QUIMIOPROSPECCIÓN DE LA RESINA DE LA FLOR DE *Clusia valerioi* (Standl.) Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROPÓLEOS DE UNA REGIÓN DE LA ZONA SUR DE COSTA RICA

CHEMIOPROSPECTION OF THE FLOWER RESIN OF *Clusia valerioi* (Standl.) AND ITS RELATIONSHIP WITH THE CHEMICAL COMPOSITION OF PROPOLIS FROM A SOUTHERN REGION OF COSTA RICA

Segura Víquez, Andrea (1) (andrea.segura.viquez@est.una.ac.cr); Soto Fallas, Roy M. (1) (roy.soto.fallas@una.cr); Borbón Alpízar, Henry (1) (henry.borbon.alpizar@una.cr); Valdés Díaz, Sandra (1) (sandra.valdes.diaz@una.cr); Umaña Rojas, Eduardo (2) (eduardo.umana.rojas@una.cr); Zamora Fallas, Luis G. (2) (luis.zamora.fallas@una.cr); Sánchez Chaves, Luis (2) (luis.sanchez.chaves@una.cr); Fallas Matamoros, Natalia (2) (natalia.fallas.matamoros@una.cr); Montenegro Hidalgo, Víctor (3) (victor.montenegro.hidalgo@una.cr); Alfaro Alarcón, Alejandro (3) (alejandro.alfaro.alarcon@una.cr); Guevara González, Mariana (3) (mariana.guevara.gonzalez@una.cr); Romero Vega, Luis (3) (luis.romero.vega@una.cr); SLoaiza Montoya, Randall (4) (rloaiza@cenat.ac.cr); Picado Canales, Natalín (4,5) (npicado@cenat.ac.cr); Barrantes Murillo, Erika (4,5) (ebarrantesm@cenat.ac.cr)

[1]Laboratorio de Productos Naturales y Ensayos Biológicos (LAPRONEB), Escuela de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Costa Rica.
[2]Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT). Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Universidad Nacional de Costa Rica.
[3]Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Costa Rica.
[4]Centro Nacional de Biotecnología (CENIBiot), Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT), Costa Rica.
[5]Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Costa Rica.

RESUMEN

Los propóleos son subproductos apícolas elaborados por abejas del género *Apis mellífera* y de otras especies, que presentan muchos tipos de bioactividad. Su origen y composición puede relacionarse con el entorno botánico del sitio de anidación de las abejas, tal es el caso de la planta *Clusia valerioi* (Standl.), especie endémica de Costa Rica, cuya flor produce una resina utilizada por las abejas que la visitan para la producción de propóleos. Lo anterior implica la

posibilidad de establecer una trazabilidad de la composición química de la resina de la flor de *C. valerioi* (Standl.) y de los propóleos recolectados de apiarios ubicados en la Zona Sur de Costa Rica, en términos de relacionar la presencia de compuestos tipo flavonoides, ácidos fenólicos y del tipo benzofenonas policíclicas polipreniladas (nemorosona) en ambos tipos de matrices, para la identificación de posibles biomarcadores activos para futuros estudios. Extractos metanólicos de muestras de propóleos de ocho apiarios visitados y extractos etanólicos de resina floral de *C. valerioi* (Standl.) de cuatro sitios cercanos a dos de estos apiarios, muestreados en la zona de Coto Brus (Costa Rica), fueron analizados y derivatizados con técnicas de HPTLC estableciéndose la presencia de 3 marcadores químicos importantes (compuestos A, B y C), a partir de análisis de espectros de resonancia magnética nuclear de protones (^{1}H-NMR) y carbono-13 (^{13}C-RMN), espectros de absorción y cromatografías para 16 extractos de propóleos, resinas y flores *C. valerioi* (Standl.). Se identificó el compuesto A como un compuesto derivado de los terpenos, el compuesto B como nemorosona y el compuesto C como un derivado de los flavonoides del tipo flavonol o flavonona.

Palabras clave: Propóleos; *Apis mellifera*; *Clusia valerioi* (Standl.); HPTLC; Nemorosona.

ABSTRACT

Propolis are bee products which exhibit many types of bioactivities. The origin and composition of propolis can be related to the botanical environment surrounding the bee nesting site. The plant *Clusia valerioi* (Standl.) is endemic from Costa Rica and it is present in the Southern Region. This plant has flowers that produce a resin that is used by bees to produce propolis. This implies that the establishment of a chemical traceability from the resin of the flowers of *C. valerioi* (Standl.) to the propolis produced in nearby apiaries in the Southern Region of Costa Rica is feasible. Methanolic extracts of propolis samples from eigth apiaries, samples of resins carried by bees and ethanolic extracts of *C. valerioi* (Standl.) floral resins from four sites in the vicinity of two apiaries, were analyzed by HPTLC techniques. Our results reveal the presence of three chemical markers that confirm the traceability from the flowers resins to the propolis (compounds A, B and C). Compound A was identified as a terpene derivate and compound C as a flavonoid derivate (a flavonol or a flavonone). Compound B was isolated and characterized as a polyprenylated polycyclic benzophenone. It was identified as nemorosone by means of proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) and 13-carbon (^{13}C-RMN) spectra.

Key words: Propolis; *Apis mellifera*; *Clusia valerioi* (Standl.); HPTLC; Nemorosone.

INTRODUCCIÓN

Los propóleos se definen como productos resinosos formados por las abejas del género *Apis melífera*, a partir de exudados de plantas que se encuentran alrededor de los apiarios

(conjunto de dos o más colmenas) en los que ellas habitan. Las abejas procesan con sus mandíbulas estos exudados, a los cuales les adicionan enzimas de las glándulas mandibulares, que luego descargan en la colmena, mezclándolos con pequeñas cantidades de azúcares y con ceras secretadas por las mismas abejas. (1,2,3). Los propóleos obtenidos se utilizan como protección de las paredes internas y de la entrada a la colmena, ya que no solo son materiales de construcción, sino que también se describen como armas químicas de las mismas, ya que funcionan como barreras preventivas contra el crecimiento de hongos y bacterias (4, 5). Son mezclas complejas, con muchos compuestos químicos, que presentan en su composición química alrededor de un 55 % de bálsamos aromáticos y resinas, 30 % de ceras, 10 % de aceites esenciales y 5 % de granos de polen junto con otros materiales.

Entre los principales compuestos presentes en los propóleos se encuentran los del tipo flavonoide, como las flavonas y las flavononas. En general, se han encontrado alrededor de 38 tipos de flavonas, 12 tipos de derivados del ácido benzoico, 14 tipos de derivados del alcohol cinamílico y del ácido cinámico, 12 tipos de compuestos variados entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 tipos de terpenos, 11 tipos de esteroides, 7 tipos de azúcares y finalmente 2 aminoácidos. Dentro de este conjunto de metabolitos, se destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos y sus ésteres como moléculas farmacológicamente activas (6).

Además, a nivel terapéutico, se ha concluido que los compuestos fenólicos y flavonoides le confieren a los propóleos esas propiedades; encontrándose que la actividad antimicrobiana la proporcionan los polifenoles, junto con los flavonoides, los ácidos fenólicos y sus ésteres (7). Además, se ha observado que los aceites esenciales le imparten propiedades como antimicrobiano, antifúngico, antitumoral, antiinflamatorio, hepatoprotector, antidiabético, cardioprotector e inmunomodulador. Estas características, han generado mucho interés por parte de la comunidad científica para estudiar más detalladamente los propóleos y los entornos de los cuales se derivan; ya que al ser un producto con tan variadas propiedades terapéuticas y una composición química de origen natural, potencialmente se podría utilizar para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (2).

Por otra parte, estudios etnobotánicos han demostrado que existen plantas que pertenecen a la familia Clusiaceae que poseen actividad antiinflamatoria. Estas plantas, se caracterizan por producir metabolitos secundarios de tipo terpenoides y polifenoles. En esta familia se encuentra el género *Clusia*, cuyas flores producen una resina que es recolectada por diferentes tipos de abejas para la construcción de nidos, siendo utilizada como pegamento y como una protección impermeable en sus colmenas (8, 9, 10). Esta relación entre la resina de la flor de *Clusia* y su utilización por parte de las abejas en la construcción y funcionamiento de sus colmenas, supone una interacción o influencia de la composición química de dichas resinas sobre los componentes químicos de los propóleos elaborados por las abejas; según lo han

demostrado estudios realizados en México, y una eventual potencialización de las actividades terapéuticas de los propóleos elaborados con dichas resinas, según estudios realizados por investigadores cubanos (11, 12).

La planta *C. valerioi* (Standl.) es un árbol regularmente epífito, con ramas cafés o negras, localizado en nuestro país en los bosques húmedos, muy húmedos y pluviales de la vertiente del Caribe, Cordilleras de Tilarán, Central y Talamanca, en las llanuras de San Carlos, Tortuguero, Valle del Coto Brus y en la región del Golfo Dulce. Se suele reconocer ya que es la única del género que presenta láminas foliares (la parte plana de hoja que generalmente es de color verde, la cual se une a la rama o tallo), que cuando secan son casi negras. Sus flores tienen pétalos rosados o rojos con una marca de las tecas en forma de anillo (13, 14).

Cabe destacar que en el género *Clusia* es característica la producción de resinas ricas en benzofenonas policíclicas polipreniladas (tipo nemorosona), las cuales son aprovechadas por las abejas para la producción de propóleos (8,11). Se han catalogado 55 benzofenonas, distribuidas en flores, frutos, tallo, ramas y hojas, sin embargo, la mayoría de estos metabolitos se encuentra en los frutos y resinas florales (15). Las benzofenonas se pueden dividir en dos categorías dependiendo de su estructura química: se encuentran las benzofenonas simples, las cuales están compuestas por un esqueleto de 13 carbonos con dos anillos aromáticos unidos a un grupo carbonilo y las benzofenonas polipreniladas, las cuales tienen sistemas policíclicos y puentes oxo con grupos epoxi y peróxidos (Figura 1) (15, 16).

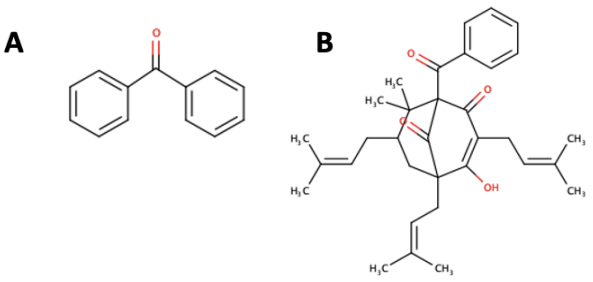

Figura 1. A) Estructura química de una benzofenona simple. B) Estructura química de la nemorosona (benzofenona poliprenilada). (15)

En Costa Rica se distinguen 3 tipos químicos de propóleos según su composición global (determinada por Resonancia Magnética Nuclear Protónica) y su capacidad antioxidante medida como efecto neutralizador del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). El tipo I contiene principalmente compuestos fenólicos como el benzoato de *n*-coniferilo, el tipo II contiene benzofenonas polipreniladas como la nemorosona y el tipo III contiene sustancias terpénicas como el agatadiol. Los propóleos de los tipos I y II muestran una mayor actividad

contra el radical DPPH, respecto a los del tipo III. Estudios locales realizados en Costa Rica demostraron que los tipos I y III fueron predominantes en el Pacífico Norte, Pacífico Central y Valle Central, mientras que en la Zona Sur solamente se encontraron propóleos del tipo II. Este tipo de propóleos también estuvo presente en las otras regiones estudiadas, pero con una frecuencia incidental. Esta tendencia en la distribución tuvo significancia estadística y de acuerdo con estos resultados, es de suponer que alguna especie de *Clusia sp*. presente en la Zona Sur del país tendría relevancia como fuente de resinas para que las abejas elaboren los propóleos (17, 18).

Los metabolitos secundarios presentes en las flores de *C. valerioi* (Standl.) suponen una fuente de productos naturales con potencial farmacéutico, tanto en la matriz vegetal, como en los productos derivados a partir de ella. Sin embargo, como los estudios de esta flor son limitados, el objetivo de esta investigación fue establecer si existe una relación entre los compuestos de tipo benzofenona policíclica poliprenilada (nemorosona) y de otras categorías presentes en la resina de la flor de *C. valerioi* (Standl.) de la Región Sur de Costa Rica y los presentes en los propóleos de colmenas de abejas melíferas recolectados en la misma región. Para lograr lo anterior, se determinó la naturaleza química de las principales familias de compuestos presentes en la resina de la flor y en los propóleos extraídos y analizados mediante HPTLC, para luego correlacionar su presencia en ambos materiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Las muestras de los receptáculos de las flores y de los propóleos de los apiarios circundantes fueron colectadas en la Región Sur de Costa Rica; específicamente durante la época de floración de *C. valerioi* (Standl.) en dicha región (junio- julio 2022). Se siguió un esquema de muestreo al azar. Dicha estrategia implicó una selección aleatoria de 8 apiarios de la Región Sur del país, que constituyen cerca de un 9% de los apiarios registrados en la región (19). En cada apiario se seleccionaron al azar las colmenas a muestrear. En la Figura 2 se detalla la codificación utilizada para los extractos preparados a partir de las muestras obtenidas y la ubicación geográfica de su origen.

Código de Muestra	Descripción	Provincia, Cantón, Distrito	Número de Ubicación en Mapa
CDRF 1	Propóleos de apiario	Puntarenas, Coto Brus, Pittier	5
CDRF 2	Extracto a partir de resina en corbículas de una abeja	Puntarenas, Coto Brus, Pittier	5
CDRF 3	Extracto de flores de *C. valerioi*	Puntarenas, Coto Brus, Pittier	5
CDRF 4	Extracto de flores de *C. valerioi*	Puntarenas, Coto Brus, Pittier	5
CD 02A	Extracto de flores de *C. valerioi*	Puntarenas, Coto Brus, Limoncito	10
CD 03B	Extracto de flores de *C. valerioi*	Puntarenas, Coto Brus, Limoncito	10
CD 05	Cúmulo de resinas en colmena (sin procesar)	Puntarenas, Coto Brus, Limoncito	10
CD 06A	Propóleos de apiario	Puntarenas, Coto Brus, Limoncito	10
CD 2A	Propóleos de apiario	Puntarenas, Buenos Aires, Buenos Aires	2
CD 3A	Propóleos de apiario	San José, Pérez Zeledón, Platanares	3
CD 4A	Propóleos de apiario	Puntarenas, Buenos Aires, Potrero Grande	4
CD 5A	Propóleos de apiario	Puntarenas, Coto Brus, Pittier	5
CD 7B	Propóleos de apiario	Puntarenas, Golfito, Puerto Jiménez	7
CD 8A	Propóleos de apiario	Puntarenas, Osa, Palmar	8
CD 9A	Propóleos de apiario	Puntarenas, Coto Brus, Gutiérrez Braun	9
CD 10B	Propóleos de apiario	Puntarenas, Coto Brus, Limoncito	10

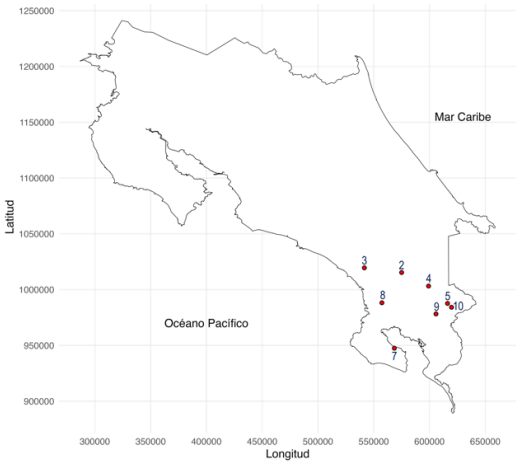

Figura 2. Codificación utilizada para los extractos analizados de flores, resinas, propóleos y la ubicación geográfica de su muestreo según puntos georeferenciados por GPS (Global Positioning System)

Colecta e identificación del material botánico

Para la determinación y confirmación del origen botánico de las muestras, se colectaron hojas, flores y botones florales de la especie *C. valerioi* (Standl.) en cuatro sitios de muestreo, ubicados en las localidades de Santa Elena de Pittier, Piedras Negras y Limoncito de Coto Brus, al sur de la provincia de Puntarenas. Las plantas muestreadas estaban en el área de pecoreo de los apiarios visitados. Además, se colectaron muestras de la misma especie vegetal en otro sitio fuera del área de pecoreo de las abejas, en la misma zona, pero en la localidad de Santa Fe de Pittier.

La verificación taxonómica del material se realizó comparando las muestras colectadas y secadas en prensa botánica, con especímenes de la colección de referencia del Herbario Nacional del Departamento de Historia Natural del Museo Nacional de Costa Rica y mediante consultas a literatura especializada (9, 20, 21). Esta verificación fue comprobada por el experto botánico Luis Jorge Poveda Álvarez, curador en el Herbario Juvenal Valerio Rodríguez de la Universidad Nacional (22).

Colecta de resinas en abejas y apiarios

Para la colecta de las cargas de resinas de las abejas se utilizaron dos métodos. El primer método consistió en colectar las cargas que transportaban las abejas pecoreadoras en sus corbículas. En este caso, con la ayuda de una pinza, se separó la carga a diez abejas individuales, en diez colmenas seleccionadas al azar en cada apiario. El segundo método consistió en realizar las colectas de diez cargas recientemente depositadas por las abejas (resina sin procesar) en los cabezales superiores de los marcos de diez colmenas seleccionadas al azar en cada apiario.

Determinación del origen botánico de las resinas

Las muestras de resina o las de cargas corbiculares colectadas se separaron por color y se estableció una frecuencia de cargas de acuerdo con la dominancia de estas con relación al color de cada una en los períodos de colecta. Posteriormente, las cargas más dominantes fueron analizadas al microscopio, para determinar mediante análisis palinológicos los granos de polen presentes en las muestras. Para este análisis, se utilizó la técnica de tinción con safranina de los preparados que fueron centrifugados en una solución de glicerol. Los granos de polen, una vez precipitados y secados en estufa, fueron montados en láminas fijas para su observación en el microscopio en aumentos de 10X y 100X. A continuación, se prepararon microfotografías de los granos de polen presentes en las resinas colectadas de las corbículas y en los cabezales. Seguidamente, se realizaron montajes del polen de las anteras de las flores identificadas para así contrastar y comparar las imágenes con las del polen provenientes de las resinas, según método modificado de Erdtman (23).

Procesamiento de las muestras y preparación de los extractos

Una vez recolectadas, todas las muestras se transportaron a temperatura ambiente al Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT), donde se conservaron bajo refrigeración (a 4 grados Celsius), para su posterior traslado y procesamiento en el Laboratorio de Productos Naturales y Ensayos Biológicos (LAPRONEB) de la Escuela de Química de la Universidad Nacional (UNA).

Las muestras de propóleos fueron deshidratadas durante 24 horas en un liofilizador. A partir de este punto, las mismas fueron procesadas en duplicado de acuerdo con la metodología descrita por Umaña (17). Posteriormente se morterizaron, pesándose con balanza analítica 400 mg de cada una en sendos tubos de ensayo. Cada muestra fue extraída con 10,0 ml de metanol (99,9%, Sigma-Aldrich) y un tratamiento de 15 minutos en un baño ultrasónico. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos (a temperatura ambiente). Los líquidos sobrenadantes se dispensaron en viales con tapa y se conservaron en refrigeración hasta su empleo.

Las muestras de los receptáculos de las flores de *C. valerioi* (Standl.) fueron maceradas en etanol absoluto (100%, Sigma Aldrich) por triplicado. Posteriormente, esos extractos se concentraron a sequedad mediante un rotavapor. De aquí en adelante, se continuó el mismo procedimiento descrito para los extractos de los propóleos.

Finalmente se prepararon soluciones de 2 mg/mL a partir de los extractos de las flores de *C. valerioi* (Standl.), de la resina en corbículas de una abeja, de la resina sin procesar en una colmena y de los propóleos.

Cromatografías en capa fina de alto desempeño (HPTLC)

Equipamiento

Se realizaron cromatografías en capa fina de alto desempeño (HPTLC) mediante el sistema HPTLC de la marca comercial CAMAG ubicado en el Centro de Investigaciones

Apícolas Tropicales (CINAT) de la Universidad Nacional (UNA). Dicho equipo estaba compuesto de un muestreador ATS 4 (Automatic TLC Sampler 4), una cámara para el desarrollo de cromatografías ADC 2 (Automatic Developing Chamber 2), un equipo para la toma de imágenes (Visualizer), un equipo para la derivatización (Derivatizer), una plantilla para calentar las reacciones de derivatización (TLC Plate Heater), un densitómetro (TLC Scanner 4) y una interfaz compuesta de un ordenador provisto del software de gestión VisionCATS 2.5 de CAMAG.

Fase estacionaria

La fase estacionaria empleada fue la de cromatofolios HPTLC Silica Gel 60 F_{254}, con dimensiones de 20 cm X 10 cm y soporte de vidrio (Merck).

Aplicación de muestras

En cada placa de HPTLC, se aplicó una alícuota de cada muestra, con un volumen de 1 a 20 µL, mediante el ATS 4 (15 muestras por placa). Las muestras se dispensaron a una altura de 8 mm en el cromatofolio y cada aplicación tenía 8 mm de longitud. El ATS 4 empleó gas nitrógeno para la aplicación en aerosol de las muestras.

Desarrollo de las cromatografías

Las cromatografías se realizaron en el ADC 2. La fase móvil empleada estaba compuesta de una disolución de diclorometano y metanol (9:1). Se emplearon 25 mL de fase móvil para la saturación de la cámara del ADC 2 y 10 mL para el desarrollo de la cromatografía. Este proceso, consistió en una etapa de saturación de 20 minutos, 10 minutos de una etapa activación con $MgCl_2$ (a fin de llevar la humedad relativa al 33%), el desarrollo de la cromatografía hasta los 70 mm de altura y el secado de la placa por 5 minutos.

Captura de imágenes y cálculo del factor de retención (Rfs)

El registro fotográfico de las exposiciones a luz visible, a luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm, las derivatizaciones y los cálculos de Rfs se realizaron con el Visualizer en conjunto con el software VisionCATS 2.5.

Derivatizaciones

La aplicación de agentes derivatizantes se realizó mediante el Derivatizer. Se emplearon los siguientes agentes derivatizantes: el reactivo de productos naturales (2-aminoetil difenilborinato), anisaldehido, vainillina y reactivo de Dragendorff. Estos reactivos, se prepararon y aplicaron acorde a las instrucciones del fabricante del Derivatizer. En los casos en que las derivatizaciones lo ameritaran, se calentó el cromatograma empleando el TLC Plate Heater.

Densitometrías

La determinación de los espectros de absorción (desde los 200 nm hasta los 900 nm), los ensayos densitométricos a 206 nm, a 307 nm, los ensayos de correlación y pureza espectral se realizaron con el TLC Scanner 4 en conjunto con el software VisionCATS 2.5.

Generación de la huella química

A partir de los cromatogramas, densitometrías y mediante el software VisionCATS 2.5, se prepararon vistas de imágenes comparativas (image comparison views). Dichas imágenes compuestas, se conocen como huella química (chemical fingerprints), que en esta investigación se emplearon para identificar las familias químicas presentes en cada muestra. La interpretación de las derivatizaciones se realizó mediante la comparación de los resultados con literatura especializada (24-29).

Aislamiento y purificación de compuestos de interés

Cromatografía preparativa (PTLC)

Los compuestos de interés fueron aislados inicialmente mediante cromatografías preparativas en capa fina que emplearon como fase estacionaria placas de PTLC Silica Gel 60 $F_{254+366}$ con 2 mm de espesor (Merck) y como fase móvil una disolución de diclorometano y metanol (9:1). Posterior a la cromatografía, se rasparon las áreas de interés. La silica gel raspada se mezcló con 100 mL de metanol y se filtró mediante un embudo provisto de un filtro Whatman #40. Posteriormente se eliminó el disolvente mediante evaporación rotativa y se disolvió la fracción aislada en 4 mL de metanol. Por último, esta disolución se pasó a través de un filtro de jeringa con un poro de 0,400 µm (Fisher Scientific) y se dispensó en un vial hasta su empleo.

Aislamiento y purificación mediante cromatografía líquida a presión media (MPLC)

Los compuestos de interés se aislaron y purificaron mediante cromatografías líquidas a presión media. Para lo anterior, se empleó un cromatógrafo flash (SepaCore®, Büchi) provisto de una columna de fase reversa (dimensiones de 12 mm X 150 mm), un detector provisto de un monocromador y un colector de fracciones automático. Se inyectó al MPLC un volumen de 2 mL de una disolución de 20 mg/mL de las fracciones a purificar. Se aplicó un flujo de 5 mL por minuto de una fase móvil compuesta de metanol y agua (75:25) para la purificación del denominado compuesto B y una fase móvil de metanol y agua (95:5) para la purificación de la sustancia denominada compuesto C. Las cromatografías se realizaron en condiciones isocráticas y se evaluó la absorbancia a los 307 nm (para el compuesto B) y 206 nm (para el compuesto C). El volumen de las fracciones colectadas fue de 5 mL. A partir de los gráficos de la separación y teniendo como criterio principal la pureza, se procedió a seleccionar las fracciones pos-cromatografía. La fase móvil del conjunto de fracciones se eliminó mediante evaporación rotativa y liofilización. A partir de este procedimiento, se logró el aislamiento y purificación de dos compuestos de interés. La pureza de los aislamientos se verificó con una HPLTC y su derivatización con una solución de 1 mg/mL de permanganato de potasio. Se consideró como criterio de pureza la presencia de únicamente la banda del compuesto de interés en el cromatograma.

Elucidación estructural para el compuesto B

Resonancia magnética nuclear

La sustancia denominada compuesto B fue aislado a partir de los propóleos de un apiario ubicado en Santa Elena de Pittier (ver Figura 2, número de ubicación 5) según la metodología detallada anteriormente. Su pureza espectral (> 99.97%) se determinó a través del sistema de HPTLC (CAMAG).

Una cantidad de 15 mg del compuesto B fue disuelta en 750 µL de metanol deuterado (CD_3OD). La disolución final (20 mg/mL) fue transferida a tubos de RMN. Los espectros fueron medidos en un espectrómetro Bruker modelo Avance III provisto de una sonda de 50 mm, a 25 °C, usando un campo magnético de 400.13 MHz para el espectro protónico (^{1}H-RMN) y 100.62 MHz para el espectro de carbono-13 (^{13}C-RMN). En ambos casos se utilizó un pulso de 30°. El tiempo de relajamiento fue de 1 s para el ^{1}H-RMN y 2 s para el ^{13}C-RMN. El FID (Free Induction Decay) en ambos casos estuvo constituido por 64K puntos.

Espectro infrarrojo

El espectro infrarrojo se midió en un equipo de reflectancia total atenuada (ATR), marca Thermo Scientific, modelo Nicolet iS50 FT-IR.

La estructura molecular del compuesto B fue determinada por comparación y consistencia de los datos obtenidos de los experimentos de RMN e IR con los reportados en la literatura (17, 18, 30, 31).

RESULTADOS

Identificación taxonómica de la especie *Clusia valerioi* (Standl.)

La especie *C. valerioi* (Standl.) es un arbusto o árbol de 2 a 15 m de alto, perteneciente a la familia Clusiaceae, con hábito algunas veces epífito, hemiepífito o estrangulador. Con hojas simples y opuestas, coriáceas, con savia lechosa o crema. La especie es considerada como dioca, con flores estaminadas (masculinas) y pistiladas (femeninas) separadas en diferentes plantas (Figura 3). En las flores estaminadas hay presencia de canales secretores de resina, así mismo estos canales se ubican en los estaminoides de las flores pistiladas. La resina secretada es de naturaleza oleosa y de color claro, que al oxidarse toma una coloración naranja parduzca y posteriormente se torna café. El perianto de las flores está conformado por 5 pétalos usualmente de color rosado con la parte interna más rojiza, algunas veces las flores tienden a ser más blancas (22).

Figura 3. Flores, hojas, ramas y botones florales de *C. valerioi* (Standl.) colectadas en la zona de estudio para su identificación.

Al analizar las muestras de resinas que transportaban las abejas individuales y las de las cargas colectadas en los cabezales de los marcos de los apiarios, se obtuvo que el color de las cargas dominantes (93 %) eran blancuzcas y luego de un tiempo se tornaron de un color naranja pálido o café una vez depositadas en los viales. Las otras cargas consideradas incidentales o accesorias (7%) eran de colores amarillo pálido, rojos y verdosos, y mantenían su coloración con el tiempo.

Una vez realizados los montajes para microscopía de las cargas dominantes, se identificó que correspondían casi en su totalidad al polen de la especie *C. valerioi* (Standl.). (Figuras 4 y 5). Los granos de polen de *C. valerioi* (Standl.) son tricolporados, con poros circulares a elípticos, exina tectada y sexina granulada. El grano es de forma esferoidal y pequeño de 22-24 µm (32, 33).

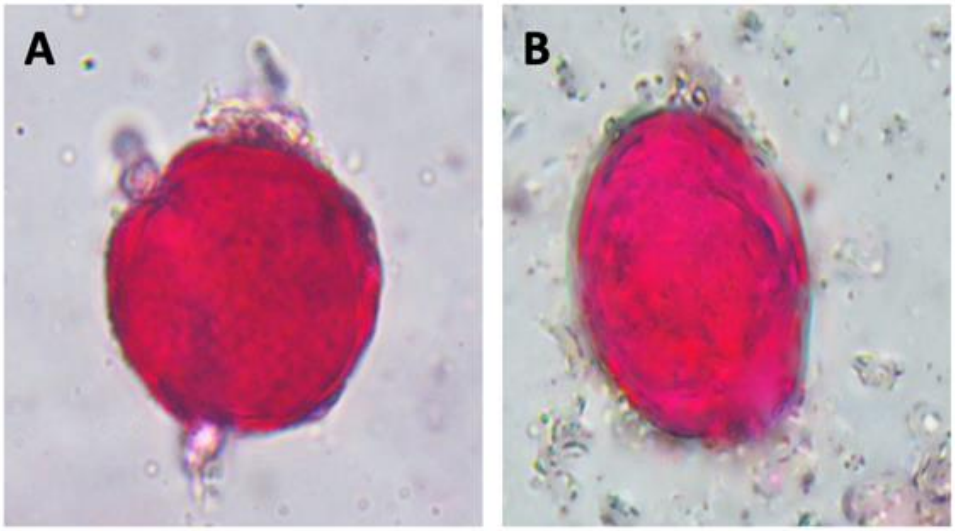

Figura 4. Microfotografía de granos de polen de *C. valerioi* (Standl.) provenientes de anteras florales (Aumento 100X). A) Vista polar, B) Vista ecuatorial.

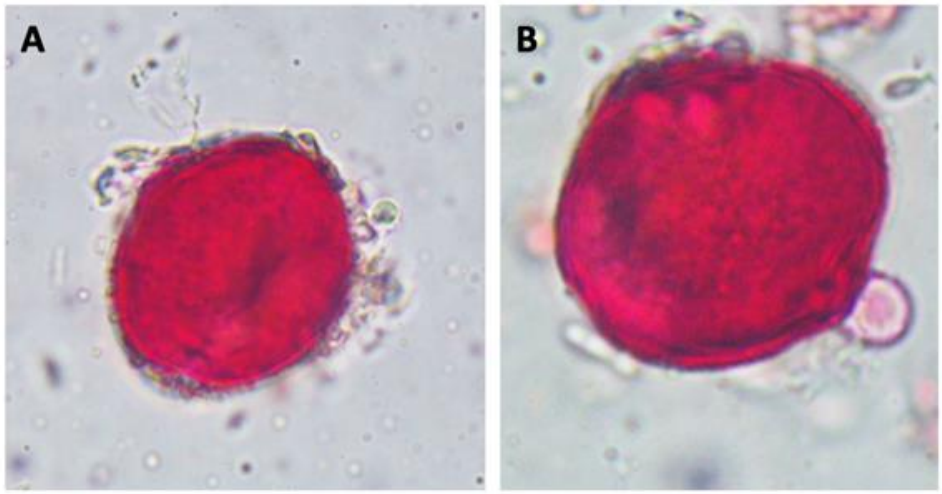

Figura 5. Microfotografía de vistas polares de granos de polen de *C. valerioi* (Standl.) (Aumento 100X). A) Grano proveniente de resina colectada por abejas, B) Grano proveniente de resina colectada en cabezales de los marcos (resina sin procesar)

El restante polen analizado provenía de las cargas de resinas incidentales, obteniéndose que la mayoría de los granos eran de la familia Asteraceae, de las especies *Tridax procumbens* y *Melampodium divaricatum*; Melastomataceae del género *Miconia sp*. y Moraceae de la especie *Cecropia insignis*.

Ensayos de Cromatografía en Capa Fina de Alto Desempeño (HPTLC)

Los resultados de las cromatografías en capa fina de alto desempeño y las derivatizaciones se presentan en las Figuras 6 y 7.

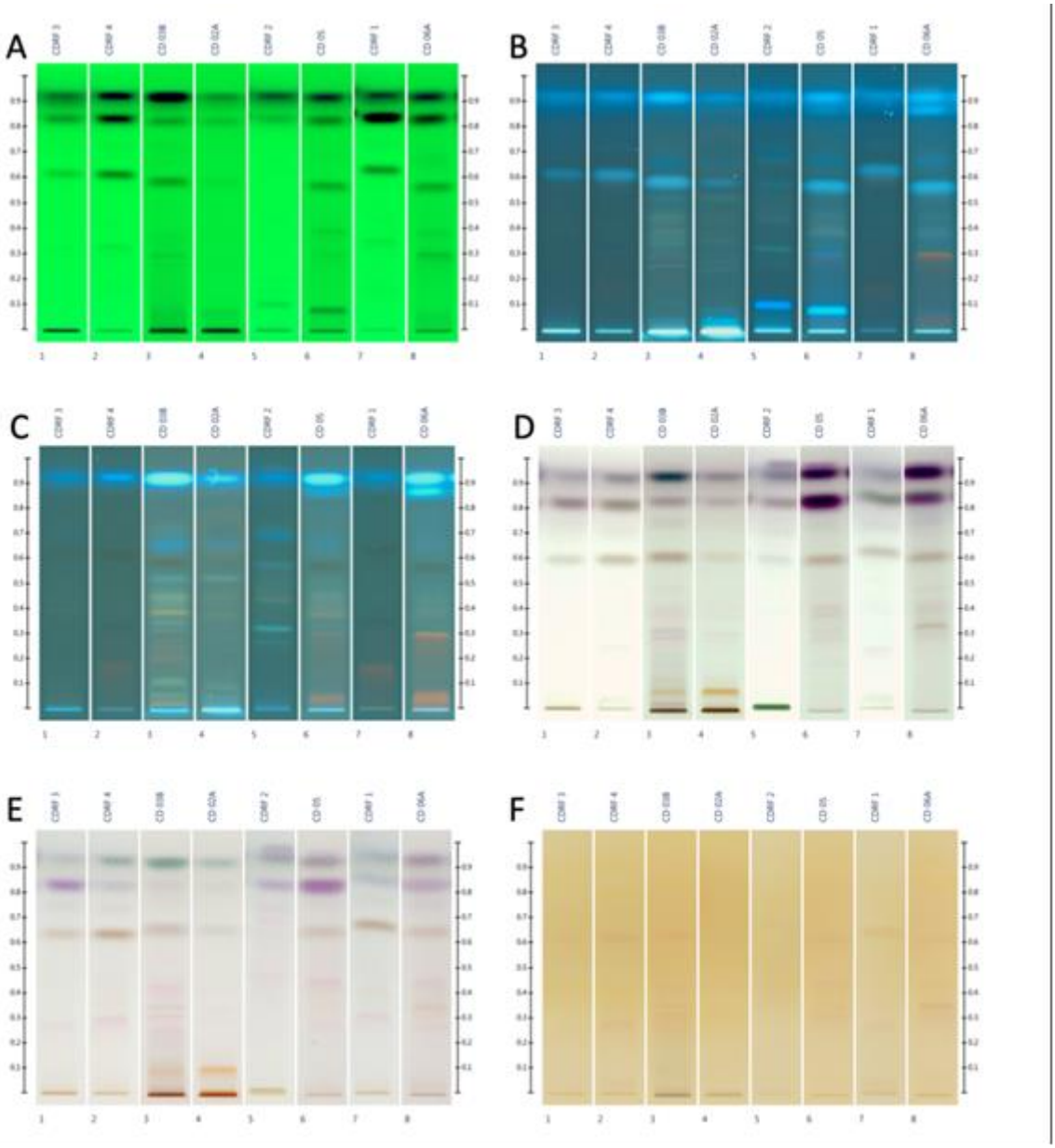

Figura 6. Cromatogramas por HPTLC de extractos de muestras de flores de *C. valerioi* (Standl.), resinas y propóleos de la Región Sur de Costa Rica (parte 1 de 2). A) exposición a luz ultravioleta a 254 nm, B) exposición a luz ultravioleta a 366 nm, C) derivatización con el reactivo de productos naturales (exposición a 366 nm), D) derivatización con el reactivo de anisaldehído (exposición a luz visible), E) derivatización con el reactivo de vainillina (exposición a luz visible), F) derivatización con el reactivo de Dragendorff (exposición a luz visible).

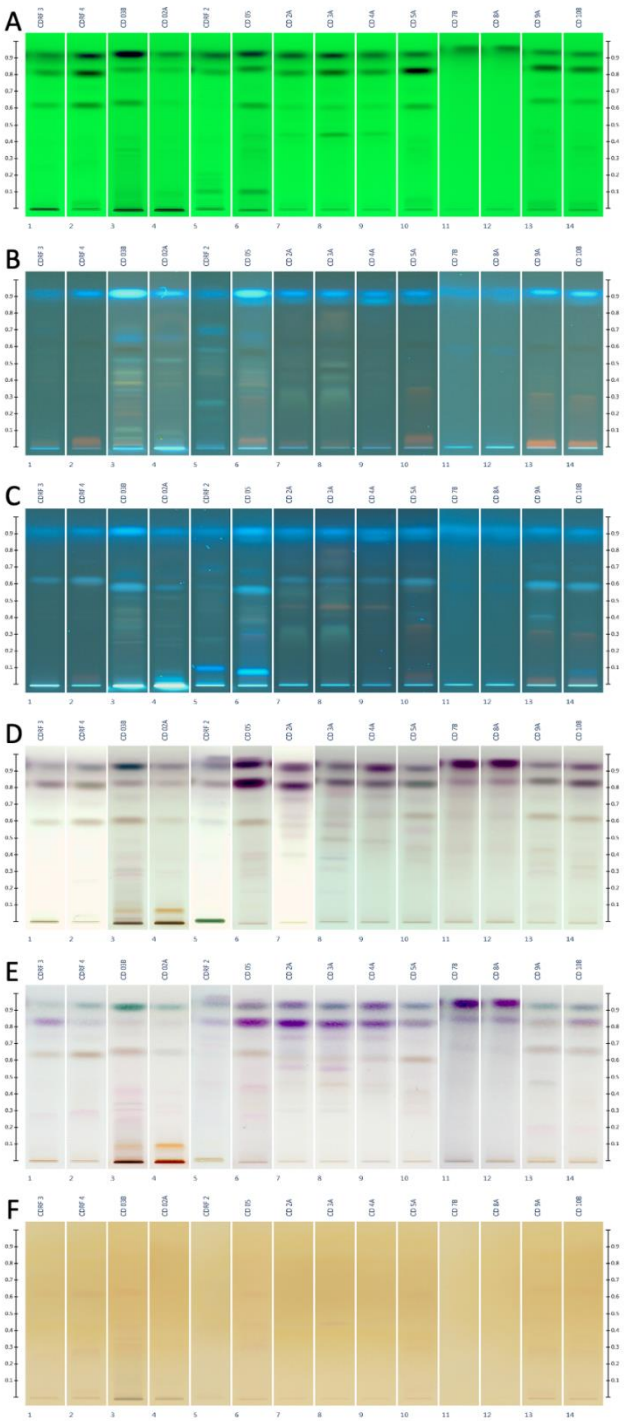

Figura 7. Cromatogramas por HPTLC de extractos de muestras de flores de *C. valerioi* (Standl.), resinas y propóleos de la Región Sur de Costa Rica (parte 2 de 2). A) exposición a luz ultravioleta a 254 nm, B) exposición a luz ultravioleta a 366 nm, C) derivatización con el reactivo de productos naturales (exposición a 366 nm), D) derivatización con el reactivo de anisaldehído (exposición a luz visible), E) derivatización con el reactivo de vainillina (exposición a luz visible), F) derivatización con el reactivo de Dragendorff (exposición a luz visible).

El 100% de los extractos analizados no presentaron una reacción positiva con el reactivo de Dragendorff. Por lo tanto, se reporta ausencia de alcaloides en las muestras analizadas.

A partir de las derivatizaciones con el reactivo de productos naturales, se observan bandas de tonos amarillos, naranjas, rojos, azules y verdes en el ámbito comprendido entre los Rfs de 0,01 a 0,60 para el 77% de las muestras. Estos resultados nos indican la presencia de compuestos fenólicos en la mayoría de los extractos, en particular, de flavononas y flavonoles.

El 91% de las muestras presenta 3 bandas con relaciones frontales (Rfs) entre 0,61 a 1,00. La banda superior (Rf=0,93), se denominó compuesto A. Dicha banda fluoresce al exponerse a luz ultravioleta a 366 nm, presenta un tono azul cuando se derivatiza con el reactivo de productos naturales, mientras que con el reactivo de anisaldehído adquiere una tonalidad púrpura muy oscura y acorde con la derivatización con el reactivo de Dragendorff no es un alcaloide. Con este patrón en su chemical fingerprint, dicho compuesto podría ser un derivado de terpenos. Sin embargo, en algunas cromatografías, se observan 2 bandas azules intensas muy unidas al exponerse a luz ultravioleta a 366 nm y los resultados de las derivatizaciones con vainillina indican en algunas bandas tonos verdes y en otras pruebas se observan tonos púrpuras (Figuras 6 y 7). Dicho resultado, supone la presencia de dos compuestos con Rfs muy similares bajo las condiciones cromatográficas en que se realizó el ensayo. Por tanto, para un análisis a mayor profundidad del compuesto A, se requiere *a priori* procurar una apropiada separación de sus constituyentes.

La banda del medio (Rf=0,83) se denominó compuesto B. Dicha banda, absorbe a 254 nm, no es visible al exponerse a 366 nm y no reacciona con el reactivo de productos naturales. Al derivatizarse el compuesto B con los reactivos de anisaldehído y vainillina expresa tonos púrpuras. Dicho compuesto, similar al compuesto A, podría ser un derivado de terpenos.

La banda inferior (Rf=0,63), se denominó compuesto C. Esta banda, absorbe cuando se expone a luz ultravioleta a 254 nm, no es visible al exponerse a la luz ultravioleta a 366 nm, reacciona con el reactivo de productos naturales dando un color azul intenso y presenta tonos naranjas al derivatizarse con los reactivos de anisaldehído y vainillina. El compuesto C, acorde a su chemical fingerprint, podría ser un compuesto fenólico, en particular, un favonol o flavonona.

En la Figura 8, se observan los chemical fingerprints de los compuestos A, B y C mencionados.

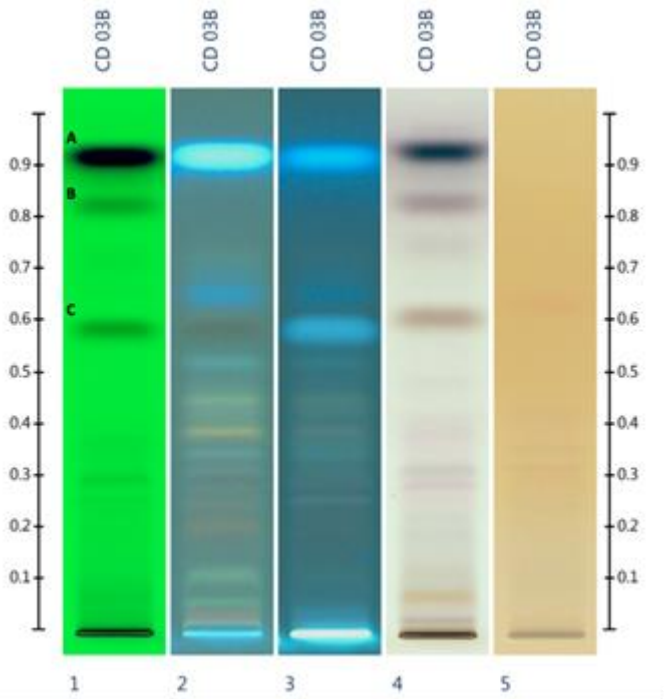

Figura 8. Chemical fingerprint para la muestra CD 03B de extracto de flores de *C. valerioi* (Standl.). En la figura se denotan los resultados de distintas exposiciones a luz ultravioleta y derivatizaciones sobre los compuestos A (Rf 0,93), B (Rf 0,83) y C (Rf 0,63). 1) exposición a luz ultravioleta a 254 nm, 2) exposición a luz ultravioleta a 366 nm, 3) derivatización con el reactivo de productos naturales (exposición a 366 nm), 4) derivatización con el reactivo de anisaldehído (exposición a luz visible), 5) derivatización con el reactivo de Dragendorff (exposición a luz visible).

A continuación, a partir de la muestra CD03B, se procedió a determinar los espectros de absorción de los compuestos B (Rf 0,83) y C (Rf 0,63) mediante ensayos densitométricos. El compuesto B presentó un pico de máxima absorción a los 307 nm y el compuesto C presentó un pico de máxima absorción a los 206 nm (Figuras 9 y 10).

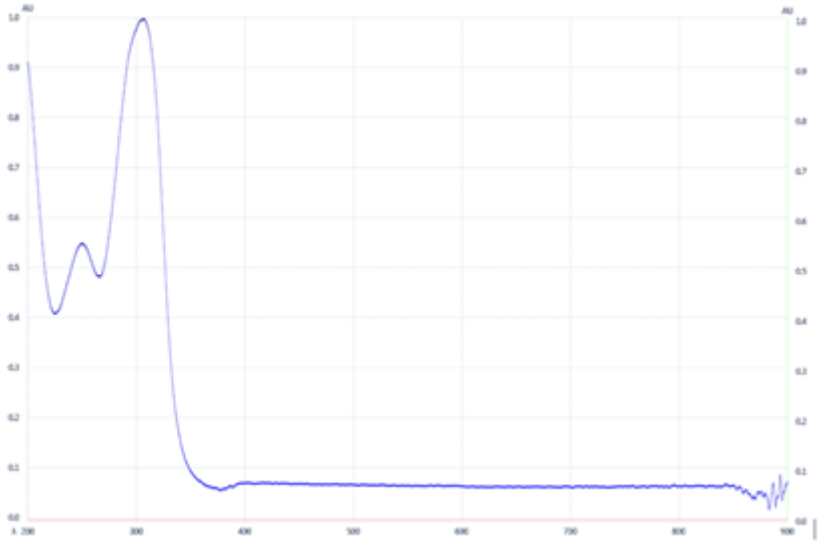

Figura 9. Espectro de absorción desde 200 nm a 900 nm del compuesto B.

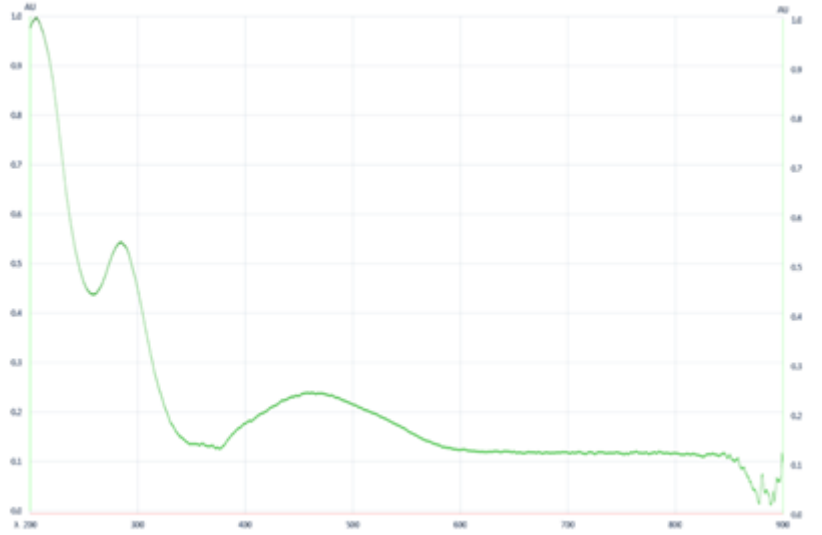

Figura 10. Espectro de absorción desde 200 nm a 900 nm del compuesto C.

Seguidamente, se realizaron densitometrías a 206 nm y 307 nm. Los resultados se sometieron a ensayos de integración para los picos de absorbancia correspondientes a los compuestos A, B y C. Así, se optimizó la visualización de los constituyentes y se logró una apropiada evaluación de presencia o ausencia de los compuestos de interés. Los resultados se presentan en las Figuras 11 y 12.

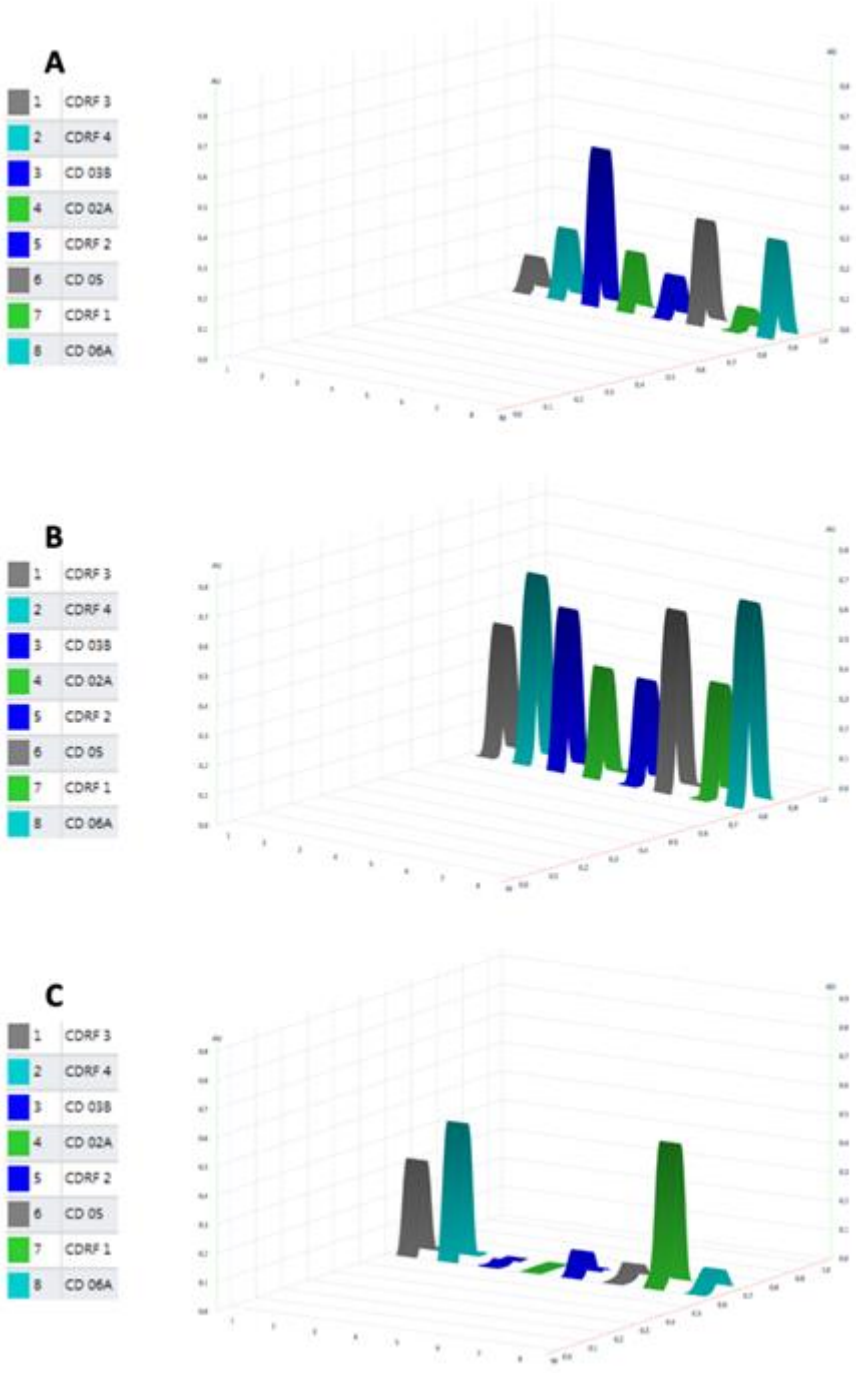

Figura 11. Análisis densitométricos a partir de cromatogramas HPTLC de extractos de muestras de flores de *C. valerioi* (Standl.), resinas y propóleos de la región sur de Costa Rica (parte 1 de 2). Se integraron los picos de absorción pertenecientes a los compuestos A, B y C a fin de evaluar su presencia en las muestras. A) Densitometría a 307 nm para la evaluación de la presencia de compuesto A. B) Densitometría a 307 nm para la evaluación de la presencia de compuesto B. C) Densitometría a 206 nm para la evaluación de la presencia del compuesto C.

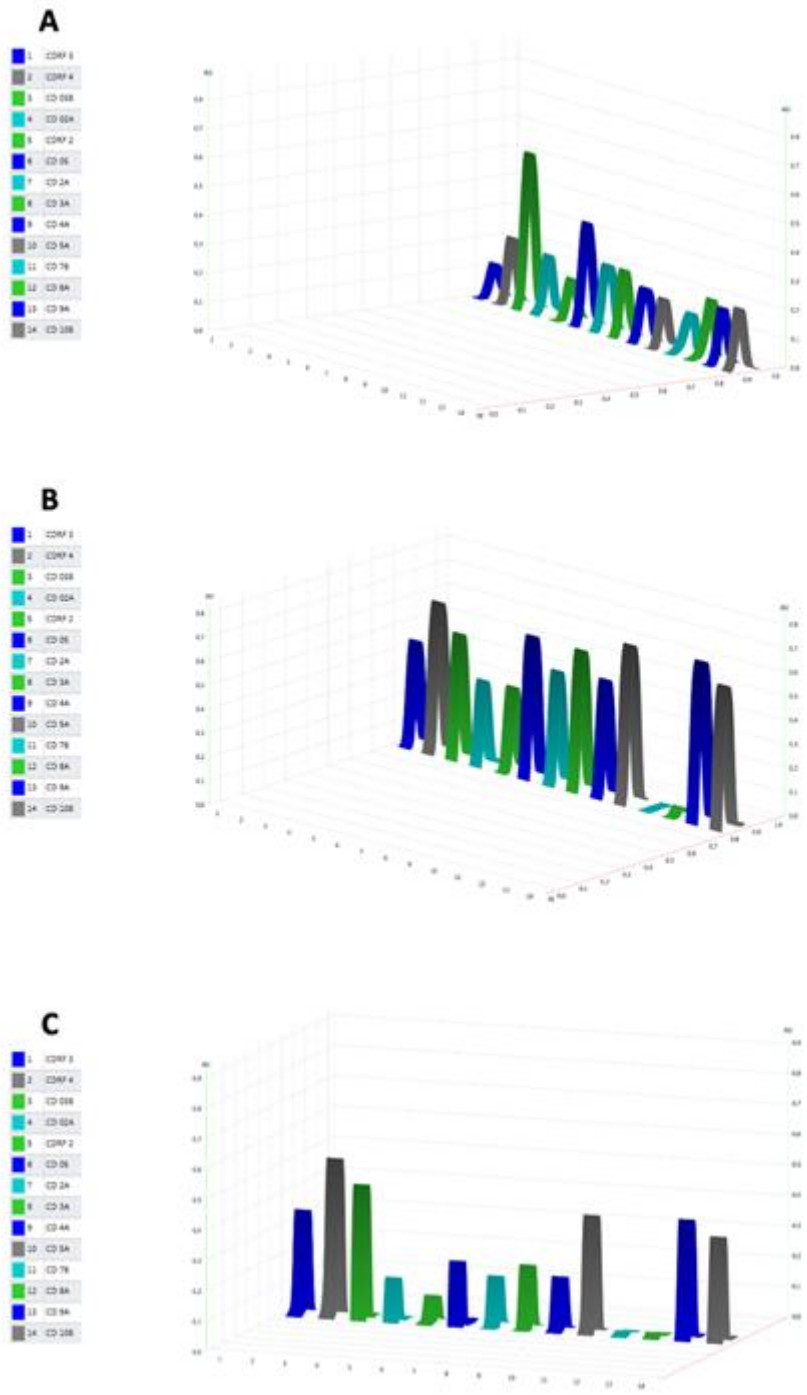

Figura 12. Análisis densitométricos a partir de cromatogramas HPTLC de extractos de muestras de flores de *C. valerioi* (Standl.), resinas y propóleos de la región sur de Costa Rica (parte 2 de 2). Se integraron los picos de absorción pertenecientes a los compuestos A, B y C a fin de evaluar su presencia en las muestras. A) Densitometría a 307 nm para la evaluación de la presencia de compuesto A. B) Densitometría a 307 nm para la evaluación de la presencia de compuesto B. C) Densitometría a 206 nm para la evaluación de la presencia del compuesto C.

Por otra parte, todas las muestras analizadas presentaron un pico de absorbancia para el compuesto A. Los picos de absorbancia para los compuestos B y C estaban presentes en

todas las muestras salvo dos excepciones. Una muestra de propóleos de Puerto Jiménez, Golfito (CD7B) no contiene el compuesto B y un extracto de flores procedente de Limoncito, Coto Brus (CD02A) no contiene el compuesto C.

Se determinaron los espectros de absorción (desde los 200 nm hasta los 900 nm) sobre las bandas de los cromatogramas con Rfs similares a los compuesto B y C. A partir de estos resultados, se prepararon análisis de correlación para los espectros de absorción. Los ensayos reportaron coeficientes de correlación de 0,995055 y 0,987449 para las bandas de los compuestos B y C respectivamente, lo cual, implica (con una alta probabilidad) que ambos compuestos están presentes en todas las muestras; salvo las excepciones citadas anteriormente.

En términos generales, los constituyentes denominados compuestos A, B y C se encuentran presentes en las flores de *C. valerioi* (Standl.), en las resinas que transportaban abejas en sus corbículas, y dentro de la colmena, en el cúmulo de resinas sin procesar y en los propóleos ya procesados.

Elucidación estructural del compuesto B

La sustancia denominada compuesto B fue identificado como nemorosona. Su estructura molecular fue determinada por comparación y consistencia de los datos obtenidos de los experimentos de ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN e IR con los reportados en la literatura (17, 18, 30, 31). Los detalles de la elucidación estructural se presentan en las Figuras 13 a 16 y en los Cuadros 1 a 3.

Numeración de carbonos en Cuesta-Rubio et al (2001), Umaña et al (2023) y Uwamori et al (2012)	Numeración de carbonos en Umaña (2013)
1	P
2	D
3	O
4	C
5	Q
6	T
7	S
8	R
9	A
10	B
11	E
12, 16	J
13, 15	K
14	H
17	Z
18	L
19	I
20	B2
21	Y
22	U
23	N
24	F
25	D2
26	W
27	V
28	M
29	G
30	C2
31	X
32	A2
33	E2

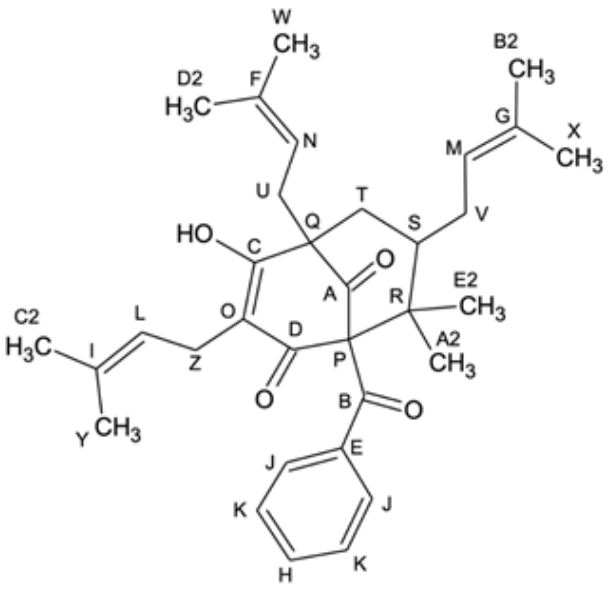

Figura 13. Equivalencia en las numeraciones empleadas para los carbonos en la literatura consultada.

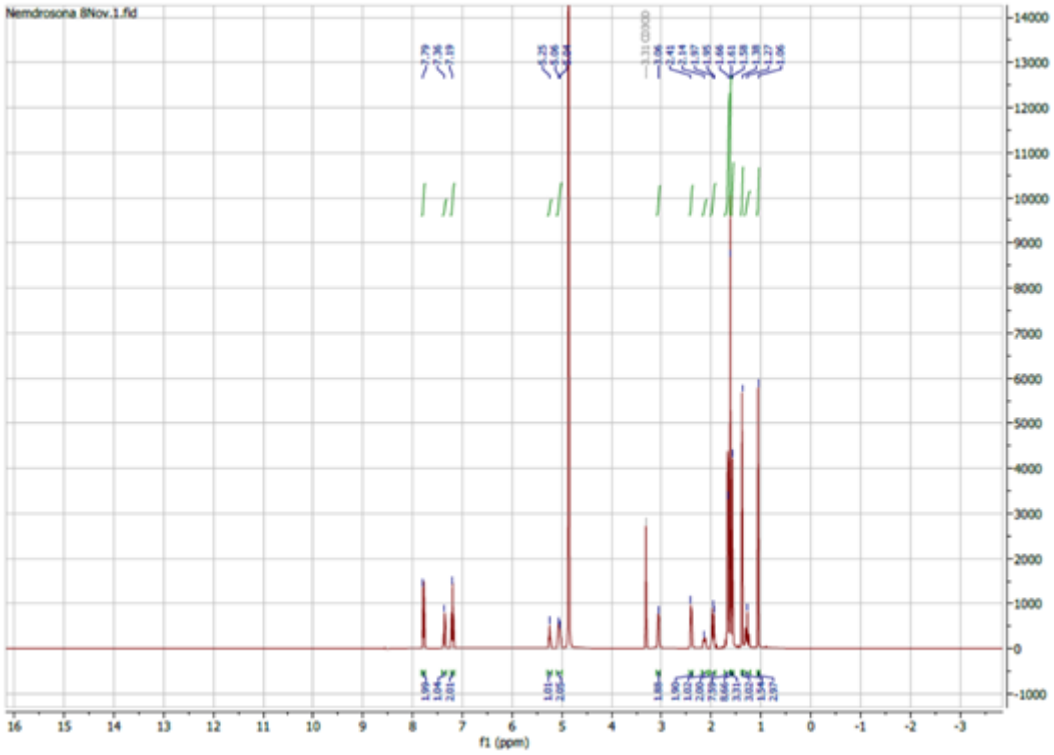

Figura 14. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica (^{1}H-RMN) en CD_3OD (referencia 3.31 ppm) medido a 400.13 MHz.

Tabla 1.

Comparación de los datos de ^{1}H-RMN de la nemorosona aislada del extracto de los propóleos CD5A con los datos reportados en la literatura.

Hidrógeno	**Nemorosona aislada del extracto CD5A CD_3OD/ppm (integración), (multiplicidad, constante de acoplamiento)**	**Umaña (2013) (17), Umaña *et al*. (2023) (18) /CD_3OD/ppm (integración), (multiplicidad, constante de acoplamiento)**	**Cuesta-Rubio (2001) (30) $CDCl_3$/-55°C/ Taut a/Taut b/ppm (integración)[2], (multiplicidad, constante de acoplamiento)**	**Nemorosona sintética (Uwamori *et al*., 2012) (31) /CD_3OD/ppm(integración), (multiplicidad, constante de acoplamiento)**
6 a (T1)	1.97 (1), (m)	1.96 (1), (m)	2.09 /1.97 (1), (dd, J = 13.5, 4 Hz)	2.02 (1), (dd, J =13.0, 3.5 Hz)
6 b (T2)	1.27 (1), (m)	1.27 (1), (m)	1.47/1.42 (1), (t, J = 13.3)	1.43 (1), (t, J = 13.0 Hz)
7 (S)	1.95 (1), (m)	1.96 (1), (m)	1.68/1.70 (1), traslapado	1.79-1.71, (m)
12,16 (J)	7.78 (2), (dd, J = 8.6, 1.2 Hz)	7.78 (2), (dbr, J = 8.6 Hz)	7.53/7.67 (2), (dd, J = 7.5, 1 Hz)	7.56 (2), (d, J = 7.5 Hz)
13,15 (K)	7.20 (2), (tbr, J = 8.0 Hz)	7.20 (2), (dd, J = 8.4, 7.8 Hz)	7.31/7.35 (2), (t, J = 7.5 Hz)	7.26 (2), (t, J = 7.5 Hz)
14 (H)	7.36 (1), (tt, J = 7.4, 1.2 Hz)	7.36 (1), (tbr, J = 7.8 Hz)	7.47/7.51 (1), (t, J = 7.5 Hz)	7.43 (1), (t, J = 7.5 Hz)
17 (Z)	3.06 (2), (m)	3.06 (2), (dbr, J = 6.5 Hz)	3.14/3.20 (1), (dd, J = 16, 7) / (dd, J = 16.5, 7); 3.20/3.28 (1), (dd, J = 16, 7) / (dd, J = 16.5, 7)	3.13 (1), (dd, J = 15.0, 7.5 Hz); 3.08 (1), (dd, J = 15.0, 7.5 Hz)
18 (L)	5.25 (1), (tq, J = 7.2, 1.3 Hz)	5.24 (1), (tq, J = 7.0, 1.4 Hz)	4.89/5.23 (1), (m)	5.09 (1), (t, J = 7.5 Hz)

20 (B2)	1.62 (3), (s)	1.62 (3), (s)	1.56-1.76/1.56-1.76 (3), (s)	1.65 (3), (s)
21 (Y)	1.66 (3), (s)	1.66 (3), (s)	1.66-1.8/1.66-1.8 (3), (s)	1.66 (3), (s)
22 (U)	2.41 (2), (m)	2.40 (2), (dd, J = 6.6, 1.7 Hz)	2.47/2.47(1), (dd, J = 15, 7.5) / (dd, J =14, 7); 2.65/2.56 (1), (dd, J = 15, 7.5) / (dd, J = 14,7)	2.53 (1), (dd, J = 14.5, 6.5 Hz); 2.48 (1) (dd, J = 14.5, 6.5 Hz)
23 (N)	5.07 (1), (m)	5.06 (1), (m)	5.11/5.13 (1), (m)	5.01 (1), (sbr)
25 (D2)	1.58 (3), (s)	1.57 (3), (s)	1.56-1.76/1.56-1.76 (3), (s)	1.59 (3), (s)
26 (W)	1.62 (3), (s)	1.62 (3), (s)	1.66-1.8/1.66-1.8 (3), (s)	1.65 (3), (s)
27 a (V1)	2.14 (1), (m)	2.14 (1), (m)	2.16/2.11 (1), (dd, J = 13, 4) / (dd, J = 13.5, 4)	2.19-2.10, (m)
27 b (V2)	1.66-1.67 (1), (m)	1.66-1.67 (1), (m)	1.80/1.71 (1) (traslapados)	1.79-1.71, (m)
28 (M)	5.04 (1), (m)	5.04 (1), (m)	4.94/4.98 (1)	5.01 (1), (sbr)
30 (C2)	1.62 (3), (s)	1.62 (3), (s)	1.56-1.76/1.56-1.76 (3), (s)	1.65 (3), (s)
31 (X)	1.67 (3), (s)	1.67 (3), (s)	1.66-1.8/1.66-1.8 (3), (s)	1.69 (3), (s)
32 (A2)	1.38 (3), (s)	1.38 (3), (s)	1.35/1.40 (3), (s)	1.34 (3), (s)
33 (E2)	1.06 (3), (s)	1.06 (3), (s)	1.13/1.17 (3), (s)	1.11 (3), (s)

Simbología: s=singulete, d=doblete, t=triplete, q=cuarteto, dd=doblete de doblete, tt=triplete de tripletes, m=multiplete, br=ancho

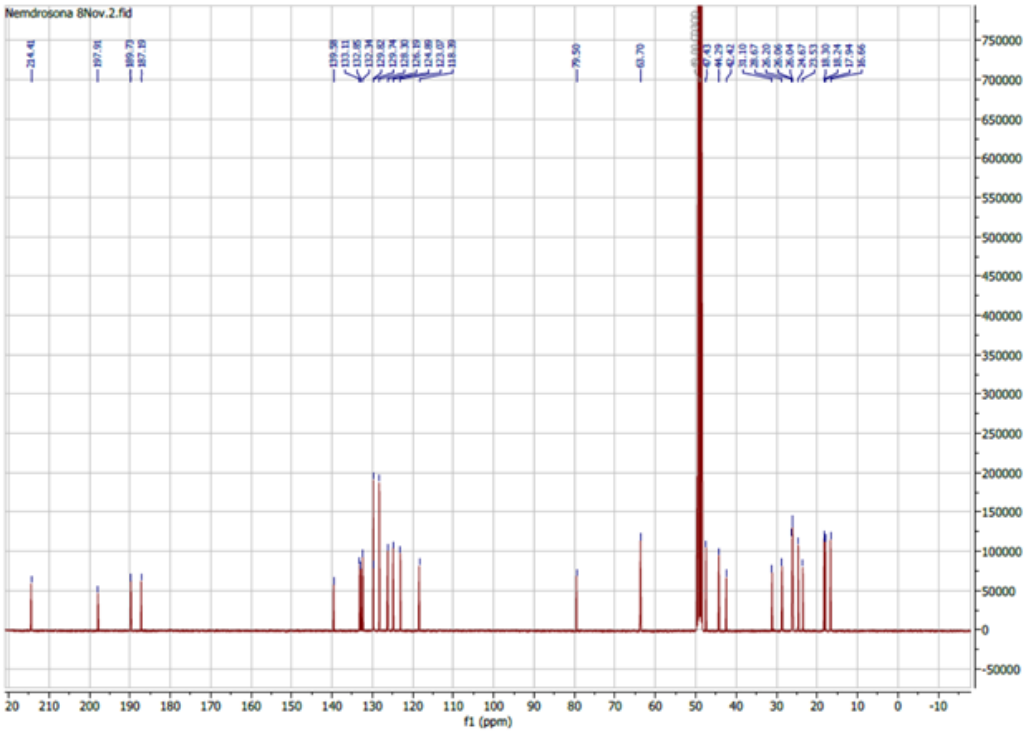

Figura 15. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C-RMN) en CD_3OD (referencia 49.00 ppm) medido a 100.62 MHZ.

Tabla 2.

Comparación de los datos de ^{13}C-RMN de la nemorosona aislada del extracto de los propóleos CD5A con datos reportados en la literatura.

Carbono	**Nemorosona aislada del extracto CD5A CD_3OD/ppm**	**Umaña (2013) (17), Umaña *et al*. (2023)(18)/ CD_3OD/ppm**	**Cuesta-Rubio *et al*. (2001) (30) $CDCl_3$/-55°C/ Taut a/Taut b/ppm[3]**	**Nemorosona sintética (Uwamori *et al*., 2012) (31) /CD_3OD**
1 (P)	79.5	79.5	78.0/71.4	78.3
2 (D)	187.2	187.2	192.2/168.2	No reportado por tautomerismo
3 (O)	118.4	118.4	117.6/117.2	121.07
4 (C)	189.7	189.7	170.9/195.0	No reportado por tautomerismo
5 (Q)	63.7	63.7	57.1/64.8	62.1
6 (T)	42.4	42.4	39.4/42.1	42.4
7 (S)	44.3	44.3	42.9/42.1	44.7
8 (R)	47.4	47.4	48.2/47.3	49.1
9 (A)	214.4	214.4	207.3/207.6	209.7
10 (B)	197.9	197.9	193.2/193.1	195.2
11 (E)	139.6	139.5	136.6/135.9	138.4
12,16 (J)	129.7	129.7	128.1/128.0	129.7
13,15 (K)	128.3	128.3	127.9/127.9	128.9
14 (H)	132.3	132.4	132.4/132.6	133.5
17 (Z)	24.7	23.5	21.6/21.7	24.5
18 (L)	126.2	126.2	119.6/119.1	124.2
19 (I)	129.8	129.8	138.2/139.5	133.2
20 (B2)	18.3	18.3	17.9/17.9	18.4
21 (Y)	26.0	26.0	25.9/25.9	26.15
22 (U)	31.1	31.1	28.9/29.2	30.6
23 (N)	123.1	123.0	118.4/119.3	121.1
24 (F)	133.1 o 132.8	133.1 o 132.9	135.2/134.7	135.2
25 (D2)	18.2	18.2	18.0/18.0	18.3
26 (W)	26.2	26.2	26.0/26.0	26.4
27 (V)	28.7	28.7	26.4/27.3	28.3
28 (M)	124.9	124.9	122.1/122.1	122.5
29 (G)	133.1 o 132.8	133.1 o 132.9	133.6/133.6	134.3
30 (C2)	17.9	18.3	18.2/18.2	18.1
31 (X)	26.1	26.2	26.3/26.3	26.17
32 (A2)	23.5	23.5	23.2/24.1	23.9
33 (E2)	16.7	16.7	15.6/15.6	16.4

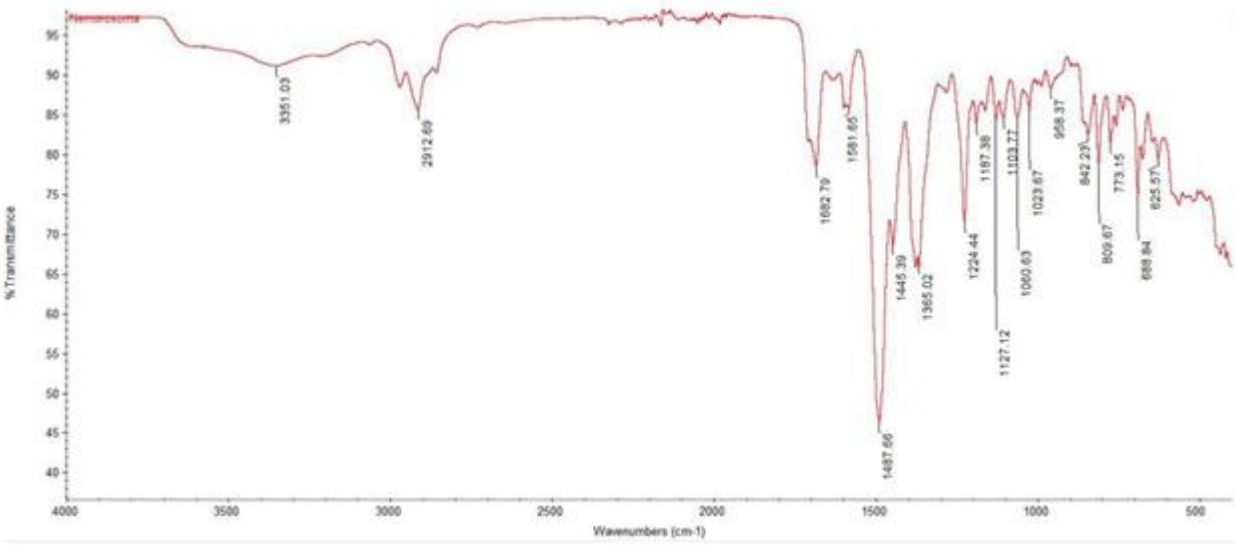

Figura 16. Espectro infrarrojo (ATR) de la nemorosona.

Tabla 3.

Comparación de los espectros infrarrojos de la nemorosona aislada del extracto CD5A con datos de literatura.

Señal (asignación)	**Nemorosona aislada del extracto CD5A/cm^{-1}**	**Cuesta-Rubio *et al*. 2001 (30)/cm^{-1}**	**Uwamori *et al*. (2001) (31)/cm^{-1}**
1 (O-H)	3351	3431	3297
2 (C-H)	2913	2969	2923
3 (C=O	1713	1708	1723
4 (C=O)	1683	NR	1699
5 (C=C)	1582	1590	1581
6 (C=C)	1445	NR	1446
7 (C-O-H)	1365	NR	1372
8 (C-O-H)	1224	NR	1220
9 (C-O-H)	1187	NR	1186

Simbología: NR=No reportada

Finalmente, la optimización de los procesos de purificación y posterior elucidación estructural de los compuestos A y C serán sujeto de próximas investigaciones.

DISCUSIÓN

El trabajo conjunto de muestreo e identificación botánica de la planta recolectada en las diferentes giras, realizado por el Lic. Luis Jorge Poveda y el M.Sc. Luis Sánchez Chaves, genera total certeza que el espécimen muestreado en las cercanías de los apiarios corresponde a la planta *C. valerioi* (Standl.). Lo anterior coincide con lo reportado por Horchwallner (20), quienes indicaron que esta especie es frecuente en la Región Sur del país.

Aunado a esto, las observaciones de campo realizadas por apicultores de la Región Sur de Costa Rica (34), corroboradas por el botánico Luis J. Poveda y confirmadas por nosotros mismos durante las visitas de muestreo, sobre la alta tasa de visitación que realizan las abejas *Apis mellifera* a la flor de *C. valerioi* (Standl.) para la recolección de las resinas de las mismas, quedan validadas con los resultados del estudio de las resinas transportadas por las abejas y de las cargas colectadas de los marcos al mostrar una carga dominante del 93% correspondiente a la Clusiaceae (Figura 5). Adicionalmente, Hochwallner *et al*. (20) reportaron que la especie *Apis mellifera* era frecuentemente observada colectando resinas, tanto en las flores masculinas como femeninas de *C. valerioi* (Standl.). Lo anterior confirma que el polen y las resinas de esta planta sí son transportados efectivamente hacia los apiarios, generando la posibilidad que estas puedan utilizarse en la producción de subproductos apícolas, circunstancia que será valorada posteriormente.

La forma directa de confirmar si el material extraído por las abejas (polen y resina) a partir de la flor de *C. valerioi* (Standl.) es incorporado en subproductos apícolas del apiario, específicamente los propóleos, es hallando la presencia de compuestos químicos comunes en ambos tipos de matrices, denominados marcadores químicos, situación que se concluye con los resultados de las Figuras 6 y 7.

En este punto se destaca que los resultados cromatográficos de los análisis por HPTLC realizados a los extractos de los corpúsculos de las flores de *C. valerioi* (Standl.), a los extractos de las resinas extraídas en las corbículas de las abejas, de los cúmulos de resinas sin procesar en las colmenas y los propóleos de los apiarios, en términos generales descarta la presencia de compuestos tipo alcaloides en todas matrices, además que confirma la presencia no muy estandarizada de compuestos fenólicos tipo flavononas y flavonoles, con Rf bajos e intermedios (menores a 0,60) en gran parte de las muestras (77%). No obstante, también se aprecia que a valores mayores de Rf (superiores a 0,60), una gran mayoría de las muestras (91%) presentan tres bandas comunes que pueden ser referenciadas como trazadores químicos que relacionan la composición química de la resina de las flores de *C. valerioi* (Standl.), de la resina colectada por la abeja en la flor y transportada hacia la colmena y de los propóleos que incorpora a esta a lo interno del apiario (Figura 9 a Figura 12).

Estos tres trazadores químicos fueron denominados **Compuesto A**, **Compuesto B** y **Compuesto C**. Respecto al **Compuesto A** (Rf=0,93), este revela con los reactivos derivatizantes como un derivado de terpeno, que bajo diferentes condiciones cromatográficas aparenta estar compuesto por una mezcla de dos productos (posiblemente isómeros o tautómeros), que requerirán de mayor cantidad de trabajo para su resolución cromatográfica y su completa elucidación estructural. El **Compuesto B** (Rf=0,83) se identificó como la benzofenona poliprenilada llamada nemorosona, producto de su comportamiento ante la derivatización química y la comparación de su respuesta espectroscópica de resonancia

magnética nuclear protónica (Figuras 13 y 14, Tabla 1) y de carbono-13 (Figura 13 y 15, Tabla 2), e infrarroja (Figura 16, Tabla 3). Finalmente, el **Compuesto C** (Rf=0,63), por su comportamiento químico ante reactivos derivatizantes, se puede relacionar con un derivado fenólico tipo flavonol o flavonona.

Cabe mencionar que investigaciones previas han mostrado que otras especies de *Clusia* son fuentes de resinas para que las abejas *Apis mellifera* produzcan sus propóleos, tal es el caso de *C. major* (*C. rosea*), *C. minor* y *C. scrobiculata* en Venezuela y de *C. major* (*C. rosea*) en Cuba, destacándose por su composición rica en benzofenonas polipreniladas como nemorosona y scrobiculactonas A y B (36, 37).

En nuestro caso, la presente investigación constituye el primer reporte de *C. valeroi* (Standl.) como fuente primaria de resinas para propóleos de *Apis mellifera* en Costa Rica, encontrándose 3 marcadores químicos, presentes todos simultáneamente en el 94 % de las muestras de propóleos, colectadas de apiarios con y sin evidencia de la presencia de *C. valeroi* (Standl.) en sus alrededores.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados registrados para el sector o ecosistema apícola estudiado, geográficamente delimitado dentro de la Región Sur de Costa Rica, específicamente en la región de Coto Brus y alrededores, se concluye que la identificación botánica positiva de la *C. valerioi* (Standl.) la posiciona como especie importante, de cuya flor procede la resina que es colectada, transportada, depositada y procesada por las abejas, y cuya composición química determina también la composición química del subproducto denominado propóleos.

Lo anterior se sustenta en resultados obtenidos por HPTLC, que demuestran la existencia de al menos tres marcadores químicos de relevancia, denominados en este estudio como Compuesto A, Compuesto B y Compuesto C.

A partir de los resultados de pruebas de derivatización, se determinó que la naturaleza química del Compuesto A es la de un derivado de terpeno presente como una posible mezcla de isómeros o tautómeros, al igual que la naturaleza terpénica del Compuesto B, mientras que el Compuesto C se relaciona con un derivado fenólico del tipo flavonol o flavonona.

El análisis espectroscópico del Compuesto B permitió determinar que su estructura química corresponde a la de la nemorosona. Por otra parte, se recomienda para el marco del proyecto de investigación macro, el estudio espectroscópico de los compuestos C y A, una vez lograda la resolución de la mezcla isomérica o tautomérica de este último, para una identificación estructural más detallada de ambos marcadores.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional, por el financiamiento del proyecto del Fondo Institucional de Desarrollo Académico (FIDA) 0571-19, bajo cuyo auspicio se realizó este trabajo de investigación. Se extiende el agradecimiento al señor Guillermo Ramírez Arias, técnico del CINAT, por su apoyo durante la realización del mismo.

REFERENCIAS

1) Chaillou, L. L., Herrera, H. A., Maidana, J. F. (2004). Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24(1), 11–15. https://doi.org/10.1590/s0101-20612004000100003

2) Fernández, M. (2008). Estudio químico de propóleos rojos cubanos. 5–21. http://tesis.repo.sld.cu/219/

3) Salas, R. (2005). Manual Técnico de Apicultura. Dicta. Sac., 1–32. https://www.mieldemalaga.com/data/manual_apicultura.hon.pdf

4) Vargas D, Torres G, Sánchez A. (2018). El Propóleo: Conservador potencial para la industria alimentaria. Interciencia, 38(10), 705–713. https://www.redalyc.org/pdf/339/33929482003.pdf

5) Rossana, Lady, García, P., Paúl, J., Galán, M., Mario, C., Pajón, G. (2010). Caracterización Fisicoquímica y Actividad antimicrobiana de propóleos en el Municipio de la Unión. 63(1), 5373–5383. http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n1/a13v63n01.pdf

6) Tolosa, L., Cañizares, E. P. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche, México. Ars Pharmaceutica, 43, 1–2. https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5681/13176

7) Fernández-León, K. J., Rodríguez-Díaz, J. A., Reyes-Espinosa, L., Duquesne-Alderete, A., Solenzal-Valdivia, Y. O., Rives-Quintero, A., Hernández-García, J. E. (2022). Comparison of *in vitro* anti- *Staphylococcus aureus* activity of eight antibiotics and four dilutions of propolis. Journal of the Selva Andina Research Society, 13(1), 35–48. https://doi.org/10.36610/j.jsars.2022.130100035

8) Herbert, L. A. (2021). METABOLITOS BIOACTIVOS DE *Clusia* spp. Tesis doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1972/1/PCB_D_Tesis_2021_Luis_Alfredo_Herbert_Doctor.pdf

9) Hochwallner, H., Weber, A. (2006). Flower development and anatomy of *Clusia valerioi*, a Central American species of Clusiaceae offering floral resin. Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 201(5), 407–418. https://doi.org/10.1016/j.flora.2005.07.017

10) Meranti, D. I. K. (2015). EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REGULADORA DE EXTRACTOS DE *CLUSIA ELLIPTICIFOLIA* EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS CON LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS). II, 1–15. https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/17916/GarzonCaicedoDannyAlexander2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y

11) Herrera, M. (2019). Caracterización química y actividad biológica de propóleos producidos en el estado de Yucatán. 25–135. https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1565/1/PCB_D_Tesis_2019_Guadalupe_Herrera_Lopez.pdf

12) Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Matheeussen, A., Van Assche, T., Maes, L., Cos, P. (2011). Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A. Phytotherapy Research, 25(3), 458–462. https://doi.org/10.1002/ptr.3401

13) Ley López, J. M. (2013). Los árboles de la Península de Osa sector Piro Una guía para su identificación. Osa Conservation, 19–26. https://www.fonafifo.go.cr/media/2985/guia-arboles.pdf

14) Zwicky, F. (1937). *Clusia valerioi* Standl., Fl. of Costa Rica. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki, 5(1), 21–34. http://mobile.kwansei.ac.jp/s_hws/attached/0000052629.pdf%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0

15) Novais, C. S. (2016). Estudo fitoquímico de espécies de *Clusia* presentes no cerrado com potencial atividade biológica. 179. https://repositorio.bc.ufg.br/tedeserver/api/core/bitstreams/8959a116-d00c-4a27-9664-745ce2285fcc/content

16) Hernández, J. E., Reyna, L. F., Ortiz, E., Salomón, M. C., Treviño, R. (2014). ESPECTROSCOPIA INFRARROJA: : Acetofenona, Ácido Benzoico, Benzofenona, Ácido Acetilsalicílico y Anhidrido Ftálico. Academia Journals, 2, 1–12. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48428114/IR_javier-libre.pdf?1472537127=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DESPECTROSCOPIA_INFRARROJA_Acetofenona_Ac.pdf&Expires=1705510823&Signature=HxSq8jG0mIjoXP4VpdoEoYEk9WYDtQislCqCCLYsO-SNwtjGZTbGqlYUUb-ZZhzv0VZtC7Ap6XssQltE6SUGGYUKjT3CAhAgTLtAeWmlhiBNzBxILuN1i2Cazkf0Jpm2~RqMK4oHpmIcsAM3qL873TI56e8qcUnMreSZdAQSCvYFfHnGE1h~8rxYLPiHVQel3G~nhYTJEPgC0GKpztNE1sqo7lK8CfzLG2piCB7cTmK5dmOH1RnXzv6mpIEHptlnpvUaddDSL2drOYNZq-KS8XgXM-kkTHYG6~z1q~C6lWJnaDOv7YZYn6lBHKO2MXQllsChDshF9DN-J7K80GhVPQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

17) Umaña, E. (2013). Análisis multivariado de huellas digitales de metabolitos secundarios mayoritarios de propóleos de Costa Rica empleando Resonancia Magnética Nuclear protónica (^{1}H-RMN). Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. https://doi.org/10.3390/molecules28207081

18) Umaña, E., Solano, G., Zamora, G., Tamayo-Castillo, G. (2023). Costa Rican Propolis Chemical Compositions: Nemorosone Found to Be Present in an Exclusive Geographical Zone. Molecules 28, 7081. https://doi.org/10.3390/molecules2820708.

19) Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. Comunicación personal. 2021.

20) Hochwallner, H., Vogel, S., Huber, W., Hammel, B. E., Weber, A. Aspects of reproductive ecology of *Clusia valerioi* Standl. and *Clusia peninsulae* Hammel (sp. nov.), two Central American species of Clusiaceae with resin flowers. 2012. Plant Biol. (Stuttg).14(1):198-207. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00471.x

21) Alencar, A., Dantas, E., Lischka, J. 2020. New perspectives on secretory structures in *Clusia* (Clusiaceae–Clusiod clade): production of latex or resins. Botany, 98, 3:137-183. https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0103

22) Poveda, L. J. Comunicación personal. 2022.

23) Erdtman, G. (1986). Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms: An introduction to the Study of Pollen Grains and Spores. Brill Academic Pub.

24) Burstein S. 1953. Reduction of Phosphomolybdic Acid by Compounds Possessing Conjugated Double bonds. Analytical Chemistry. Vol. 25. No.3. pp 422-424. https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v44.4.2019.p57-72

25) Conde, E., Cadahía, E., García-Vallejo, M. (1992). Optimization of TLC for Research on the Flavonoids in Wood and Bark of Species of the Genus Eucalyptus L'Héritier. Chromatographia, 33(9), pp.418-426. DOI: 10.1007/BF02262321

26) Foti, M., Daquino, C., Geraci, C. (2004). Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH•Radical in Alcoholic Solutions. The Journal of Organic Chemistry, 69(7), pp.2309-2314. https://doi.org/10.1021/jo035758q

27) Matteini, P., Agati, G., Pinelli, P., Goti, A. (2011). Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 142(9), pp.885-893. DOI:10.1007/s00706-011-0545-z

28) Spangenberg, B. (2008). Derivatization, Detection (Quantification), and Identification of Compounds Online. En: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma and T. Kowalska, ed., Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp.175-192. https://doi.org/10.1201/9781420046786

29) Wagner, H., Bladt, S. (1996). Plant drug analysis. 2nd ed. Berlin: Springer. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9

30) Cuesta-Rubio, O., Velez-Castro, H., Frontana-Uribe, B. A., Cardenas, J. (2001). Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. Phytochemistry 57, 279–283. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00510-0

31) Uwamori, M., Saito, A., Nakada, M. (2012). Stereoselective total synthesis of nemorosone. The Journal of Organic Chemistry 77, 5098-5107. https://doi.org/10.1021/j0300646j

32) Galería de fotos del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT), Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar (FCTM), Universidad Nacional (UNA), 2024.

33) Roubik, D., Moreno, J. (1991). Pollen and Spores of Barro Colorado Island. Monographs in Sistematic Botany. Vol. 36. Missouri Botanical Garden. DOI:10.2307/4110734

34) Bermúdez, Benjamín (apicultor de la zona). Comunicación personal. 2019.

35) Trusheva, B., Popova, M., Naydenski, H., Tsveykova, I., Rodríguez, J.G., Bankova, V. (2004). New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. Fitoterapia 75, 683-689. DOI: 10.1016/j.fitote.2004.08.001

36) Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B., Ramírez-Apan, T., Cárdenas, J. (2000). Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. Z. Naturforsch. 57c, 372-378. DOI: 10.1515/znc-2002-3-429