de onda 220 nm y 280 nm, estos deben ser tenidos en cuenta en el análisis de muestras de apitoxina ya que indica el límite con el cual dará resultados cuantificables ambos componentes.

Sabemos que es importante la determinación de la precisión y exactitud para continuar con la validación del método desarrollado, pero por temas de tiempo no se determinaron en esta ocasión. Se seguirá trabajando en el mismo, determinando los parámetros faltantes de validación del método analítico para contar con las herramientas necesarias para definir si el método además presenta características de robusto para ser empleado por otros equipos y si es apto para determinar la composición cuali-cuantitativa de la apitoxina.

7) CONCLUSIONES

Fue posible desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinar la composición cuali-cuantitativa de los principales componentes de apitoxina como son melitina y apamina, alcanzado el desarrollo del método 11, que presenta un tiempo final de 24 minutos, incluyendo el tiempo de análisis y tiempo de estabilización, disminuyendo 12 minutos totales con respecto al método que se utilizó como de partida. Además, continúa conservando la buena resolución de los picos en las dos longitudes de onda de trabajo.

Para una muestra de apitoxina analizada en el método 11 con una longitud de onda de 220 nm, se determinó que presentaba una concentración de melitina de 0.6313 ± 0.018 mg/mL la cual corresponde a 73,9 % de los componentes de la muestra y en el caso de la concentración de apamina presentaba $0,01386 \pm 0,0034$ mg/mL correspondiente al 1,6 % de los componentes de la muestra de apitoxina.

Se comenzó a evaluar los parámetros de validación del método seleccionado, como linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, para los estándares de melitina y apamina. En la evaluación de la linealidad para melitina se obtuvieron resultados de R^2 a $\lambda = 220$ nm de 0,999 y a $\lambda = 280$ nm de 0,999. En el caso de la apamina a $\lambda = 220$ nm el R^2 fue de 0,999 y para $\lambda = 280$ nm de 0,999: Para todos los casos, se cumple con los límites establecidos, determinando que el método es lineal en el rango de concentraciones de trabajo. También se determinó el límite de detección con un resultado para la melitina a 220 nm de 0,00178 mg/mL y de 0,00101 mg/mL a 280 nm, y para la apamina de 0,00117 mg/mL en una longitud de onda de 220 nm y 0,00189 mg/mL para 280 nm. Por último, se calculó el límite de cuantificación donde para la melitina a 220 nm de longitud de onda se obtuvo un resultado de 0,00541 mg/mL y de 0,0031 mg/mL para una longitud de onda de 280 nm, para la apamina 0,00353 mg/mL a 220 nm y 0,00571 mg/mL a 280 nm.

8) BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Wahed, A., Khalifa, S., Sheikh, B., Farg, M., Saeed, A., Larik, F., ... El-Seedi, H. (2018). Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 60, 459-485).
- Abd El-Wahed, A., Khalifa, S., Elashal, M. H., Musharraf, S. G., Saeed, A., Khatib, A., ... El-Seedi, H. R. (2021). Cosmetic Applications of Bee Venom. *Toxins*, 13(11), 1-10.
- Alarcón, R.E., Mestanza, B.S., y Vásquez, O.C. (2016). Características morfométricas, comportamiento higiénico y agresividad de abejas criollas *Apis mellifera* sp. *Universidad Cesar Vallejo-HACER*, 5(1), 16-23.
- Altıntaş. L., y Bektaş N. (2019). Apiterapi. *Uludag bee journal - Uludag arıcılık dergisi*, 19(1), 82-95.
- An H., Kim J. Kim W., Gwon M., Gu H., Jeon M., ... Park, K. (2018). Therapeutic effects of bee venom and its major component, melittin, on atopic dermatitis in vivo and in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 175(23), 4310-4324.
- Banks, B.E.C., y Shipolini, R.A. (1986). Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. En T., Piek (Ed.). *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects* (pp. 329-416). Orlando: Academic Press.
- Bessis, N., Doucet, C., Cottard, V., Douar, A.M., Firat, H., Jorgensen, C., ... Boissier, M.C. (2002). Gene therapy for rheumatoid arthritis. *The Journal of Gene Medicine*, 4(6), 581-591.
- Bieber, T., y Bruijnzeel-Koomen, C. (1990). La cellule de Langerhans dans la physiopathologie de la dermatite atopique. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 117(3), 185-193.
- Bohórquez, F., Cabrera, B.K., y Vélez R.A. (2010). *Apiterapia como modalidad terapéutica complementaria a la fisioterapia en pacientes con artritis reumatoide* (Tesis de grado). Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
- Branchiccela, B., Aguirre, C., Parra, G., Estay, P., Zunino, P., y Antúnez, K. (2014). Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 years of Africanization. *Apidologie*, 45(6), 752-756.
- Brasil. (2000, octubre 10). *Instrução Normativa Nº 11, de 20/10/2000*. Recuperado de https://www.dourados.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/05/RTIQ-Mel-completo-IN-11_2000.pdf
- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez A., y Simal-Gandara, J. (2020) Bee Venom: an updating review of its bioactive molecules and its health applications. *Nutrients*, 12

(11), 1-27.

- Chang, Y.H., y Bliven, M.L. (1979). Anti-arthritic effect of bee venom. *Agents Actions*, 9(2), 205–211.
- Chen, J., Guan, S-M., Sun, W., y Fu, H. (2016). Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Neuroscience Bulletin*, 32(3), 265–272.
- Cho, S.Y., Shim, S.R., Rhee, H.Y., Park, H.J., Jung, W.S., Moon, S.K., ...Park, S.U. (2012). Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18(8), 948–952.
- Cordara, J. (2005). *La Historia de la Apicultura en el Uruguay*. Montevideo: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de la Empresa.
- Crane, E. (1990) *Bees and Beekeeping*. Oxford: Heinemann Newnes.
- De Graaf, D., Brochetto, M., Magalhães, R., Blank, S., Bridts, C., De Clerck, L., ... Van Vaerenbergh, M. (2020). Standard methods for *Apis mellifera* venom research. *Journal of Apicultural Research*, 60(4), 1-31.
- De Roodt, A.R., Salomón, O.D., Orduna, T.A., Robles, L.E., Paniagua, J.F., y Alagón, A. (2005). Envenenamiento por picaduras de abeja. *Gaceta Médica de México*, 141(3), 215-222.
- Demolin, G.L., Leite, S. (2005). Apitoxina. *Unimontes Científica*, 7(1), 115-125.
- Dini, C.B., y Bedascarrasbure, E. (2011). *Manual de apicultura para ambientes subtropicales*. Buenos Aires: INTA.
- Dotimas, E.M., y Hider, R.C. (1987). Honeybee venom. *Bee World*, 68(2), 51-70.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). *Good beekeeping practices for sustainable apiculture*. Roma: FAO.
- Ferreira Junior, R., Sciani, J., Marques-Porto, R., Lourenço Junior, A., Orsi, R., Barraviera, B., y Pimenta, D. (2010). Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, 56(3), 355–36.
- Gomis, V. (2008). *Tema 2. Cromatografía: principios generales*. Recuperado de <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>
- Gomis, V. (2008). *Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución*. Recuperado de <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>

- Gu, H., Han, S.M., y Park, K.K. (2020). Therapeutic effects of apamin as a bee venom component for non-neoplastic disease. *Toxins*, 12(3), 195.
- Habermehl, G.G. (1981). Arthropoda. En *Animales venenosos y sus toxinas* (pp. 21-91). Berlín: Springer.
- Han, S.M., Hong, I.P., Woo, S.O., Chun, S.N., Park, K.K., Nicholls, Y.M., y Pak, S.C. (2015). Los efectos beneficiosos del suero de veneno de abeja sobre las arrugas faciales en humanos. *Intervenciones clínicas en el envejecimiento*, 10, 1587–1592.
- Hernandez, J. M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficiencia. *Educación continuada en el laboratorio clínico*, 8, 49-62.
- Ionete, R.E., Dinca, O.R., Tamaian, R., y Geana, E.I. (2013). Exploring Apis Mellifera venom compounds using highly efficient methods. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 16(2), 89-100.
- International Conference on Harmonisation (junio, 2014). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). En *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. ICH, San Diego.
- Kim, S.U., y Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 302–313.
- Kim, C.M.H. (2013). Apitherapy – Bee Venom Therapy. En M. Grassberger, R. A. Sherman, O. S. Gileva, C.M.H. Kim, y K.Y. Mumcuoglu (Eds.), *Biotherapy - History, Principles and Practice. A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms*. Dordrecht: Springer.
- Kim J.Y., Lee WR, Kim K.H., An H.J., Chang Y.C., Han S.M., ...Park K.K. (2015). Efectos del veneno de abeja contra la inflamación inducida por *Propionibacterium acnes* en queratinocitos y monocitos humanos. *International Journal of Molecular Medicine*, 35, 1651–1656.
- Kim, H., Park, S.Y., y Lee, G. (2019). Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: a literature review. *Toxins*, 11(7), 1-29.
- Kokot, Z. J., Matysiak, J., Urbaniak, B., & Dereziński, P. (2011). New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(7), 2487–2494.
- Le conte, Y. (2012). Mejorar el conocimiento de las abejas. En H. Clément (Dir.), *Tratado de apicultura* (pp. 12-16). Barcelona: Omega.
- Le conte, Y. (2012). Biología de la abeja. En H. Clément (Dir.), *Tratado de apicultura* (pp. 18-37). Barcelona: Omega.

- Martin, S.J., Dils, V., y Billen, J. (2005). Morphology of the Dufour gland within the honey bee sting gland complex. *Apidologie*, 36(4), 543–546.
- Miranda, K.F., Palmera, K.J., y Sepúlveda, P.A. (2014). Abejas. *Info ZOA*, 6, 1-12.
- Montenegro, G. (2016). *Manual apícola*. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica.
- Montoya, B.A., Argueta, M., Aldana, J., y Castellanos, M.T. (2019). Estandarización del proceso de obtención de apitoxina, para el cumplimiento de requisitos de exportación. *Masferrer investiga*, 9(4), 49-61.
- Novak N., y Bieber T. (2005). The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(2), 171–176.
- Nowar, E. (2016), Venom Glands Parameters, Venom Production and Composition of Honeybee *Apis mellifera L.* Affected by Substitute Feeding. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 5(4), 596-603.
- Oarquivo. Ciencia y Tecnología (s.f.). *Apitoxina*. Recuperado de <https://www.oarquivo.com.br/variedades/ciencia-e-tecnologia/6145-apitoxina.html>
- Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. New York: Naciones Unidas.
- Owen, M.D., Plaff, L.A., Reisman R.E., y Wypych, Y. (1990). Phospholipase A2 in venoms extract from honey bees (*Apis Mellifera L.*) of different ages. *Toxicon*, 28(7), 813-820.
- Pacifikovfi, V., Stulik, K., Thi Hau, P., Jelfnek, I., Vins, I., y Sýkora, D. (1995). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A*, 700(1-2), 187-193.
- Peña, L., Pineda, M.E., Hernández, M., y Rodríguez-Acosta, A. (2006). Toxinas Naturales: abejas y sus venenos. *Archivos Venezolanos de farmacología y terapéutica*, 25(1), 6-10.
- Rady, I., Siddiqui, I., Rady, M., y Mukhta, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, 402, 16-21.
- Rybak-Chmielewska, H., y Szczêsna, T. (2004). HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera L.*) venom. *Journal of Apicultural Science*, 48(2), 103-109.

- Silva, J., Monge-Fuentes, V., Gomes, F., Lopes, K., Anjos, L.D., Campos, G., ...Mortari, M. (2015). Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins*, 7(8), 3179-3209.
- Son D. J., Woong J., Hee Y., Sueb H., Kil CH., y Tae, J. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115(2), 246–270.
- Soares, R.M. (2006). Análise conformacional da melitina por dinâmica molecular e caracterização dos efeitos do peptídeo na função plaquetária, (Tesis de grado). Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Theory labster. 2021. *Cromatografía líquida de alta resolución*. Recuperado de <https://theory.labster.com/hplc-definition-es/>
- University of Guelph. Honey Bee Research Centre. (s.f.). *Castes of honey Bees*. Recuperado de <https://hbrc.ca/castes-of-honey-bees/>
- Vit, P. (2004). Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35(2), 32-39.
- Vit, P. (2005). Productos de la colmena secretados por las abejas: Cera de abejas, jalea real y veneno de abejas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 36(1), 35-42.

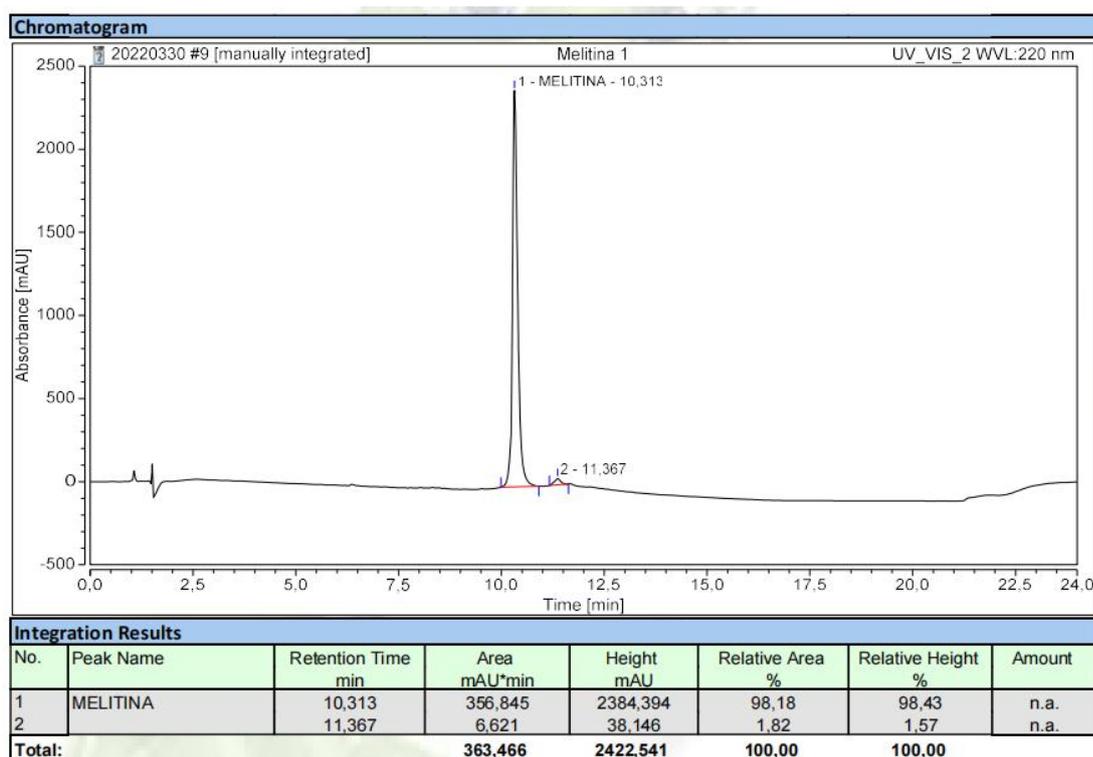
9) ANEXOS

Cromatogramas del estándar de melitina.

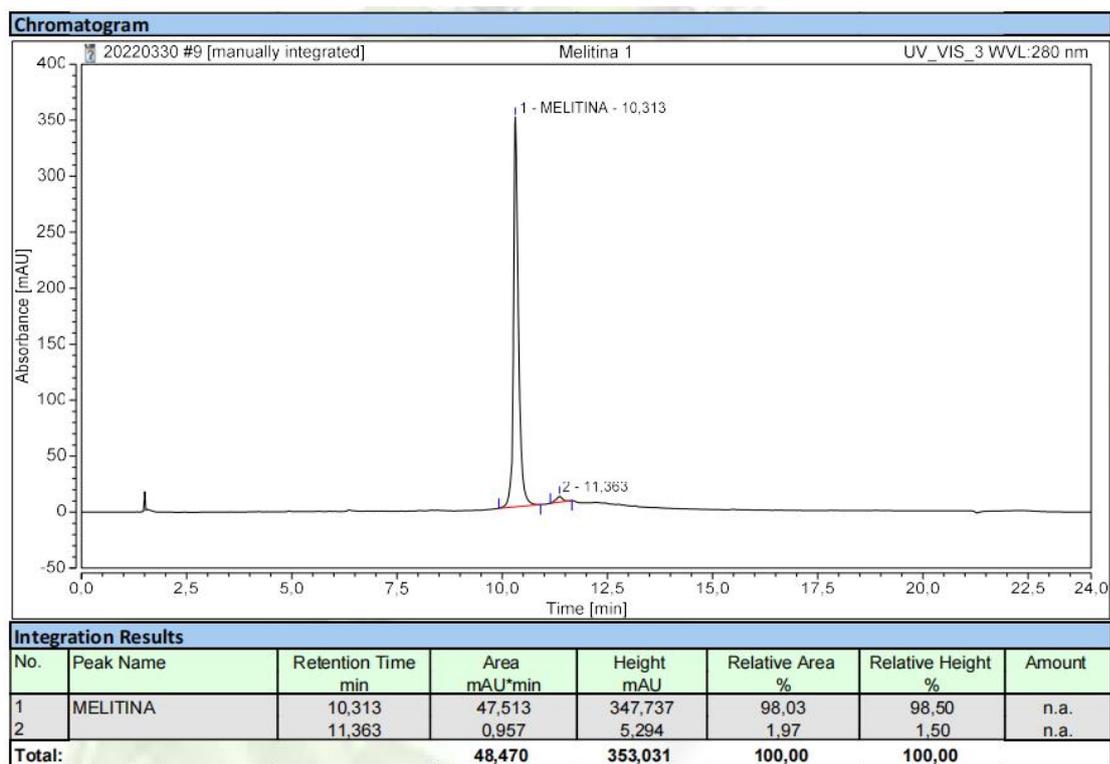
Las áreas que corresponden a la concentración de los componentes de la apitoxina en este caso del estándar de melitina, es indicada en cada tabla complementaria a su cromatograma en la columna denominada "Área mAU*min".

Corrida 1 en HPLC con método 11

Concentración 1, 220 nm

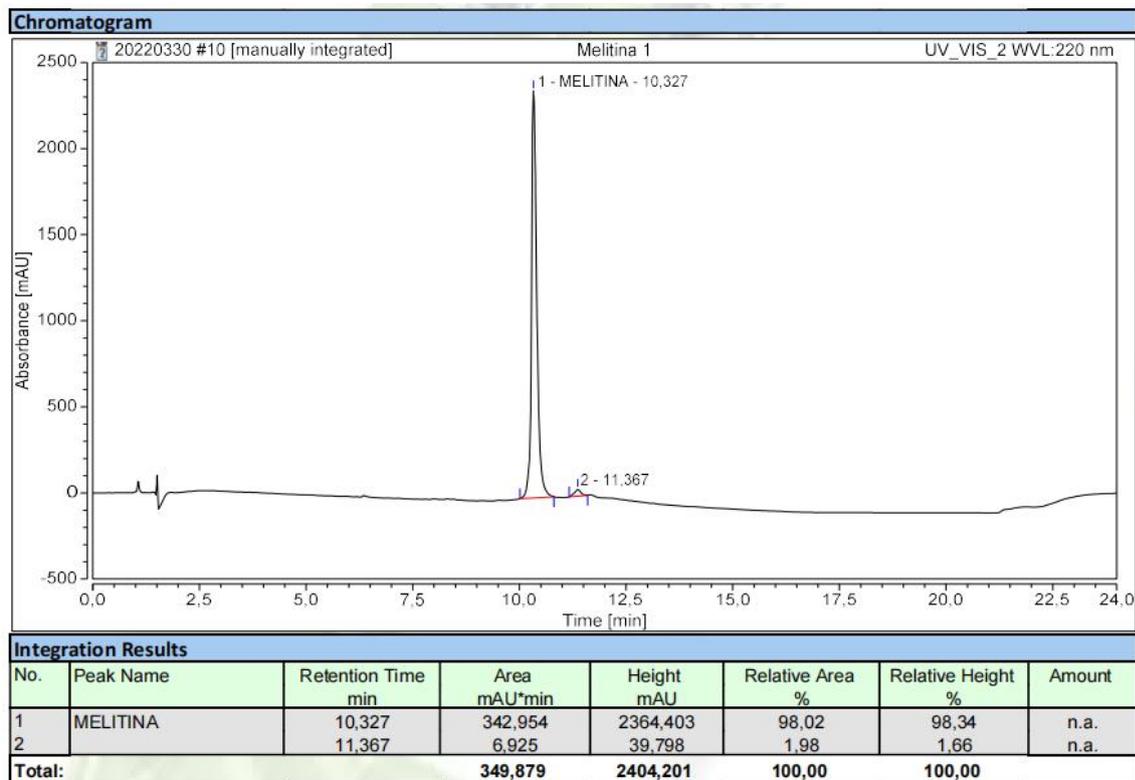


Concentración 1, 280 nm

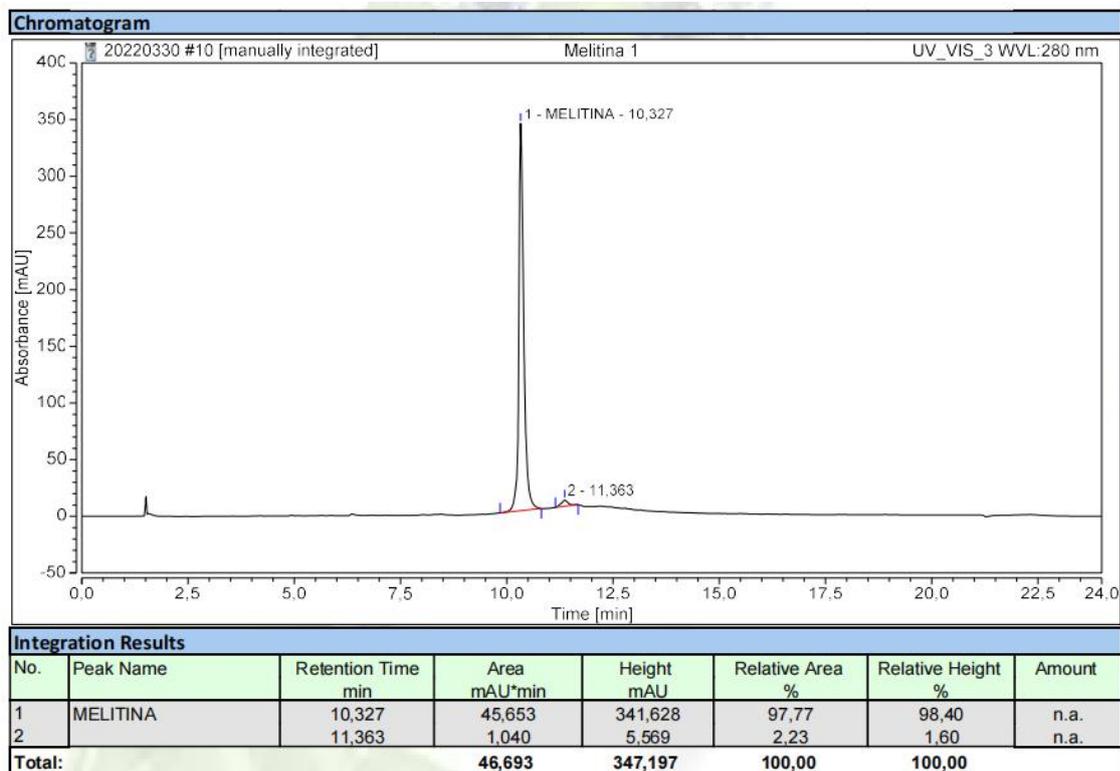


Corrida 2 en HPLC con método 11

Concentración 1, 220 nm

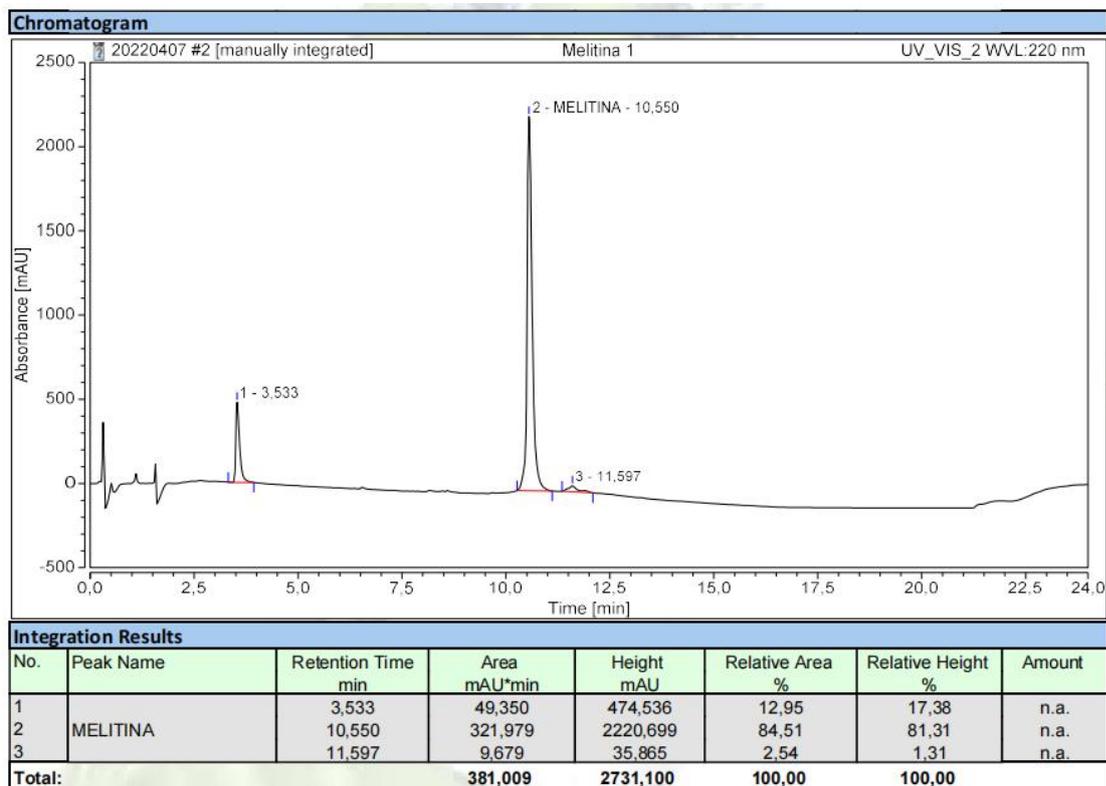


Concentración 1, 280 nm

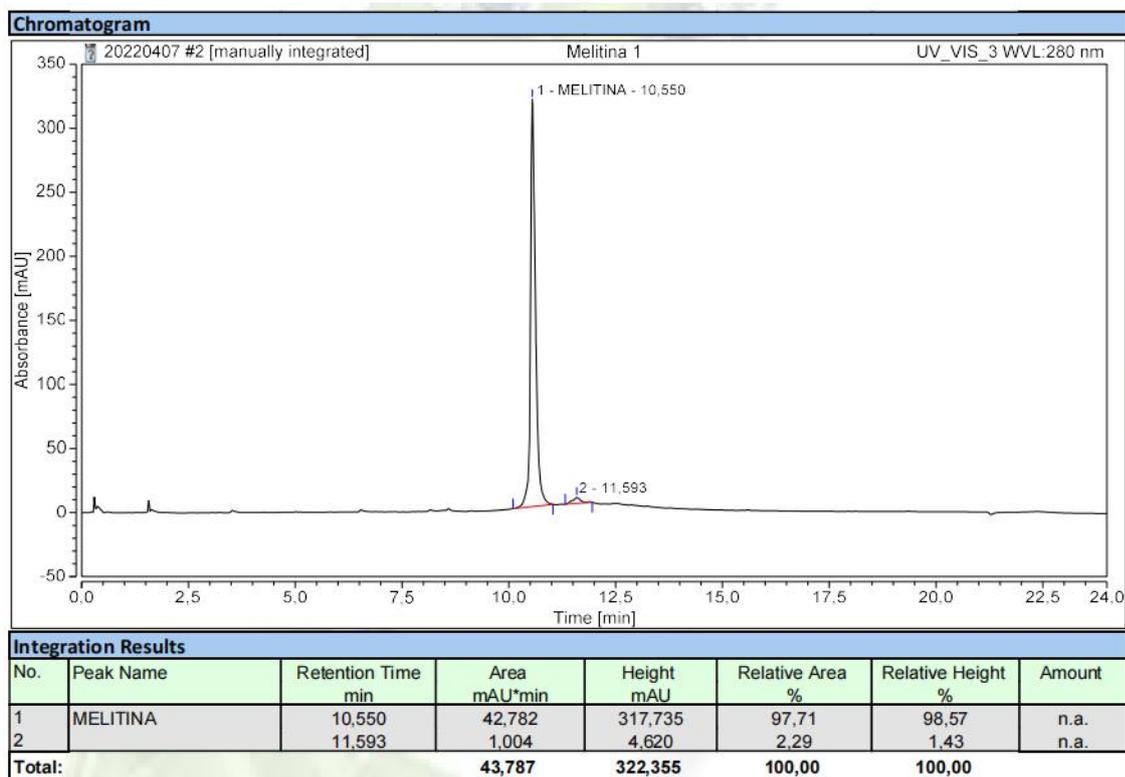


Corrida 3 en HPLC con método 11

Concentración 1, 220 nm

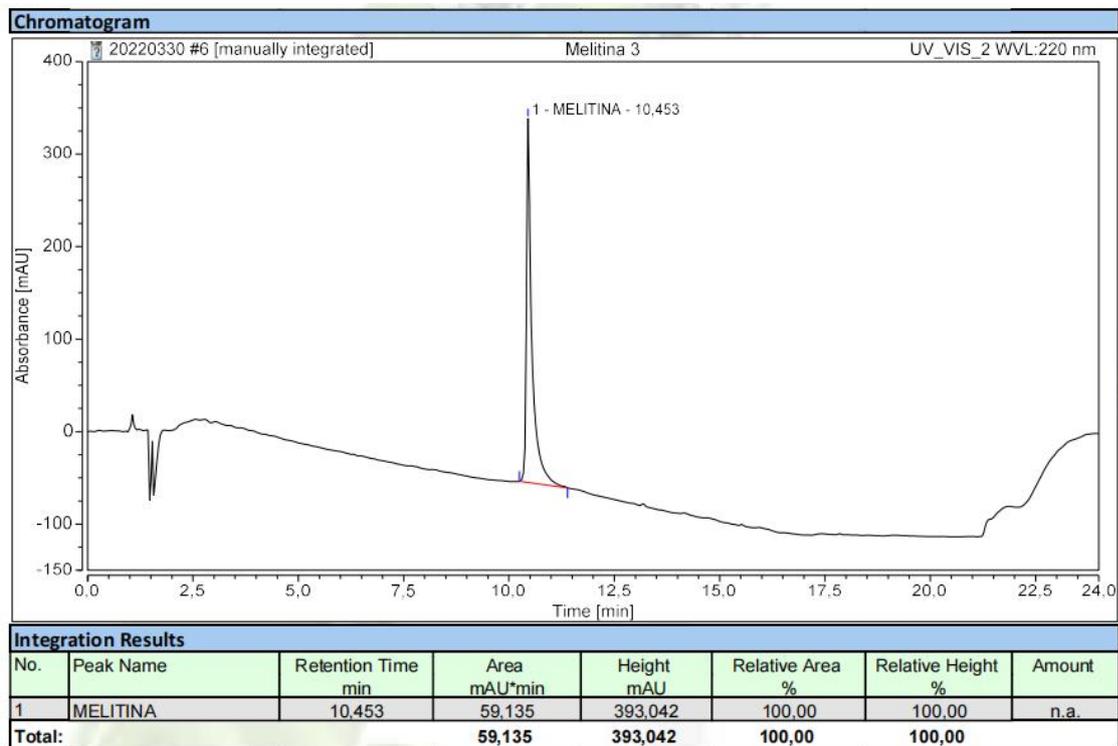


Concentración 1, 280 nm

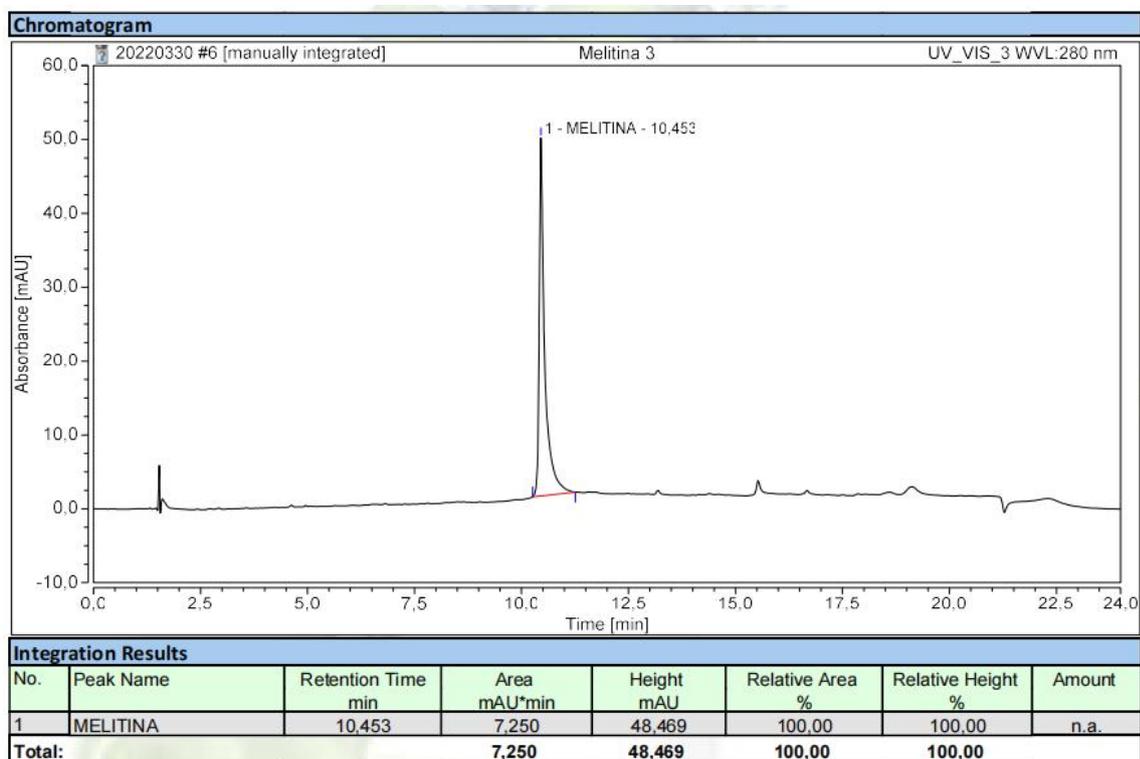


Corrida 1 en HPLC con método 11

Concentración 3, 220 nm

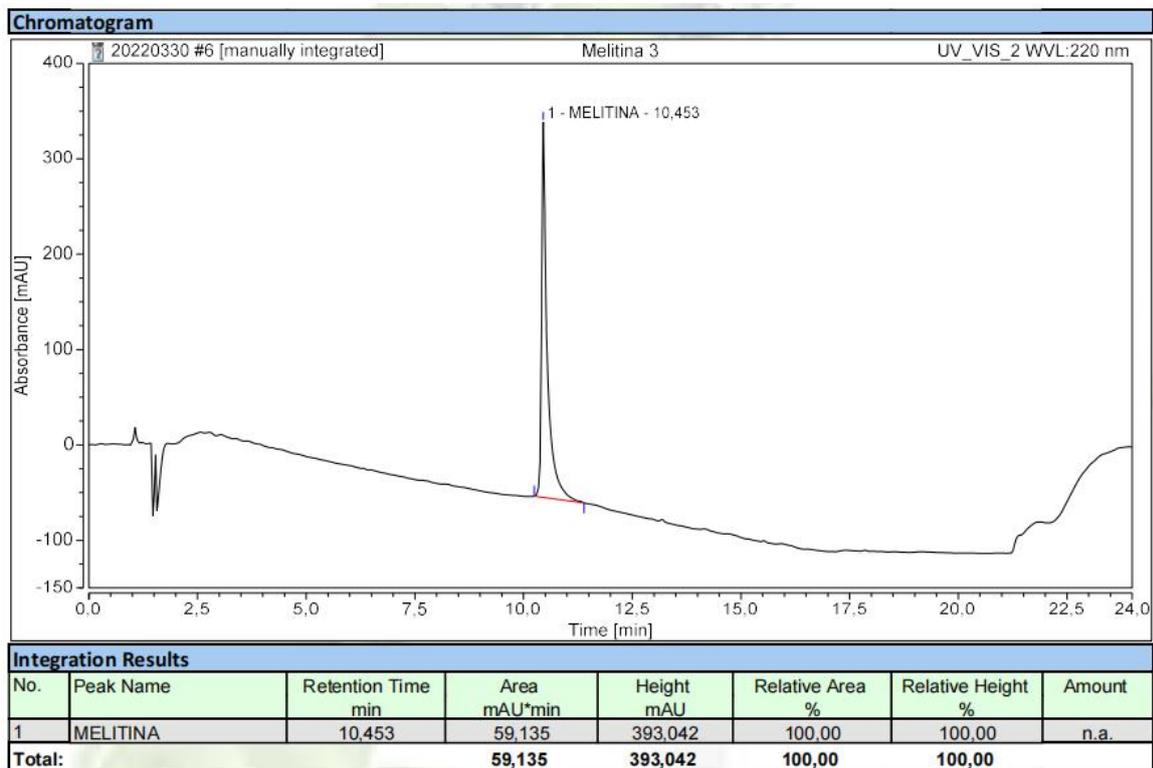


Concentración 3, 280 nm

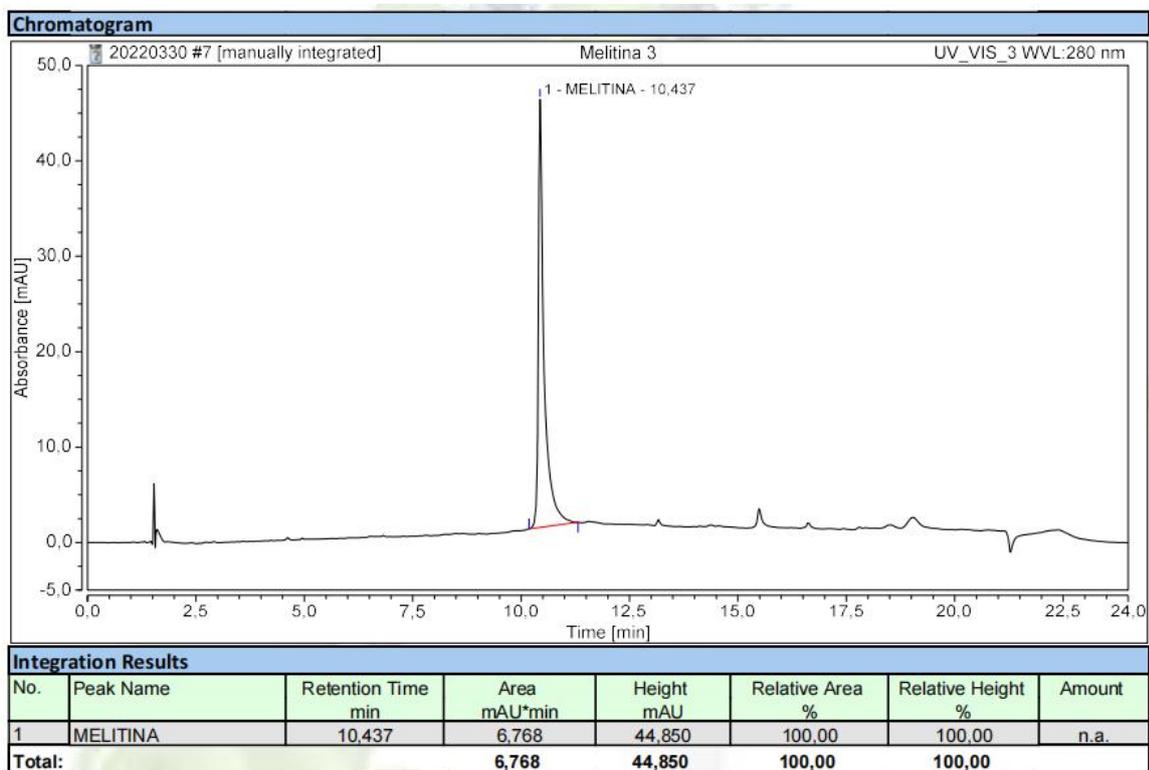


Corrida 2 en HPLC con método 11

Concentración 3, 220 nm

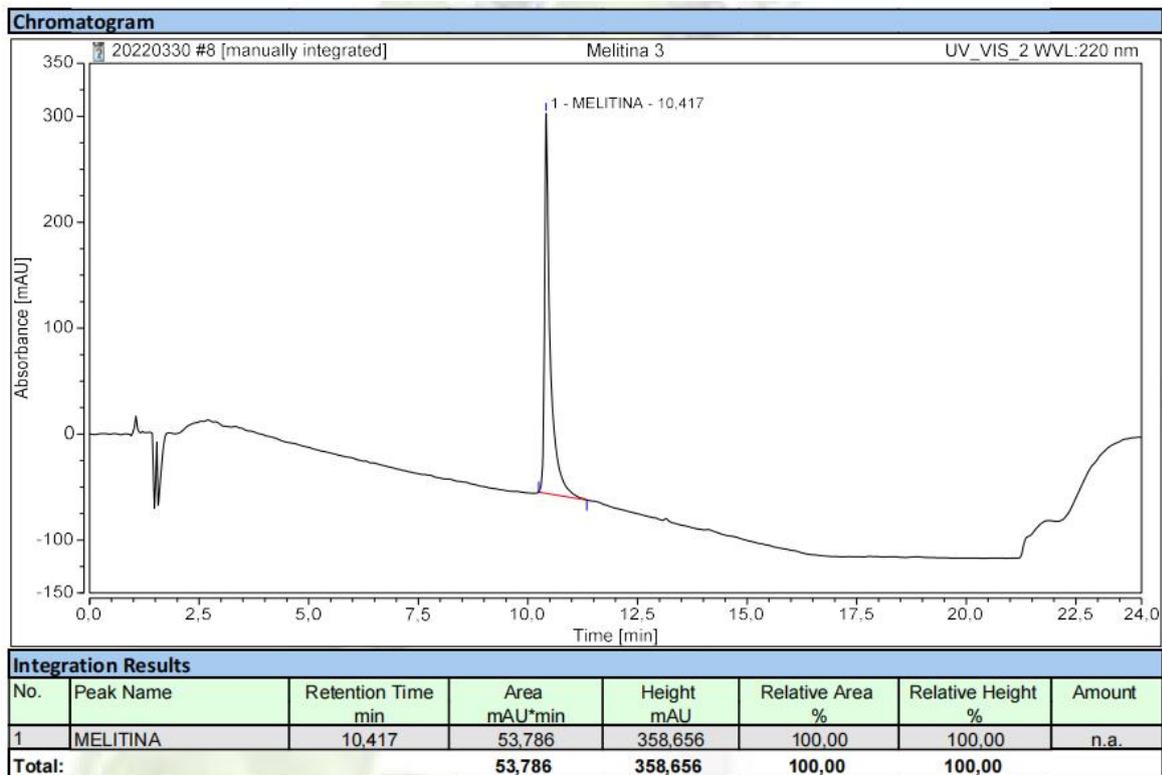


Concentración 3, 280 nm

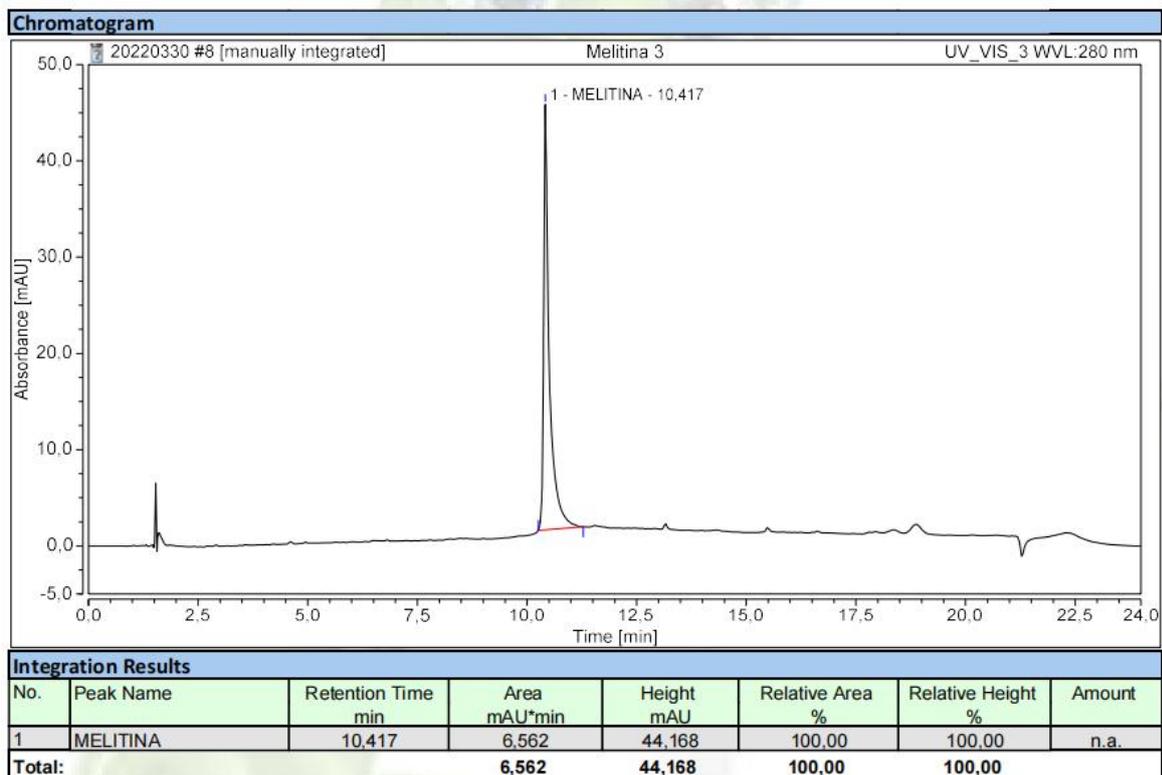


Corrida 3 en HPLC con método 11

Concentración 3, 220 nm

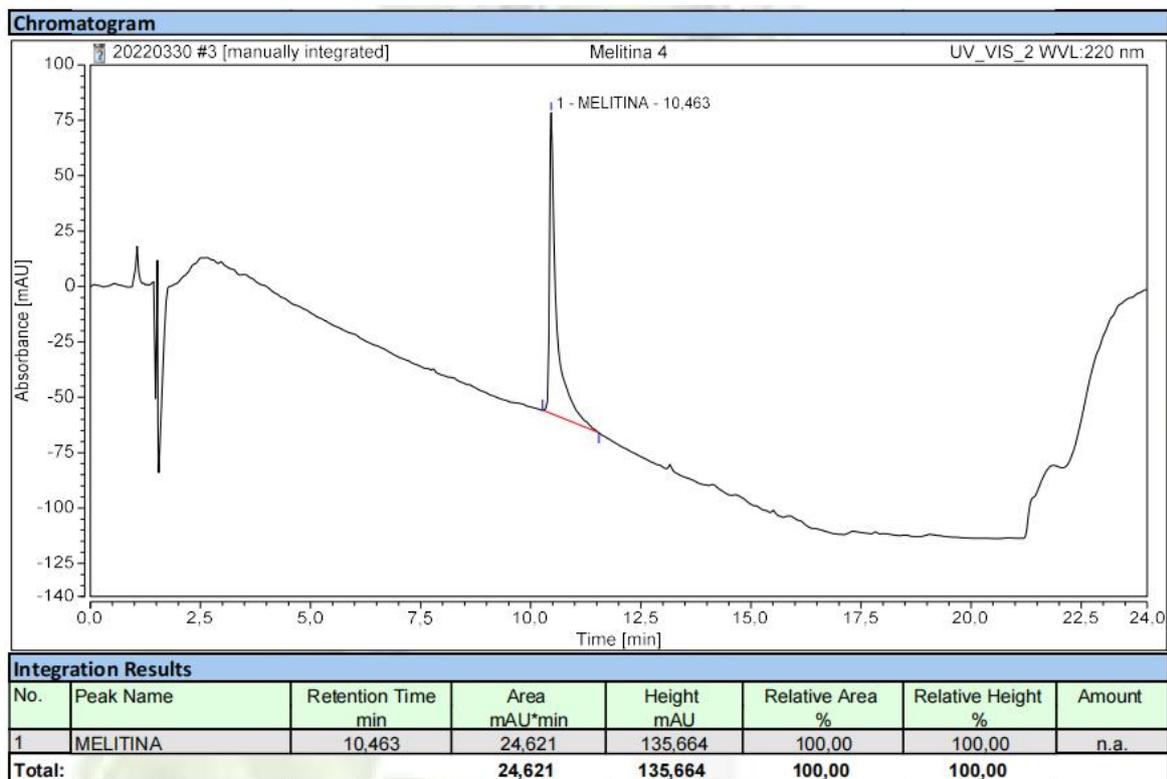


Concentración 3, 280 nm

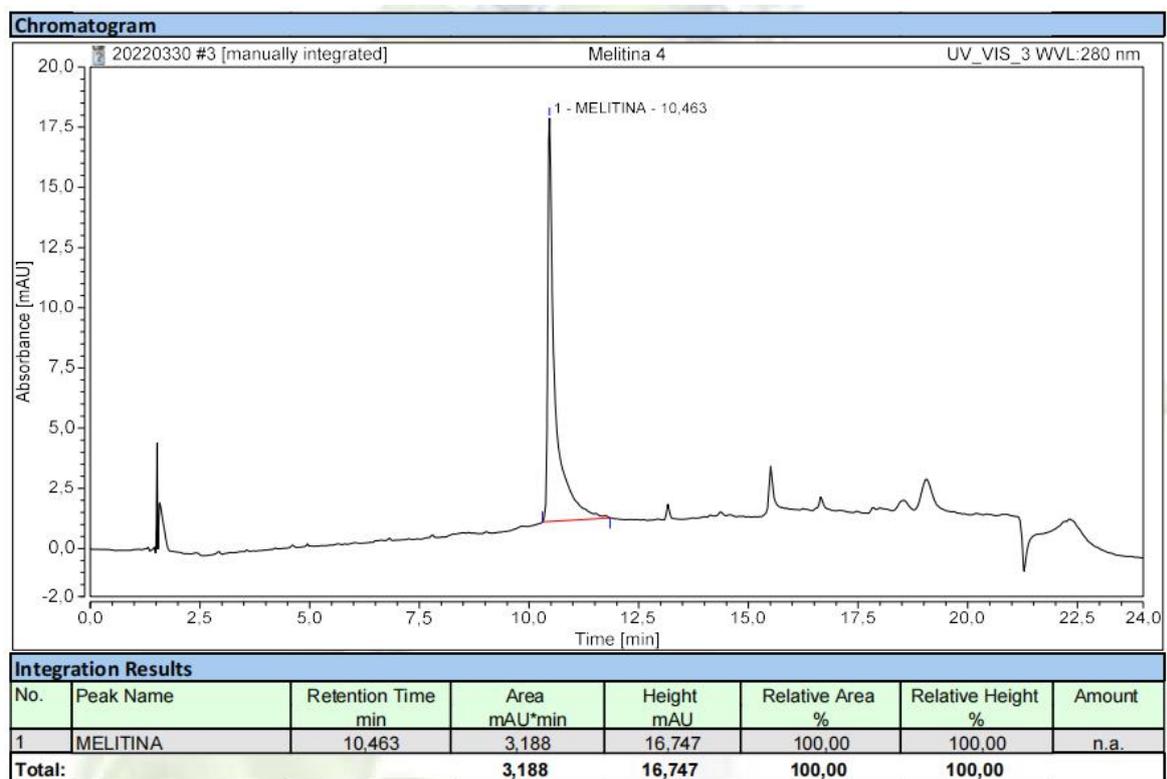


Corrida 1 en HPLC con método 11

Concentración 4, 220 nm

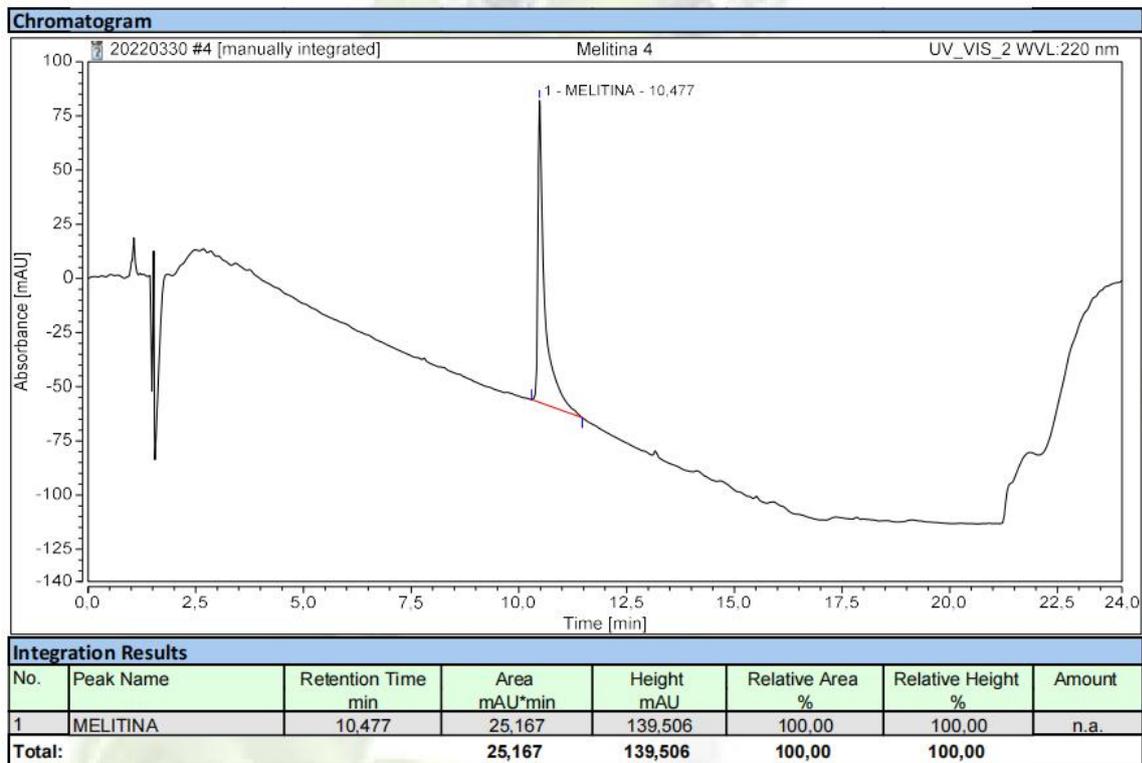


Concentración 4, 280 nm

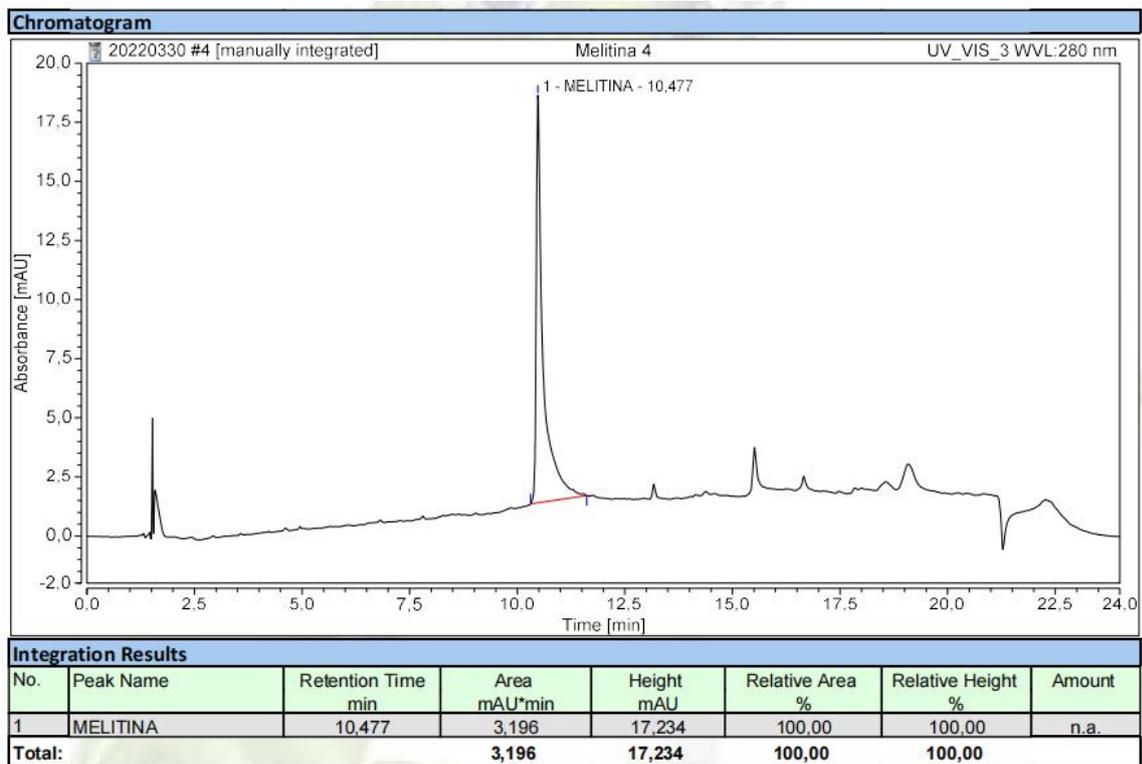


Corrida 2 en HPLC con método 11

Concentración 4, 220 nm

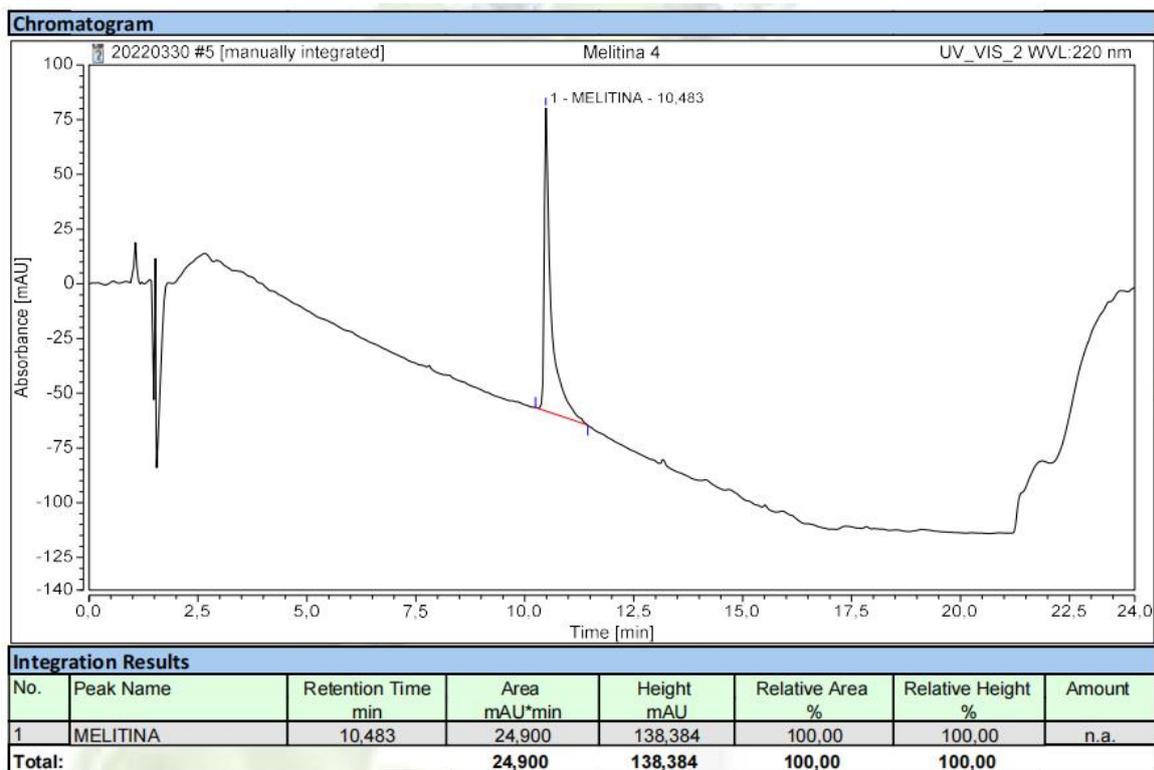


Concentración 4, 280 nm

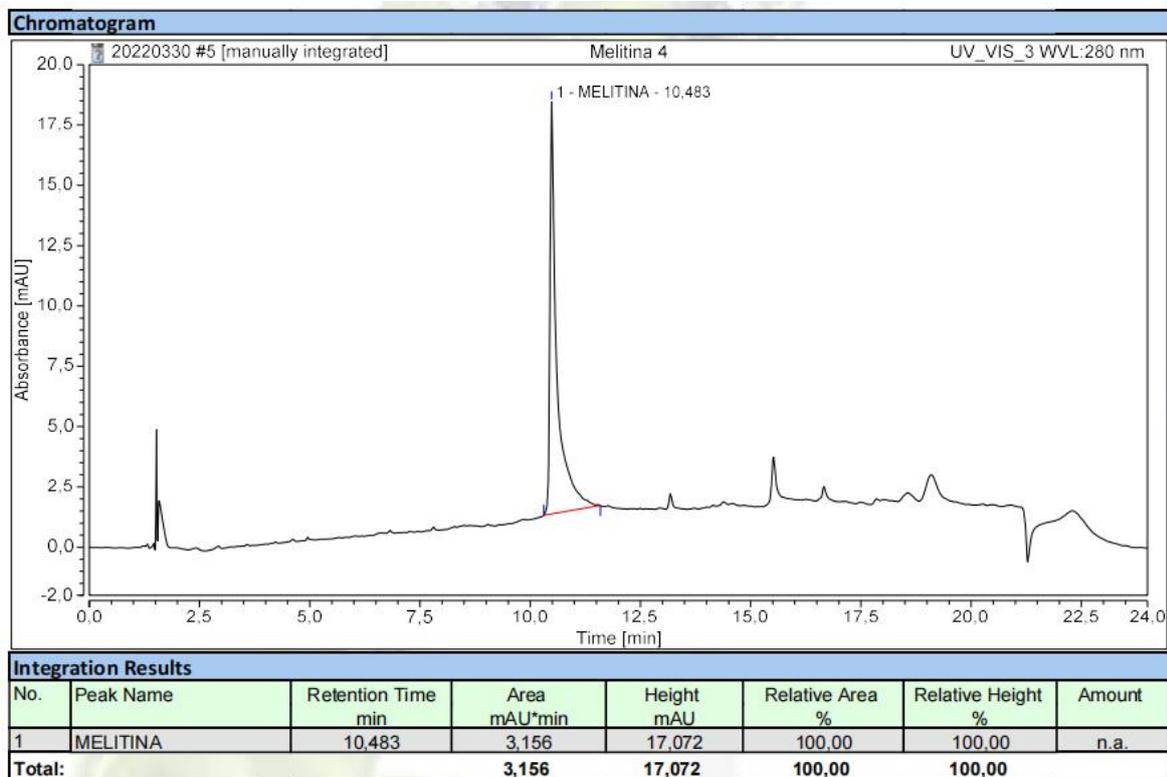


Corrida 3 en HPLC con método 11

Concentración 4, 220 nm



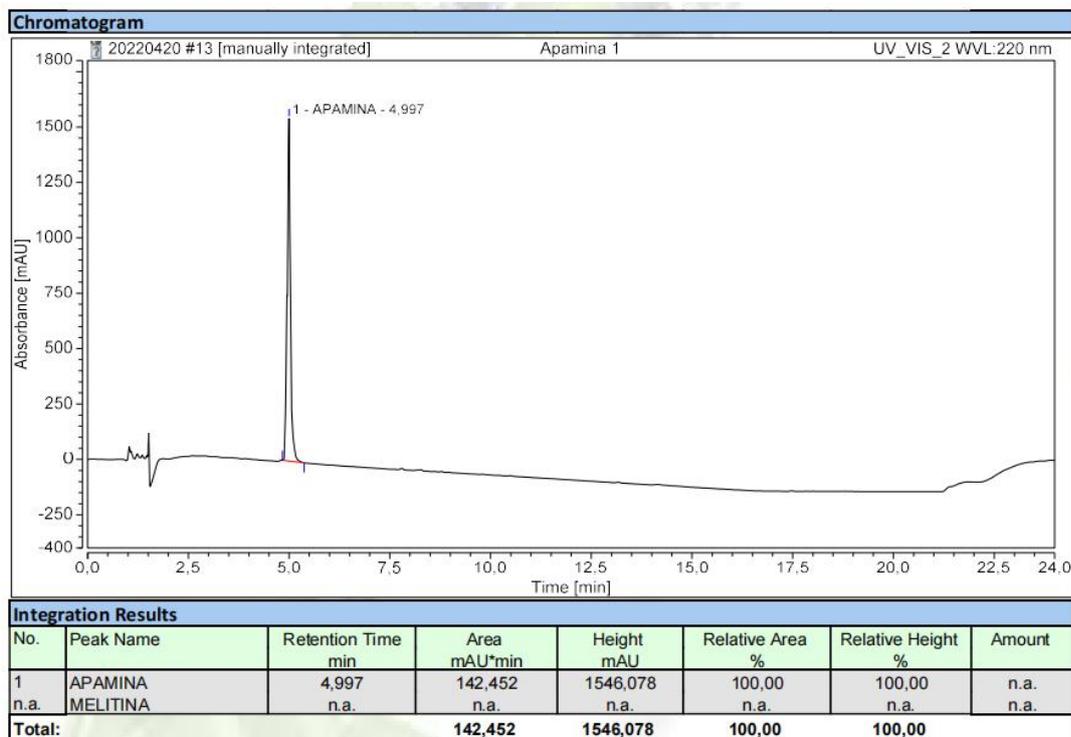
Concentración 4, 280 nm



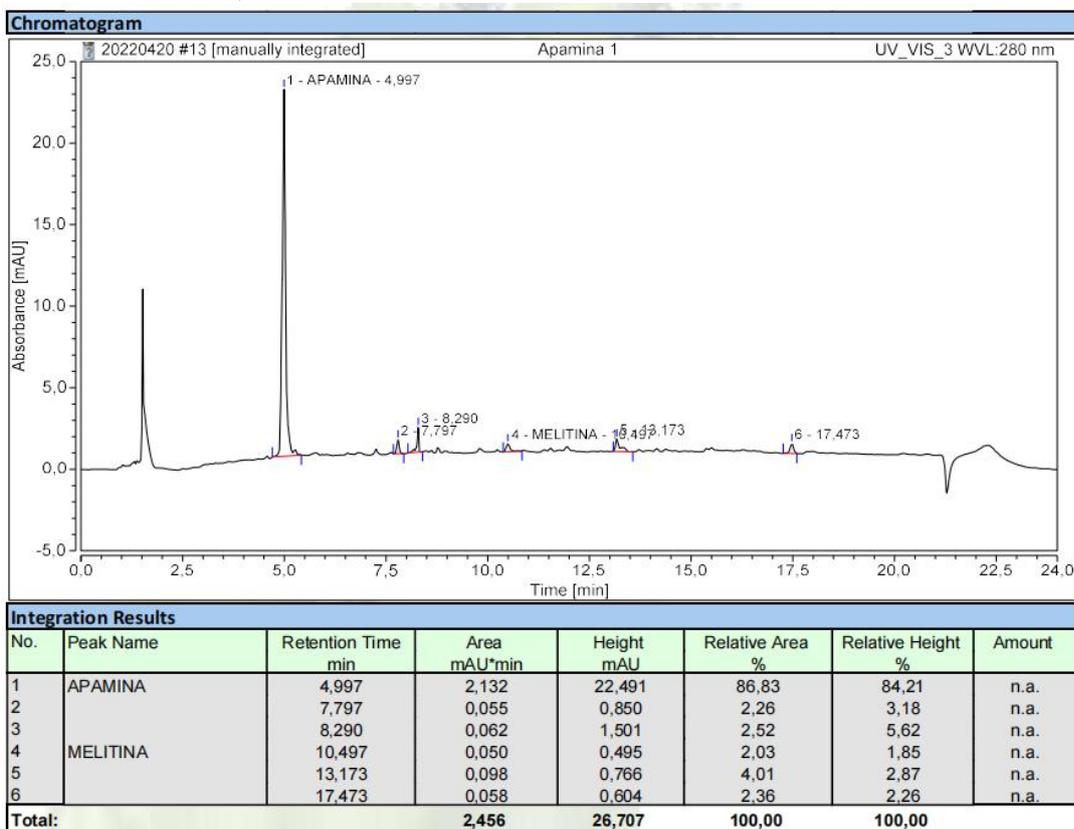
Cromatogramas del estándar de apamina

Corrida 1 en HPLC con método 11

Concentración 1, 220 nm

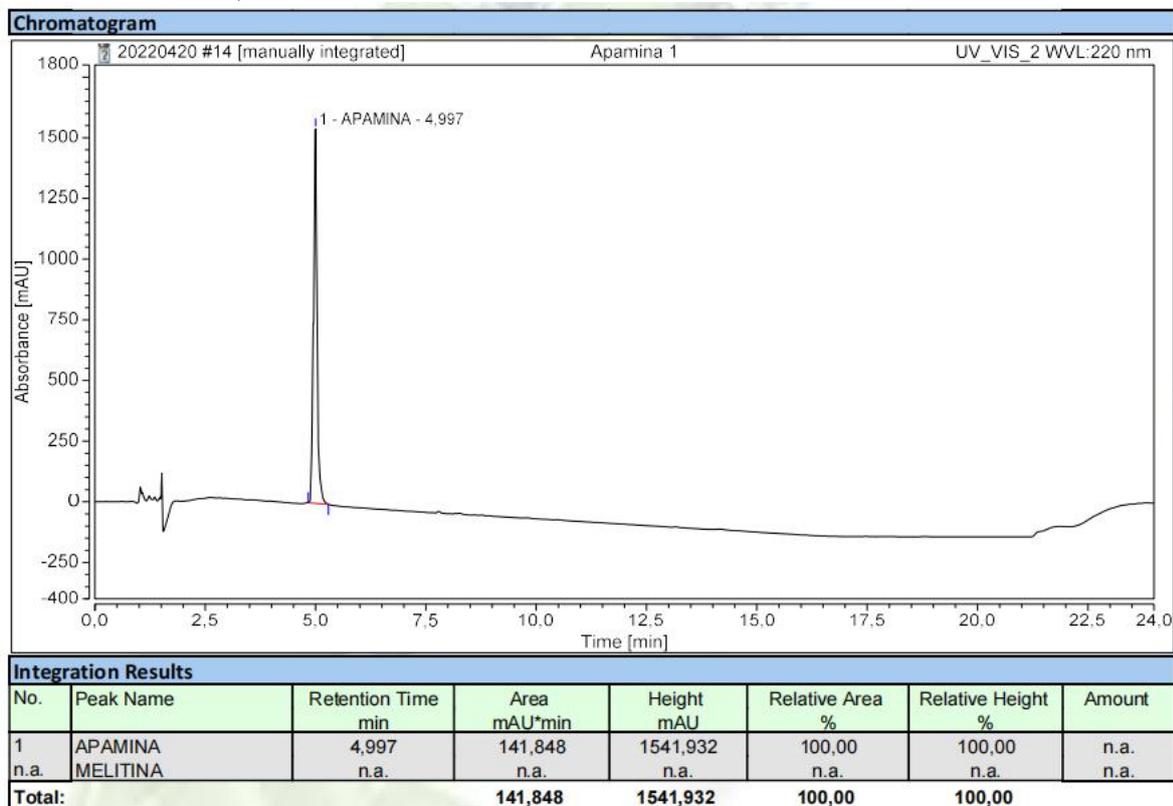


Concentración 1, 280 nm

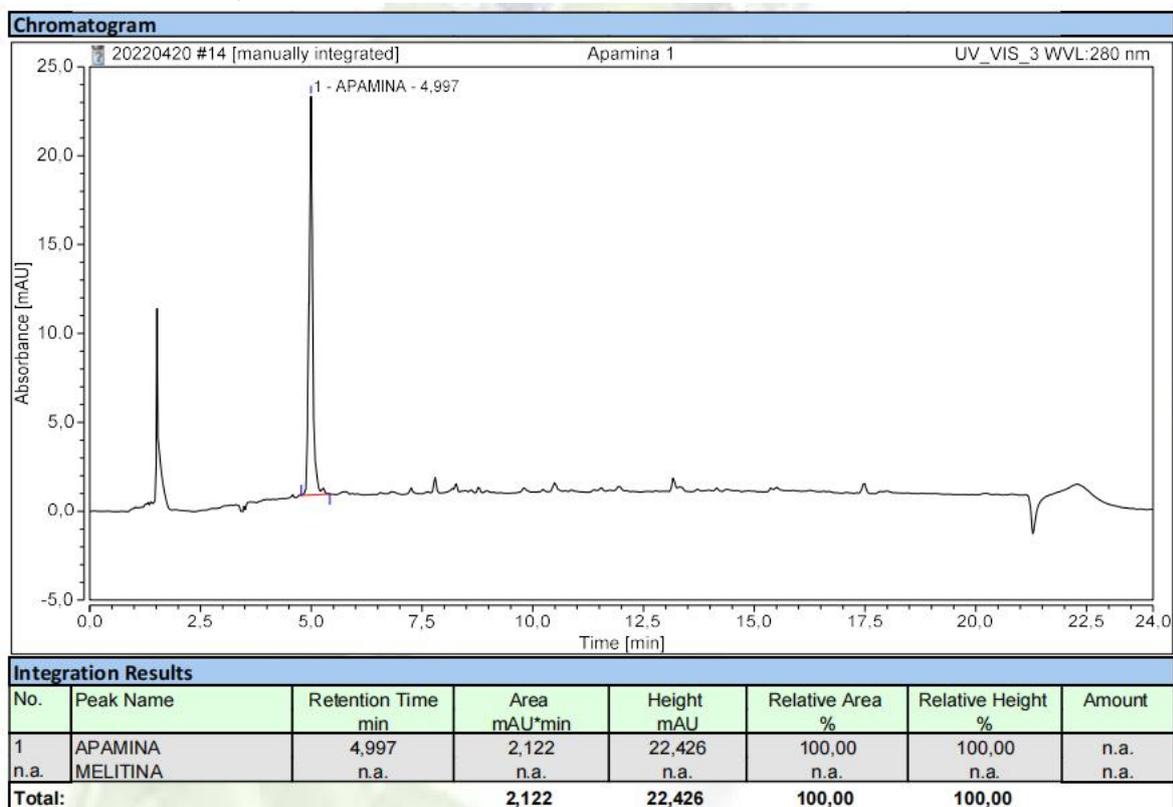


Corrida 2 en HPLC con método 11

Concentración 1, 220 nm

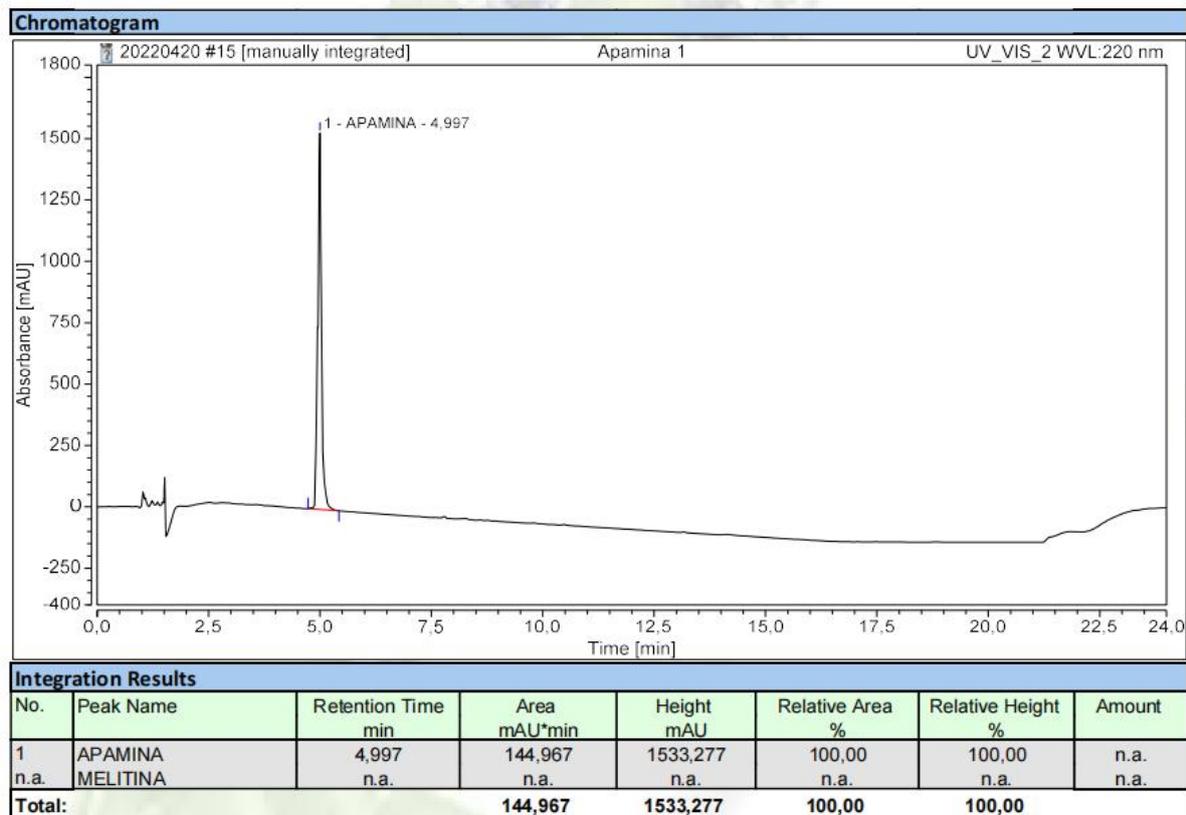


Concentración 1, 280 nm

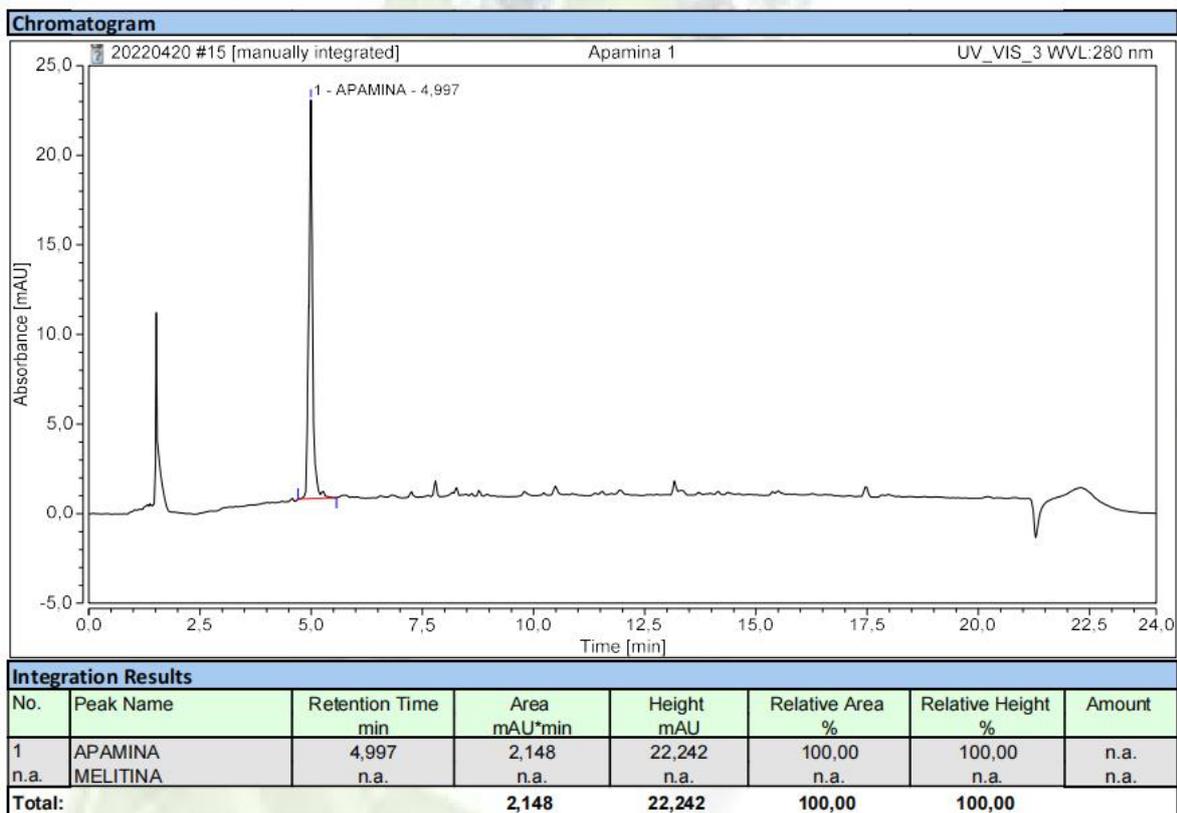


Corrida 3 en HPLC, método 11

Concentración 1, 220 nm

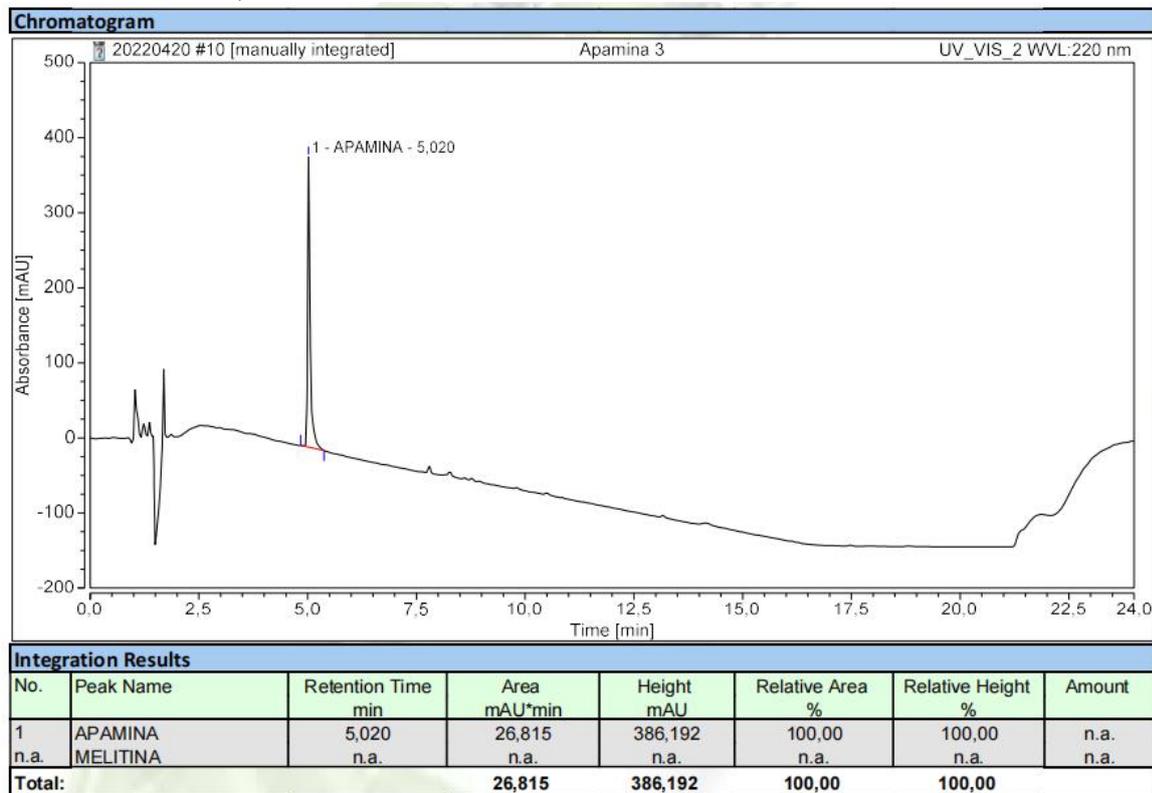


Concentración 1, 280 nm

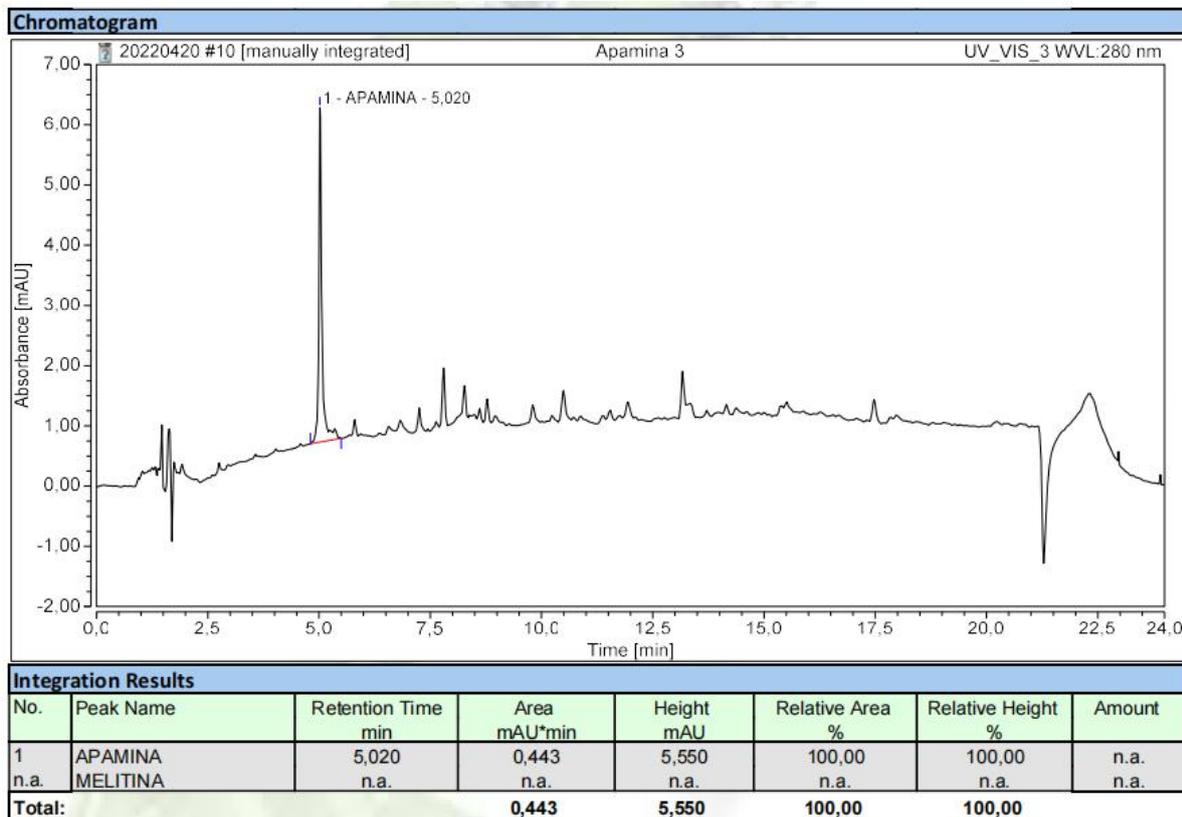


Corrida 1 en HPLC con método 11

Concentración 3, 220 nm

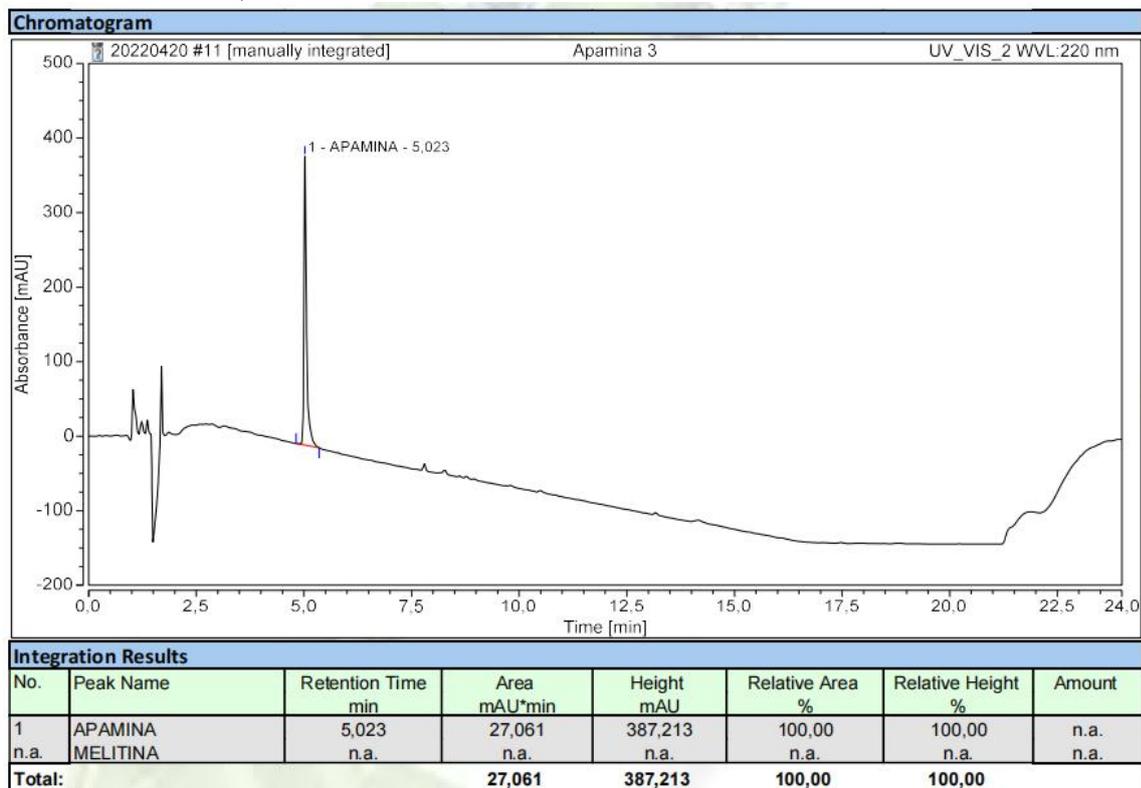


Concentración 3, 280 nm

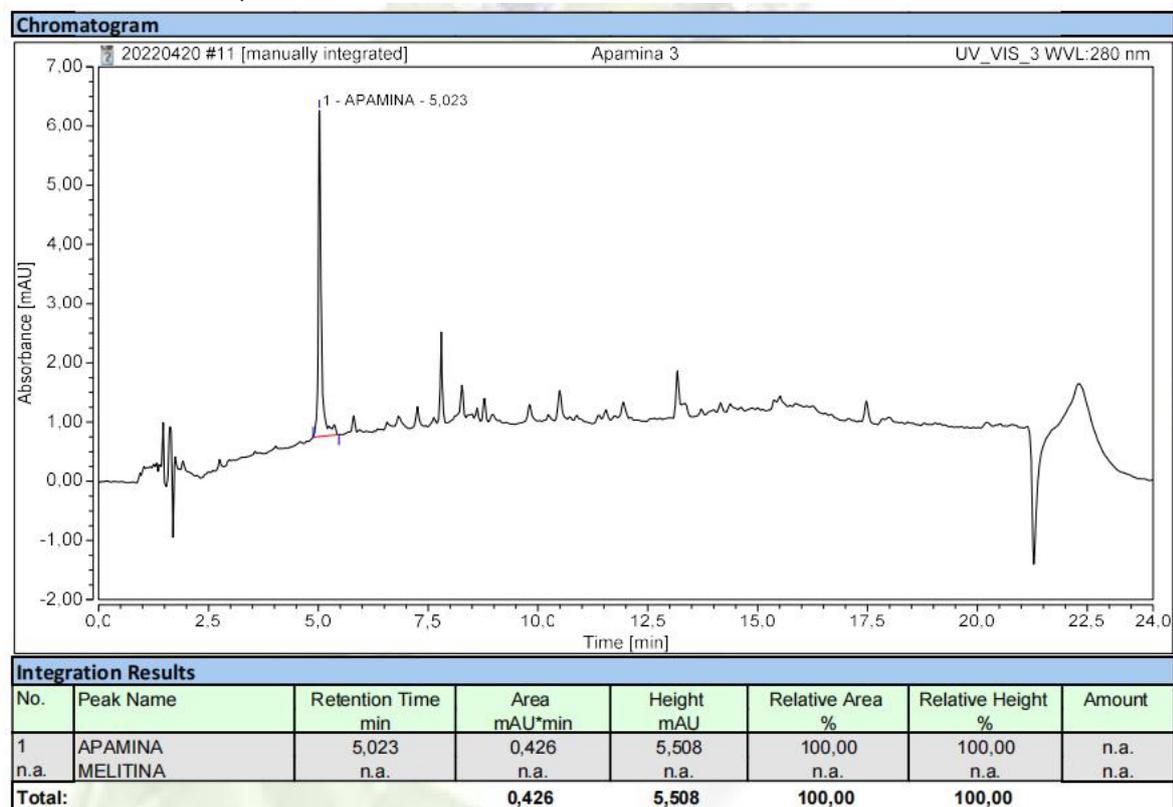


Corrida 2 en HPLC con método 11

Concentración 3, 220 nm

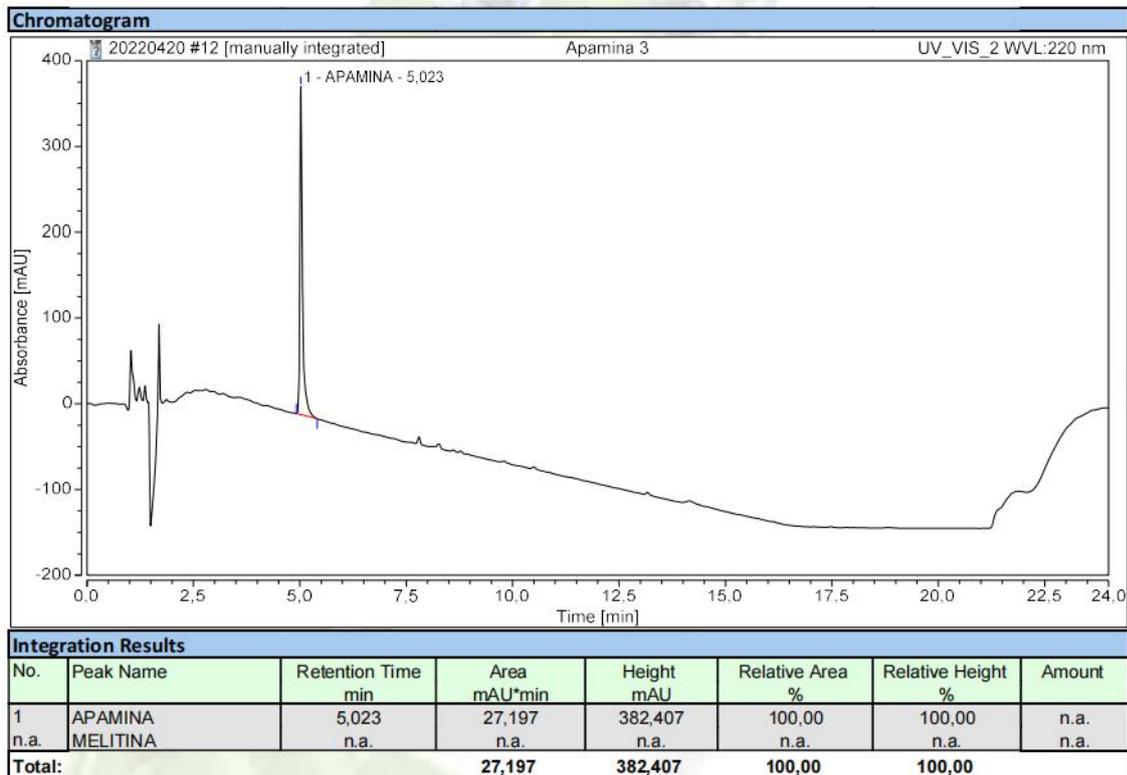


Concentración 3, 280 nm

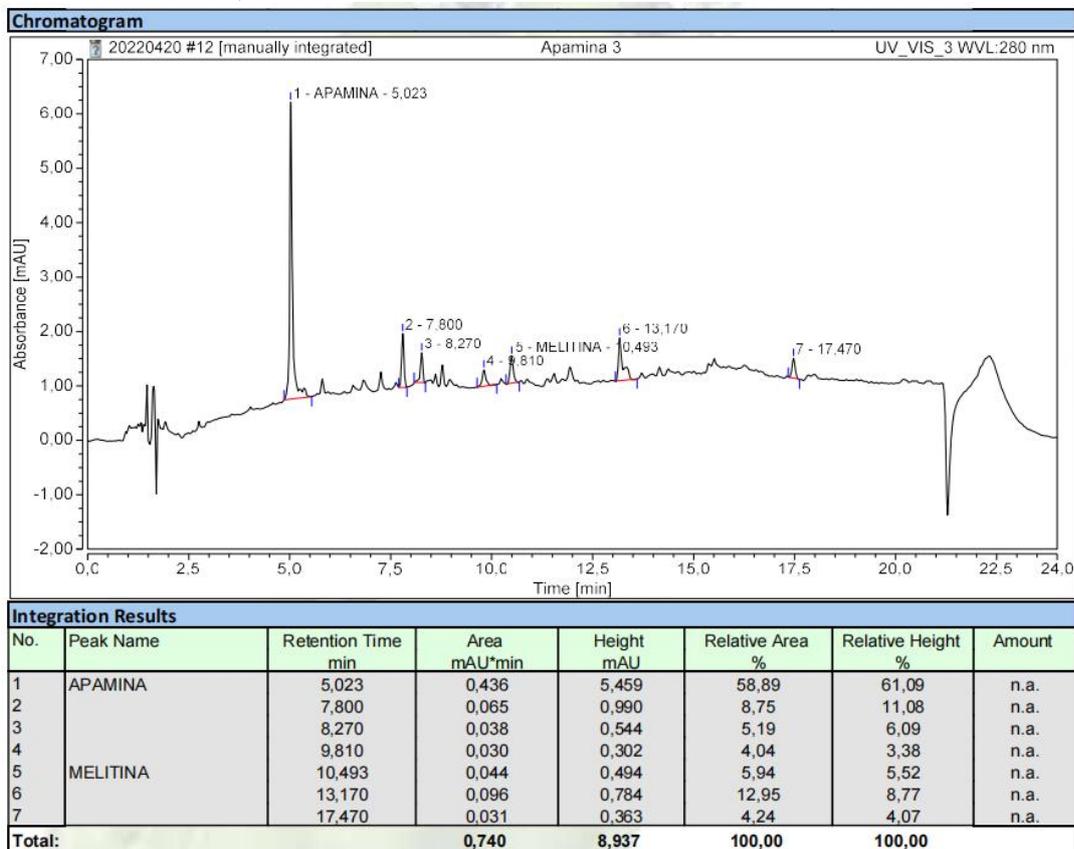


Corrida 3 en HPLC con método 11

Concentración 3, 220 nm

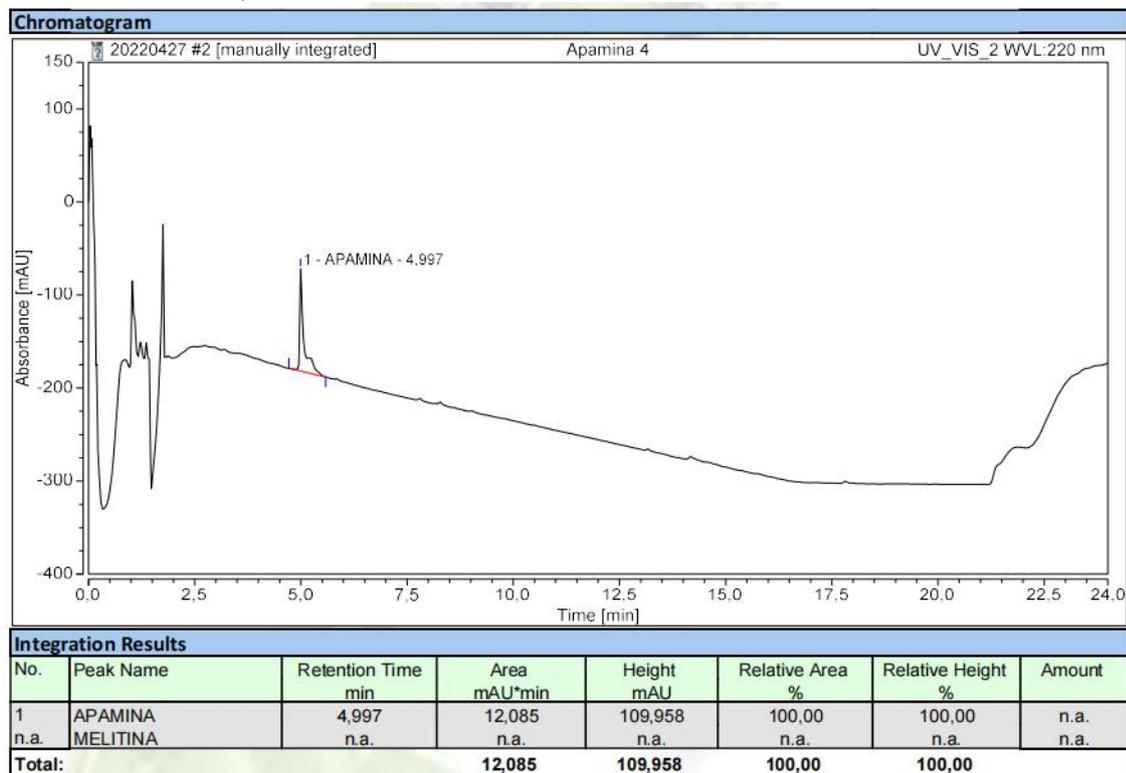


Concentración 3, 280 nm

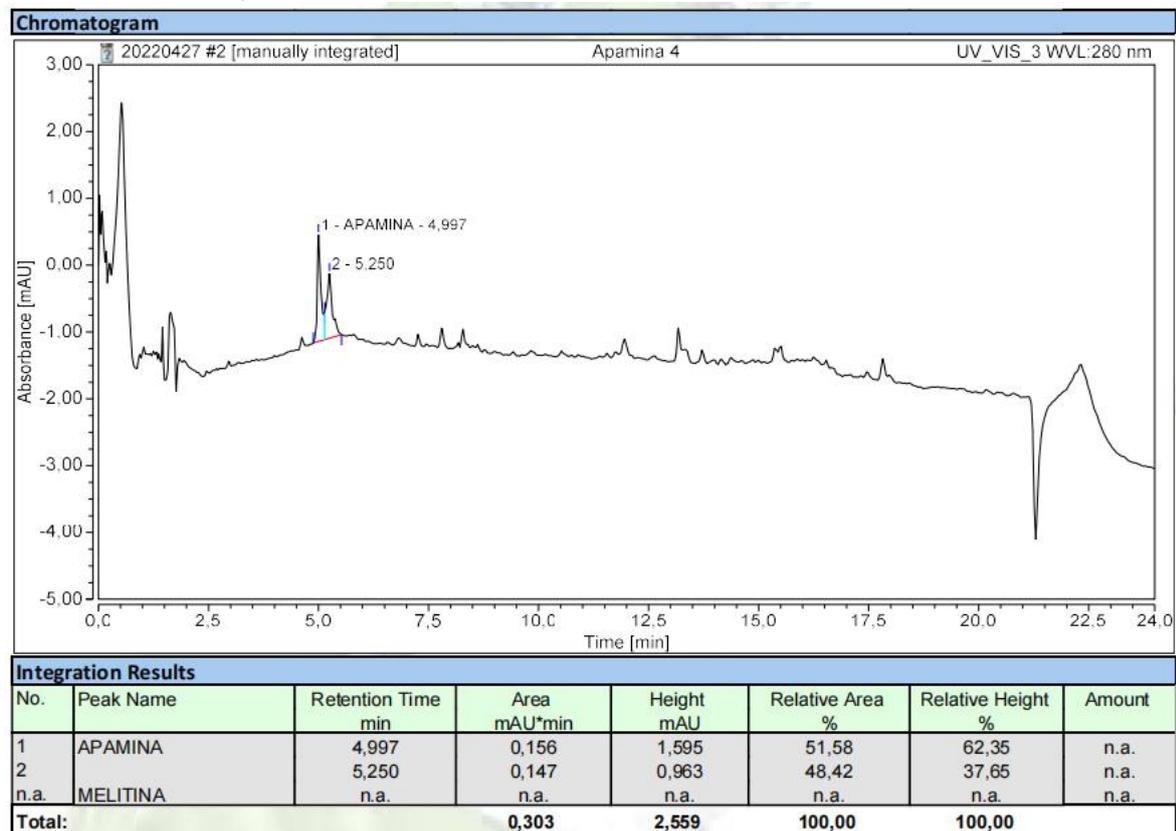


Corrida 1 en HPLC, método 11

Concentración 4, 220 nm

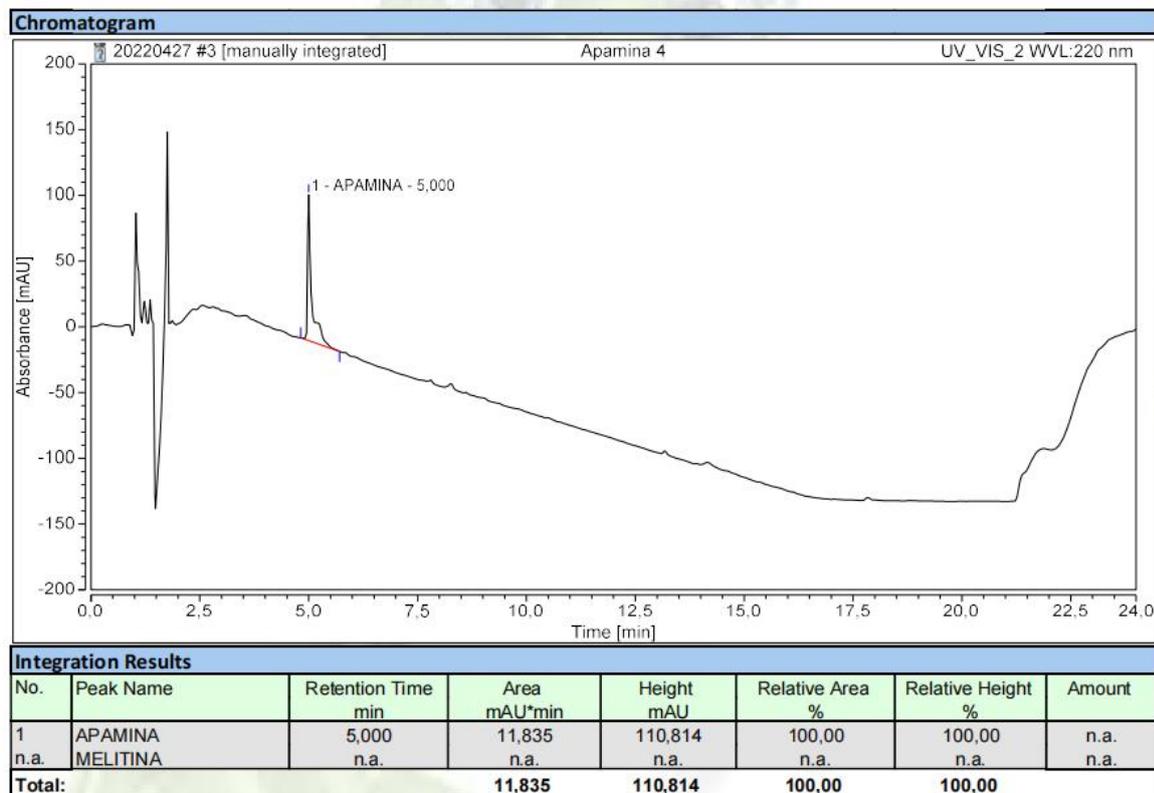


Concentración 4, 280 nm

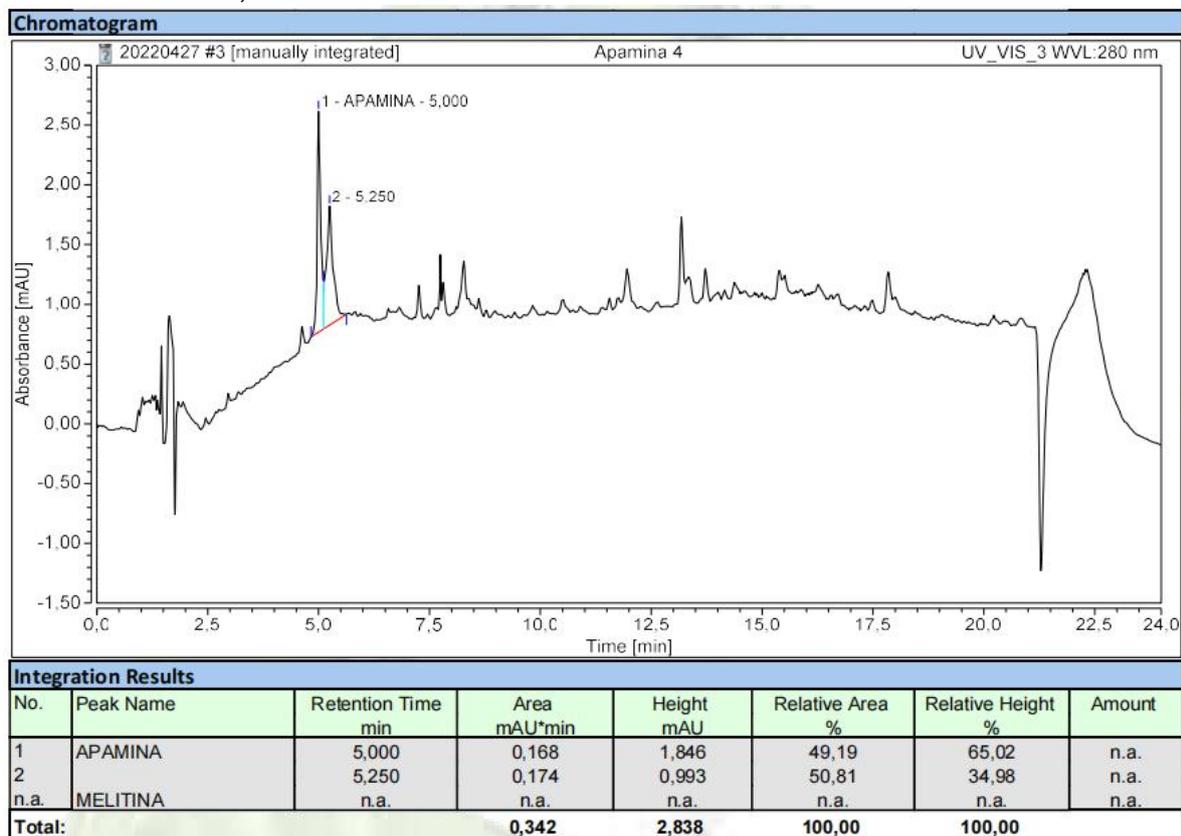


Corrida 2 en HPLC, método 11

Concentración 4, 220 nm

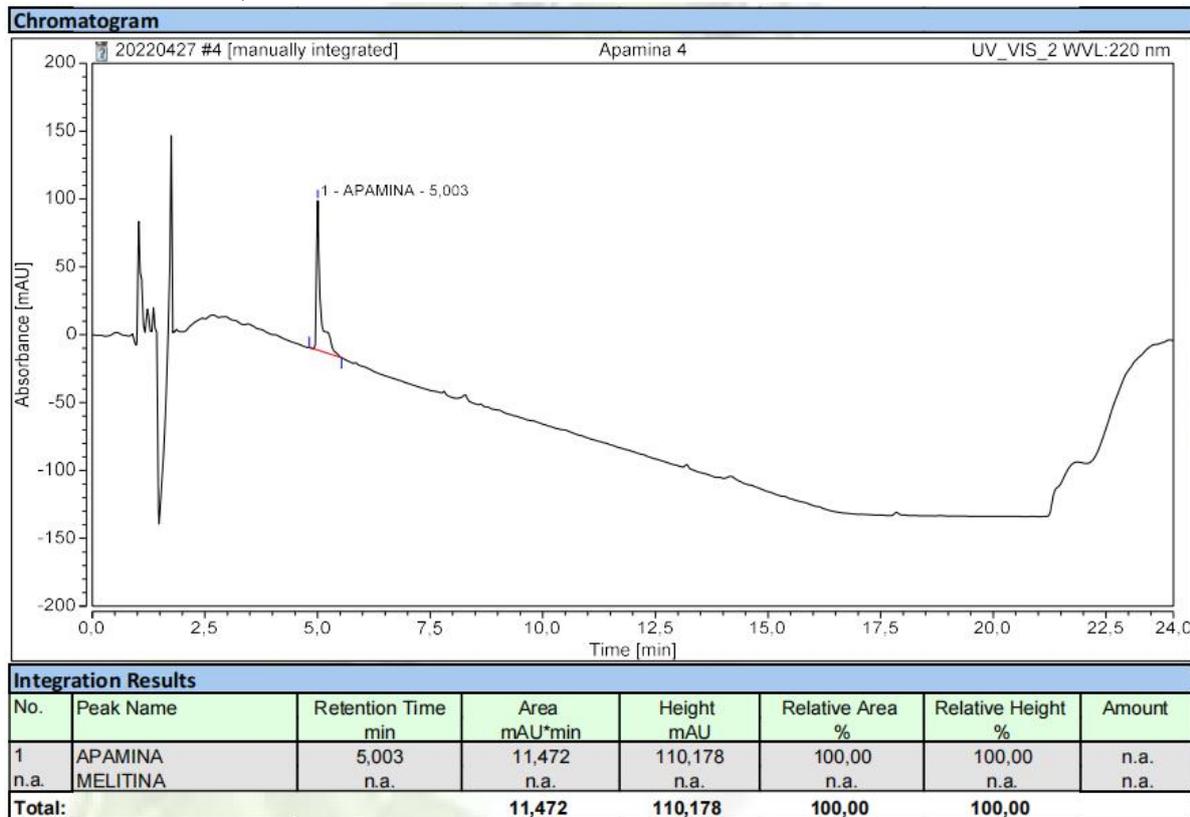


Concentración 4, 280 nm



Corrida 3 en HPLC, método 11

Concentración 4, 220 nm



Concentración 4, 280 nm

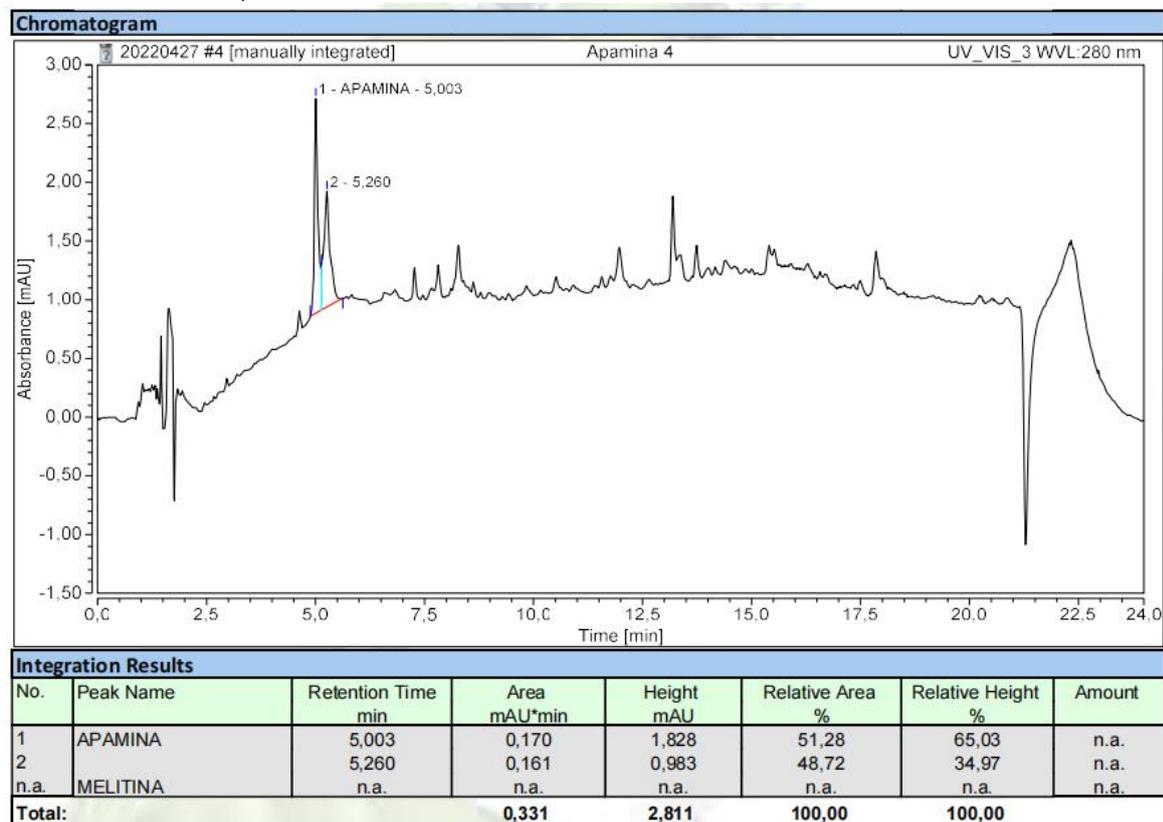


Tabla de abreviaturas

Å	Armstrong
MeCN	Acetonitrilo
TFA	Ácido trifluoroacético
H ₂ O	Agua
R ²	Coefficiente de determinación
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
σ	Desviación estándar
°C	Grados Celcius
kDa	Kilodalton
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetros
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
mg/mL	Miligramos/mililitros
mL	Mililitros
mL/min	Mililitros/minutos
min	Minutos
mm	Milímetro
S	Pendiente de la curva de calibración
R	Resolución
T°	Temperatura