

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE PRÓPOLEOS A BASE DE NEMOROSONA: COMPOSICIÓN QUÍMICA
Y ESTABILIDAD

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Química para optar al grado y título de Maestría Académica en Química

Oscar Alberto Fernández Sánchez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi papá, que desde el cielo me apoyó, gracias

A mi mamá, gracias por ese amor y apoyo incondicional, gracias por empujarme a seguir adelante siempre, gracias infinitas, por tanto y por todo

A la profe Tamayo, gracias por inspirarme a trabajar fuerte, con excelencia en cada detalle y gracias por tanta paciencia

Al Inciensa, gracias por todo el apoyo a lo largo de este trabajo

A todos los de que una forma u otra me apoyaron, gracias infinitas

«Si quieres tener buenas ideas, tienes que tener muchas ideas. La mayoría de ellas serán erróneas, solo tienes que aprender cuáles desechar»

Linus Pauling

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado y título de Maestría Académica en Química”

Dra. Rosaura Romero Chacón
**Representante del Decano del
Sistema de Estudios de Posgrado**

Dra. Giselle Tamayo Castillo
Directora de tesis

M.Sc. Eduardo Umaña Rojas
Asesor

Dr. Max Chavarría Vargas
Asesor

Dr. Juan José Araya Barrantes
**Representante del
Director Programa de Posgrado en Química**

Oscar Alberto Fernández Sánchez
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	ii
HOJA DE APROBACIÓN	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
RESUMEN	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Referencias	11
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPITULO II. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CLAR-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE NEMOROSONA EN PROPÓLEOS DEL PACÍFICO SUR DE COSTA RICA	17
Resumen	17
2.1 Introducción.....	18
2.2 Materiales y Métodos	20
2.2.1 Recolección de propóleos y selección de sitios de muestreo	20
2.2.2 Preparación de extractos etanólicos	20
2.2.3 Análisis del contenido de Nemorosona por CLAR-DAD	20
2.2.4 Validación del método cromatográfico CLAR-DAD	21
2.2.5 Análisis estadísticos y cálculos computacionales	21
2.3 Resultados y Discusión	22

2.4 Conclusiones	33
2.5 Referencias	34
CAPITULO III. VALIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA NEMOROSONA	36
Resumen	36
3.1 Introducción.....	37
3.2 Materiales y métodos.....	39
3.2.1 Aislamiento y cristalización de la Nemorosona	39
3.2.2 Aislamiento de los productos Scrobiculactona A y Scrobiculactona B	39
3.2.3 Medición de espectros RMN	40
3.2.4 Cálculos computaciones	40
3.2.5 Medición de Rayos X de Monocristal	40
3.2.6 Determinación de rotación específica α	41
3.3 Resultados y discusión	42
3.3.1 Caracterización estructural de la nemorosona mediante RMN y medición de rotación específica	42
3.3.2 Caracterización estructural de la nemorosona mediante Rayos X monocristal ..	49
3.3.3 Estabilidad y posible ruta de descomposición de la nemorosona	52
3.4 Conclusiones	58
3.5 Referencias	59
CAPITULO IV. VISTA PRELIMINAR AL INTERIOR DE UN PROPÓLEO: HERRAMIENTA ^1H -DOSY	63
Resumen	63
4.1 Introducción.....	64
4.2 Materiales y métodos.....	66
4.2.1 Preparación de extractos.....	66
4.2.2 Nemorosona.....	66

4.2.3 Experimento ^1H -DOSY	67
4.3 Resultados y discusión	68
4.4 Conclusiones	73
4.5 Referencias	74
CAPITULO V. PERFIL QUÍMICO DE PROPÓLEOS COSTARRICENSES DEL QUIMIOTIPO D: NEMOROSONA	76
Resumen	76
5.1 Introducción.....	77
5.2 Materiales y métodos.....	79
5.2.1 Recolección de propóleos y selección de sitios de muestreo	79
5.2.2 Aislamiento de la Nemorosona	79
5.2.3 Aislamiento de Agatadiol.....	80
5.2.4 Aislamiento de los productos Scrobiculactona A y Scrobiculactona B	80
5.2.4 Medición de espectros RMN	80
5.2.5 Preparación y medición de extractos para en GC-MS	81
5.2.6 Anotaciones para GC-MS	82
5.2.7 Preparación y medición de extractos para en LC-MS/MS	82
5.2.8 Análisis estadísticos	83
5.2.9 Procesamiento de datos y Redes moleculares (Feature-Based Molecular Networking, FBMN)	84
5.3 Resultados y discusión	86
5.3.1 Selección de sitios de muestreo y rendimiento de extracción.	86
5.3.2 Caracterización fitoquímica tradicional	88
5.3.3 Caracterización metabolómica mediante cromatografía de gases con detección de Masas (GC-MS)	94

5.3.4 Caracterización mediante cromatografía líquida con detección de Masas (LC-MS/MS).....	111
5.4 Conclusiones	134
5.5 Referencias	135
CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES.....	141
APÉNDICE	142

RESUMEN

Los propóleos poseen un alto valor etnofarmacológico, conocido por la humanidad desde hace milenios. Su variabilidad química hace difícil tanto su estudio como su caracterización. En este trabajo se caracterizó el perfil químico de una muestra de propóleos costarricenses con la nemorosona como metabolito secundario bioactivo principal; con el fin de ser utilizados como materia prima para el desarrollo de productos e investigación futura. Se estudiaron seis apiarios modelo de los cantones: de Coto Brus (ID:19), Buenos Aires de la provincia de Puntarenas (ID:20 y 48), Turrubares (ID: 29) y Pérez Zeledón (ID: 35 y 47) de la Provincia de San José. El estudio se realizó en cuatro líneas de trabajo: **CAPÍTULO II:** Se realizó un seguimiento durante seis meses al contenido de nemorosona, utilizando un método CLAR-DAD validado y desarrollado en este trabajo, de todos apiarios indicados. Se determinó que la concentración de la nemorosona varía según la ubicación de cada apiario, así como con la estación del año, disminuyendo considerablemente en la época seca. **CAPÍTULO III:** Validación de la estructura de la nemorosona mediante LC-MS/MS, CLAR-DAD, RMN: ^{13}C , ^1H , HSQC, HMBC, COSY y Rayos X monocristal, con lo cual fue posible confirmar la estructura reportada en la literatura. Adicionalmente se estudió su estabilidad mediante RMN, se propuso una ruta de descomposición apoyada en evidencia experimental y cálculos computacionales. **CAPÍTULO IV:** Se estudió la naturaleza de las interacciones entre la nemorosona y los compuestos que conforman los propóleos mediante ^1H -DOSY, para ello se utilizaron los apiarios modelos 35 y 48. Se determinó el coeficiente de difusión molecular (D : $\text{m}^2/\text{s} \times \text{E}^{-10}$) de la nemorosona y se caracterizaron los demás compuestos detectados mediante el rango en el peso molecular y coeficiente de difusión. Se determinó que no existe un efecto de agregación entre nemorosona y los demás componentes que integran los propóleos. **CAPÍTULO V:** Se realizaron análisis metabolómicos mediante GC-MS y LC-MS/MS en los apiarios 35 y 48. Para ello se utilizaron tres colectas compuestas por cinco colmenas diferentes para un total de 30 muestras las cuales se estudiaron mediante análisis multivariados. De forma complementaria se analizó la diversidad química mediante redes moleculares (FBMN), lográndose anotar 32 componentes para GC-MS (nivel 2) y 3 para LC-MS/MS (nivel 1). Además de la nemorosona se aislaron y se caracterizaron mediante LC-MS/MS y RMN: ^{13}C , ^1H , HSQC, HMBC y COSY los siguientes compuestos: Scrobiculactona A, Scrobiculactona B y Agatadiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación principal de la acumulación de benzofenonas poliisopreniladas reportadas en plantas del género <i>Garcinia</i> (familia Clusiaceae)	2
Figura 2. Componentes mas frecuentes encontrados en propóleos, de acuerdo con cada quimiotipo.	4
Figura 3. Principales PPAPs encontrados en propóleos provenientes de Brasil y Cuba.	5
Figura 4. Ruta biosintética propuesta para los PPAPs de acuerdo con Yang et al., 2018 (15).	5
Figura 5. Representación esquemática del mecanismos de desacoplamiento protonofórico para la nemorosona, en células aisladas de hígado de rata (21, 41)	7
Figura 6. Productos mayoritarios generados de la descomposición de la nemorosona, en diferentes disolventes según lo reportado por Piccinelli et al., 2009 (22).....	8
Figura 7. Resumen del trabajo realizado para la caracterización de propóleos costarricenses ricos en nemorosona.	10
Figura 8. Sitios de muestreo seleccionados para la determinación de la variación del contenido de nemorosona en el tiempo.	22
Figura 9. Estimación de la pureza espectral de de nemorosona, concentración: 33,6 mg/L: A-Cromatograma del estándar, Tr: 16,18 min, B-Diferencia espectral para los puntos adquiridos a el tiempo de retención indicado, C-Evaluación de pureza espectral	24
Figura 10. Espectro UV de la nemorosona	25
Figura 11. Algunas de las pruebas realizadas durante la verificación del método cromatográfico CLAR-DAD utilizado para la determinación de nemorosona en propóleos costarricenses.....	26
Figura 12. Perfil cromatográfico característico de un extracto de propóleo ($\lambda= 280$ nm, propóleo 35, colecta 1) cuyo componente principal es la nemorosona.....	27
Figura 13. Variación en el perfil cromatográfico y contenido de nemorosona en algunas de las colmenas muestreadas en las colectas realizadas del apiario 35.....	29
Figura 14. Variación en el perfil cromatográfico y contenido de nemorosona en algunas de las colmenas muestreadas en las colectas realizadas del apiario 48.....	30

Figura 15. Variación en el contenido de nemorosona con respecto a colecta y sitio en diferentes apiarios muestreados.....	31
Figura 16. Principales características estructurales de las tres familias de PPAPs que se han reportado en la literatura.....	38
Figura 17. Estructura de la nemorosona indicando la ubicación de equilibrio enólico.....	42
Figura 18. Espectro ¹ H-RMN de la nemorosona (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K).....	44
Figura 19. Espectro ¹ H-RMN de la nemorosona (Cloroformo-d; 600 MHz; 298,15 K). Se resalta la señal del HSQC correspondiente a los metilos geminales de C-8.	44
Figura 20. Conformaciones silla-bote presentes en la nemorosona	46
Figura 21. ¹ H-RMN de la nemorosona a diferentes temperaturas (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K).....	46
Figura 22. Numeración utilizada para la asignación de los desplazamientos químicos de la nemorosona	47
Figura 23. A: Fotografía de un cristal de nemorosona utilizado durante la medición de Rayos X, B: Estructura Nemorosona representada con elipsoides de desplazamiento a un 50 % de nivel de probabilidad.....	50
Figura 24. Empaquetamiento de una celda unidad de un cristal de nemorosona. Se indican en amarillo las distancias (Å) de las interacciones puente de hidrógeno que estabilizan la estructura.	50
Figura 25. Exploración de la estabilidad de la nemorosona en el tiempo mediante ¹ H-RMN (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K).....	51
Figura 26. Evidencia cromatográfica para la descomposición observada de la nemorosona: A- CCF, FM: hexano/acetato de etilo (7:3) en extracto etanólico de propóleos, B- CLARIDAD a 254 nm	53
Figura 27. Numeración utilizada para la asignación de los desplazamientos de la Scrobiculactona A y B.....	54
Figura 28. Ruta de degradación propuesta para la nemosona, de acuerdo con la evidencia cromatográfica, espectroscópica y cálculos computacionales.....	57
Figura 29. Espectros ¹ H-RMN de los extractos seleccionados para el análisis del efecto del coeficiente de difusión de la nemorosona con respecto a la composición de la totalidad del extracto de propóleo.	68

Figura 30. Espectro ¹ H-DOSY de la nemorosona 99,8 % de pureza.	69
Figura 31. Espectro ¹ H-DOSY para el extracto etanólico del apiario 48 conformado por la mezcla de las colectas 1-6.	70
Figura 32. Espectro ¹ H-DOSY para el extracto etanólico del apiario 35 colecta 3C (400 MHz; 600 μL CD ₃ OD; 5 mg; 298,15 K).	72
Figura 33. Espectro ¹ H-DOSY para el extracto etanólico del apiario 35 colecta 1C (400 MHz; 600 μL CD ₃ OD; 5 mg; 298,15 K).	72
Figura 34. Ubicación de los sitios de muestreo seleccionados para la caracterización química de apiarios ricos en nemorosona.	87
Figura 35. Esquema de separación fitoquímico utilizado para la caracterización del extracto etanólico del propóleo 48 Pool.	90
Figura 36. Esquema de separación fitoquímico utilizado para la caracterización del extracto etanólico del propóleo 35-1C.	91
Figura 37. Estructura molecular del Agatadiol, ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃), ¹³ C-RMN (400 MHz, CDCl ₃).	92
Figura 38. Estructura molecular de la Scrobiculactona A, ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃), ¹³ C-RMN (400 MHz, CDCl ₃).	92
Figura 39. Estructura molecular de la Scrobiculactona B, ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃), ¹³ C-RMN (400 MHz, CDCl ₃).	93
Figura 40. Estructura molecular de la Nemorosona, ¹ H-RMN (600 MHz, CD ₃ OD), ¹³ C-RMN (600 MHz, CD ₃ OD).	93
Figura 41. Esquema de trabajo para el procesamiento de datos de GC-MS para análisis estadístico multivariado e identificación de compuestos.	95
Figura 42. Calidad de las anotaciones evaluadas mediante la correlación entre el índice de Kovats calculados y el reportado en la literatura para los datos generados de los extractos de acetona y etanol (A) y Hexano (B).	95
Figura 43. Cromatogramas GC-MS representativos de la variabilidad observada en los diferentes disolventes utilizados para el análisis de composición: hexano, etanol y acetona.	97
Figura 44. Distribución porcentual por clase de compuestos identificados en los extractos de las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48 (Disolvente: Hexano).	99

Figura 45. Distribución porcentual por clase de compuestos identificados en los extractos de las colectas 1-3 del apiario 35 (Disolvente: Etanol y Acetona).	99
Figura 46. PCA Scores plot de PC1 vs PC2 de los apiarios 35 y 48 extraídos con Hexano (colectas 1-3).	102
Figura 47. A: PLS-DA Score Plot de PC1 vs PC2, B: 15 puntuaciones de mayor diferenciación (VIP Score Plot) para PC1, de los apiarios 35 y 48 extraídos con Hexano (colectas 1-3)	103
Figura 48. Mapa de calor por agrupación gerárquica para 25 anotaciones de las colectas 1-3 extraída con hexano de los apiarios 35 y 48.	104
Figura 49. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de hexano de las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48.	107
Figura 50. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de hexano de las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48	108
Figura 51. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de acetona y etanol de las colectas 1-3 del apiario 35	109
Figura 52. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de acetona y etanol de las colectas 1-3 del apiario 35.	110
Figura 53. Esquema de trabajo para el procesamiento de datos de LC-MS/MS para análisis estadístico multivariado y dereplicación utilizando GNPS.	112
Figura 54. Perfil LC-MS/MS, ESI+ para la colectas 1-3, colmenas A-E del apiario 35. .	113
Figura 55. Perfil LC-MS/MS, ESI+ para la colectas 1-3, colmenas A-E del apiario 48. .	114
Figura 56. PCA-Score plot para PC1 y PC2 de las colectas 1-3, colmenas A-E de los apiarios 35 y 48.	117
Figura 57. Hierarchical Clustering Heatmap para 25 anotaciones de las colectas 1-3, colmenas A-E de los apiarios 35 y 48	118
Figura 58. PLS-DA Score Plot de PC1 vs PC2 de los apiarios 35 y 48.	120
Figura 59. Características más importantes identificadas en el PLS-DA	121
Figura 60. LC-MS/MS Red molecular creada con los perfiles de las colectas 1-3 del apiario 35 y 48.	122
Figura 61. Espectro ¹³ C de la nemorosona (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K).	143
Figura 62. Espectro COSY de la nemorosona (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K),	144

Figura 63. Espectro HMBC de la nemorosona (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K).	145
Figura 64. Espectro HSQC de la nemorosona (Metanol-d ₄ ; 600 MHz; 298,15 K).....	146
Figura 65. Espectro ¹ H de la Scrobiculactona A y B (CDCl ₃ ; 400 MHz; 298,15 K).	147
Figura 66. Espectro ¹³ C de la Scrobiculactona A y B (CDCl ₃ ; 400 MHz; 298,15 K).	148
Figura 67. Espectro HSQC de la Scrobiculactona A y B (CDCl ₃ ; 400 MHz; 298,15 K).	149
Figura 68. Espectro HMBC de la Scrobiculactona A y B (CDCl ₃ ; 400 MHz; 298,15 K).	150
Figura 69. Espectro COSY de la Scrobiculactona A y B (CDCl ₃ ; 400 MHz; 298,15 K).	151
Figura 70. Espectro de LC-MS/MS (ESI+) del la Scrobiculactona A y B.....	152
Figura 71. Espectro ¹ H-RMN del Agatadiol (CDCl ₃ , 600 MHz).....	153
Figura 72. Espectro ¹³ C-RMN del Agatadiol (CDCl ₃ , 600 MHz).	154
Figura 73. Espectro COSY del Agatadiol (CDCl ₃ , 600 MHz).....	155
Figura 74. Espectro HSQC del Agatadiol (CDCl ₃ , 600 MHz).....	156
Figura 75. Espectro HMBC del Agatadiol (CDCl ₃ , 600 MHz).	157
Figura 76. Espectro de LC-MS/MS del agatadiol.	158
Figura 77. Extractos etanólicos de propóleos costarricenses pertenecientes al apiario 35, así como su fraccionamiento mediante CC.....	159
Figura 78. Estimación teórica de la distribución porcentual de la nemorosona de acuerdo con su protón más ácido.	160
Figura 79. PTLC característica de la nemorosona durante su aislamiento	161
Figura 80. Análisis univariante del contenido de nemorosona (% m/m) con respecto al sitio de muestreo.....	162

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales familias de compuestos con actividad biológica encontrados en propóleos de diferentes zonas geográficas y su respectivo quimiotipo.....	3
Cuadro 2. Figuras de mérito evaluadas durante la validación del método utilizado para la determinación del contenido de nemorosona en propóleos costarricenses	23
Cuadro 3. Prueba de media de mínimos cuadrados (Prueba de efectos) para el contenido de nemorosona y la relación con el apiario y el mes de recolección	32
Cuadro 4. Resumen de los principales datos cristalográficos de la nemorosona, así como los ajustes utilizados de adquisición y de refinamiento	41
Cuadro 5. Asignaciones de desplazamientos químicos de la nemorosona en diferentes disolventes	48
Cuadro 6. Asignaciones de desplazamientos químicos de la Scrobiculatona A (Producto A) y Scrobiculactona B (Producto B).....	55
Cuadro 7. Coeficiente de difusión (D) de la nemorosona aislada y formando parte de extractos de propóleos	71
Cuadro 8. Descripción de muestras Seleccionadas para análisis fitoquímico	87
Cuadro 9. Compuestos identificados en los extractos preparados en hexano a partir de los propóleos seleccionados 35 y 48 para las colectas 1-3	100
Tabla 10. Compuestos identificados en los extractos preparados en Etanol y Acetona a partir para las colectas 1-3 del apiario 35	100
Cuadro 11. Datos UHPLC-MS/MS para las anotaciones realizadas sobre las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAR-DAD: cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos.

LC-MS/MS: cromatografía líquida con detección de masas en tándem.

RMN: resonancia magnética nuclear.

¹H-RMN: resonancia magnética nuclear protónica.

¹³C-RMN: resonancia magnética nuclear de carbono 13.

COSY: correlación espectroscópica.

HSQC: correlación heteronuclear cuántica simple.

HMBC: correlación heteronuclear enlace múltiple.

ESI: ionización por electrospray.

PTLC: cromatografía en capa fina preparativa.

ppm: partes por millón.

GC-MS: cromatografía de gases con detección por masas.

Rf: factor de respuesta para TLC.

TLC: cromatografía de capa fina.

Metanol-d₄: metanol deuterado.

Cloroformo-d: cloroformo deuterado.

R-Factor: factor de concordancia cristalográfico.

ESI+: ionización por electrospray en modo positivo.

ESI-: ionización por electrospray en modo negativo.

PCA: análisis por componentes principales.

PLS-DA: análisis de discriminante mediante mínimos cuadrados parciales.

Qtof: cuadrupolo por tiempo de vuelo.

PPAPs: acilfuroglucinoses policíclicos poliisoprenilados.

Tr: tiempo de retención (min).

HRMS: siglas en inglés para, Espectrometría de masas de alta resolución (High resolution mass spectrometry).

NOESY: siglas en inglés para Espectrometría de Efecto Nuclear Overhauser: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, **Oscar Alberto Fernández Sánchez**, con cédula de identidad **1-1240-0964**, en mi condición de autor del TFG titulado **ESTUDIO DE PROPÓLEOS A BASE DE NEMOROSONA: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTABILIDAD**.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado.

SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: NA año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las abejas forman parte de la familia de insectos más exitosa, pues ha logrado proliferar en todos los hábitats que cuenta con plantas angiospermas. Parte de su éxito adaptativo se debe a su capacidad para seleccionar de acuerdo con los recursos disponibles aquellos que les permitan producir alimento y defenderse al mismo tiempo y es gracias a esto que existen dos de los grandes productos del mundo apícola, la miel y los propóleos (1). El valor etnofarmacológico de los propóleos es conocido desde los antiguos griegos, desde entonces se ha asociado principalmente a su uso como agente antimicrobiano de amplio espectro (2).

El término “propóleo” (del griego: *-pro-* en frente de, *-polis-* ciudad) se utiliza para describir un material de coloración variable (generalmente oscura) de consistencia resinosa semejante a una arcilla, que utilizan las abejas para diversos propósitos. A nivel estructural, las abejas emplean el propóleo para reparar las colmenas, fortalecer los orificios de entrada al panal con el fin de facilitar la defensa en caso de ataque y principalmente reforzar las paredes internas del panal para darle un mayor soporte. A nivel biológico se postula que las abejas emplean propóleos para funciones más diversas, aunque su fin primordial se puede relacionar a la defensa contra microorganismos patógenos; por ejemplo, las abejas “embalsaman” los cuerpos de agentes invasores (tales como insectos) con este material, evitando transportarlo fuera del panal y protegiendo a su vez la colmena de los microorganismos que se generan a raíz de su descomposición (2,3,4). Es esta última utilidad la que ha llamado la atención de los investigadores, pues cubre un amplio espectro de actividades biológicas que resultan relevantes en la búsqueda de moléculas con aplicaciones terapéuticas (3,4).

Apesar de tener un gran potencial para aplicaciones farmacológicas, su estudio resulta complicado dado la variabilidad en su composición (6); para entender esto es necesario tener en mente cómo se originan los propóleos, los cuales son el resultado de una mezcla de un muestreo selectivo de plantas. Las abejas obtienen la materia prima a partir de diferentes secciones de la planta, siendo un equilibrio entre accesibilidad y concentración del principio activo de interés para la abeja, por esta razón, se ha encontrado que la diversidad química de estos productos se debe principalmente a variaciones fitogeográficas (4, 8). En el caso de los

propóleos ricos en benzofenonas poliisopreniladas (como la nemorosona), las plantas de los cuales obtienen este tipo de compuestos han sido asociadas principalmente a la familia de las *Clusiaceae*, que como se observa en la **Figura 1**, mayoritariamente se localizan en los frutos, resinas florales y flores (18). Por lo que es de esperar que el componente mayoritario de los propóleos de origen tropical se trate de las resinas que han sido recuperadas a partir de estas plantas.

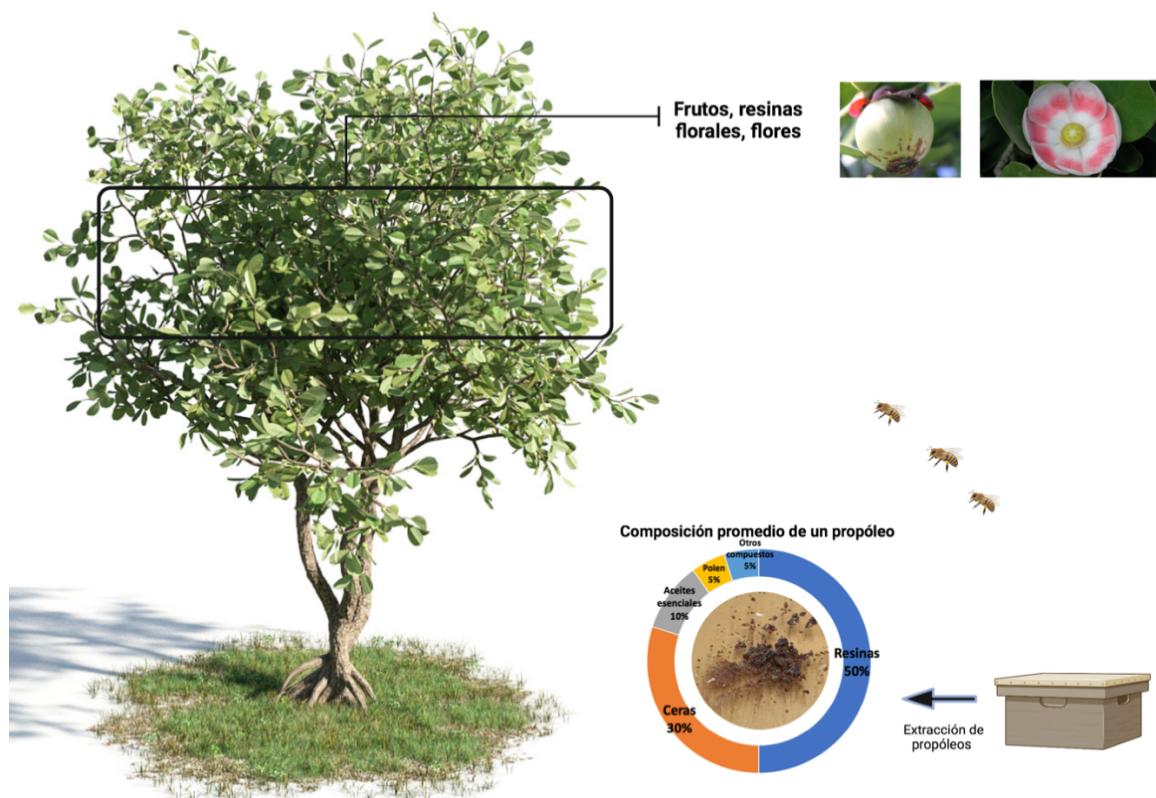


Figura 1. Ubicación principal de la acumulación de benzofenonas poliisopreniladas reportadas en plantas del género *Garcinia* (familia *Clusiaceae*). Elaborado utilizando www.biorender.com

De manera general, los propóleos están compuestos por un 50 % de resinas (ricas en flavonoides y ácidos fenólicos relacionados), 30 % ceras, 10 % aceites esenciales, 5 % polen y 5 % de otros compuestos (10) (ver **Figura 1**). Este último grupo de compuestos es de origen muy variado y junto con las resinas, concentran los estudios mas recientes pues son los que mayor variedad de moléculas con interés farmacológico han producido, algunos ejemplos se muestran en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Principales familias de compuestos con actividad biológica encontrados en propóleos de diferentes zonas geográficas y su respectivo quimiotipo.

Tipo de propóleo	Quimiotipo *	Actividad antibacterial	Actividad antiinflamatoria	Actividad antioxidante
Europa	Cafés (E,F)	Flavanonas, flavones, ácidos fenólicos y sus ésteres (5, 6)	Flavanonas, flavones, ácidos fenólicos y sus ésteres (6)	Flavonoides, polifenoles y sus ésteres (8)
Brasil, Uruguay	Cafés, Amarillos, Verdes (A,B,C,D)	Ácidos p-cumáricos prenilados, labdanos diterpenicos (11)	No identificados	Ácidos p-cumáricos prenilados, flavonoides (4, 14, 15, 16),
Cuba	Cafés (D)	Benzofenonas polipreniladas (12,13)	No analizados	Benzofenonas polipreniladas (10, 13)

(*): El grupo de investigación en propóleos liderado por la Dra. Giselle Tamayo ha denominado los diferentes quimiotipos con letras mayúsculas para una mayor comodidad. De aquí en adelante se referirán a esa clasificación.

Los compuestos responsables de la actividad biológica encontrada en los propóleos tienen estructuras diversas. Para facilitar su estudio, se han clasificado cualitativamente de acuerdo con el color siendo: Café, amarillo, verde y rojo los más abundantes caracterizados hasta el momento. Se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios en cada una de estas familias de propóleos, por lo que un enfoque práctico ha sido agruparlos de acuerdo con sus estructuras base principales (ver **Figura 2**), a las cuales también se les ha llamado quimiotipos (18, 40).

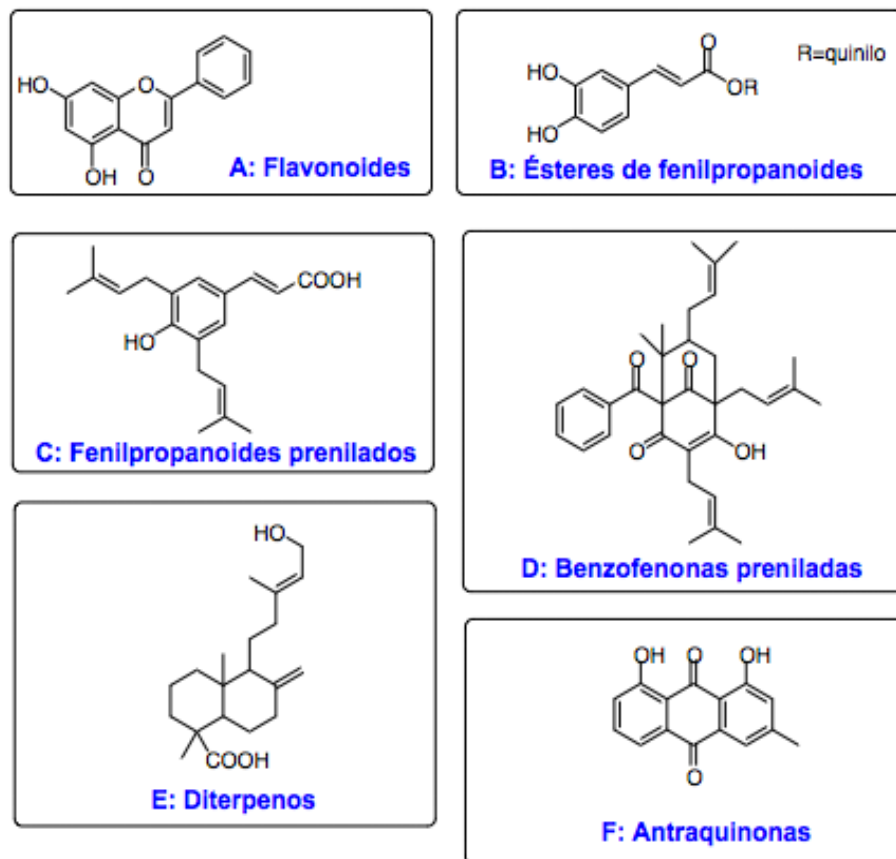


Figura 2. Componentes más frecuentes encontrados en propóleos, de acuerdo con cada quimiotipo señalado en paréntesis.

Dentro de los propóleos que han llamado la atención por su elevado potencial farmacológico son los propóleos cafés con metabolitos secundarios principalmente del quimiotipo D. Estos son característicos de las zonas tropicales (caso de Cuba y Brasil) donde numerosos estudios han reportado el aislamiento de varias especies de acilfloroglucinoles policíclicos poliisoprenilados (PPAPs, siglas en inglés) (12, 13) con actividad biológica variada y cuyo origen fitoquímico reside en las plantas de la familia *Clusiaceae* (*Guttiferae*), como se mencionó anteriormente. Dentro de esta familia de compuestos la mayor atención se ha centrado en la nemorosona (ver **Figura 3**) que, si bien no ha sido el único compuesto de esta familia encontrado en propóleos cafés de origen cubano, si ha sido el mayoritario hasta la fecha (18).

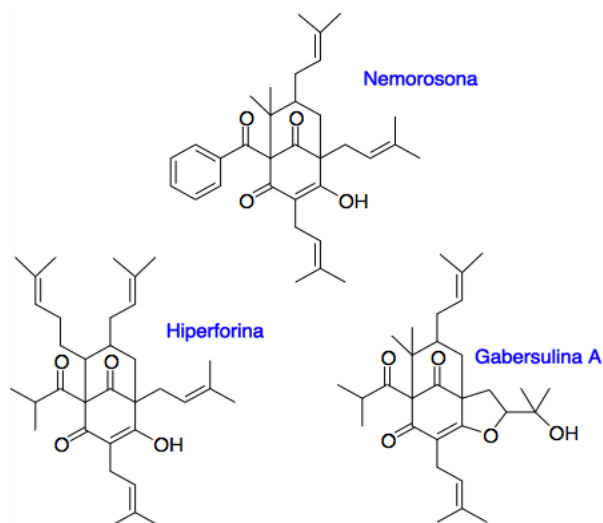


Figura 3. Principales PPAPs encontrados en propóleos provenientes de Brasil y Cuba (15).

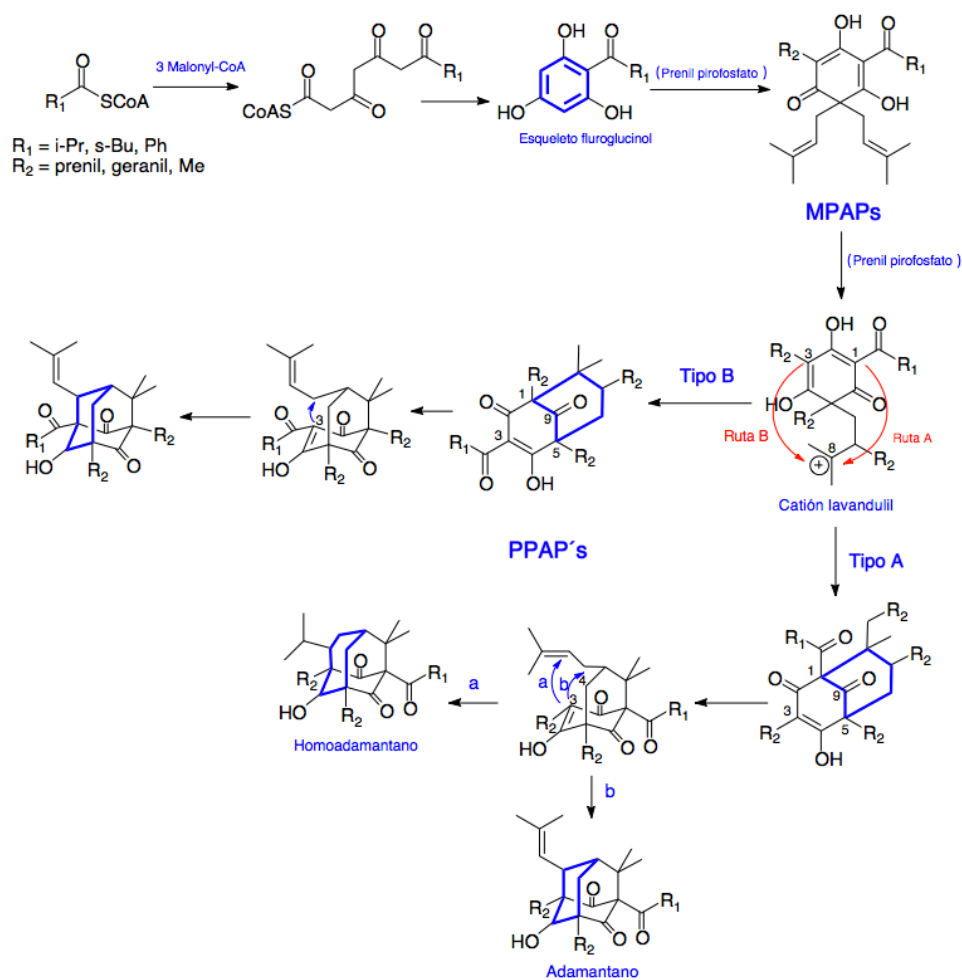


Figura 4. Ruta biosintética propuesta para los PPAPs de acuerdo con Yang et al., 2018 (15).

Esta familia de compuestos se caracteriza por poseer en común un núcleo de tipo biciclo [3.3.1] nonano-2,4-9-triona (15). Tradicionalmente se ha dividido en tres tipos dependiendo de la posición del grupo acilo alrededor del núcleo mencionado en: A, B y C. Los PPAPs tipo A, resultan de un ataque del carbocatión intermediario (catión lavandulil) a la posición 1 (ver **Figura 4**) del floroglucinol, este tipo de biciclo es el más abundante (se han reportado alrededor de 80 compuestos). Los de tipo B, se originan del ataque en la posición 3, esta variante es menos abundante que la anterior y se caracteriza por poseer un grupo prenilo en el C-3 alílico (ver **Figura 4**). En cuanto al tipo C, que no se incluyen en la **Figura 4**, son aún menos abundante que las de tipo B, hasta la fecha no han sido reportadas en plantas de la familia de la *Guttiferae*, de hecho han sido erróneamente asignadas muchas estructuras a esta familia. Los PPAPs de tipo A y B pueden experimentar reordenamientos que derivan en estructuras aún más complejas, producto del ataque y posterior ciclación del enol en C-3 a C-27 o C-28 generando otra nueva familia de compuestos con un esqueleto diferente y las cuales han sido ampliamente reportadas en la literatura (15).

El grupo de investigación liderado por Cuesta-Rubio ha realizado investigaciones para determinar la estructura (10, 18) y el origen de la actividad biológica de esta familia de compuestos, de la cual destaca la nemorosona (13), dada su abundancia natural principalmente en propóleos de origen cubano. Un enfoque reciente comprende estudiar su actividad anticancerígena, para lo cual se han empleado diferentes líneas celulares. Cuesta Rubio et al., 2002 (16) utilizaron modelos del carcinoma humano de cérvix (HeLa), carcinoma humano de laringe (HEp-2), carcinoma de próstata (PC-3) y carcinoma de sistema nervioso central (U251). En todos los casos la nemorosona mostró actividad anticancerígena significativa (el IC₅₀ menos fue para HEp-2, 1,5 μmol/mL) en comparación contra los tratamientos de referencia. Cuesta-Rubio propone que el origen de esta actividad se encuentra en el equilibrio tautomérico que presenta estas estructuras (en general todas las PPAPs de tipo B, ver **Figura 4**) dado que la actividad disminuye en el derivado metilado de la nemorosona.

Dada la fuerte actividad anticancerígena *in vitro* que presentan y particularmente la nemorosona, se han realizado estudios dirigidos a tratar de explicar el mecanismo por medio del cual exhiben esta propiedad. Las investigaciones sugieren un mecanismo de desacoplamiento protonofórico mitocondrial (8, 21, 41). Este mecanismo estaría asociado al equilibrio ceto-enólico, lo que favorecería la estabilización de especies aniónicas mediante la deslocalización de la carga sobre la estructura central (fluoroglucinol) actuando como un transportador de protones. La nemorosona protonada podría difundir a través del espacio intermembrana de la mitocondria (pH alto) hacia la matriz mitocondrial (pH bajo), disociándose y difundiendo nuevamente en su forma ionizada al interior del espacio intermembrana repitiendo el ciclo nuevamente (ver **Figura 5**). Esto ocasionaría un desacoplamiento en la producción de ATP, al alterar la cadena transportadora de electrones debido al ingreso de protones por una vía diferente a la ATP Sintasa (afectando también el potencial de membrana $\Delta\psi_m$). Si bien este mecanismo ocurre naturalmente, en el caso de las células cancerígenas se ha identificado como atípicamente alto, lo que le daría selectividad a la nemorosona sobre células sanas (41).

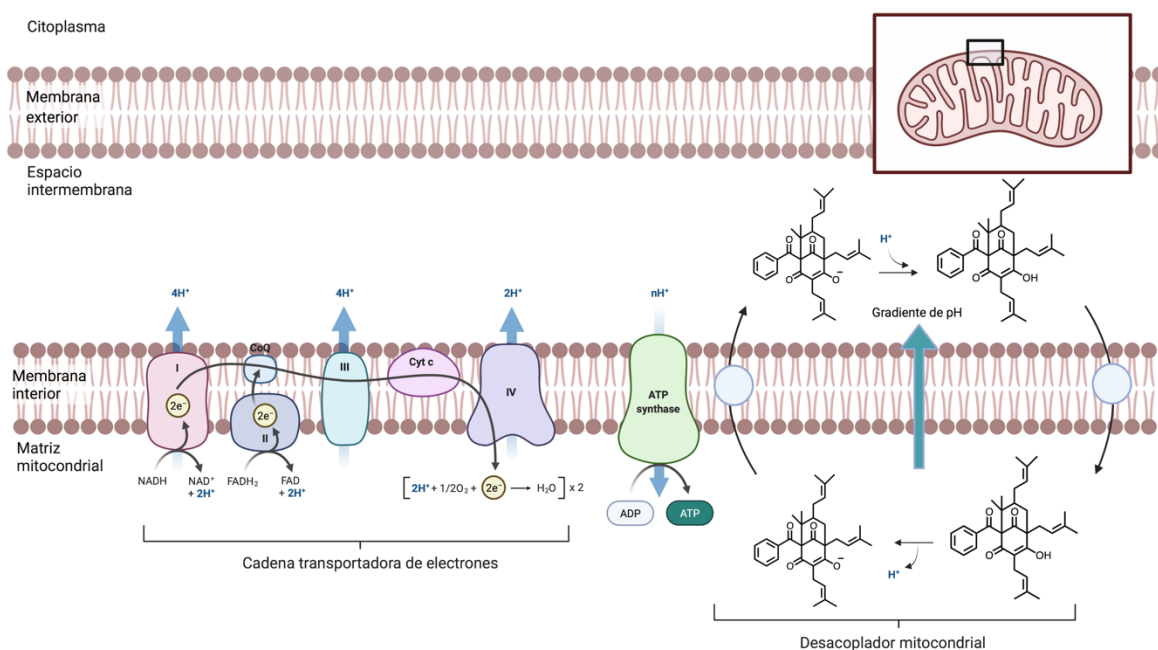


Figura 5. Representación esquemática del mecanismos de desacoplamiento protonofórico para la nemorosona, en células aisladas de hígado de rata (21, 41). Adaptado de Shrestha et al., 2021 (41) y elaborado utilizando www.biorender.com

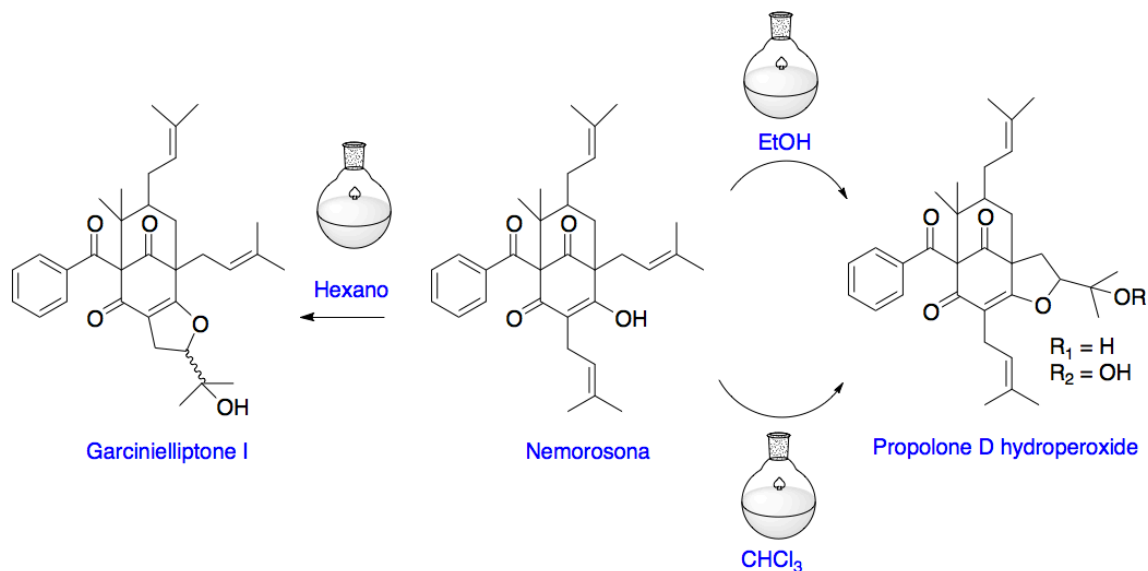


Figura 6. Productos mayoritarios generados de la descomposición de la nemorosona, en diferentes disolventes según lo reportado por Piccinelli et al., 2009 (22).

De hecho, la presencia del sistema 1,3-dicarbonílico enolizable también ha dificultado el aislamiento y caracterización de su estructura (13) y algunas de las síntesis propuestas (23, 24). Un estudio conducido por Piccinelli et al., 2009 (22) (**Figura 6**) evidenció que la nemorosona (al igual que sus congéneres con el biciclo [3.3.1]nonano-2,4,9-triona) son muy susceptibles a la degradación en procesos de extracción y purificación en donde los disolventes juegan un papel clave, formando derivados generados por procesos de ciclación intramolecular. Por esta razón, es posible que durante su aislamiento se empleen condiciones que modifiquen su estructura y por lo tanto cambie también su actividad biológica. En este trabajo se identificó que la Garcinielliptona I es el producto de degradación principal cuando la nemorosona se almacena en hexano, su aparición alcanzó el pico máximo al cabo de 24 h.

Para el caso de etanol y cloroformo el producto de degradación principal fue el mismo la Propolona D hidroperóxido, sin embargo, la rapidez de aparición fue significativamente diferente pues en cloroformo alcanzó una concentración máxima al cabo de 120 h mientras que para el caso de etanol a los 120 días apenas alcanzó un 5 %. La evidencia indica que la nemorosona es estable a los alcoholes de bajo peso molecular (metanol y etanol) y altamente inestable en disolventes no polares (hexano, cloroformo) y es posible que algunos de los productos derivados reportados como de origen natural sean más bien artefactos producidos durante los procesos de aislamiento.

Hasta la fecha, la nemorosona ha sido reportada principalmente en propóleos de origen cubano (20) sin embargo, gracias un trabajo pionero sobre la caracterización mediante huella química utilizando $^1\text{H-RMN}$, Umaña et al., 2013 (17) identificó a la nemorosona como componente diferenciante en un quimiotipo de propóleos costarricenses utilizando análisis multivariado por componentes principales (PCA, siglas en inglés).

Estos hallazgos plantearon la necesidad de profundizar en el estudio de los propóleos con el quimiotipo distintivo de nemorosona tanto por su potencial farmacológico ya demostrado como por su posibilidad de dinamizar el mercado regional, pues abriría la posibilidad de diversificar el comercio apícola de Costa Rica con propóleos altamente valiosos ya sea para el consumo humano directo o para el desarrollo de productos en áreas farmacéuticas o cosmetológicas. Este contexto se tomó como punto de partida para el desarrollo de este proyecto de investigación y cuya estrategia de ejecución se resume en la **Figura 7**.

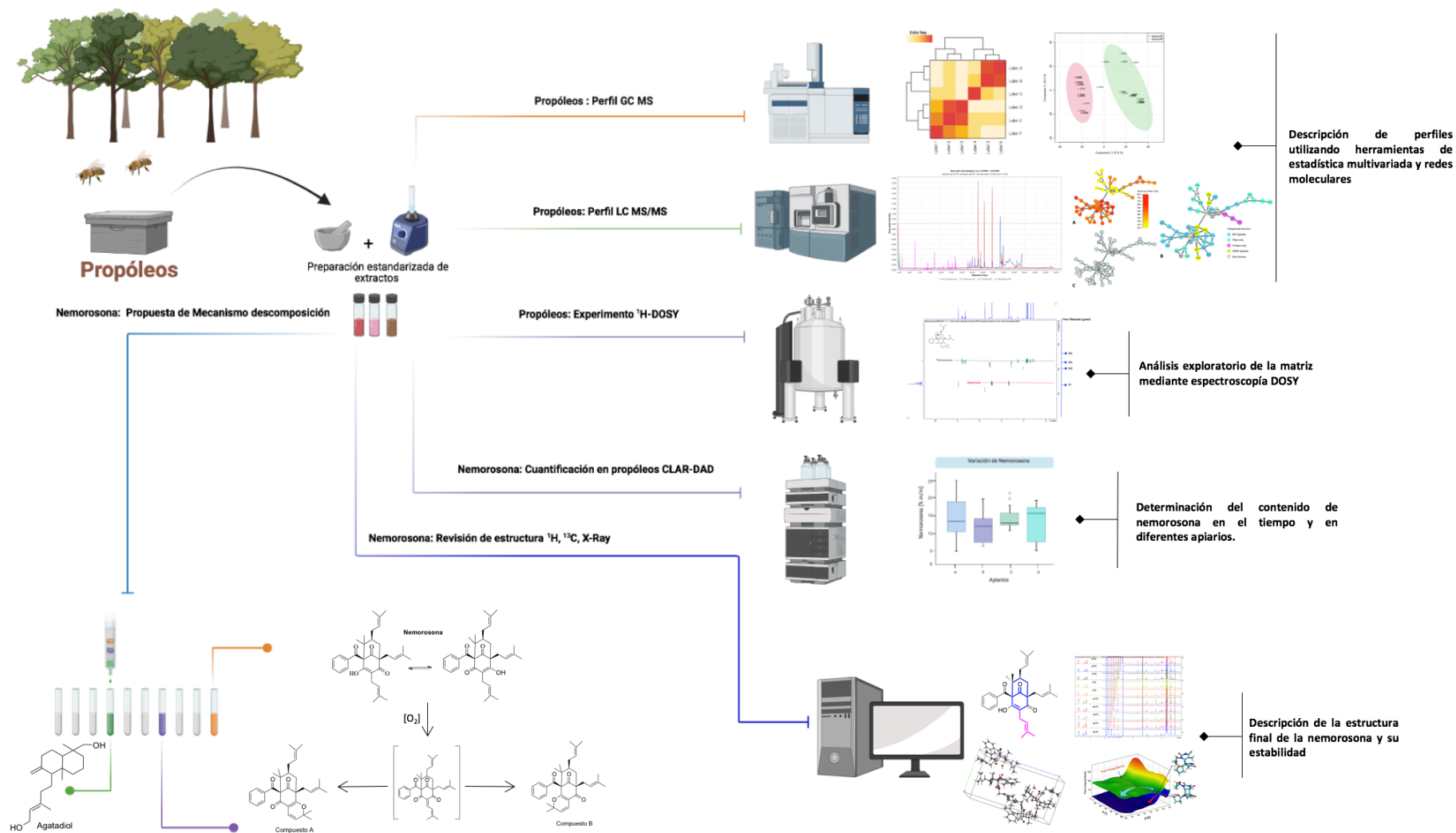


Figura 7. Resumen del trabajo realizado para la caracterización de propóleos costarricenses ricos en nemorosona.

1.1 Referencias

1. Bankova V., L de Castro S., Marcucci M., Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, **2000**, 31: 3-15.
2. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S., Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 64: 235-240.
3. Sforcin M., Bankova V., Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?, *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133: 253-260.
4. Bankova V., Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*, **2005**, 2(1): 29-32.
5. Bankova V., Marcucci M., Standardization of propolis: present status and perspectives, *Bee World*, **2000**, 81(4): 182-188.
6. Do Nascimento, T.G., dos Santos Arruda, R.E., da Cruz Almeida, E.T. *et al.* Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. *Sci Rep*, **2019**, 9:18293.
7. Frión-Herrera Y., Gabbia D., Díaz-García A., Cuesta-Rubio O., Carrara M., Chemosensitizing activity of Cuban propolis and nemorosone in doxorubicin resistant human colon carcinoma cells, *Fitorerapia*, **2019**, 136: 104173.
8. Reis F., Pardo-Andreu G., Nuñez-Figueredo Y., Cuesta-Rubio O., Marín-Prida J., Uyemura S., Curti C., Alberici L., Clusianone, a naturally nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondrial and induces HepG2 cell death, *Chemico-Biological Interactions*, **2014**, 212: 20-29.

9. Guilherme da Cunha M., Franchin M., Paula-Eduardo L., Almeida Freires I., Beutler J., Matias de Alencar I., Ikegaki M., Machado Tabchoury M., Mattar Cunha T., Luis Rosalen P., Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis, *Journal of Functional Foods*, **2016**, 26: 27-35.
10. Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods*, **2021**, 18:747–756.
11. Werner E., Heiler J., Ducruix C., Ezan E., Junot C., Tabet J., Mass spectrometry for the identification of the discriminant signals from metabolomics: current status and future trends., *J. Chromatogr.*, 2008, 871: 143-163.
12. Guo J., Huan T., Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, Data-Independent Acquisition modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics, *Analytical Chemistry*, **2020**, 97: 8072-8080.
13. Cuesta-Rubio O., Velez-Castro H., Frotana-Uribe B., Cárdenas J., Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*, *Phytochemistry*, **2001**, 57: 279-283.
14. Uwamori M., Saito A., Nakada M., Stereoselective Total Synthesis of Nemorosone, *The Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 77: 5098-5107.
15. Yang X., Grossman R., Xu G., Research progress of Polycyclic Polyprenylated Acyphoroglucinols, *Chemical Reviews*, **2018**, 118: 3508-3558.
16. Cuesta-Rubio O., Frontana-Uribe B., Ramirez-Apan T., Cárdenas J., Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban propolis; Biological Activity of Nemorosone, *Z. Naturforsch*, **2002**, 57c: 372-378.

17. Umaña E., Análisis multivariado de huellas digitales de metabolitos secundarios mayoritarios de propóleos de Costa Rica empleando Resonancia Magnética Nuclear protónica (^1H -RMN), Tesis de Maestría, 2013, Universidad de Costa Rica.
18. Kumar S., Sharma S., Chattopadhyay S., The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance, *Fitoterapia*, **2013**, 89: 86-125.
19. Bankova V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 100: 114-117.
20. Salatino A.; Teixeira E.; Negri G., Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis, *eCAM*, **2005**, 42(1): 33-381.
21. Salatino A.; Fernandez-Silva C.; Righi A.; Salatino M., Propolis research and the chemistry of plant products, *Nat. Pro. Rep*, **2011**, 28: 925-9368.
22. Burdock G., Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), *Food Chem Toxicol* **1998**, 36: 347-363.
23. Popova M.; Bankova V.; Butovska D.; Petkov V.; Nikolava D.; Sabatini A.; Marcazzan L.; Bogdanov S., Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis, *Phytochem. Anal.* **2004**, 15: 235-240.
24. Kumar S.; Shama S.; Chattopadhyay S., The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance, *Fitoterapia* **2013**, 89: 86-125.
25. Banskota A.; Tezuka Y.; Kadota S., Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis, *Phytother. Res.*, **2001**, 15: 561- 571.
26. Burdock G., Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), *Food Chem Toxicol* **1998**, 36: 347-363.

27. Righi A.; Alves T., Negri G.; Marques L.; Breyer H., Salatino A., Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities, *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*: 2363-2370.
28. Monzote L.; Cuesta-Rubio O.; Matheussen A.; Assche V.; Maes L.; Cos P., Antimicrobial Evaluation of the Polyisoprenylated Benzophenones Nemorosone and Guttiferone A, *Phytother. Res.* **2011**, *25*: 558-462.
29. Cuesta-Rubio O.; Cuellar A.; Castro H.; Rastrelli L.; Aquino R., A Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Propolis, *J. Nat. Prod.* **1992**, *62*: 1013-101518.
30. Righi A.; Alves T., Negri G.; Marques L.; Breyer H., Salatino A., Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities, *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*: 2363-2370.
31. Silva V.; Genta G.; Moller M.; Masner M.; Thomsom L.; Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*: 6430-6437.
32. Hayashi K.; Komura S.; Isaji N.; Ohishi N.; Yagi K.; Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*(11): 1521-1524.
33. Cuesta-Rubio O.; Piccinelli A.; Fernandez M.; Márquez I.; Rosado M.; Rastrelli L., Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and RMN: The Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis, *J. Agric. Food Chem* **2007**, *55*: 7502-75093.
34. Nuhant P.; David M.; Poumplin T.; Delpech B.; Maranzano C., α,α -Annulation of 2,6-Prenyl-Substituted Cyclohexanone Derivatives with Malonyl Chloride: Application to a Short Synthesis of (\pm)-Clusianone. Formation and Rearrangement of a Biogenetic-Like Intermediate, *Org. Lett.* **2007**, *9*(2): 287-289.

35. Cuesta-Rubio O.; Frontana U.; Ramírez A.; Cárdenas J., Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone, *Z. Naturforsch* **2002**, *57c*: 372-378.
36. Pardo-Andreu G.; Nuñez-Figueroa Y.; The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler, *Mitochondrion* **2011**, *11*: 255-263.
37. Nuhant P.; David M.; Poumpilin T.; Delpéch B.; Maranzano C., α,α -Annulation of 2,6-Prenyl-Substituted Cyclohexanone Derivatives with Malonyl Chloride: Application to a Short Synthesis of (\pm)-Clusianone. Formation and Rearrangement of a Biogenetic-Like Intermediate, *Org. Lett.* **2007**, *9*(2): 287-289.
38. Uwamori M.; Saito A.; Nakada M., Stereoselective Total Synthesis of Nemorosone, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*: 5098-5107.
39. Piccinelli A.; Campone L.; Dal Piaz F.; Cuesta-Rubio O.; Rastrelli L., Fragmentation Pathways of Polycyclic Polyisoprenylated Benzophenones and Degradation Profile of Nemorosone by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry, *J. Mass. Soc. Mass. Spectrom* **2009**, *20*(9): 1688-1698.
40. Machado C.S., et al, Comparative Study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown and red Brazilian propolis, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016**, ID: 6057650.
41. Shrestha R., Johnson E., Byrne F., Exploring the therapeutic potential of mitochondrial uncouplers in cancer, *Molecular Metabolism*, **2021**, *51*: 1-20.

HIPÓTESIS

Dado que en trabajos preliminares se ha propuesto que la nemorosona es el componente principal mayoritario en los extractos etanólicos de los apiarios de la zona sur, es posible producir propóleos con base en nemorosona de una forma continua y estable en el tiempo, es decir, de forma estandarizada.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la estabilidad y composición del extracto etanólico de propóleos costarricenses con una composición mayoritaria de nemorosona.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un método cuantitativo empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un Detector de Arreglo de Diodos (CLAR-DAD) para la determinación de nemorosona en propóleos a base de ésta.
2. Obtener los datos espectrométricos y espectroscópicos que validen la estructura originalmente propuesta como nemorosona.
3. Determinar si el efecto estabilizador de la matriz (extracto) sobre la nemorosona se debe a efectos sinérgicos o si depende de un componente mayoritario particular.
4. Caracterizar los componentes mayoritarios presentes en una selección de muestras de apiarios.

CAPITULO II. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CLAR-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE NEMOROSONA EN PROPÓLEOS DEL PACÍFICO SUR DE COSTA RICA

Resumen

Los propóleos poseen un gran mercado como materia prima, ya sea para el aislamiento de metabolitos secundarios o para formulación de productos comerciales por lo que su adecuada estandarización se hace indispensable. Sin embargo, existe un gran debate si es realmente posible dada la variabilidad natural de estos materiales. En este trabajo se demostró que es posible mediante la caracterización de la variación del componente bioactivo principal nemorosona, proponer una estandarización. Para ello se desarrolló y validó un método cromatográfico CLAR-DAD utilizando nemorosona aislada y caracterizada a partir de propóleos costarricenses con un pureza de 99,8 %. Se evaluaron las siguientes figuras de mérito: linealidad, ámbito de trabajo, límite de detección y cuantificación, exactitud y precisión de acuerdo con lo solicitado por ICH; todos los valores obtenidos fueron satisfactorios. Para verificación del alcance del método se realizó un seguimiento en el contenido de nemorosona, distribuida en seis colectas realizadas durante los meses de Junio 2014-Enero del 2015 en seis apiarios ubicados en el pacífico sur del país. Se encontró que la variación en el contenido de nemorosona sigue patrones geográficos y estacionales, disminuyendo con la transición de época lluviosa a seca. Los meses que reportaron mayor contenido de nemorosona fueron junio, agosto, setiembre y octubre. El valor más alto de nemorosona en extracto fue de 50 % m/m. A partir de los perfiles de CLAR-DAD en los diferentes apiarios y colectas realizadas, se pudo determinar que existe poca diversidad de compuestos estructuralmente relacionados con la nemorosona, siendo éste el principal.

2.1 Introducción

Debido a que el origen de los propóleos, así como su composición está sujeto a la variabilidad de la flora local y a su ubicación, la estandarización resulta un reto (1). Si bien en muchos de los casos reportados en la literatura, la actividad biológica que presentan estos materiales es prometedora, no se describe en detalle el origen estacional o geográfico por lo que se podría comprometer la respuesta en caso de variar factores como la fecha de recolección o zona geográfica (2, 3). La estandarización en general de materia prima con fines farmacológicos es necesaria para establecer una relación causa-efecto que pueda ser reproducible a lo largo de tiempo (4). Existen diferentes propuestas para la estandarización de propóleos, donde la que está tomando cada vez más auge parte de la caracterización de un método cuantitativo que permita dar seguimiento a la composición ya sea de los componentes mayoritarios o de los principios activos previamente identificados (3, 5).

La composición promedio de un propóleos es 50 % de resinas vegetales, 30 % ceras, 10 % aceites aromáticos, 5 % polen y 5 % de otras sustancias no identificadas y amplio margen de variación (2). Esa distribución se mantiene relativamente constante a pesar de las variaciones geográficas de flora circulante, por lo que los métodos cromatográficos resultan muy convenientes principalmente por su capacidad de resolución y robustez.

El método cromatográfico más utilizado en la actualidad es la cuantificación de fenoles/flavonoides en conjunto con la capacidad antioxidante (6). Sin embargo, al incluir el componente geográfico, la caracterización de la capacidad antioxidante resulta insuficiente para describir apropiadamente las propiedades farmacológicas que un propóleo podría desarrollar sin caer en datos insuficientes o poco reproducibles. La ampliación del concepto de estandarización ha dado un nuevo camino hacia la cuantificación de los componentes bioactivos, principalmente mediante métodos cromatográficos tales como la cromatografía en capa fina (TLC, siglas en inglés) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, siglas en inglés). Este nuevo concepto se ha aplicado en propóleos principalmente de regiones como Brasil y Cuba, identificando gran diversidad de productos bioactivos (7). En la línea de cromatografía líquida se han dado avances, pero aún quedan muchas líneas de investigación

por explorar. Cabe mencionar el trabajo pionero de Cuesta-Rubio et al., 2001 (8) quien estableció un método CLAR-DAD para la determinación de nemorosona en propóleos cubanos dando rendimientos aceptables en términos de resolución cromatográfica, pero quedando pendiente la validación rigurosa de la respuesta obtenida, algo indispensable si se desea utilizar para fines industriales. Esto sirve de contexto para enfrentar la estandarización de propóleos en Costa Rica, donde se presenta un gran reto al contar con una amplia diversidad ecológica en un territorio pequeño, lo que resulta en una mezcla ideal para la producción de propóleos costarricenses que exhiban propiedades de interés farmacológico.

En Costa Rica se dieron los primeros pasos hacia la caracterización de la producción de propóleos en todo el territorio nacional. Un estudio dirigido por Umaña et al., 2013 (9) caracterizó para un total de 24 apiarios (129 muestras totales) productores de propóleos, mediante resonancia magnética nuclear y técnicas estadísticas multivariadas, tres quimiotipos particulares: Apiarios ricos en terpenos (Quimiotipo E), apiarios ricos en restos aromáticos prenilados (Quimiotipo C y D) y apiarios en ésteres de fenil propanoides (quimiotipo B). Dentro del quimiotipo D, se identificaron varios apiarios donde se producen propóleos ricos en nemorosona ubicados principalmente en la zona sur del país. Dadas las condiciones climatológicas y geográficas de Costa Rica es de esperar una variación en el contenido de este metabolito a lo largo de tiempo, de manera que si se considera como materia prima ya sea para fines farmacológicos o de investigación, se hace indispensable cuantificar su contenido y caracterizar su variabilidad en el tiempo.

En este capítulo se presentan los principales hallazgos sobre la variación del contenido de nemorosona en el tiempo y sitio geográfico utilizando un método cromatográfico validado para la cuantificación como herramienta.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Recolección de propóleos y selección de sitios de muestreo: Dado que los propóleos son matrices complejas y con una heterogeneidad intrínseca, se siguió para la selección para los sitios de muestreo se siguió un muestreo aleatorio simple, distribuido en 6 colectas diferentes cada dos meses para cada apiario, tomando en cuenta aleatoriamente colmenas diferentes por apiario en cada colecta. Las colectas se realizaron entre los meses de junio a enero de los años 2014 y 2015 respectivamente. La selección de los sitios de muestreo tomó como referencia el contenido de nemorosona según lo descrito por Umaña et al., 2013 (9). El muestreo se realizó en la zona sur del país, se incluyeron seis apiarios de los cantones de Coto Brus (ID:19) y Buenos Aires de la provincia de Puntarenas (ID:20 y 48), Turrubares (ID: 29) y Pérez Zeledón (ID: 35 y 47) de la Provincia de San José. Los propóleos se colectaron utilizando rejillas de extracción, las cuales fueron proporcionadas por parte del CINAT-UNA. Las muestras fueron almacenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

2.2.2 Preparación de extractos etanólicos: Se preparó un extracto por cada colmena y colecta realizada. Para ello se pesó 0,400 gramos de propóleo seco en viales limpios de 20 mL, se extrajo utilizando 10 mL de Etanol absoluto (CAS # 64-17-5, Merck) en baño sónico por 10 min. Seguidamente se centrifugó (Svant, modelo: SC200), por 5 min, se tomó el líquido sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfirió a un vial de 40 mL para evaporar hasta sequedad utilizando un evaporador rotatorio (Buchi, modelo R-111). Se repitió el proceso de extracción hasta que el material residual tomara un tono grisáceo. Los extractos finales se almacenaron en un recipiente oscuro para protegerlos de la Luz y refrigeración a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su análisis.

2.2.3 Análisis del contenido de Nemorosona por CLAR-DAD: Se pesó de 6,00-8,00 mg de extracto etanólico. Se disolvió con 1,0 mL de Etanol absoluto, seguidamente se trasvasó cuantitativamente a un balón de 25,00 mL y se aforó con etanol absoluto. Se filtraron aproximadamente 2 mL mediante un filtro de celulosa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$, para su posterior inyección en cromatógrafo líquido con detección por arreglo de diodos (CLAR-DAD) Agilent serie 1260. Se utilizó una columna Agilent Zorbax-Eclipse Plus C-18, $4,6\text{ x }150\text{ mm}$,

5 μm . La preparación de muestras se realizó en un cuarto con luz amarilla, para reducir la fotodegradación que pudieran experimentar durante su manipulación. Para la elusión cromatográfica se utilizó una fase móvil compuesta por Metanol (CAS 67-56-1, Merck) como disolvente A y Ácido Acético al 2 % v/v (CAS # 64-19-7, Merck) como disolvente B, a un flujo de 1 mL/min y con el siguiente gradiente: (A:B) 50 % v/v inicial, se mantiene en gradiente lineal hasta 20 min con 100 % v/v de A, regresa a A:B 50 % v/v al minuto 21 y se mantiene en gradiente cero hasta minuto 25. Se utilizó una longitud de onda de cuantificación de 254 nm y una longitud de onda de cualificación de 280 nm. La temperatura utilizada en el horno de la columna fue de 40 °C. Para la cuantificación de nemorosona en los extractos se utilizó una curva de calibración externa en dos rangos analíticos: (2,2-11,2) mg/L y (26,8-174,0) mg/L. Cada colmena de cada colecta fue analizada por duplicado.

2.2.4 Validación del método cromatográfico CLAR-DAD: La validación se realizó de acuerdo con la Guía de Validación Q2, 2005 del Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) (10). Se utilizó un estándar de nemorosona aislado y caracterizado a partir de propóleos costarricenses con una pureza espectral de 99,0 %, determinada mediante CLAR-DAD. Para su obtención se utilizó un apiario con un alto contenido de nemorosona, el cual fue identificado gracias al trabajo realizado por Umaña et al., 2013 (9). Posteriormente, utilizando cromatografía preparativa en conjunto con cromatografía de capa fina se separó y purificó la nemorosona que posteriormente fue caracterizada estructuralmente mediante ^1H -RMN de 1D y 2D y CL-MS/MS.

2.2.5 Análisis estadísticos y cálculos computacionales: Las pruebas de efecto sobre el contenido de nemorosona según el apiario y meses de colecta se realizó utilizando el programa JMP ® 16.0.0. Los cálculos de pKa relacionado con el protón de intercambio enólico y la distribución porcentual de especies según el pH se realizó utilizando el software MarvinSketch 14.12.1.10.

2.3 Resultados y Discusión

La selección de apiarios para el seguimiento de la variación del contenido de nemorosona se realizó en la zona sur del país (ver **Figura 8**), la cual posee apiarios con alta concentración de nemorosona (9), por lo que resultaron ideales para monitorear la variación en el contenido de este metabolito con el tiempo. La selección de los meses de julio-enero para realizar el muestreo se hizo con el objetivo de asegurar la época lluviosa y una máxima floración pues el aislamiento de nemorosona en propóleos costarricenses sugiere que las abejas colectan resinas florales de plantas del Género *Clusia* las cuales florecen en esta época.

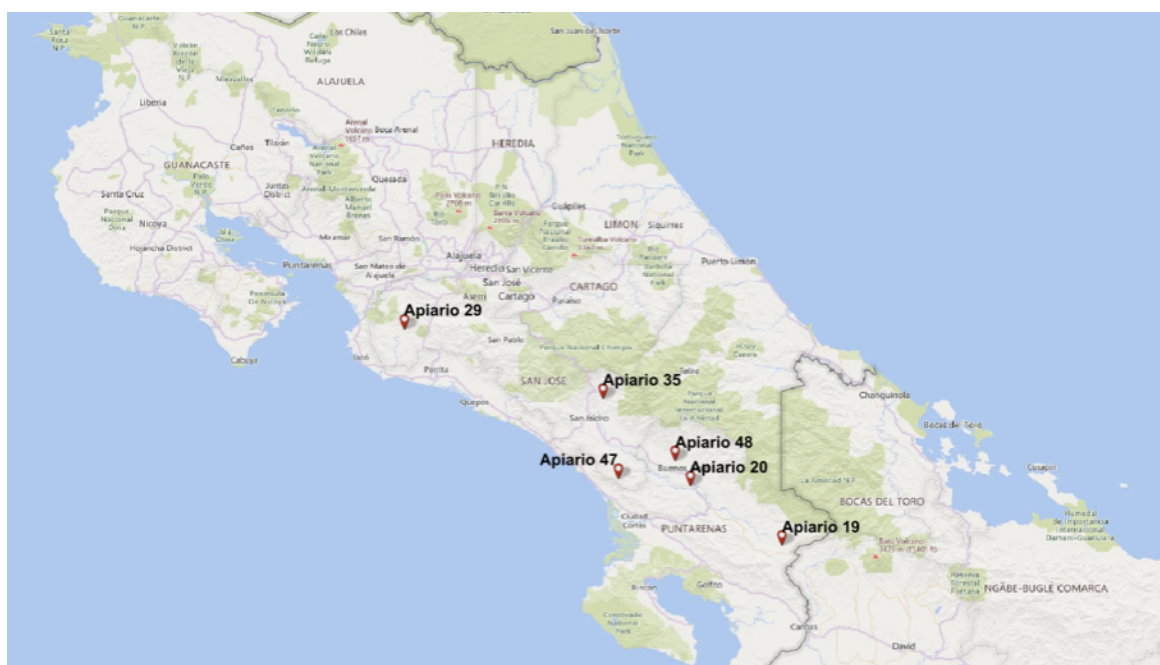


Figura 8. Sitios de muestreo seleccionados para la determinación de la variación del contenido de nemorosona en el tiempo.

Para poder realizar apropiadamente el seguimiento del contenido de nemorosona se validó un método cromatográfico CLAR-DAD que permitiera la identificación y cuantificación de forma inequívoca así como el análisis de los perfiles químicos. En el **Cuadro 2** se muestran las figuras de mérito que se seleccionaron de acuerdo con la recomendación de la Comisión Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) (10) para la validación de métodos analíticos utilizados con fines farmacéuticos.

La determinación de la linealidad se hizo con el fin de cubrir apropiadamente la variabilidad en los resultados sin un compromiso analítico, por lo que para efectos de medición el rango se separó en dos curvas de calibración que permitieran reducir la dispersión del modelo de calibración relacionada con los valores extremos y adicionalmente evitar recurrir a diluciones que pudieran aumentar la incertidumbre. La exactitud se evaluó utilizando una matriz de propóleo enriquecida con una cantidad conocida de nemorosona; el resultado se considera satisfactorio pues de acuerdo con la AOAC para concentraciones en fracción de masa de 1 (100 %) se espera una recuperación de (98-102) % si bien el valor obtenido es ligeramente menor (96,1 %) es apropiado para fines de estandarización.

Cuadro 2. Figuras de mérito evaluadas durante la validación del método utilizado para la determinación del contenido de nemorosona en propóleos costarricenses. r: repetibilidad, R: reproducibilidad, LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación.

Linealidad		Ámbito de trabajo (% m/m)	LD (% m/m)	LC (% m/m)	Exactitud	Precisión	
					Nemorosona (% m/m)	r	R
Bajo	$y = 15,215x + 8,448$ $R^2 = 0,996$	(0,86-67,23)	0,26	0,86	48,8 ± 0,4 (96,1 % Recuperación)	HorRat = 0,51	HorRat = 1,03
Alto	$y = 16,362x - 2,1423$ $R^2 = 0,997$						

Se evaluó la precisión mediante la descomposición en componentes de repetibilidad y reproducibilidad y determinó su conformidad mediante el coeficiente de Horwitz (11). En términos de repetibilidad (r) se considera satisfactorio cuando el valor de HorRat es menor a 1,3 lo que refleja una variación máxima del 67 % sobre la desviación estándar predicha para el nivel de concentración al realizar las mediciones (12), para el caso de reproducibilidad se considera satisfactorio cuando el HorRat es menor a 2, lo que significa una variación del doble sobre la desviación estándar predicha. Para ambos parámetros los resultados fueron satisfactorios.

Una de las limitaciones al inicio de la validación fue la obtención de la nemorosona con el grado de pureza necesario para utilizarse como estándar de referencia para toda la validación y cuantificación de los diferentes propóleos, dado que este compuesto no se consigue

comercialmente con grado estándar. La caracterización estructural se realizó mediante RMN de 1 y 2 dimensiones y Espectrometría de Masas, la determinación de la pureza se realizó mediante CLAR-DAD.

En la **Figura 9.A** se muestra un cromatograma del estándar de nemorosona utilizado durante la preparación de las curvas de calibración, donde el único pico observable en UV es justamente el de la nemorosona. En la **Figura 9.B y C** se muestra el cálculo de la pureza mediante la superposición de un barrido espectral que va desde los (200-400) nm; la similitud entre cada espectro determina la pureza de la señal cromatográfica. El valor obtenido fue de 99,8 %, garantizando así la identificación y cuantificación confiable de la nemosona.

La selección de la longitud de onda apropiada para la cuantificación se hizo a partir de un barrido espectral (ver **Figura 10**) donde se indentificaron dos máximos a 254 y 280 nm. Para la cuantificación se utilizó 254 nm y no 280 nm como en otros trabajos reportados (8), al ser el máximo de mayor intensidad y que por lo tanto brindaría una respuesta más selectiva, la longitud de onda de 280 nm se utilizó para confirmación de identidad.

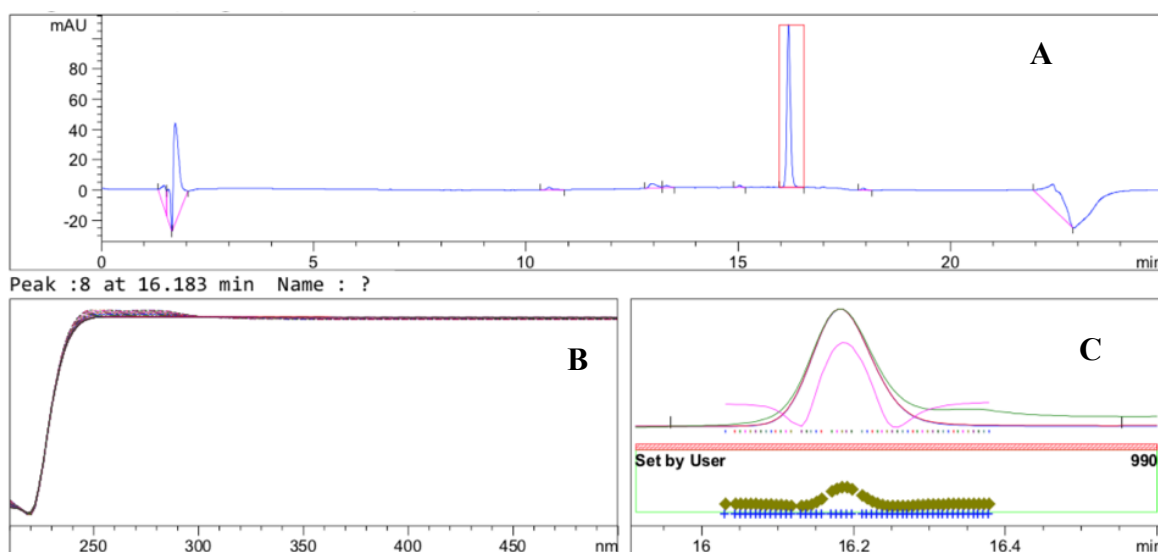


Figura 9. Estimación de la pureza espectral de de nemorosona, concentración: 33,6 mg/L: A-Cromatograma del estándar, Tr: 16,18 min, B-Diferencia espectral para los puntos adquiridos a el tiempo de retención indicado, C-Evaluación de pureza espectral (Pureza: 99,8 %).

La definición de las condiciones cromatográficas apropiadas se logró luego de realizar varias pruebas (ver **Figura 11**), las cuales mostraron cómo más apropiado un método cromatográfico en fase reversa y con una columna de relleno C18 (octadecilsilano). El factor de mayor influencia en la resolución del cromatograma fue el pH de la fase móvil, ya que fue necesario un ajuste de $\text{pH} \approx 2,4$ para optimizar la simetría de la señal cromatográfica de la nemorosona, confirmando la recomendación indicada en la literatura al respecto (8). De forma paralela se realizaron cálculos *in silico* para determinar el valor ideal de pH a partir del cual se tendría una especie dominante, para ello se estimó el valor de pK_a utilizando un modelo cinético optimizado por ChemAxon® (13) el cual considera efectos de tautomerización y proximidad (interacciones puente de hidrógeno) en moléculas polipróticas, cómo es el caso de la nemorosona.

A partir de los cálculos computacionales se determinó que la causa se puede atribuir al protón de intercambio asociado al equilibrio enólico, el cual tiene un mayor carácter ácido ($\text{pK}_a = 3,53$, *in silico*) cuando la nemorosona se encuentra en su tautómero B (ver **Figura 17**), por lo que con el ajuste de pH se rompe el tautomerismo, lo que causa una mejora en la respuesta cromatográfica. La polaridad del fase móvil también posee un rol importante, pues afecta directamente el tiempo de retención, en este trabajo se optó por un gradiente lineal que si bien retrasa un poco la detección de la nemorosona ($\text{Tr}: 16,2 \text{ min}$) mejora significativamente la resolución cromatográfica.

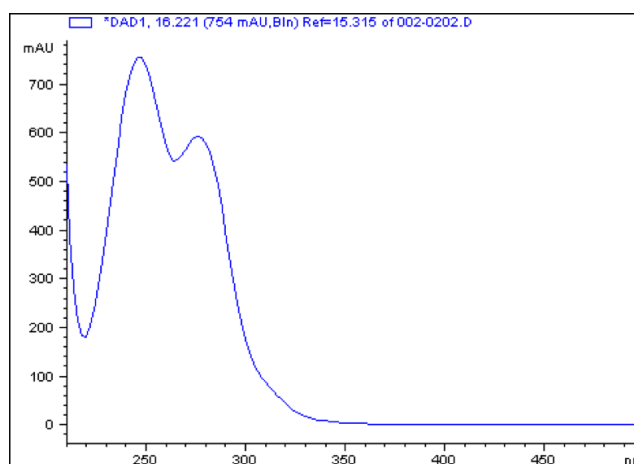


Figura 10. Espectro UV de la nemorosona, Concentración: 174 mg/L , $\lambda_{Max}^{EtOH} [\text{mAu}] = 251 \text{ nm}, 282 \text{ nm}$.

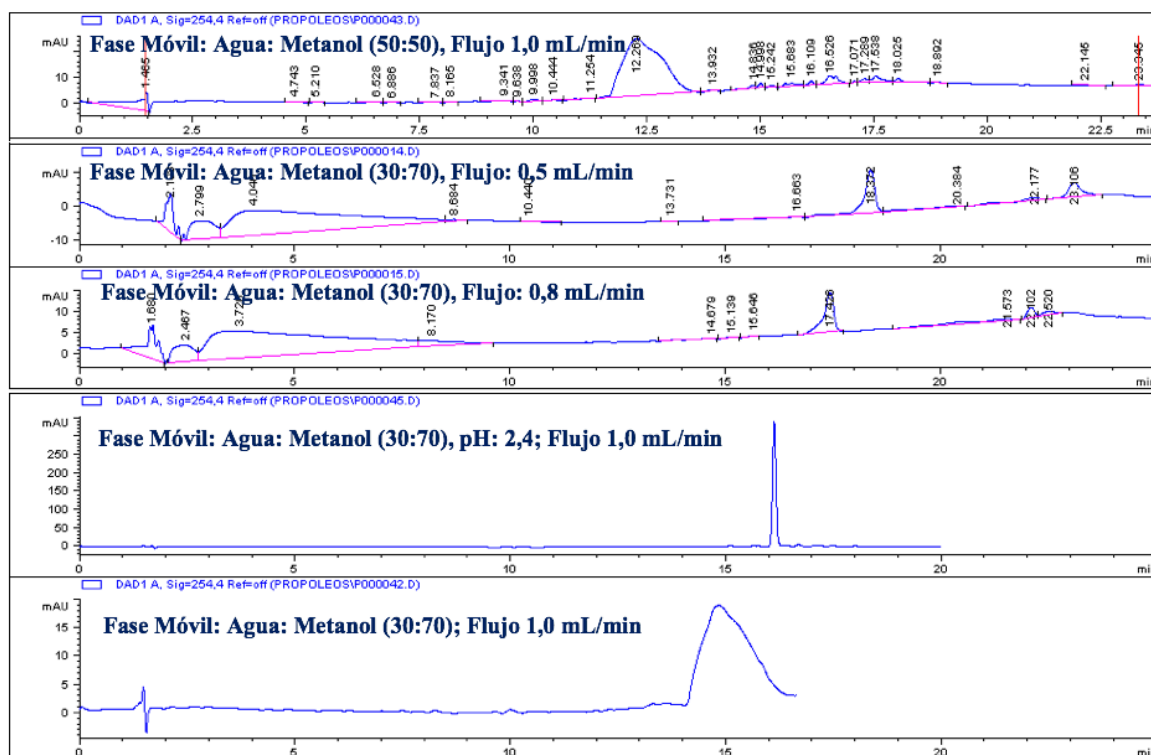


Figura 11. Algunas de las pruebas realizadas durante la verificación del método cromatográfico CLAR-DAD utilizado para la determinación de nemorosona en propóleos costarricenses.

En todos los propóleos analizados se observaron perfiles cromatográficos con poca diversidad de señales (ver **Figura 12**), tomando en cuenta la información relacionada con la composición de los propóleos costarricenses es de esperar esta respuesta pues la mayoría de compuestos presente serían altamente saturados y con pocos grupos cromofóricos que permitan la detección utilizando detectores de longitud de onda variable, diferenciándose significativamente de propóleos de otras latitudes como el caso de los de origen cubano o brasileño que muestran una mayor diversidad en compuestos de la misma familia de la nemorosona (7, 14, 15). Esta particularidad le da una ventaja al método utilizado en términos de selectividad para la identificación de la nemorosona y en general compuestos relacionados biosintéticamente.

El seguimiento en el tiempo de la variación del contenido de nemorosona también permitió estudiar la presencia de otros compuestos estructuralmente relacionados, a diferencia de propóleos de otras regiones como el caso de los de origen cubano (14,15). En las **Figuras 13 y 14** se observan los perfiles CLAR-DAD de los apiarios con mayor y menor variabilidad en contenido de nemorosona siendo éstos los apiarios 35 y 48 respectivamente. La cantidad de picos diferentes a la nemorosona es muy poca y en su mayoría parecen tener menor polaridad, se observa un claro efecto estacional sobre la variación de estos, principalmente en las colectas 1, 2 y 3 que corresponden con los meses de julio, agosto y setiembre.

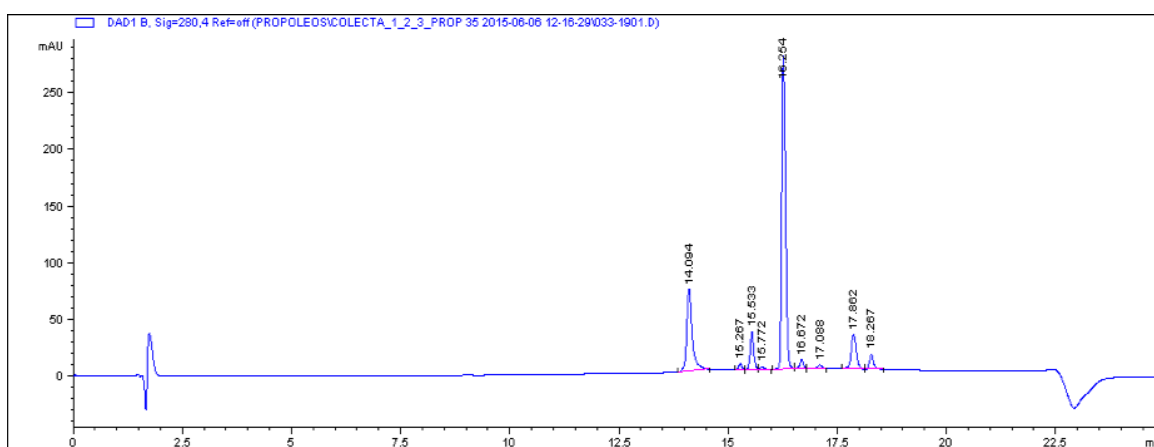


Figura 12. Perfil cromatográfico característico de un extracto de propóleo ($\lambda=280$ nm, propóleo 35, colecta 1) cuyo componente principal es la nemorosona.

El resultado del seguimiento del contenido de nemorosona en el tiempo (ver **Figura 15**) muestra una disminución en concordancia con la transición de la época lluviosa (mayo-noviembre) a época seca (diciembre-mayo), esto posiblemente se daba a los períodos de floración de las plantas del género *Clusia* adonde se presume las abejas colectan este metabolito (16). La relación entre el contenido de nemorosona con el apiario muestreado y el mes de recolección se exploró mediante una prueba de efectos, en el **Cuadro 3** se resumen los resultados obtenidos.

En relación con el sitio de muestreo se observan tres grupos con diferencias estadísticamente significativas. El grupo A corresponde a los apiarios con el mayor contenido de nemorosona (48, 19 y 20) y con un comportamiento semejante a lo largo del muestreo realizado. El apiario 47 muestra una diferencia significativa del resto del grupo debido a su comportamiento en

tiempo, pues en una de las colectas tuvo un resultado de contenido de nemorosona menor al límite de cuantificación. Los apiarios 35 y 29 mostraron el menor contenido de nemorosona. En el caso del apiario 29, solo se pudo colectar propóleos en las colectas 1, 2 y 3; adicionalmente es importante destacar que este apiario se encuentra en un región diferente (Región Central) lo que puede afectar significativamente tanto el rendimiento en producción de propóleo como el contenido de nemorosona, sin embargo se debe explorar más a detalle esta relación.

Los meses en los que las muestras recolectadas mostraron un mayor contenido de nemorosona y un comportamiento constante entre los diferentes sitios fueron los identificados con la letra E siendo junio, agosto, setiembre y octubre siendo ideales para la recolección de propóleos con un alto contenido de nemorosona y con una menor variabilidad (ver **Cuadro 3**). Los meses de julio y noviembre muestran una diferencia significativa debido a la variabilidad en los resultados obtenidos, el caso particular del mes de julio se debe a un resultado atípico en la segunda colecta del apiario 47 (ver **Figura 15**) cuyo contenido promedio de nemorosona fue significativamente menor del resto de colectas. En el caso de noviembre, diciembre y enero corresponden con los meses de mayor variabilidad y menor contenido de nemorosona, de forma que no sería recomendable recolectar propóleos en este periodo. Es posible que esto se deba al ingreso de la época seca (diciembre a mayo) que estaría afectando la floración de las especies de *Clusias*.

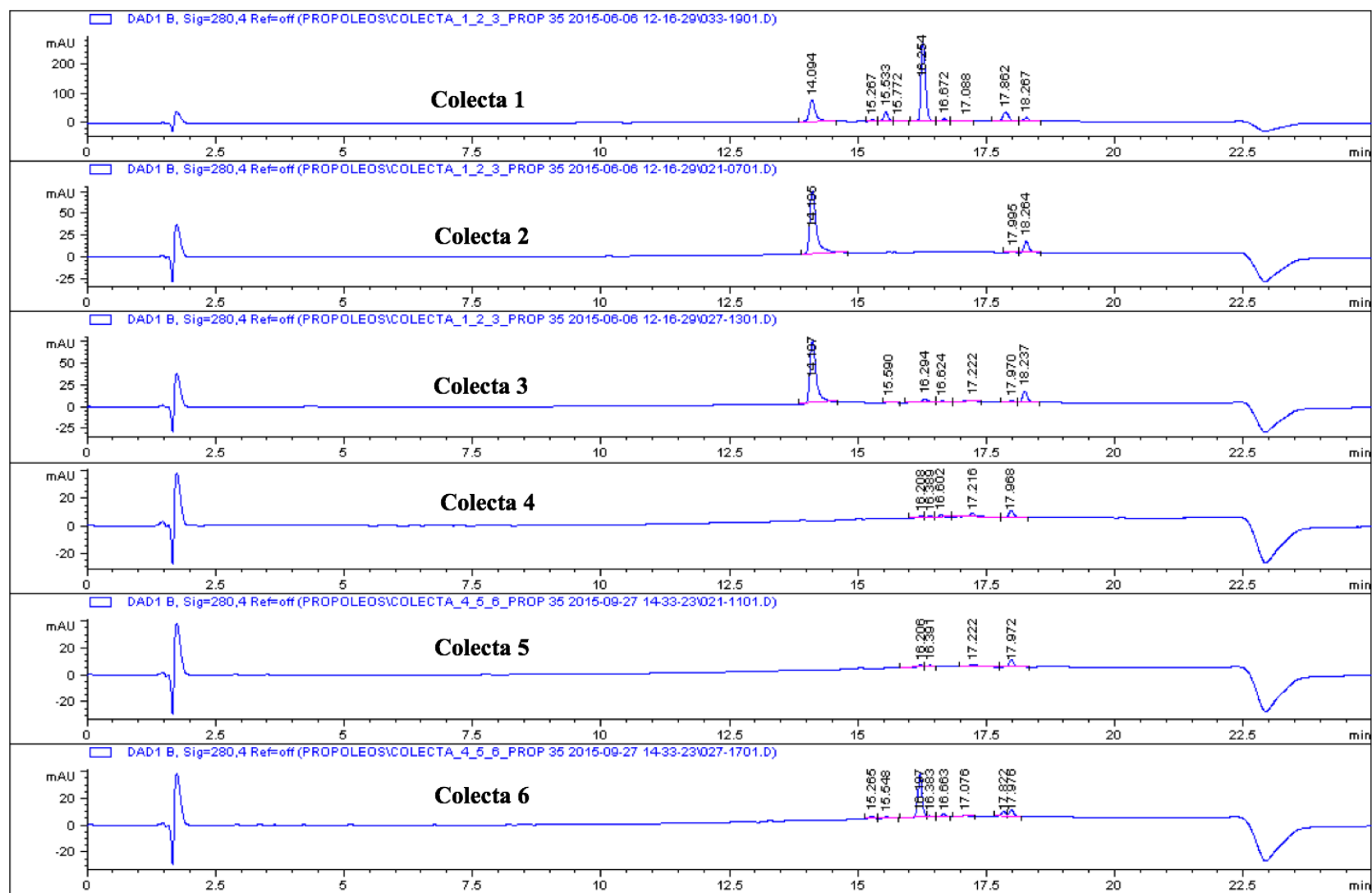


Figura 13. Variación en el perfil cromatográfico y contenido de nemorosona en algunas de las colmenas muestreadas en las colectas realizadas del apiario 35 ($\lambda = 280$ nm).

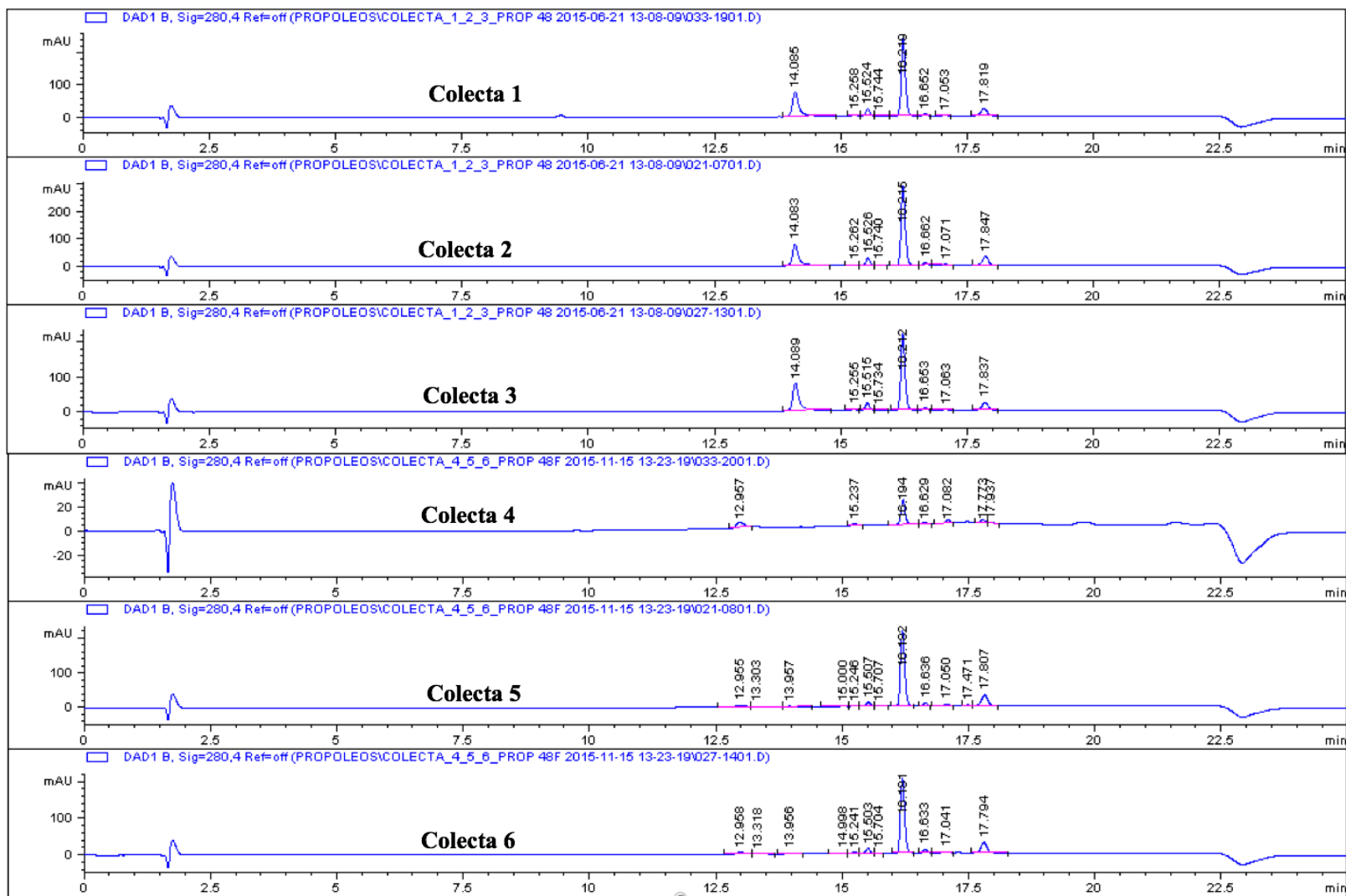


Figura 14. Variación en el perfil cromatográfico y contenido de nemorosona en algunas de las colmenas muestreadas en las colectas realizadas del apiario 48 ($\lambda = 280$ nm).

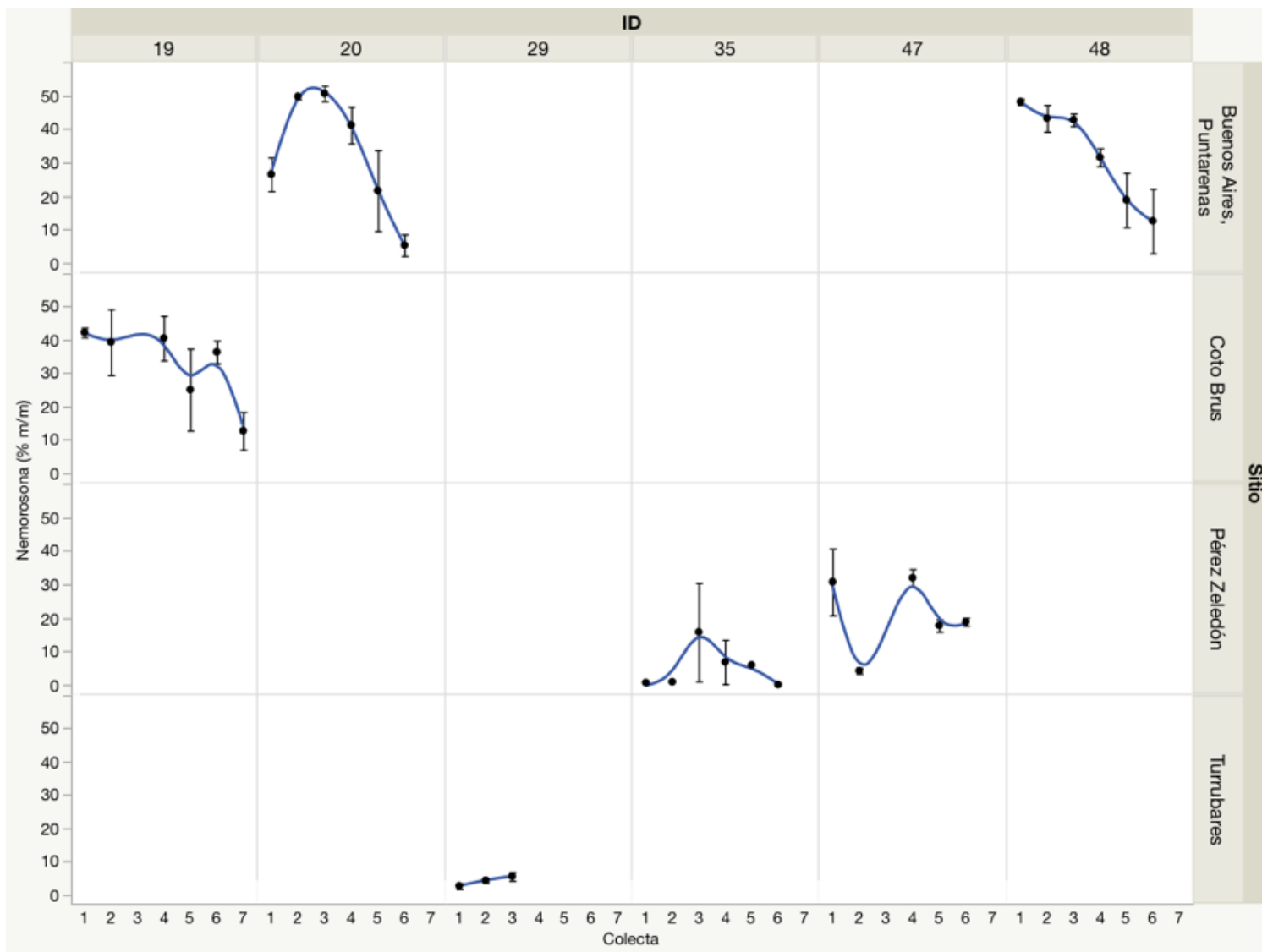
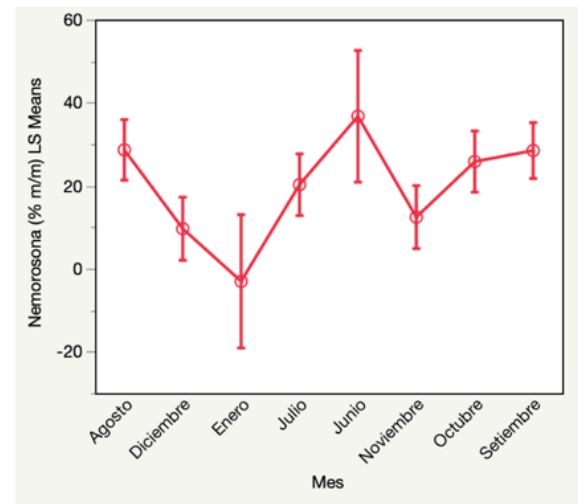
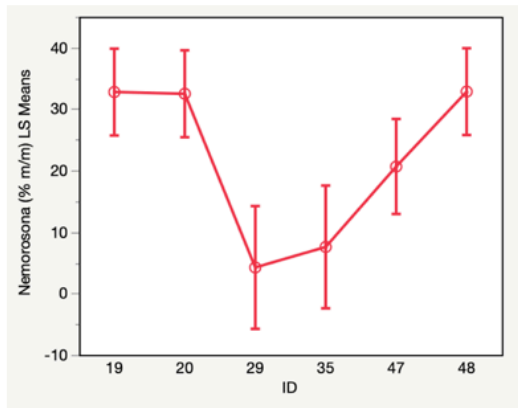


Figura 15. Variación en el contenido de nemorosona con respecto a colecta y sitio en diferentes apiarios muestreados. La línea azul corresponde a una curva alisada con el valor de las medias. Se incluyen las barras de error por cada colecta (n = 3).

Cuadro 3. Prueba de media de mínimos cuadrados (Prueba de efectos) para el contenido de nemorosona y la relación con el apiario y el mes de recolección ($\alpha = 0,050$; $t = 1,9917$). Las relaciones representadas con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas en el contenido de nemorosona, MC: Mínimos cuadrados.



Apiario	Relación	Media MC
48	A	32,8244
19	A	32,7533
20	A	32,4750
47	B	20,6360
35	C	7,5600
29	C	4,2222

Mes	Relación	Media MC
Junio	E	36,7191
Agosto	E	28,6183
Setiembre	E	28,4506
Octubre	E	25,7967
Julio	E, F	20,2345
Noviembre	F, G	12,4114
Diciembre	G	9,6260
Enero	G	-3,0513

2.4 Conclusiones

Se validó un método cromatográfico CLAR-DAD para la cuantificación del contenido de nemorosona en extractos de propóleos. La selección de las figuras de mérito evaluadas se hizo de acuerdo con lo solicitado por la Comisión Internacional de Armonización para métodos cromatográficos utilizados con fines farmacéuticos. Todos resultados de validación fueron excelentes.

La tautomería enólica conocida de la nemorosona afecta su determinación por CLAR-DAD. Cuando se utiliza un método en fase reversa es necesario ajustar el pH por debajo de 3,53; pues corresponde al valor de pKa del protón de intercambio del equilibrio enólico. De acuerdo con cálculos teóricos el tautómero predominante al pH utilizado en la fase móvil es el B.

El perfil cromatográfico promedio muestra una poca variedad de señales, lo que indica compuestos con pocos grupos cromofóricos con características similares a la nemorosona. Este aspecto le da alta selectividad al método y permite la posibilidad de ampliar su alcance a Acilfluroglicinoles policíclicos isoprenilados en general.

Los apiarios que mostraron un contenido de nemorosona mayor y un comportamiento predecible y uniforme en el tiempo fueron 48, 19 y 20. Los apiarios que mostraron menor contenido de nemorosona y mayor variabilidad fueron 35 y 29. El apiario 47 mostró un comportamiento atípico en la segunda colecta, pues el contenido promedio de nemorosona fue significativamente menor.

Los meses más apropiados para la recolección de propóleos con un alto contenido de nemorosona y respuesta uniforme en el tiempo son junio, julio, agosto, setiembre y octubre en los sitios mencionados anteriormente. En el caso del mes de julio, debe tomarse particular importancia para el apiario 47.

2.5 Referencias

1. Bankova V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 100: 114-117.
2. Salatino A., Fernandez-Silva C., Abbud Righi A., Propolis research and the chemistry of plant products, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28: 925-936.
3. Bankova V., Recent trends and important developments in propolis research, *eCAM*, **2005**, 2(1): 29-32.
4. Marquele-Oliveira F., Fonseca Y.M., Freitas O., Fonseca M., Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies, *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 342: 40-48.
5. Sforcin M., Bankova V., Propolis: Is there a potential for the development of new drugs, *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133: 253-260.
6. Popova M., Bankova V., Butovska D., Petkov V., Nikolova-Damyanova B., Gloria Sabatini A., Marcazzan G., Bogdanov S., Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis, *Phytochemical Analysis*, **2004**, 15: 235-240.
7. Piccinelli A., Lotti C., Campone L., Cuesta-Rubio O., Campo Fernandez M., Rastrelli L., Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food. Chem.*, **2011**, 59: 6584-6491.
8. Cuesta-Rubio O., Frontana-Uribe B., Ramirez-Apan T., Cárdenas J., Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone, *Z. Naturforsch.*, **2002**, 57c:372-378.

9. Umaña-Rojas E.; Solano-Arias G.; Tamayo-Castillo G., Antioxidant Activity of Costa Rican Propolis. A multivariate analysis approach. En proceso de escritura.
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), **1994**.
11. Horwitz W., Richard A., The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *Journal of AOAC International*, **2006**, 89(4):1095-1109.
12. AOAC, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, **2016**.
13. Szegezdi J., Csizmadia F., A method for calculation the pK_a values of small and large molecules, *American Chemical Society Spring meeting*, **2007**, March 25-29th.
14. Cuesta-Rubio O., Cuellar-Cuellar, Rojas N., Velez-Castro H., Rastrelli L., Aquino R., A Polyisoprenylated Benzophenones from Cuban Propolis, *J. Nat Prod.*, **1999**, 62: 1013-1015.
15. Cuesta-Rubio O., Piccinelli A., Campo Fernández M., Márquez Hernández I., Rosado A., Rastrelli L., Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55: 7502-7509.
16. Cuesta-Rubio O., Velez-Castro H., Frontana-Uribe B., Cárdenas J., Nemorosone, the mayor constituent of floral resins of *Clusia rosea*, *Phytochemistry*, **2001**, 57: 279-283.

CAPITULO III. VALIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA NEMOROSONA

Resumen

Los acilfloroglucinoles policíclicos poliisoprenilados (PPAPs, siglas en inglés) son una familia de compuestos que ha demostrado una importante actividad biológica en áreas como anticancer, antibióticos, y antioxidante entre otros. Dentro de esta familia se ubica la nemorosona que, si bien ya ha sido reportada en propóleos, se conoce poco en relación con su estabilidad química. En este trabajo se realizó la caracterización estructural mediante LC-MS/MS, CLAR-DAD, RMN: ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY y Rayos X monocristal de la nemorosona aislada a partir de propóleos costarricenses. Se estudió la estabilidad y el equilibrio tautomérico ubicado en C-2, C-3, C-4 y la estabilidad por un período de seis meses mediante ^1H -RMN; se confirmó la presencia de dos tautómeros en una relación 2:1, los cuales no sufrieron cambios estructurales significativos al conservarse en metanol durante un período de seis meses. Durante el aislamiento de la nemorosona se identificaron, aislaron y caracterizaron dos compuestos previamente reportados en la literatura: Scrobiculactona A y Scrobiculactona B. De acuerdo con evidencia cromatográfica, espectroscópica y cálculos computacionales se propusieron ambos metabolitos como posibles productos de descomposición de la nemorosona, posiblemente originados durante su aislamiento y no como PPAPs diferentes; estos compuestos han sido previamente reportado en propóleos de origen venezolano.

3.1 Introducción

La familia de metabolitos secundarios conocidos como acilfluroglicinoles policíclicos poliisoprenilados es amplia (PPAPs por sus siglas en inglés: Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols) en términos de diversidad química (1), se caracterizan por tener un núcleo biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona ó biciclo[3.2.1]octano-2,4,8-triona generalmente con sustituciones de grupos prenilo (C_5H_9) o geranilo ($C_{10}H_{17}$). Se clasifican en tres grupos: Tipo A sustituyente acilo en C-1 y un carbono cuaternario en C-8, Tipo B sustituyente acilo en C-3 y Tipo C sustituyente acilo en C-1 y carbono cuaternario en C-6 (ver **Figura 16**).

En cuanto a actividad biológica, esta familia de compuestos ha presentado un amplio espectro de respuestas dentro de las que destacan: antiséptica, antidepresiva, antibiótica, anticancerígena, entre otras (2). En la familia de la *Guttiferaceae* se han reportado la mayor parte de los PPAPs (3), sin embargo, en algunos casos se han hallado en productos relacionados con la industria apícola como la miel y en mayor proporción los propóleos (4, 5, 6). Como es el caso de este trabajo, en donde se aisló la nemorosona a partir propóleos costarricenses. Las particularidades estructurales de los PPAPs hacen difícil su caracterización y plantean muchos retos para su obtención por vía sintética (7), en el caso particular de la nemorosona la posición de los sustituyentes en los carbonos cuaternarios C-1 y C-5 (carbonos cabeza-puente) se reportaron inicialmente intercambiados (3, 28) por lo se le asignó a la familia C pero posteriormente fue rectificada como perteneciente a la familia A, gracias al trabajo de Cuesta-Rubio et al., 2001 (8) quien demostró la existencia del equilibrio ceto-enólico en el núcleo bicíclico y la correcta asignación mediante una azometilación y posterior estudio de los productos mediante RMN (8,3).

Desde su aislamiento la nemorosona ha mostrado un potencial farmacológico que la ha posicionado como un agente antimicrobiano de amplio espectro y más recientemente como anticancerígeno. El mecanismo no se tiene del todo claro, pero se ha asociado principalmente con el equilibrio tautomérico que podría actuar como un desacoplador protonofórico mitocondrial selectivo para varias líneas celulares (8, 10, 11). Estos hallazgos han despertado el interés en la obtención de la nemorosona por vía sintética (12, 13), por lo que se han dado

grandes avances en la aplicación efectiva de técnicas de ciclación para la obtención del núcleo complejo biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona (2).

Adicionalmente en el proceso de síntesis se ha descubierto información relevante en torno a la estabilidad de las PPAPs y en particular de la nemorosona. Se ha propuesto que el mecanismo general de descomposición iniciaría con una ciclación concertada que podría favorecerse por factores como la polaridad y tipo de disolvente utilizado, sin embargo, no está del todo claro y por el momento es la única propuesta existente para la nemorosona (14). En este trabajo se busca aportar conocimiento en torno las características estructurales de la nemorosona y su relación con una posible ruta de descomposición.

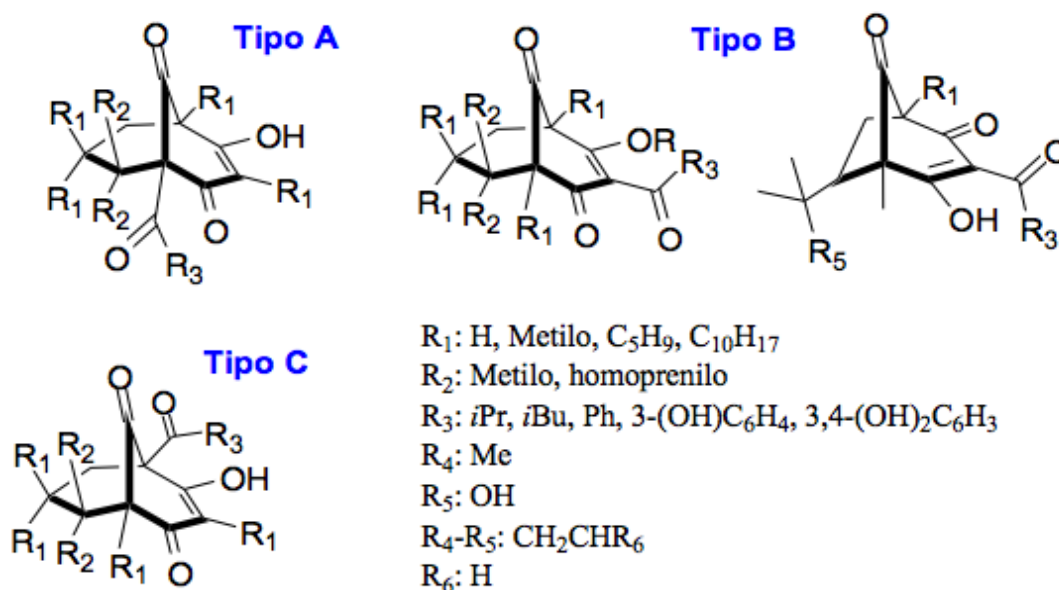


Figura 16. Principales características estructurales de las tres familias de PPAPs que se han reportado en la literatura.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Aislamiento y cristalización de la Nemorosona: fue aislada y purificada mediante cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) a partir de una mezcla de las colectas 1-6 del apiario 48. Se pesaron 100 mg de extracto etanólico de propóleo y separaron en cromatofolios de vidrio de (20 x 20) cm recubierta con silica gel (CAS: 112926-00-8, GF₂₅₄, Merck) utilizando una fase móvil de hexano (CAS: 110-54-3, Merck) y acetato de etilo (CAS: 141-78-6, Merck) en relación 7:3, se recolectó la fracción con un $R_f \approx 0,6$. Se monitoreó la separación mediante la revelación con solución metanólica DPPH (CAS: 1898-66-4, Merck) a 1 mg/mL. Se determinó la pureza mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (CLAR-DAD) a $\lambda = 254$ nm utilizando el método descrito en el **CAPÍTULO III**. Se pesó 5 mg del producto purificado, se disolvió en 600 μ L de metanol-d₄ (CAS: 811-98-3; Merck; 99,8 % D) para su análisis en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La caracterización cristalográfica se hizo a partir de cristales obtenido mediante una evaporación lenta, a temperatura ambiente de una disolución sobresaturada Etanol:Agua (80:20) de 100 gramos de extracto etanólico de propóleo enriquecido con nemorosona.

3.2.2 Aislamiento de los productos Scrobiculactona A y Scrobiculactona B: fueron aisladas y purificadas mediante cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) a partir de una mezcla de las colectas 1-6 del apiario 48. Se pesaron 100 mg de extracto etanólico de propóleo y separaron en cromatofolios de vidrio de (20 x 20) cm recubierta con silica gel (CAS: 112926-00-8, GF₂₅₄, Merck) utilizando una fase móvil de hexano (CAS: 110-54-3, Merck) y acetato de etilo (CAS: 141-78-6, Merck) en relación 7:3, se recolectó la fracción con un $R_f \approx 0,70-0,75$. Se monitoreó la separación mediante la revelación uso de la longitud de onda corta en lámpara UV. Posteriormente se purificó mediante CLAR-UV a $\lambda = 254$ nm utilizando una columna Xterra RP18 150 x 3,9 mm de 5 μ m de tamaño de partícula, Se utilizó un flujo de 1 mL/min, isocrático, una fase móvil de (95:5) v/v de Metanol (CAS: 67-56-1, Merck) y agua desionizada respectivamente. Se pesó 5 mg del producto purificado, se disolvió en 600 μ L de metanol-d₄ (CAS: 811-98-3; Merck; 99,8 % D) para su análisis en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

3.2.3 Medición de espectros RMN: se utilizó un equipo Bruker, modelo: Ascent de 600 MHz. La adquisición de los espectros de 1D de la nemorosona, según cada disolvente se realizaron utilizando los pulsos zg30 para ^1H y zgpg30 para ^{13}C con los siguientes tiempos de adquisición: a. Metanol- d_4 : 2,72 s para ^1H y 0,90 s para ^{13}C , b. Acetonitrilo- d_3 : 2,72 s para ^1H y 0,80 s para ^{13}C , c. Cloroformo- d : 2,72 s para ^1H y 0,90 s para ^{13}C , d. DMSO- d_6 : 2,72 s para ^1H y 0,90 s para ^{13}C . La adquisición de los espectros de las Scrobiculactonas A y B se hizo utilizando como disolvente cloroformo- d , se utilizaron los pulsos zg30 para ^1H y zgpg30 para ^{13}C y un tiempo de adquisición de 4,08 s para ^1H y 1,36 s para ^{13}C . La obtención de los espectros de 2D se realizaron utilizando los siguientes programas de pulsos: cosygpmfppf, hmbcetgp13nd y hsqcedetgsp3. La temperatura de medición fue de 298,1 K, excepto para el estudio del tautomerismo adonde se utilizó un gradiente escalonado de temperatura (218-308) K. Se utilizará “.” para separar los decimales en los datos de δ .

3.2.4 Cálculos computacionales: Todos los cálculos mecánico-cuánticos se realizaron utilizando el software TURBOMOLE 7.2 quantum chemical (15). Los cálculos para la confirmación de la configuración absoluta de la nemorosona (descartar su epímero 7-epi-nemorosona) se realizaron utilizando la teoría de perturbación de segundo orden de Moller-Plesset (MP2) para resolución de identidad (RI), al vacío y en metanol. Los efectos de solvatación se tomaron en cuenta mediante el modelo DCOSMO-RS. Todas las geometrías fueron estrictamente optimizadas, para ello se utilizó cc-pVTZ (all-electron) y su conjunto de basis set auxiliar (16). Las constantes de blindaje para RMN (Shielding constants) del confórmero 7S se calcularon a partir de geometrías optimizadas utilizando método GIAO (gauge-including atomic orbital) con un nivel de teoría MP2 junto con un basis set pcSseg-1 (all-electron) (17). Para análisis de la población de los productos A y B se consideró una distribución de Boltzmann a 298,15 K.

3.2.5 Medición de Rayos X de Monocristal: Las mediciones se realizaron utilizando un difractómetro Bruker D8 Venture, los softwares de procesamiento utilizados fueron: Bruker Instrument Service vV6.2.3, SAINT V8.37A (Bruker AXS Inc., 2015), XT, VERSION 2014/5, SHELXL-2014/7 (Sheldrick, 2014), shelXle (C,B, Huebschle, rev 758). En el siguiente cuadro se resumen los datos cristalográficos, adquisición y refinamiento:

Cuadro 4. Resumen de los principales datos cristalográficos de la nemorosona, así como los ajustes utilizados de adquisición y de refinamiento.

Datos cristalográficos	
Nombre común	Nemorosona
Fórmula química	C ₃₃ H ₄₅ O ₅
Peso atómico	520,68 g/mol
Sistema cristalino; grupo espacial	Ortorrómico; P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Temperatura (K)	100
a, b, c (Å)	9,2872(2); 12,8426(2); 24,5930(5)
V (Å ³)	2933,25(10)
α; β; γ	90;90;90
Tipo de radiación	Cu Kα
μ (mm ⁻¹)	0,616
Tamaño de cristal (mm)	0,250 x 0,200 x 0,150
Factor R	0,0665
Factor Flack	0,1592
Descripción del cristal	Bloque
Color	Blanco claro
Datos de adquisición	
Corrección de absorción	Multi-Scan (SADABS-2014/5)
T _{min} ; T _{max}	0,6030; 0,7531
No de mediciones, reflexiones independientes y [I > 2σ (I)]	5311; 4873
R _{int}	0,0567
(sin θ/λ) _{max} (Å ⁻¹)	0,989
Refinamiento	
R [F ² > 2σ (F ²)], wR(F ²), 2	0,0610; 0,1592; 1,041
No de Reflexiones	5311
No de Parámetros	363
H-átomos tratamiento	Mixed
Δρ _{max} , Δρ _{min} (e Å ⁻³)	1,324; -0,516

3.2.6 Determinación de rotación específica $[\alpha]_D$: los cristales utilizados para la medición de rotación específica se obtuvieron mediante una evaporación lenta, a temperatura ambiente, de una disolución sobresaturada Etanol:Agua (70:30) con 20 gramos de extracto etanólico de propóleo enriquecido con nemorosona. La determinación se hizo con una concentración de 0,7 mg/mL de nemorosona en etanol, utilizando una lámpara de sodio (D) a 21°C. Las mediciones se realizaron en la Escuela de Medicina de Harvard gracias a la colaboración del profesor Timothy R. Ramadhar, Ph.D.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización estructural de la nemorosona mediante RMN y medición de rotación específica

Se seleccionó el metanol- d_4 como disolvente de medición inicial, dado que en cloroformo- d se observaba la tautomería reportada en la literatura (8), lo que dificultaba la apropiada asignación de las señales (ver **Figuras 18 y 19**). De esta forma fue posible observar un solo tautómero y así confirmar la clasificación de la nemorosona (ver **Figura 17 y Figura 22**) dentro del grupo A de las PPAPs propuesto por Grossman y colaboradores (1,2) pues de acuerdo con el espectro ^{13}C el desplazamiento químico de 77.0 ppm para C-1 coincide con un carbono puente para un sistema biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona fuertemente desprotegido por un sustituyente acilo y C-8 con el desplazamiento químico de 47.6 ppm corresponde con un carbono cuaternario con una sustitución -gem- dimetilo, confirmada posteriormente mediante HMBC y reportes en la literatura (18).

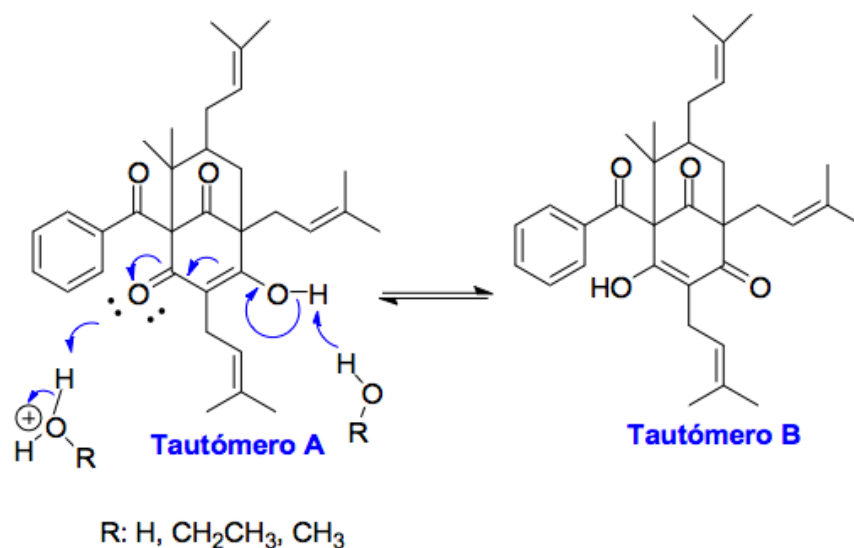


Figura 17. Estructura de la nemorosona indicando la ubicación de equilibrio enólico

El núcleo biciclo [3.3.1]nonano-2,4,9-triona presenta un desplazamiento mayor al esperado (19), debido al efecto desprotector que ejercen el sistema tricarbónico, este se pudo reconocer mediante ^{13}C donde el C-9 mostró un desplazamiento de 209.1 ppm (ver **Cuadro 5**) y los carbonos C-2 y C-4 tuvieron un desplazamiento a 193.8 y 175.1 ppm respectivamente. El carbono C-3 (119.2 ppm) a diferencia del C-7 (43.1 ppm) muestra un

desplazamiento mucho mayor, lo cual confirma su identidad al ser un carbono sp^2 y encontrarse α a un sistema dicarbonilo cetónico conjugado (C-2, C-3, C-4). La presencia del grupo benzofenona como sustituyente en C-1 se confirmó mediante 1H a partir de los desplazamientos observados en la región aromática (7.62; 7.45; 7.28 ppm) los cuales son propios de un sistema monosustituido con un grupo electroextractor lo es el carbonilo (ver **Figura 18**). La presencia de sustituyentes isoprenilos se confirmó con el desplazamiento de los hidrógenos vinílicos H-28 a 5.10 ppm; H-18 a 5.11 ppm y H-23 a 5.02 ppm (**Cuadro 3**), mediante COSY se pudo identificar los acoplamientos respectivos con H-27 (2.52 ppm, Integración: 2), H-22 (1.74; 2.16 ppm, integración: 2) y H-17 (3.10 ppm; Integración: 2), Mediante HMBC y 1H se pudo identificar los seis metilos correspondientes a tres unidades isopreno: C-20 (17.0 ppm, integración: 3) y C-21 (24.9 ppm; integración: 3), C-30 (17.1 ppm, integración: 3) y C-31 (25.1 ppm integración: 3), C-25 (16.8 ppm, integración: 3) y C-26 (25.1 ppm, integración: 3). Su ubicación se pudo definir mediante HMBC y HSQC a través de acoplamientos a larga distancia (J_3) para los carbonos C-17, C-27 y C-22.

De acuerdo con la literatura, el isómero más común de la nemorosona es la 7-epi-nemorosona (20). Si bien se aisló en la familia de la *Guttiferaceae* no se ha reportado aún en propóleos, por lo que era necesario identificar si el producto aislado se trataba de este metabolito. Gracias a uso de RMN se descartó como probable dado que el desplazamiento para el carbono C-33_{ax} en la nemorosona ocurre a campo más alto (14.92 ppm) con respecto a su epímero (23.8 ppm), de acuerdo con Cuesta-Rubio et al., 2001 (8) esto ocurre debido a una compresión estérica producto de una interacción gauche entre los carbonos C-33 ax y C-27 sobre el carbono C-7 (8).

La rotación óptica medida para la nemorosona aislada fue $[\alpha]_D^{21} = -105,4^\circ$ ($c = 0,7$; EtOH), la cual es de signo opuesta a lo reportado por Cuesta-Rubio et al., 2001 (8), $[\alpha]_D^{23} = +112,8^\circ$ ($c = 0,101$; $CHCl_3$). Nuestro resultado es consistente con respecto a la nemorosona reportada por vía sintética $[\alpha]_D^{23} = -86,3^\circ$ ($c = 1,19$; $CHCl_3$) (13). Esta medición es ampliamente afectada por la presencia de impurezas (ejmplo: agua) provenientes del proceso de aislamiento (3,13) por lo que que es posible el valor reportado previamente a este trabajo requiera revisión.

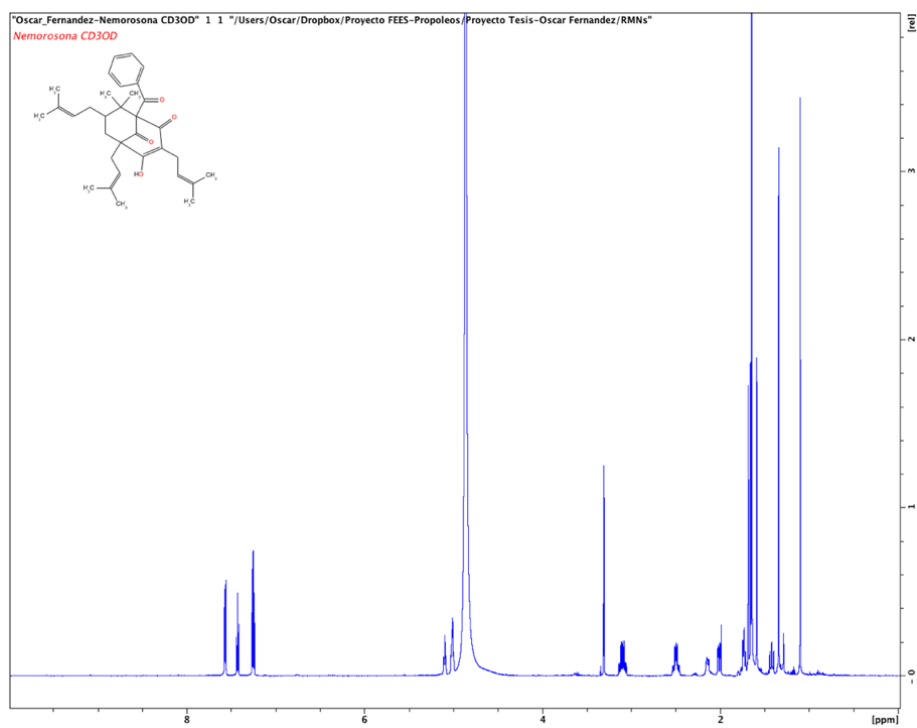


Figura 18. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de la nemorosona (Metanol- d_4 ; 600 MHz; 298,15 K)

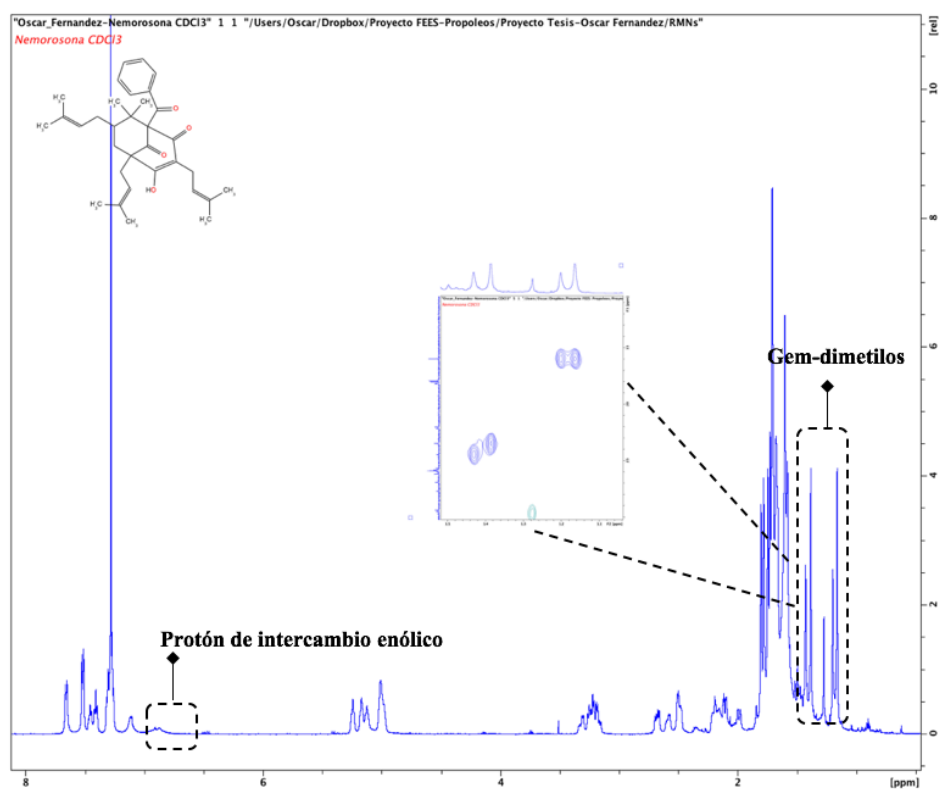


Figura 19. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de la nemorosona (Cloroformo- d ; 600 MHz; 298,15 K). Se resalta la señal del HSQC correspondiente a los metilos geminales de C-8.

La literatura reporta que la nemorosona existe en un equilibrio tautomérico en el sistema definido por C-2, C-3, C-4 (8). De hecho, en el trabajo de Cuesta-Rubio et al., 2001 (8) no lograron obtener un espectro de RMN razonable en cloroformo-d, por lo que tuvieron que realizar la metilación de la nemorosona para tener un espectro *congelado* de uno de los dos tautómeros y así realizar la caracterización apropiada, dado que cómo se mencionó al inicio en cloroformo son visibles ambos tautómeros. Para estudiar el efecto del uso metanol-d₄ en la tautomería de la nemorosona, se realizó una medición a diferentes temperaturas para determinar si alguno de los dos tautómeros se veía favorecido con el cambio. En la **Figura 21** se observa que a pesar de haber realizado la medición en un amplio rango (-55 a 35) °C no existe ningún cambio significativo en la integración de las señales ya conocidas ni en el patrón de desdoblamiento, por lo que no fue posible confirmar la existencia simultánea de los tautómeros observados en cloroformo-d, en todo momento el tautómero A se observó cómo el único compuesto presente. Una posible causa se deba a la pequeña diferencia energética entre ambas estructuras, que de acuerdo con cálculos computacionales de tipo DFT se estimó aproximadamente en 0,2 kcal/mol (21), por lo que la interconversión ocurriría muy rápidamente. El fenómeno observado en cloroformo, podría deberse al carácter ácido de este disolvente que influiría en la rapidez con la que ocurre el intercambio protónico, sin embargo se debe confirmar esta hipótesis.

Si se pudo observar un leve corrimiento a campo bajo de las señales correspondientes a los hidrógenos vinílicos (H-28, H-18 y H-23) a medida que la temperatura aumenta. Una posible causa de esta desprotección se deba a la transición entre las conformaciones silla-bote que se generan en el anillo formado por C-1; C-9; C-5; C-6; C-7; C-8 (ver **Figura 20**), pues de acuerdo con cálculos computacionales de tipo DFT la conformación de silla es significativamente más estable que la de bote, al tener una diferencia energética a temperatura ambiente, de aproximadamente 16 kcal/mol (21). Es de esperar que la conformación de silla minimize la repulsión estérica que ocasiona el sustituyente isoprenilo en C-7, por lo que es posible que al disminuir la temperatura, la diferencia energética entre ambos conformeros se intensifique al reducirse la libertad de rotación en torno a los carbonos alílicos de los grupos isopropilo influyendo levemente en el ambiente químico de los carbonos vinílicos, sin embargo esta hipótesis debe ser confirmada.

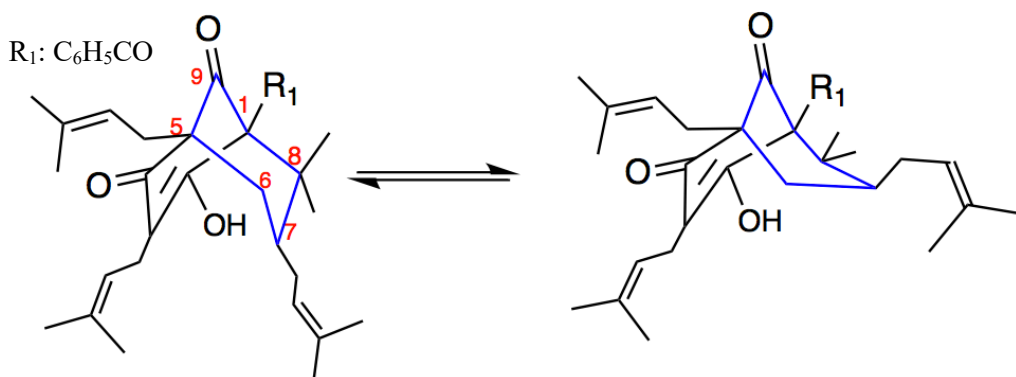


Figura 20. Conformaciones silla-bote presentes en la nemorosona

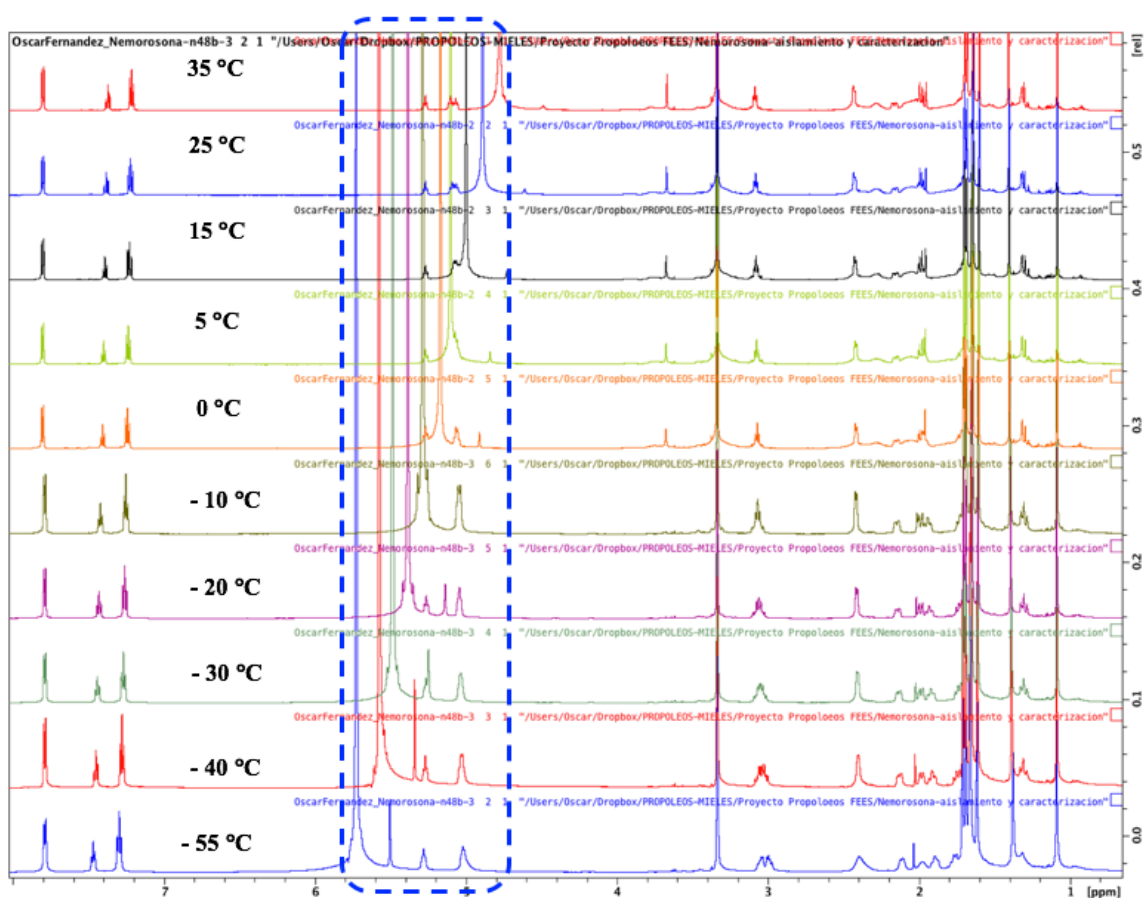


Figura 21. ¹H-RMN de la nemorosona a diferentes temperaturas (Metanol-d₄; 600 MHz; 298,15 K). Se remarca en azul la región que experimentó un cambio de desplazamiento.

En la **Figura 19** se observa el espectro $^1\text{H-RMN}$ de la nemorosona medido en cloroformo- d , una de las señales que mejor confirma la existencia de ambos tautómeros es la correspondiente a los gem-dimetilos del C-8. Estos aparecen duplicados en una relación aproximada de 2:1 (**Figura 17** y **Figura 22**), correspondiendo con lo reportado en la literatura para la nemorosona tanto con evidencia experimental, como mediante cálculos computacionales (4, 8). Es de esperar una mayor estabilidad en el tautómero A, pues la ubicación del enol en C-4 genera una interacción más favorable y un menor impedimento estérico para el intercambio de protónico con el disolvente.

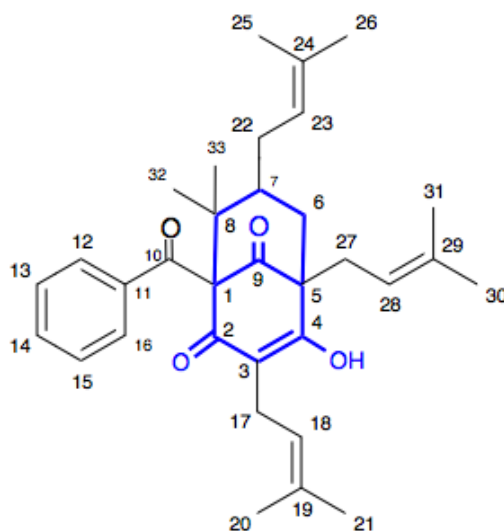


Figura 22. Numeración utilizada para la asignación de los desplazamientos químicos de la nemorosona

Adicionalmente se realizaron mediciones de la nemorosona en otros disolventes para determinar si se era visible la tautomería al igual que en cloroformo, para ello se seleccionaron disolventes polares apróticos con el fin de restringir la rapidez del intercambio protónico en el equilibrio enólico. Como se observa en el **Cuadro 5**, los desplazamientos químicos mostraron una gran similitud en los diferentes disolventes y en ninguno fue posible identificar la tautomería, Para el caso del DMSO (más polar de los disolventes seleccionados) las asignaciones de la mayor parte de los carbonos se realizaron utilizando experimentos en dos dimensiones (HSQC y HMBC) ya que no fue posible observarlos mediante ^{13}C , de manera que este disolvente no se recomendaría para realizar mediciones espectroscópicas de la nemorosona y posiblemente PPAPs relacionados.

Cuadro 5. Asignaciones de desplazamientos químicos de la nemorosona en diferentes disolventes (600 MHz; 298,15 K)

ID	Metanol		Acetonitrilo		Cloroformo				DMSO	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	Tautómero A		Tautómero B		¹³ C	¹ H
δ (ppm)										
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
C1	77.0	-	77.00	-	78.9	-	72.3	-	82.6	-
C2	193.8	-	193.50	-	191.95	-	167.72	-	169	-
C3	119.2	-	119.10	-	118.24	-	117.94	-	117.34	-
C4	175.1	-	170.00	-	170.35	-	194.82	-	172.6	-
C5	60.85	-	77.50	-	57.37	-	65.16	-	77.0	-
C6	41.4	2.01 (1)	42.80	1.73; 2.48 (1)	39.63	ec: 2.107; ax: 1.49	42.49	ec: 1.99; ax: 1.46	40.69	1.50 (1)
C7	43.19	1.77 (1)	43.10	1.49 (1)	42.84	1.70	42.49	1.70 (1)	43.02	1.71 (1)
C8	47.6	-	48.00	-	48.46	-	47.39	-	47.3	-
C9	209.1	-	210.00	-	207.18	-	206.7	-	207.99	-
C10	193.9	-	195.10	-	193.23	-	193.18	-	193.8	-
C11	137.01	-	136.70	-	136.56	-	136.1	-	136.83	-
C12 y C16	128.32	7.62 (2)	128.50	7.57 (2)	128.34	7.66 (2)	128.27	7.52 (2)	128.15	7.52 (2)
C13 y C15	127.30	7.28 (2)	127.07	7.27 (2)	127.88	7.28 (2)	127.86	7.31 (2)	128.52	7.28 (2)
C14	131.92	7.45 (1)	131.66	7.44 (1)	132.2	7.66 (1)	131.98	7.52 (1)	133.0	7.46 (1)
C17	22.80	3.1 (2)	23.17	1.32 3.10 (2)	22.14	3.22 (2)	22,00	3.22 (2)	23.21	1.32 (2)
C18	121.29	5.1 (1)	122.80	5.04 (1)	119.0	5.17 (1)	119.6	5.04 (1)	119.16	4.97 (1)
C19	131.40	-	132.10	-	139.0	-	137.77	-	133.16	-
C20	17.00	1.66 (3)	18.00	1.70 (3)	17.92	1.67-1.74 (3)	18,00	1.67-1.74 (3)	17.0	1.60 (3)
C21	24.90	1.66 (3)	25.16	1.67 (3)	25.84	1.67-1.72 (3)	25.9	1.67-1.72 (3)	23.3	1.33 (3)
C22	29.30	2.52 (2)	29.17	2.57 (2)	29.52	2.48; 2.50 (2)	29.37	2.48; 2.50 (2)	29.62	1.30; 2.51 (2)
C23	119.78	5.02 (1)	119.83	5.06 (1)	119.67	5.00 (1)	119.6	5.12 (1)	120.64	5.05 (1)
C24	135.00	-	133.83	-	136.11	-	134.40	-	133.11	-
C25	16.78	1.707 (3)	17.30	1.71 (3)	18.19	1.67-1.77 (3)	18.18	1.67-1.77 (3)	17.28	1.66 (3)
C26	25.10	1.68 (3)	25.20	1.65 (3)	25.83	1.66-1.73 (3)	25.9	1.66-1.73 (3)	25,0	1.68 (3)
C27	27.10	1.74; 2.16 (2)	27.10	1.50 (2)	27.73	1.70; 2.19 (2)	26.91	1.70; 2.19 (2)	26.92	1.65 (2)
C28	121.60	5.11 (1)	122.80	5.05 (1)	122.44	5.03-4.98 (1)	122.56	5.03-4.98 (1)	122.81	5.05 (1)
C29	133.00	-	133.50	-	133.4	-	133.37	-	133.93	-
C30	17.10	1.67 (3)	17.20	1.67 (3)	18.2	1.67-1.71 (3)	18.1	1.58-1.60 (3)	23.6	1.39 (3)
C31	25.10	1.71 (3)	25.30	1.66 (3)	26.18	1.66-1.75 (3)	26,00	1.66-1.75 (3)	27.79	1.71 (3)
C32	23.10	1.36 (3)	23.60	1.10 (3)	23.46	1.38 (3)	23.46	1.43 (3)	23.22	1.33 (3)
C33	14.92	1.12 (3)	15.00	1.33 (3)	15.93	1.20 (3)	15.93	1.16 (3)	15.38	1.11 (3)

3.3.2 Caracterización estructural de la nemorosona mediante Rayos X monocristal

El proceso de cristalización fue exitoso, se lograron cristales de nemorosona (ver **Figura 23.A**) del tamaño y forma apropiados luego de varios intentos, con diferentes disolventes próticos tales como: Agua, etanol y Metanol. El tautómero obtenido fue el A, adonde el carbonilo se ubica en C-2 y el enol en C-4, confirmando las observaciones realizadas mediante RMN. El sistema tautomérico formado por C-2, C-3, C-4 coincide en longitud y ángulo de enlace con el reportado en la literatura (21). El valor del parámetro Flack para el cristal analizado fue de 0,1592 por lo que la configuración absoluta para los centros asimétricos respectivos corresponden con la estructura obtenida mediante cristalización siendo: (1R, 5S, 7S). Este resultado es consistente con lo reportado en www.pubchem.com CID: 637105, y contribuyó a descartar de forma definitiva la posibilidad de que el compuesto aislado se tratara de la 7-*epi*-nemorosona. El parámetro flack es utilizado para la estimación de la configuración absoluta de un cristal, si este valor es menor a 0,5 la configuración corresponde a la observada durante la medición y no es necesario un análisis inversión de maclas (23). En la **Figura 23.B** se aprecia la estructura ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) adonde los sustituyentes isoprenilos ubicados en C-3, C-5 y C-7 muestran elipsoides con una mayor anisotropía térmica, producto de una alta correlación entre parámetros posicionales y térmicos (24). La cual puede ser causada por la hibridación sp^3 en C-17, C-27 y C-22 que permite una libre rotación de estos grupos dificultando su ubicación. Es importante destacar la necesidad de una molécula de agua para anclar uno de los tautómeros y así lograr una cristalización apropiada.

El % R-Factor obtenido fue de 6,10 lo que da una excelente confianza a los datos estructurales generados, pues de acuerdo con Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) para 2016 el rango más aceptado para las estructuras cristalográficas reportadas (81,8 % del total reportado) se ubica entre 5,01-7,0 (24, 27). En la **Figura 24** se aprecia la celda unidad y su patrón de empaquetamiento el cual es claramente estabilizado mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno, lo cual puede resultar en un punto de partida para entender la actividad biológica tan prometedora que ha mostrado esta molécula en campos como fármacos anticáncer (9) (ver **Figura 5**).

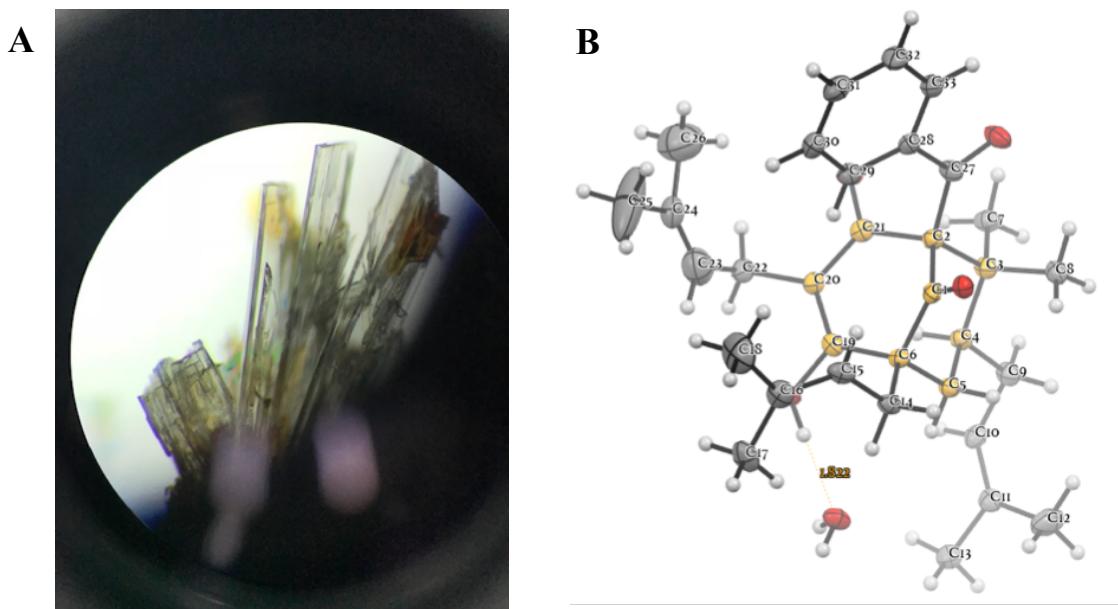


Figura 23. A: Fotografía de un cristal de nemorosona utilizado durante la medición de Rayos X, **B:** Estructura Nemorosona representada con elipsoides de desplazamiento a un 50 % de nivel de probabilidad. Se resalta en color amarillo los átomos de carbono del núcleo bicíclico.

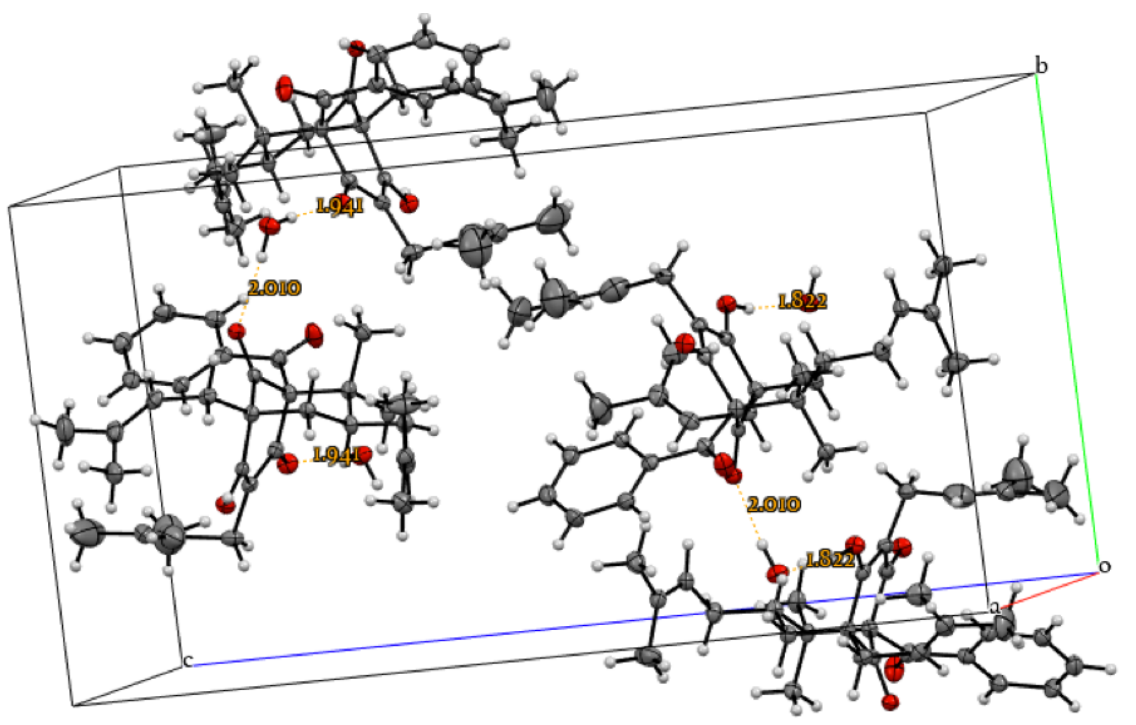


Figura 24. Empaquetamiento de una celda unidad de un cristal de nemorosona. Se indican en amarillo las distancias (Å) de las interacciones puente de hidrógeno que estabilizan la estructura.

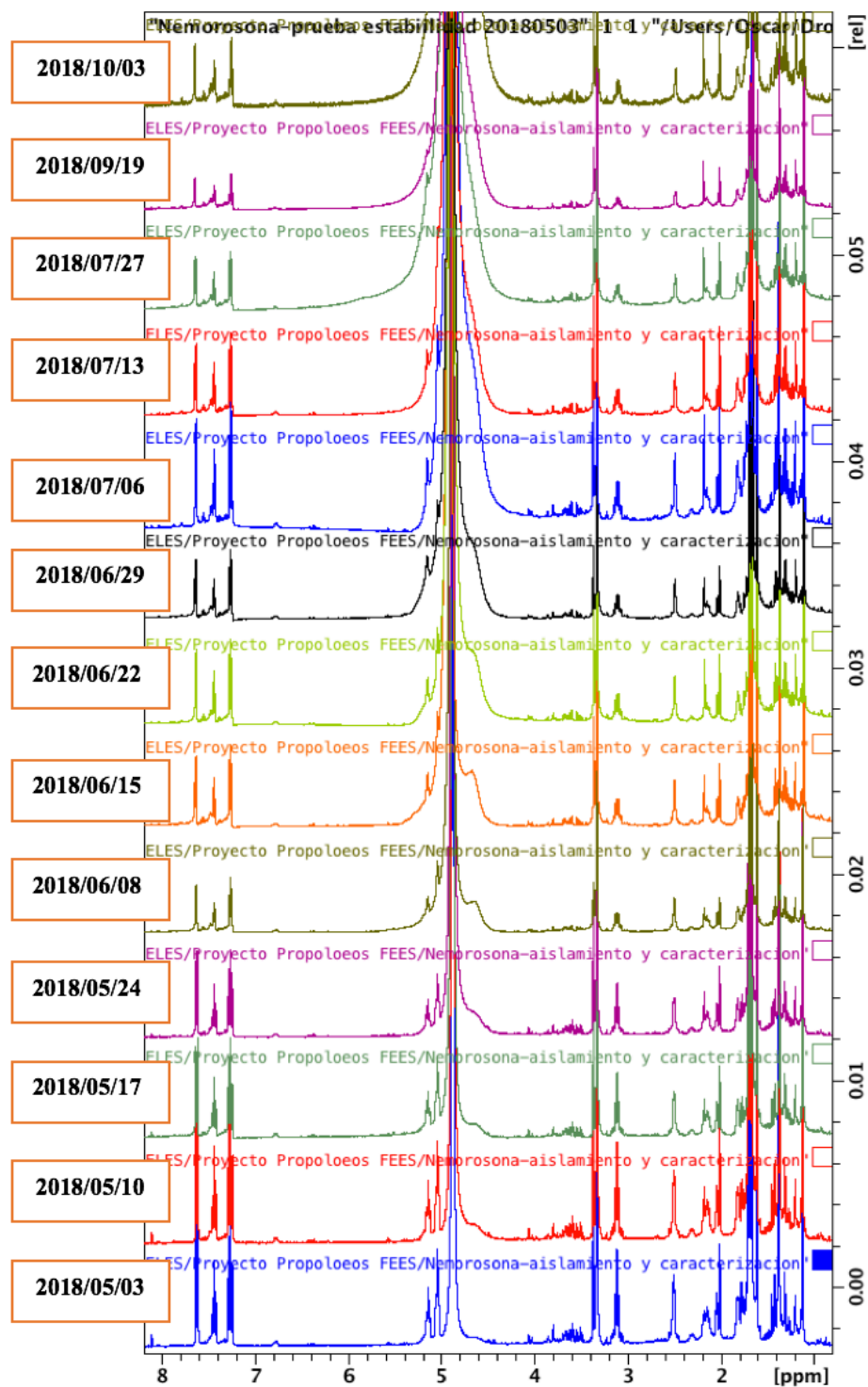


Figura 25. Exploración de la estabilidad de la nemorosona en el tiempo mediante ^1H -RMN (Metanol- d_4 ; 600 MHz; 298,15 K).

3.3.3 Estabilidad y posible ruta de descomposición de la nemorosona

En el contexto de las aplicaciones farmacológicas que la nemorosona ha mostrado, se hace necesario conocer la estabilidad en el tiempo pues de ello depende la conservación de actividad biológica. En la **Figura 25** se muestra un seguimiento mediante $^1\text{H-RMN}$ que se le hizo a una disolución de nemorosona en metanol- d_4 durante 5 meses. No aparece ninguna señal sin identificar a lo largo del tiempo, ni tampoco se observa un cambio apreciable en la multiplicidad ni en el desplazamiento químico con respecto al espectro original, lo que indica que la nemorosona parece conservarse sin cambios apreciables en el tiempo cuando es almacenada en un disolvente como metanol, esto resulta consistente con lo reportado en la literatura (14). Por otro lado en el proceso de aislamiento y purificación se observaron dos manchas (señales) con un R_f respectivamente de 0,71 y 0,74, siendo muy similar a la nemorosona $R_f = 0,6$ (ver **Figura 26**). Ambas se aislaron mediante PTLC, la pureza de los productos aislados fue verificada mediante CLAR-DAD, en la **Figura 26** se observa dos picos principales con un tiempo de retención de 16,84 min para la especie A (Pureza de 96,8%) y 17,24 min para la especie B (Pureza de 84,2 %), ambos productos mostraron un tiempo de retención mayor a la nemorosona (16,40 min), lo que se asocia con una naturaleza menos polar dado el tipo de fase móvil utilizada (Metanol:Agua).

Es importante destacar que A y B se aislaron como manchas individuales en el PTLC, sin embargo, al medir su RMN ambas manchas consistían en mezclas con la misma proporción, Igualmente, al separarlas por CLAR-DAD, donde A y B se diferencian por alrededor de 0,4 min (ver **Figura 26**), cada pico individual aislado, ofrecía el mismo RMN en mezcla. Esta evidencia propone la posibilidad de que A y B se interconvierten rápidamente hasta lograr una mezcla en equilibrio, que aporta el mismo RMN, este comportamiento ya había sido reportado en la literatura (25, 26). Los productos identificados como A y B fueron caracterizados mediante RMN y se muestran en el cuadro **Cuadro 6**.

Estos metabolitos ya habían sido reportados en la literatura como Scrobiculactona A y Scrobiculactona B respectivamente (**Figura 27**), ambos fueron aislados originalmente en

plantas de la especie *Clusia plukenetti* (25) y *Clusia scrobiculata* (26). La Scrobiculactona A mostró señales en el espectro ^1H a δ : 6.50 ($J = 10.1$ ppm, H-17) y 5.24 ($J = 10.1$ ppm, H-18) a partir de las cuales fue posible confirmar la presencia de un sistema sp^2 , mediante ^{13}C y HMBC se pudo confirmar el sistema π conjugado conformado por C-4; C-3; C-17; C-8 con desplazamientos a δ : 167.0; 114.3; 119.7; 123.6. En el caso del Scrobiculactona B las señales a δ 6.50 (H-17) y 5.24 (H-18) confirman el sistema sp^2 propuesto y el desplazamiento ^{13}C para el sistema π conjugado conformado por C-2; C-3; C-17; C-18 se confirmó mediante HMBC y HSQC, siendo respectivamente sus desplazamientos δ : 167.5; 112.7; 114.5; 124.0,

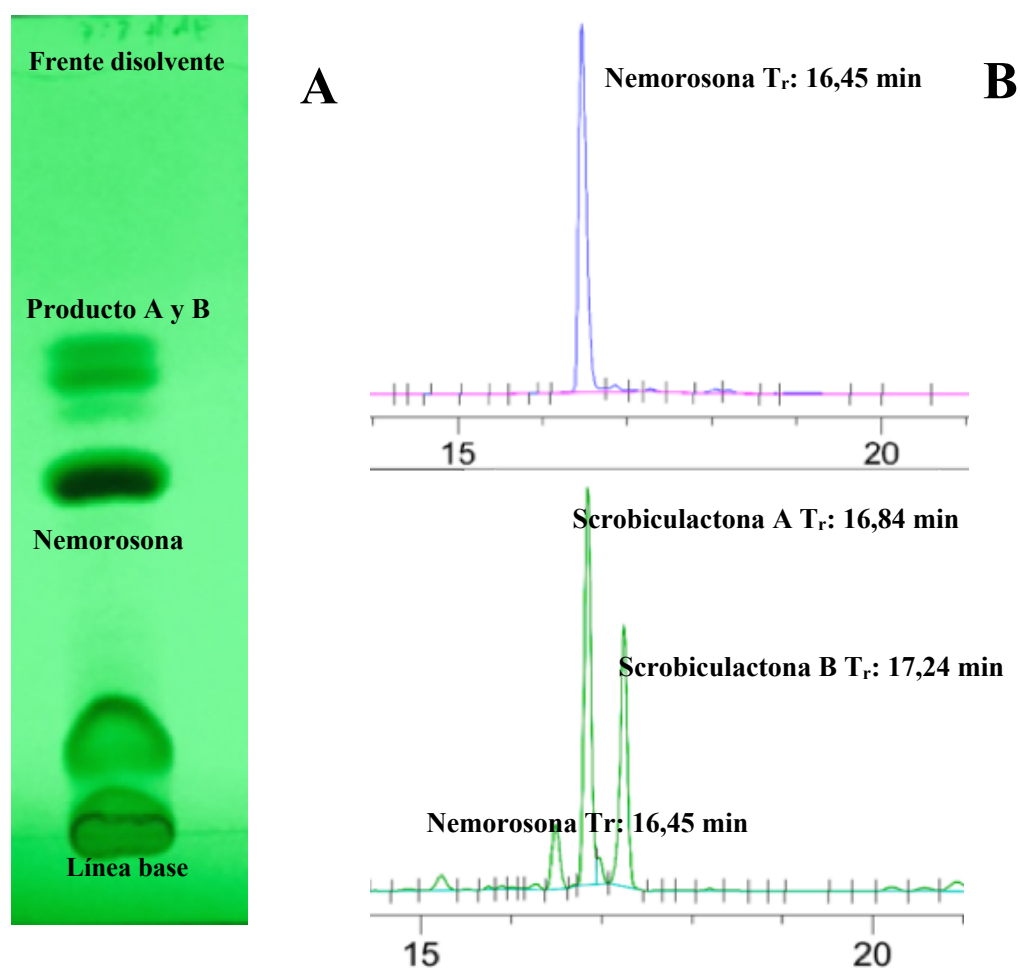


Figura 26. Evidencia cromatográfica para la descomposición observada de la nemorosona: A- CCF, FM: hexano/acetato de etilo (7:3) en extracto etanólico de propóleos, B- CLAR-DAD a 254 nm (condiciones cromatográficas indicadas en el **CAPÍTULO III**).

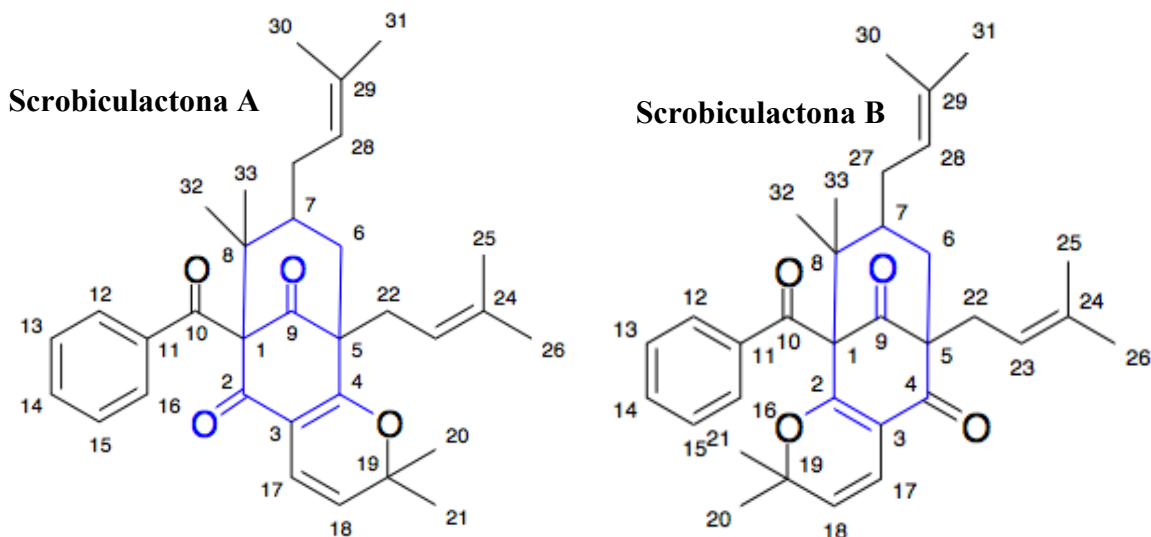


Figura 27. Numeración utilizada para la asignación de los desplazamientos de la Scrobiculactona A y B.

Estas estructuras caracterizadas por RMN y confirmadas sus masas moleculares por HRMS, ya habían sido reportadas previamente en propóleos de origen venezolano (4), sin embargo, la estereoquímica no es consistente con la identificada en este trabajo, pues la sustitución reportada en C-7 fue -endo- lo que plantea un origen biosintético diferente, posiblemente proveniente de la 7-epi-nemorosona. De acuerdo con Grossmann & Jacobs et al., 2018 (1) este tipo de inconsistencias son relativamente comunes por la dificultad que plantea la asignación de la configuración relativa mediante un experimento NOESY debido al traslape a campo alto de H-6 y H-7, lo cual también fue confirmado en este trabajo.

Para estudiar el posible origen de las Scrobiculactonas caracterizadas (identificadas como A y B) se realizaron cálculos computacionales con el fin de determinar su abundancia relativa mediante un análisis de la distribución del Boltzmann, el resultado obtenido indica que la Scrobiculactona A es la más abundante y se encuentra en una relación de (59:41) con respecto a la Scrobiculactona B. Las proporciones obtenidas fueron similares a las calculadas mediante $^1\text{H-RMN}$ y CLAR -DAD, donde la población relativa de ambos productos se calculó en 60:40 (A:B).

Cuadro 6. Asignaciones de desplazamientos químicos de la Scrobiculactona A (Producto A) y Scrobiculactona B (Producto B) (cloroformo-d; 400 MHz; 298,15 K).

Identificación	Scrobiculactona A		Scrobiculactona B	
	δ			
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
C1	65.44	-	79.39	-
C2	167.5	-	191.79	-
C3	112.73	-	114.27	-
C4	167.01	-	170.28	-
C5	72.01	-	57.64	-
C6	42.24	2.00 ; 2.06 (2)	39.93	2.00 ; 2.06 (2)
C7	43.8	1.41 (1)	43.8	1.41 (1)
C8	48.16	-	48.7	-
C9	206.5	-	206.6	-
C10	193.2	-	193.01	-
C11	133.4	-	133.4	-
C12 y C16	127.92	7.52 (2)	128.38	7.52 (2)
C13 y C15	128.04	7.64 (2)	128.44	7.64 (2)
C14	128.4	7.43 (1)	128.4	7.43 (1)
C17	114.52	6.50 (1)	119.67	6.46 (1)
C18	124,0	5.24 (1)	123.6	5.41 (1)
C19	81.8	-	83.4	-
C20	28.4	1.38 (3)	28.5	1.56 (3)
C21	24.6	1.23 (3)	29.34	1.27 (3)
C22	29,0	2.61 (1); 2.49 (1)	29.0	2.60 (2)
C23	119.4	5.05 (1)	119.4	5.05 (1)
C24	134.23	-	133.5	-
C25	18,0	1.69 (3)	18.24	1.69 (3)
C26	24.7	1.57 (3)	25.9	1.59 (3)
C27	26.93	2.03 (1); 2.19 (1)	27.79	2.15 (2)
C28	122.6	5.01 (1)	120.0	5.04 (1)
C29	132.28	-	132.02	-
C30	18.16	1.67 (3)	18.0	1.69 (3)
C31	25.92	1.57 (3)	25.86	1.59 (3)
C32	24.05	1.418 (3)	23.3	1.15 (3)
C33	25.86	1.67 (3)	24.54	1.22 (3)

Esta evidencia plantea la posibilidad de que ambas estructuras están relacionadas mediante un intermediario en común, algo que se ve puede ver reforzado debido a la orientación del sustituyente en C-7, pues de acuerdo con la regla de Grossmann and Jacobs (1) su posición sería -exo- para ambas Scrobiculactonas, lo que es consistente con la configuración de la nemorosona. Por lo que junto con la evidencia cromatográfica (**Figura 26**) se propuso la ruta de degradación de la nemorosona que se observa en la **Figura 28**, siguiendo un mecanismo polar en medio ácido. La oxidación de la nemorosona bajo condiciones de temperatura y humedad normal es un proceso favorable, de hecho resulta una de las actividades más prometedoras reportadas, el origen se ha asociado principalmente al sistema enolizable 1,3-dicetona (29), sin profundizar en los posibles productos resultantes.

El intermediario indicado (ver **Figura 28**) fue sugerido por Geneive et al., 1999 (25), la proposición se basó en evidencia estructural y experimental, principalmente relacionada con el aparente equilibrio espontáneo que mostraban las Scrobiculactonas cuando se encontraban en disolución, que cómo ya se mencionó anteriormente, es consistente con lo observado en este trabajo. La formación del intermediario (tipo: Quinone methide) podría involucrar un producto termodinámico proveniente de una oxidación por vía fotoquímica (30), sin embargo es importante destacar que este producto no fue identificado en este trabajo, posiblemente por su alta reactividad.

De manera que la posibilidad de que la oxidación de la nemorosona ocurra por la ruta propuesta estaría relacionada con el disolvente y condiciones de extracción utilizadas, la literatura consultada hasta el momento no plantea una relación de derivación entre las Scrobiculactonas A y B y la nemorosona. Es importante profundizar en la confirmación del mecanismo propuesto, pues podrían contribuir a explicar la gran cantidad de metabolitos aislados de las *Clusias* con una similitud estructural alta, lo que lleva a pensar si el núcleo altamente funcionalizado de los PPAPs favorece la aparición de compuestos cuyo origen estarían relacionado con los métodos de aislamiento utilizados.

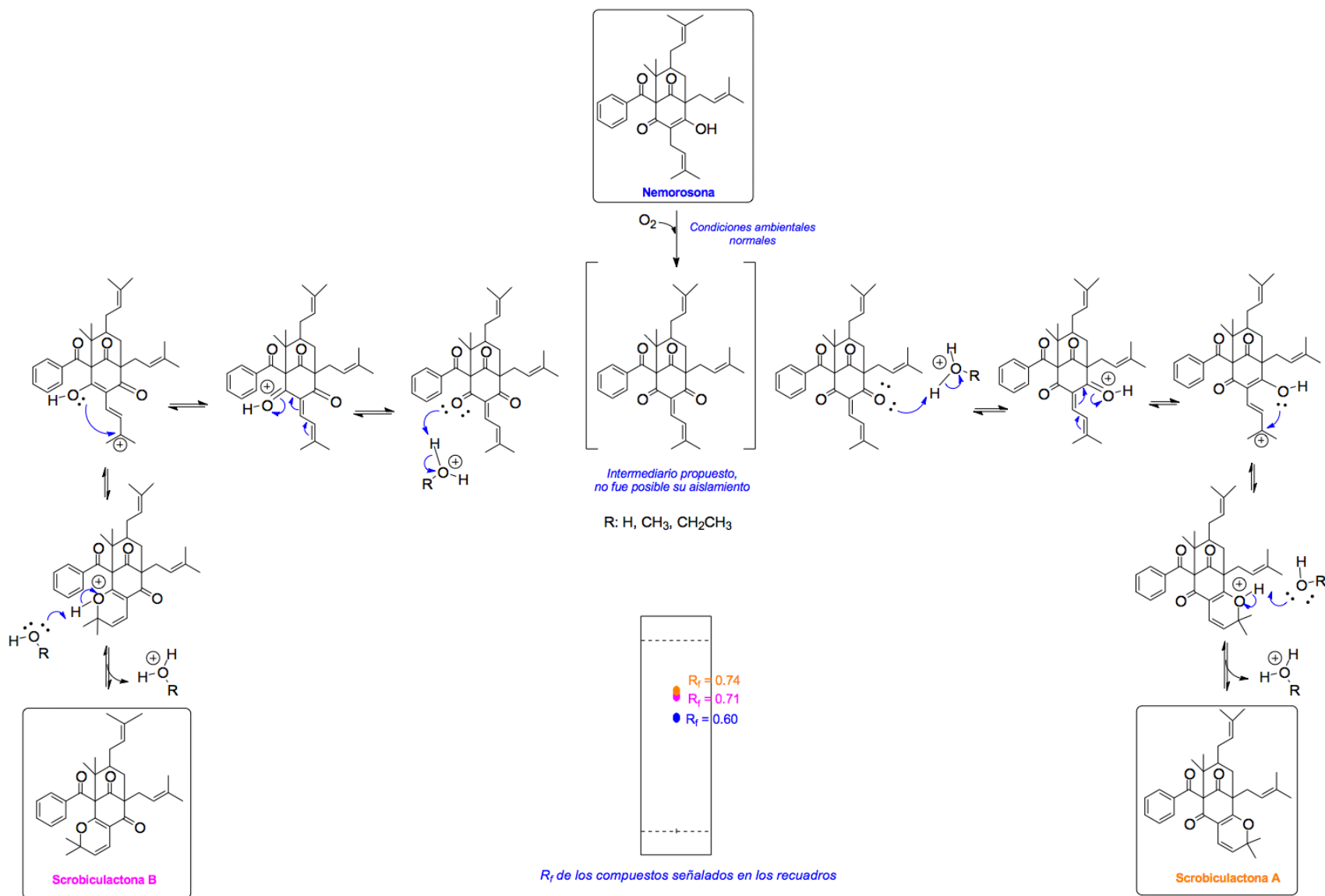


Figura 28. Ruta de degradación propuesta para la nemorosona, de acuerdo con la evidencia cromatográfica, espectroscópica y cálculos computacionales.

3.4 Conclusiones

La caracterización estructural así como la propuesta de descomposición de la nemorosona refuerza la hipótesis sobre que la actividad biológica se debe al equilibrio enólico presente en el sistema biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona pues las principales características estructuras y de reactividad se localizan en este sistema.

La nemorosona muestra una estabilidad significativa cuando se encuentra disuelta en metanol, verificada por un periodo de seis meses.

Los hidrógenos vinílicos de la nemorosona (H-28, H-18 y H-23), muestran un corrimiento a campo alto cuando se realizan mediciones por debajo de los 0 °C. Se propone que posiblemente se deba a un aumento en la desprotección del -CH- por un efecto anisotrópico que se intensifica al incrementar la temperatura.

El tautómero obtenido en los cristales analizados fue el A, confirmando las evidencias experimentales y computaciones que señalaba a este como el más abundante.

La rotación específica para estos cristales obtenida = $-105,4^\circ$ ($c = 0,7$, EtOH), la cual concuerda con la obtenida por síntesis (13). Tal y como lo reportan Sparling et al., 2015, Cuesta-Rubio et al., 2008 (8) no obtuvo esos valores, probablemente por tener contaminaciones de otros componentes.

De acuerdo con la evidencia experimental y espectroscópica se propone la ruta de oxidación de la nemorosona, en donde los productos son la Scrobiculactona A y B, ambos en equilibrio a través de una estructura hipotética oxidada.

Se requiere más investigación para comprobar la oxidación de la nemorosona y la concomitante formación de las Scrobiculactonas A y B.

3.5 Referencias

1. Xing-Wei Yang, Robert B. Grossman, and Gang Xu, Research Progress of Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols, *Chemical Reviews*, **2018**, 118 (7): 3508-3558.
2. Richard J.A., Pouwer R., Chen Y-K D., The chemistry of the Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols, *Angew. Chem.*, **2012**, 51:4536-4561.
3. Ciochina R., Grossman B., Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols, *Chemical Reviews*, **2006**, 106(9): 3963-3986.
4. Cuesta-Rubio O., Cuellar Cuellar A., Velez Castro H., Rastrelli L., Aquino R., A Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Propolis, *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62: 1013-1015.
5. Castro L.M., Nascimento do A., Ikegaki M., Costa-Neto C., Alencar S., Rosalen P., Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17: 5332-5335.
6. Márquez Hernandez I., Campo Fernandez M., Cuesta-Rubio O., Piccinelli A., Rastrelli L., Polyprenylated Benzophenone derivatives from Cuban Propolis., *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68: 931-934.
7. Mehta G., Dhanbal T., Bera M., Synthetic studies toward the PPAP natural products, prolifenones A and B and hyperforin: an Effenberger cyclization approach, *Tetrahedron Letters*, **2010**, 51: 5302-5305.
8. Cuesta-Rubio O., Velez-Castro H., Frontana-Uribe B., Cárdenas J., Nemorosone, the mayor constituent of floral resins of *Clusia rosea*, *Phytochemistry*, **2001**, 57: 279-283.
9. Reis F., Pardo-Andreu G., Nuñez-Figueredo Y., Cuesta-Rubio O., Marín-Prida J., Uyemura S., Curti C., Alberici L., Clusianone, a naturally occurring nemorosone

- regioisomer, uncouples rat liver mitochondrial and induces HepG2 cell death, *Chemico-Biological Interactions*, **2014**, 212: 20-29.
10. Diaz-Carballo D., Gustmann S., Haydar Acikellii A., Bardenhueuer W., Buehler H., Jastrow H., Ergun S., Strumberg D., 7-epi-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells, *Phytomedicine*, **2012**, 19: 1298-1306.
 11. Pardo-Andreu G., Nuñez-Figueroa Y., Tudella V., Cuesta-Rubio O., Rodriguez F., Pestana C., Uyemura S., Leopoldino A., Alberici L., Curti C., The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler, *Mitochondrion*, **2011**, 11: 255-263.
 12. Uwamori M., Saito A., Nakada M., Stereoselective Total Synthesis of Nemorosone, *The Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 77: 5098-5107.
 13. Sparling B., Tucker J., Moebius D., Shair M., Total Synthesis of (-)-Nemorosone and (+)-Secohyperforin, *Organic Letters*, **2015**, 14: 3398-3401.
 14. Piccinelli A.L., Campone L., Dal Piaz F., Cuesta-Rubio O., Rastrelli L., Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom*, **2009**, 20:1688-1698.
 15. S. G. Balasubramani, G. P. Chen, S. Coriani, M. Diedenhofen, M. S. Frank, Y. J. Franzke, F. Furche, R. Grotjahn, M. E. Harding, C. Hättig, A. Hellweg, B. Helmich-Paris, C. Holzer, U. Huniar, M. Kaupp, A. Marefat Khah, S. Karbalaei Khani, T. Müller, F. Mack, B. D. Nguyen, S. M. Parker, E. Perlt, D. Rappoport, K. Reiter, S. Roy, M. Rückert, G. Schmitz, M. Sierka, E. Tapavicza, D. P. Tew, C. van Wüllen, V. K. Voora, F. Weigend, A. Wodyński, and J. M. Yu, TURBOMOLE: Modular program suite for *ab initio* quantum-chemical and condensed-matter simulations, *J.Chem. Phys.*, **2020**, 152: 184107.

16. Ewa Papajak, Jingjing Zheng, Xuefei Xu, Hannah R. Leverentz, and Donald G. Truhlar, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2011** 7 (10), 3027-3034.
17. Jensen F., Segmented Contracted Basis Sets Optimized for Nuclear Magnetic Shielding, *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11: 132-138.
18. Grossman R., Jacobs H., On the structures of plukenetions B, D, and E and their relationships to other polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols, *Tetrahedron Letters*, **2000**, 41: 5165-5169.
19. Senda Y., Ishiyama J., Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 3,7-Disubstituted Bicycle [3.3.1] nonanes. Conformation and Through-space Interaction, *J.Chem.Soc., Perkin Trans*, **1981**, 90-93.
20. Bittrich, V.; Amaral, M.; Machado, S.; Marsaioli, A. Floral Resin of *Tovomitopsis saldanhae* (Guttiferae) and 7-Epi-nemorosone: Structural Revision. *Zeitschrift Für Naturforschung* **2003**, 58: 643-648.
21. Pagano B., Pavone M., Piccinelli A., Rastrelli L., Cuesta-Rubio O., Mattia C., Barone V., Structural and conformation investigation of nemorosone: A combined X-ray and quantum mechanical study, *Chemical Physics Letters*, **2008**, 462: 158-163.
22. Reichart C., *Solvents and Solvent effects in Organic Chemistry*, 3 Edición, *Wiley*, **2004**, pp: 106.
23. Flack HD. Absolute-structure reports. *Acta Crystallogr C*. **2013**, 69(Pt 8):803-807.
24. Harlow R., *Trouble Crystal Structures: Prevention, Detection, and Resolution*, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, **1996**, 101(3): 327-339.

25. Geneive H., Jacobs H., Carrington C.M., McLean S., Reynolds W.F., Prenylated Benzophenone derivatives from Caribbean *Clusia* species (Guttiferae). Plukenetiones B-G and Xerophenone A., *Tetrahedron*, **1999**, 55: 1581-1596.
26. Porto A., Machado S., Oliveira C., Bittrich V., Amaral M., Marsaioli A., Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins, *Phytochemistry*, **2000**, 55: 755-768.
27. CDS_R-factor_Statistics_2016.pdf. descargado de: <https://www.ccdc.cam.ac.uk>.
28. Oliveira C., Porto A., Bittrich V., Marsaioli A., Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species, *Phytochemistry*, **1999**, 50: 1073-1079.
29. Cuesta-Rubio O.; Frontana U.; Ramírez A.; Cárdenas J., Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone, *Z. Naturforsch* **2002**, 57c: 372-378.
30. Wan P., Brousmiche D., Chen C., Cole J., Lukema M., Xu M., Quinone methide intermediates in organic photochemistry, *Pure Appl.Chem*, **2001**, 73 (2): 529-534.

CAPITULO IV. VISTA PRELIMINAR AL INTERIOR DE UN PROPÓLEO: HERRAMIENTA ^1H -DOSY

Resumen

Los propóleos son materiales de gran complejidad química, por lo que el estudio de su composición plantea muchos retos. La posibilidad de estudiar propiedades moleculares como el estado de agregación o el peso molecular mediante la determinación del coeficiente de difusión es parte de las ventajas que el uso de la espectroscopía DOSY brinda al estudio de matrices complejas, como extractos de origen vegetal o de propóleos. En este trabajo se comparó el coeficiente de difusión (D : $\text{m}^2/\text{s} \times \text{E}^{-10}$) de la nemorosona aislada con respecto al mostrado dentro de extractos de propóleos con el fin de identificar una posible agregación de este compuesto en la matriz, así como también aportar información de los otros componentes de la matriz, en función del peso molecular. Para ello se seleccionaron apiarios modelo con las siguientes características: alto contenido de nemorosona y huella química poco variable, sin nemorosona y huella química variable, con nemorosona y huella química variable. Los metabolitos mayoritarios que conforman todos los propóleos analizados tienen un rango de peso molecular (600-700) Daltons, estos no parecen tener ningún efecto de encapsulación o agregación sobre la nemorosona pues la variación en el coeficiente de difusión no se consideró significativa en ninguno de los apiarios analizados; éste se mantuvo por debajo del 2 % error con respecto al producto aislado. El coeficiente de difusión de la nemorosona determinado es $6,7574 \text{ m}^2/\text{s} \times \text{E}^{-10}$.

4.1 Introducción

El estudio de la difusión molecular en estado líquido ofrece información importante relacionada con propiedades como tamaño molecular, forma, agregación o encapsulación. En años recientes, esta información se ha podido aplicar en diferentes áreas gracias al desarrollo de espectrofotómetros de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución y a la inclusión de pulsos de gradientes de campo magnético. La aplicación de estos gradientes, permite codificar la ubicación de una molécula o complejo a lo largo de la dirección del gradiente aplicado. Hoy en día los espectrómetros comerciales permiten realizar mediciones rápidas y con un amplio ámbito de temperatura (1).

Al obtener las velocidades de difusión de moléculas o de complejos en sistemas isotrópicos complementariamente al desplazamiento químico convencional se construyen espectros bidimensionales, que es lo que se conoce como espectroscopía ordenada por difusión (DOSY, por sus siglas en inglés) (2). Ha mostrado ser una herramienta muy valiosa con aplicaciones en el campo de la química supramolecular tan diversas como el cálculo del grado de agregación, cómo por ejemplo de ácido fulvico en sustancias húmica (6) o la determinación del radio hidrodinámico en complejos de autoensamblaje metalocíclicos (5).

Una de las aplicaciones poco exploradas de DOSY es el análisis de los pesos moleculares en mezclas complejas, que se logran separar y evidenciar bien en una gráfica bidimensional, es por esto que también se le conoce como cromatografía de RMN vía DOSY, ^1H -DOSY (10). La razón principal de su poco uso posiblemente se deba al compromiso en el rango dinámico producto del traslape en el desplazamiento químico o la presencia de moléculas pequeñas. A pesar de estas limitaciones ha sido utilizada exitosamente en aplicaciones tan diversas como el control de calidad mediante el monitoreo de la conversión y formación de aductos en reacciones de transesterificación de aceites vegetales (7) o en el análisis de mezclas de hidrocarburos y asfaltenos para identificar el cambio en las interacciones existentes en función de la concentración (9).

La estimación del peso molecular a partir del coeficiente de difusión ha sido retomada recientemente con el desarrollo de modelos de cálculo de mayor exactitud, como es el caso de la aproximación de Stokes-Einstein Gierer-Wirtz (SEGWE) la cual mejora considerablemente la aproximación clásica de Stokes-Einstein al disminuir el efecto de la temperatura y aumentar la respuesta lineal del peso atómico calculado (demostrada hasta 1,5 kDa) (2,3).

Los propóleos son resinas generadas por las abejas a partir de exudados de plantas y enzimas propias por lo que es de esperar que su composición sea muy variada y compleja. Este material es utilizado por las abejas para fines muy variados, que van desde construcción de sus colmenas hasta la defensa de agentes patógenos; se les puede considerar como biobloques de construcción. Por esta razón, su exorcación en la búsqueda de metabolitos secundarios con aplicaciones farmacológicas ha recibido mucha atención en los últimos años y hallazgos como la nemorosona han reforzado considerablemente su investigación (11, 14).

El análisis de este tipo de matrices a través de herramientas de RMN como la espectroscopía ordenada por difusión (DOSY) han sido poco explorada pues se ha dirigido principalmente al análisis de otro producto derivado de la viticultura, la miel (12,13). En este capítulo se plantea la espectroscopía ^1H -DOSY como herramienta para explorar un comportamiento observado en propóleos ricos en nemorosona, cuando se compara mediante ^1H -RMN el producto aislado y purificado con respecto al presente en el extracto de propóleo.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Preparación de extractos: se pesó 0,4 gramos de propóleo y se le realizaron 3 extracciones sucesivas con 10 mL de Etanol Absoluto (Merck, grado: Análisis) utilizando baño sónico (Fisher Scientific, modelo: FD28) durante 10 minutos cada una. Se combinaron y se centrifugó la mezcla (Svant, modelo: SC200), se recolectó el sobrenadante y se evaporó hasta sequedad (Buchi, modelo R-111). Se pesaron 5 mg del extracto seco, se disolvieron en 600 μ L de metanol- d_4 (Merck, 99,8 %) para su medición de ^1H -DOSY y coeficiente de difusión (D , m^2/s). Para las determinaciones, se emplearon los extractos combinados del apiario 48, y dos extractos del apiario 35, una sin nemorosona (1C) y otra rica en nemorosona (3C).

4.2.2 Nemorosona: este compuesto fue aislado y purificado del combinado del apiario 48: colectas 1-6 (formando una mezcla compuesta) mediante cromatografía de capa fina preparativa (CCFP). Se pesaron 100 mg de extracto etanólico de propóleo y separaron en cromatofolios de vidrio de (20 x 20) cm recubierta con silica gel (CAS# 112926-00-8, GF₂₅₄, Merck) utilizando una fase móvil de hexano (CAS: 110-54-3, Merck) y acetato de etilo (CAS: 141-78-6, Merck) en relación 7:3, se recolectó la fracción con un $R_f \approx 0,6$. Este compuesto revela con solución metanólica DPPH (CAS: 1898-66-4, Merck) a 1 mg/mL. Se determinó la pureza mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (CLAR-DAD) a $\lambda = 254$ nm utilizando el método descrito en el **CAPÍTULO II**, con el cual se obtuvo un producto final con un 99,8 % de pureza. Se pesó 5 mg del producto purificado, se disolvió en 600 μ L de metanol- d_4 (CAS: 811-98-3, Merck, 99,8 % D) para su análisis en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se pesaron 5 mg del extracto seco, se disolvió en 600 μ L de metanol- d_4 (Merck, 99,8 % D) para su medición de ^1H -DOSY y coeficiente de difusión (D , m^2/s).

4.2.3 Experimento ¹H-DOSY: se utilizó un equipo Bruker de 400 MHz. La adquisición del espectro ¹H-RMN se realizó a 298,1 K utilizando el programa de pulsos zg30 de Bruker con 16 scans.

La adquisición del espectro ¹H-DOSY se hizo a 298 K, utilizando el programa de pulsos ledbpgp2s de Bruker con 16 scans el cual es equivalente al gradiente de pulsos spin-echo; la función de ajuste para las curvas de decaimiento se calculó con el modelo Stajskal-Tanner a un tiempo de relajación 2τ constante y un gradiente de campo variable (G) (ecuación1)(10).

$$I_G = I_{G=0} e^{-(\gamma\delta G)^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

G: fuerza del campo aplicado

γ : Constante giromagnética del nucleo observado

δ : Longitud de los pusos para cada gradiente

D: Coeficiente de difusión (m²/s)

Δ : Período de medición del gradiente

El procesamiento de cada espectro se realizó utilizando el software TopSpin 4.0.6. Para el procesamiento y cálculo del coeficiente de difusión se utilizó el software Dynamics Center 2.7.2, y se tomó como referencia la región aromática ($n=7$ y δ ppm: 7.58-7.25). Para el cálculo del peso molecular se siguió la estimación de Stokes-Einstein Gierer-Wirts (SEGWE) (3) (ecuación2).

$$D = \frac{k_B T \left(\frac{3\alpha}{2} + \frac{1}{1+\alpha} \right)}{6\pi\eta \sqrt[3]{\frac{3MM_s}{4\pi\rho_{\text{efect}}N_A}}}; \quad \alpha = \frac{r_s}{r} = \sqrt[3]{\frac{MM_s}{MM}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

MM_s : Masa molecular del disolvente

MM : Masa molecular de la molécula de interés

ρ_{efect} : densidad efectiva

T: temperatura de medición

α : relación entre el radio hidrodinámico del soluto y disolvente

η : viscosidad del disolvente

K_B : constante de Boltzmann

4.3 Resultados y discusión

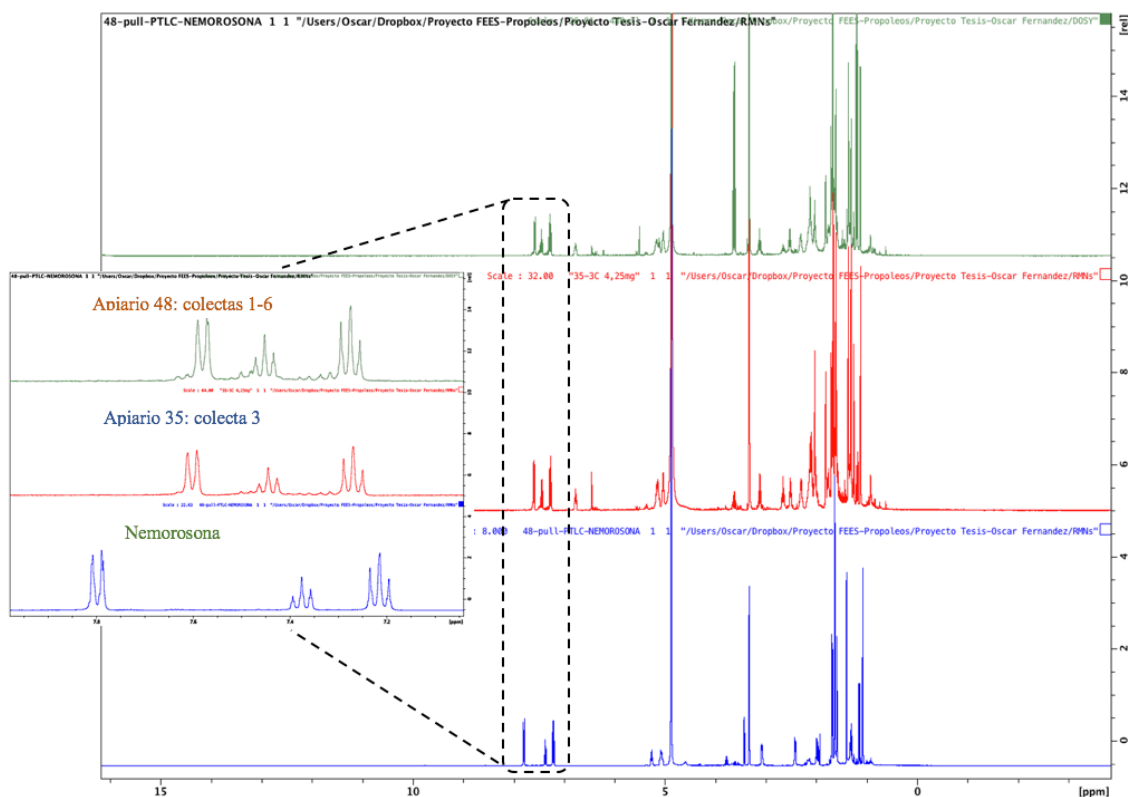


Figura 29. Espectros ^1H -RMN de los extractos seleccionados para el análisis del efecto del coeficiente de difusión de la nemorosona con respecto a la composición de la totalidad del extracto de propóleo. Traza azul: nemorosona purificada, Traza roja: Extracto 35, colecta 3 rico en nemorosona, Traza verde: Apiario 48, colecta 1-6 rico en nemorosona.

La caracterización de los apiarios costarricenses ricos en nemorosona permitió describir la composición química de forma exhaustiva y adicionalmente planteó otras interrogantes relacionadas con la interacción de la nemorosona y los demás compuestos presentes en los extractos de propóleos. En la **Figura 29**, traza roja y verde se aprecia cómo la nemorosona presente en ambos extractos muestra un desplazamiento químico en la región aromática propio de un sistema benzoilo monosustituido. Al comparar la misma región del espectro en la nemorosona aislada, se puede observar un desplazamiento a campo alto de los protones *meta* y *para* y a campo bajo los protones *orto*. Una posible justificación de este cambio es un desplazamiento de las señales del sustituyente benzoato como resultado de la separación de la nemorosona de la matriz del propóleo, esto podría deberse a un efecto anisotrópico producto de una solvatación selectiva al cambiar de medio (extracto de propóleo a disolvente)

sobre el anillo aromático si la nemorosona se aísla de la matriz (propóleo) y se compara con respecto al producto purificado.

En ambos extractos crudos, el desplazamiento en la región mencionada no experimenta cambios significativos a pesar de que la composición y concentración difiere entre ambos propóleos. Esto lleva a pensar en la posibilidad de la existencia de algún efecto producto de un encapsulamiento de la matriz sobre la nemorosona.

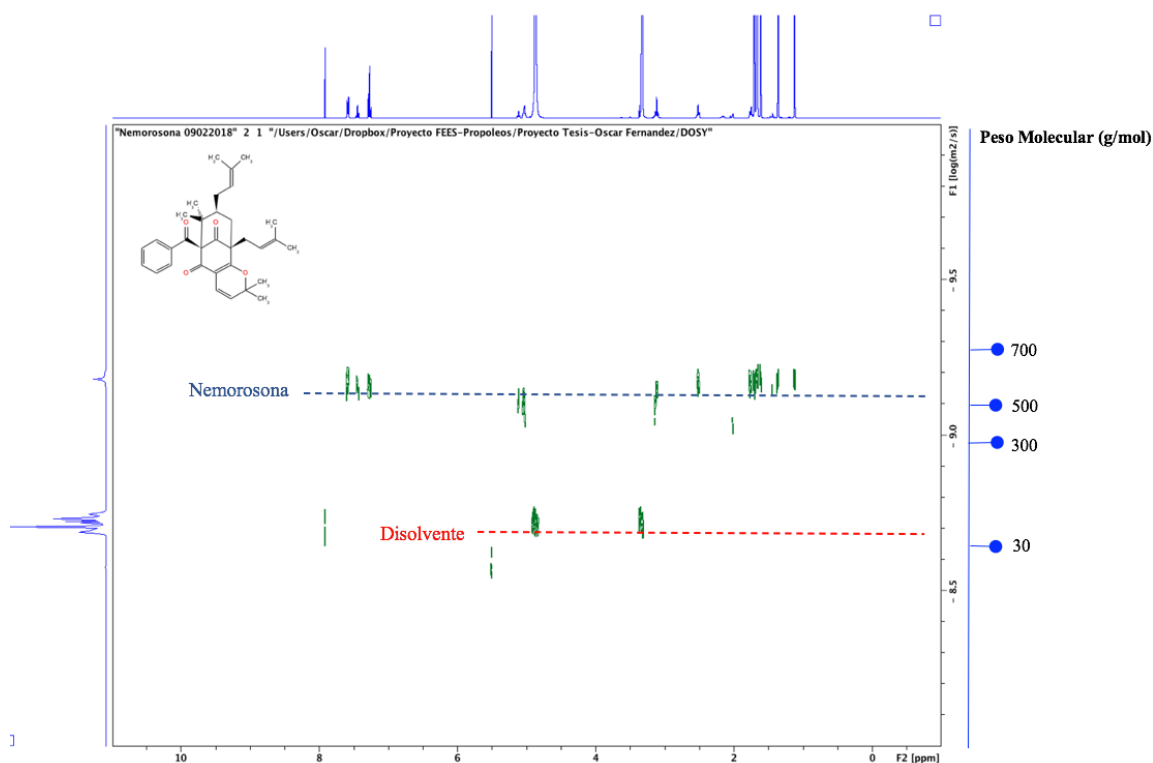


Figura 30. Espectro ¹H-DOSY de la nemorosona 99,8 % de pureza.

El extracto de propóleo posee una composición compleja y dada la naturaleza de su composición general, no es de esperar moléculas con pesos atómicos superiores a los 700 Dalton, por lo que la espectroscopia ordenada por difusión (DOSY) resulta ideal para determinar si existe algún efecto colaborativo entre la nemorosona y los demás componentes de la matriz mediante la determinación del coeficiente de difusión (D), pues de existir interacciones intermoleculares fuertes, producto de factores como peso atómico o cargas

efectivas entre la nemorosona y la matriz el coeficiente de difusión no sería diferenciable del resto de los compuestos presentes.

En la **Figura 30** se aprecia el espectro DOSY de la nemorosona, la línea azul punteada representa las señales asociadas con el coeficiente de difusión, el cuál se indica en el **Cuadro 7**. A partir del coeficiente de difusión experimental es posible estimar el peso molecular de un compuesto y viceversa teniendo así una aproximación más detallada de la clase de moléculas que pueden estar presentes en una mezcla (2,3). La nemorosona tiene un peso molecular de 502,7 g/mol y el valor calculado a partir del D_{exp} fue 545,8 g/mol, siendo menos de un 9 % de error.

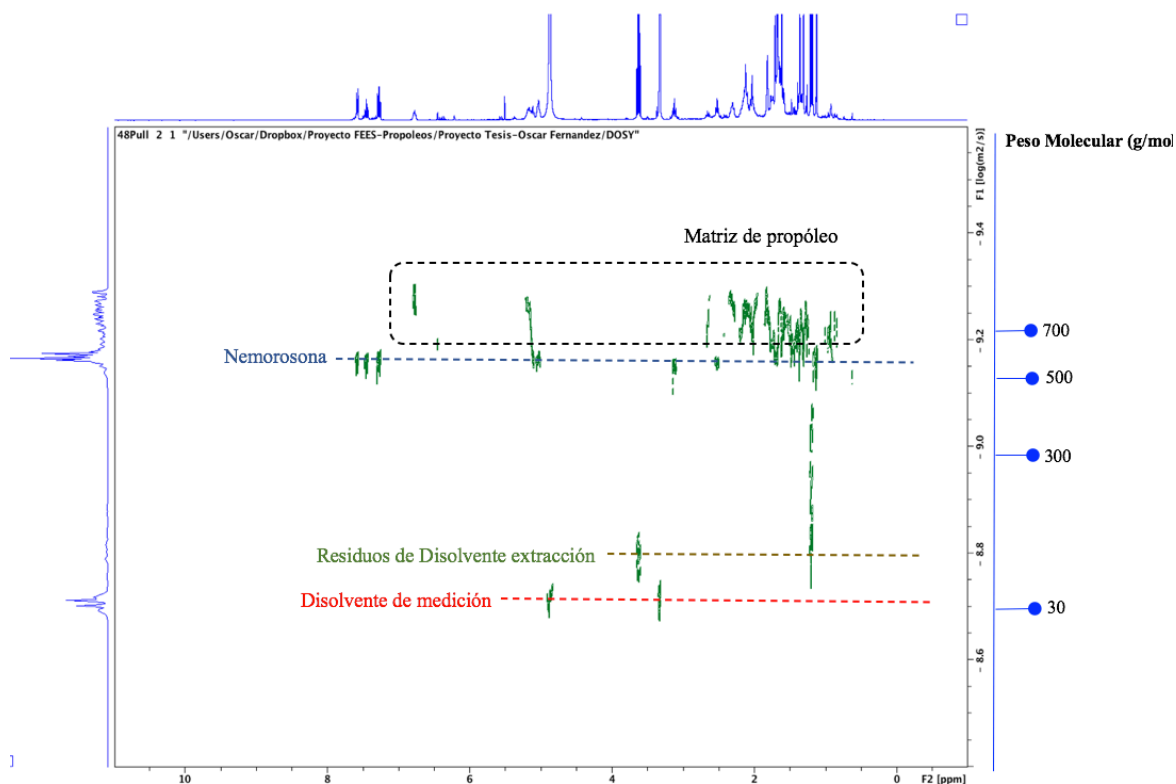


Figura 31. Espectro ^1H -DOSY para el extracto etanólico del apiario 48 conformado por la mezcla de las colectas 1-6.

En las **Figura 31** y **32** se puede observar los espectros ^1H -DOSY para dos extractos de propóleos que poseen concentraciones significativas altas de nemorosona (aproximadamente 50 % m/m). Se puede apreciar que las señales asociadas a la nemorosona son características diferenciables en la región aromática del resto de componentes.

Cuadro 7. Coeficiente de difusión (D) de la nemorosona aislada y formando parte de extractos de propóleos.

Propóleo	D (m ² /s x E ⁻¹⁰)	Nemorosona D (m ² /s x E ⁻¹⁰)	Error (%)
Apiario 48: colectas 1-6	6,8683	6,7574	1,64
Apiario 35: 3C	6,6290		1,90

De presentarse un fenómeno de agregación, se observaría una disminución en el valor del coeficiente de difusión D, dado que la nemorosona difundiría más lento. En el **Cuadro 7** se aprecia que las diferencias no superan el 2 % con respecto al coeficiente de difusión obtenido para la nemorosona aislada. Por lo tanto, no se puede presumir que la variación en los desplazamientos observados en la **Figura 29** se trate de algún efecto de asociación intermolecular, sino más bien de otros efectos intermoleculares que influyen de forma más directa sobre los protones aromáticos.

Es posible identificar que la nemosona es el compuesto principal de menor peso molecular en los apiarios analizados. Los demás componentes de la matriz se tratarían de metabolitos de estructura y peso molecular muy cercano y con señales alifáticas características, exceptuando dos señales a campo bajo. Tal y cómo se observa en los extractos de las muestras del apiario 35-3C, la huella del espectro protónico es similar para la matriz y la nemorosona del extracto 48 Pool (**Figura 31**).

En el caso particular del apiario 35-1C (**Figura 33**) se puede observar que los metabolitos que lo conforman son de peso molecular muy cercano con valores superior a 600 g/mol. Esto hace pensar que la distribución de los compuestos mayoritarios no difiere significadamente en los diferentes propóleos. El experimento ¹H-DOSY es una herramienta poderosa para la exploración de mezclas complejas, los propóleos proporcionando no solo información cualitativa sino cuantitativa en relación con composición y tamaño de los metabolitos, así como el tipo de interacción entre ellos.

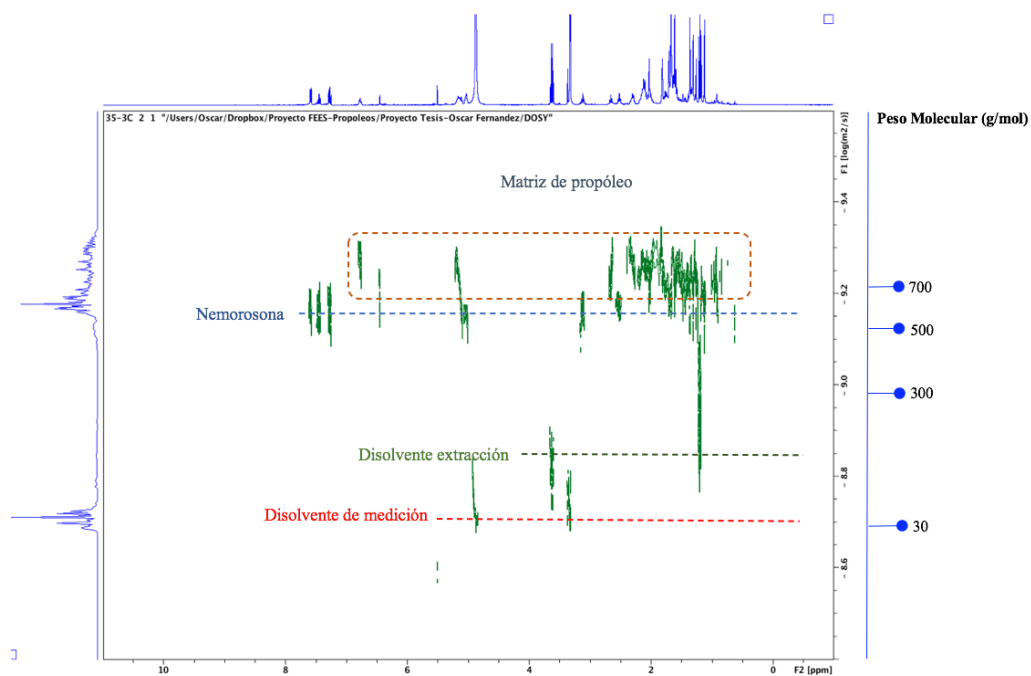


Figura 32. Espectro ^1H -DOSY para el extracto etanólico del apiario 35 colecta 3C (400 MHz; 600 μL CD_3OD ; 5 mg; 298,15 K).

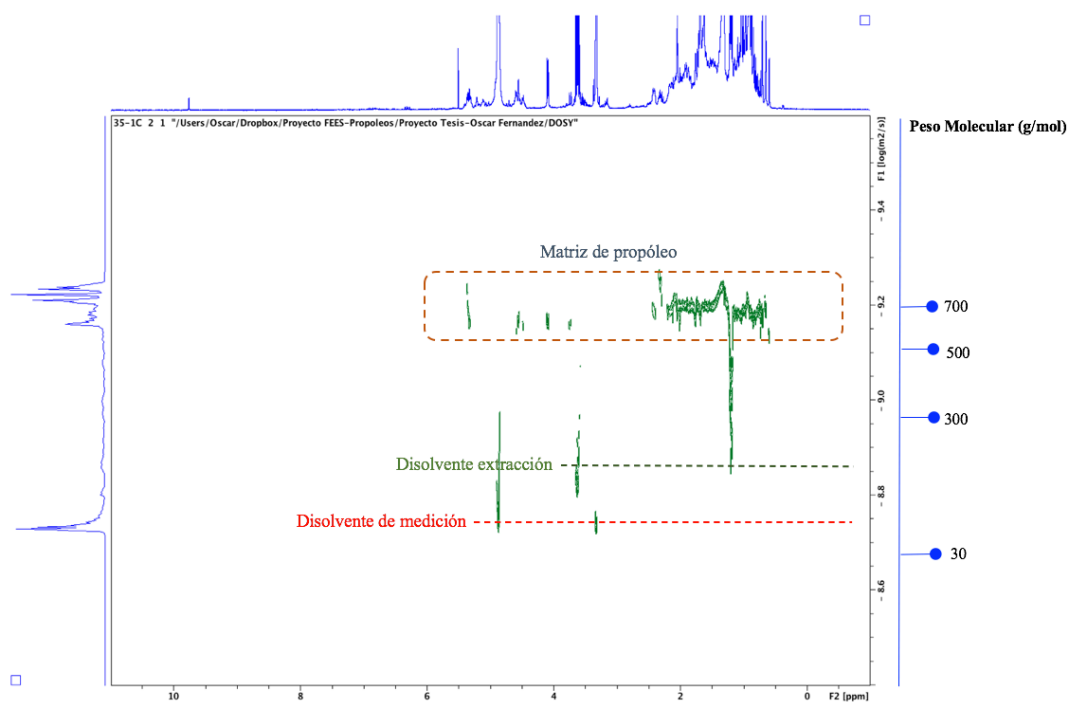


Figura 33. Espectro ^1H -DOSY para el extracto etanólico del apiario 35 colecta 1C (400 MHz; 600 μL CD_3OD ; 5 mg; 298,15 K). Esta colecta no contenía nemorosona.

4.4 Conclusiones

La exploración de la composición de matrices complejas como propóleos mediante ^1H -DOSY es posible y brinda información valiosa relacionada con la diversidad y peso atómico de las moléculas presentes.

La variación en los desplazamientos observados en los espectros ^1H -RMN en la región aromática no es producto de un efecto de encapsulamiento de la matriz sobre la nemorosona.

Las moléculas presentes en mayor concentración en los extractos de los propóleos analizados se tratarían de metabolitos de estructura semejante y peso molecular cercano a los 700 Da posiblemente agregados altamente saturados (nombrados como matriz). Esto hace pensar que la distribución de los compuestos mayoritarios no difiere significadamente en los diferentes propóleos.

4.5 Referencias

1. Jonhson Jr., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, *Progress in Nuclear Resonance Spectroscopy*, **1999**, 34: 203-256.
2. Evans R, Dal Poggetto G, Nilsson M, Morris GA. Improving the Interpretation of Small Molecule Diffusion Coefficients, *Analytical Chemistry*. **2018**, 90(6):3987-3994.
3. Evans R, Deng Z, Rogerson AK, McLachlan AS, Richards JJ, Nilsson M, Morris GA. Quantitative interpretation of diffusion-ordered NMR spectra: can we rationalize small molecule diffusion coefficients? *Angew Chem*, **2013**, 11;52(11):3199-202.
4. Floquet S, Brun S, Lemonnier JF, Henry M, Delsuc MA, Prigent Y, Cadot E, Taulelle F. Molecular weights of cyclic and hollow clusters measured by DOSY NMR spectroscopy, *J Am Chem Soc*, **2009**, 2;131(47):17254-9.
5. Megyes T, Jude H, Grósz T, Bakó I, Radnai T, Tárkányi G, Pálinkás G, Stang PJ. X-ray diffraction and DOSY NMR characterization of self-assembled supramolecular metallocyclic species in solution, *J Am Chem Soc*, **2005**, 3;127(30):10731-8.
6. Smejkalová D, Piccolo A. Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSY-NMR), *Environ Sci Technol*, **2008**, 1;42(3):699-706.
7. Socha, Aaron M.; Kagan, Gerald; Li, Weibin; Hopson, Russell; Sello, Jason K.; Williard, Paul G, Diffusion Coefficient–Formula Weight Correlation Analysis via Diffusion-Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (DOSY NMR) To Examine Acylglycerol Mixtures and Biodiesel Production, *Energy Fuels*, **2010**, 24: 4518-4521.

8. Vieira, M. G. S., Gramosa, N. V., Ricardo, N. M. P. S., Morris, G. A., Adams, R. W., & Nilsson, L. M., Natural product mixture analysis by matrix assisted DOSY using Brij surfactants in mixed solvents, *RSC Advances*, **2014**, 4(79), 42029-42034.
9. Emmanuelle Durand, Martin Clemancey, Anne-Agathe Quoineaud, Jan Verstraete, Didier Espinat, and Jean-Marc Lancelin, ¹H Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as a Powerful Tool for the Analysis of Hydrocarbon Mixtures and Asphaltenes, *Energy & Fuels*, **2008** 22 (4), 2604-2610.
10. Claridge T., High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, 2da Edición, Elsevier, vol 27, **2009**; pp 303.
11. Sforcin J.M., Bankova V., Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?, *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133: 253-260.
12. Gerginova, D.; Simova, S.; Popova, M.; Stefova, M.; Stanoeva, J.P.; Bankova, V. NMR Profiling of North Macedonian and Bulgarian Honeys for Detection of Botanical and Geographical Origin, *Molecules*, **2020**, 25, 4687.
13. Gray I.A., Igoli O. J., Edrada-Ebel R., Natural products isolation in modern drug discovery programs. *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, **2012**, vol 864.
14. Pardo Andreu GL, Reis FH, Dalalio FM, Nuñez Figueredo Y, Cuesta Rubio O, Uyemura SA, Curti C, Alberici LC., The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling, *Chem Biol Interact*, **2015**, 228:28-34.

CAPITULO V. PERFIL QUÍMICO DE PROPÓLEOS COSTARRICENSES DEL QUIMIOTIPO D: NEMOROSONA

Resumen

El estudio del perfil metabólico de los propóleos permite además de la identificación de nuevos metabolitos secundarios, la comprensión de la relación de estos productos con su entorno. En este trabajo se realizó la caracterización del perfil químico mediante GC-MS, LC-MS/MS y adicionalmente, de fracciones y componentes individuales mediante ¹H-RMN de dos apiarios modelo del pacífico sur de Costa Rica. La escogencia de estas muestras se basó en los perfiles de RMN y CLAR-DAD, con los que fue posible identificar valores extremos (concentraciones altas y bajas) en el contenido de nemorosona. Se realizó por cada apiario, tres colectas en cinco colmenas diferentes durante los meses de junio-setiembre del 2014. Para la caracterización mediante GC-MS se utilizaron los disolventes etanol y acetona con el fin de realizar una exploración exhaustiva de la variabilidad química dentro de un mismo apiario y hexano para la comparación entre apiarios diferentes. La caracterización mediante LC-MS/MS se realizó utilizando ESI-Qtof. El análisis de los datos para ambos perfiles se realizó utilizando las herramientas de análisis multivariados: PCA, PLS-DA, Mapas de calor y Dendrogramas utilizando la plataforma en línea MetaboAnalyst. Además se estudió la relaciones estructurales de los metabolitos detectados en ambos perfiles mediante redes moleculares utilizando la plataforma en línea GNPS. Finalmente se realizó un fraccionamiento utilizando cromatografía de columna en dos muestras seleccionadas de ambos apiarios, para su estudio mediante TLC (monitoreadas con λ : 254 nm, 366 nm y anisaldehído) y ¹H-RMN. Se logró determinar que la composición química en ambos apiarios es estadísticamente diferente tanto para perfil GC-MS como para LC-MS/MS, a pesar de estar en zonas relativamente cercanas, lo que indica la gran influencia que tiene el sitio sobre la composición de los propóleos en un país con una biodiversidad tan alta, además se identificó que a mayor contenido de nemorosona menor variabilidad química en el tiempo. Para GC-MS se realizaron 32 anotaciones a nivel 2 siendo las más frecuentes n-alcanos y terpenos y para LC-MS/MS se realizaron 3 anotaciones a nivel 1 correspondientes a la nemorosona y la Scrobiculatona A y B. Mediante el fraccionamiento con cromatografía se aisló y caracterizó el agatadiol junto con la nemorosona y Scrobiculatonas A y B.

5.1 Introducción

Los propóleos son materiales de consistencia pegajosa y generalmente de colores oscuros producidos por las abejas como una defensa biológica y como biobloques de construcción. Sus características físicas pueden variar con la región y flora disponible (1) pues son la materia prima para la elaboración de estos productos. Desde tiempos ancestrales se conocen las propiedades farmacológicas de estos productos tales como: antibacterial, antifúngico, antiinflamatorio, antitumoral entre otros, razón por la cual se ha desarrollado mucha investigación en torno a describir su composición (2, 3, 4, 5).

La composición de los propóleos es muy variable y depende de factores tales como el tipo de plantas disponibles, la estación del año o la especie de abejas productoras. Sin embargo se han podido establecer generalidades en torno a su composición, siendo principalmente que la especificidad de la flora disponible en el sitio de recolección determina en mayor medida la composición química de los propóleos (6,7). Dentro de la familia de compuestos mayoritarios que se han caracterizado en los propóleos (y que destacan por su actividad biológica) se incluyen los fenoles y flavonoides los cuales constituyen la fracción principal de algunos tipos de propóleos (aproximadamente un 20 % en propóleos europeos), hasta el año 2018 se habían identificado aproximadamente 548 diferentes compuestos fenólicos (6). La siguiente familia son los terpenoides los cuales son particularmente abundantes en propóleos tropicales; constituyen una importante fracción en relación con la actividad biológica que manifiestan, para el año 2018 se habían identificado un aproximado de 133 compuestos (6). Finalmente los ácidos grasos, alcoholes grasos, alcaloides y otros compuestos constituyen las fracciones más variables de los propóleos, dentro de las cuales se han identificado metabolitos de gran interés farmacológico, como lo es el caso de la nemorosona.

Para el aislamiento y caracterización química de los propóleos se han utilizado técnicas fitoquímicas clásicas tales como TLC, PTLC, CLAR-DAD, GC-FID las cuales han resultado apropiadas para la identificación de compuestos mayoritarios, pero su alcance cuando se utilizan para describir el metaboloma completo es limitado, razón por la cual cada vez más

se ha buscado la integración con sistema de detección sensibles y que brinden información tanto estructural cómo cuantitativa. Dentro de las técnicas más utilizadas para la caracterización del perfil químico de los propóleos se encuentra la cromatografía tanto de gases (CG) cómo de líquidos (CL) acoplada con espectrometría de masas (8, 9, 10) dado que este arreglo permite obtener tanto información cuantitativa relacionada con la abundancia relativa de metabolitos así como sus características estructurales con una alta sensibilidad y un bajo límite de cuantificación, en un solo análisis lo que permite la optimización de recursos y tiempo (11). Además es posible el procesamiento de los datos para el desarrollo de análisis estadísticos multivariados (ejemplo: PCA, PLS-DA) que mejoren la comprensión de los perfiles observados y contribuyan en la identificación de metabolitos secundarios (12). En años recientes se ha facilitado considerablemente este proceso gracias al desarrollo de bases de datos, tanto de acceso libre (Ejemplo: Metlin, MassBank, GNPS) como privadas (Ejemplo: Wiley, NIST) (11).

La espectrometría de masas aplicada en la dereplicación de metabolomas complejos (como el de propóleos) ha tenido avances significativos en los últimos años con el desarrollo de herramientas bioinformáticas que mejoran y simplifican el procesamiento de datos en sus etapas de detección (feature detection), alineamiento, normalización e identificación e integrándose oportunamente con el avance en los sistemas de detección de masas MS/MS tales cómo: Q-TOF (tiempo de vuelo), TQ (triple cuadruplo) o Q-TRAP (trampa de iones). La utilización de instrumentos de alta resolución y el empleo de tecnologías MS-MS permite a la vez la identificación de de metabolitos secundarios conocidos (dereplicación).

Un ejemplo es el análisis de patrones de fragmentación mediante algoritmos de similitud tales como las redes moleculares (molecular networks) (13), la cual representa una nueva estrategia para análisis metabolómicos. La aplicación en conjunto de todas las herramientas mencionadas ha sido poco explorada en el estudio de la huella química de propóleos, de manera que este trabajo busca aportar una mejor comprensión del metaboloma de los propóleos utilizando las mejores herramientas bioinformáticas disponibles.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Recolección de propóleos y selección de sitios de muestreo: fue de interés del proyecto centrarse en la zona del Pacífico sur, cuyos apiarios en estudios preliminares mostraron tener una consistencia en el contenido de nemorosona. Por ello, se seleccionaron 2 apiarios representativos: el apiario de menor variación ubicado en Buenos Aires de Puntarenas (ID: 48) y el de mayor variación ubicado en Pérez Zeledón (ID: 35) de San José. En cada apiario se seleccionaron de las colectas de 1-3, las colmenas A-E para un total de 15 muestras (5 por cada colecta). En la **Figura 20** se detalla su ubicación. Los propóleos se colectaron utilizando rejillas de extracción, las cuales fueron proporcionadas por parte del CINAT-UNA y recolectadas por el personal de este Centro. Una vez entregadas, las muestras fueron almacenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. Para el fraccionamiento cromatográfico del apiario 48, se unieron las colectas 1-3, colmenas A-E (15 colectas en total) en una mezcla denominada: 48 Pool. Para validar la combinación se determinó el contenido de nemorosona dentro de cada colecta, por cada colmena y entre las colectas 1-3, obteniendo una variación promedio en el contenido de nemorosona menor al 6,4 % RSD.

5.2.2 Aislamiento de la Nemorosona: fue aislada y purificada del apiario 48 Pool mediante cromatografía de capa fina preparativa (PTLC). Se pesaron 100 mg de extracto etanólico de propóleo y separaron en cromatofolios de vidrio de (20 x 20) cm recubierta con silica gel (CAS# 112926-00-8, GF₂₅₄, Merck) utilizando una fase móvil de hexano (CAS: 110-54-3, Merck) y acetato de etilo (CAS: 141-78-6, Merck) en relación 7:3, se recolectó la fracción con un $R_f \approx 0,6$. Este compuesto revela con solución metanólica del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl (DPPH•) (CAS: 1898-66-4, Merck) a 1 mg/mL. Se determinó la pureza mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (CLAR-DAD) a $\lambda = 254\text{ nm}$ utilizando el método descrito en el **CAPÍTULO III**, se obtuvo un producto final con un 99,8 % de pureza. Para la caracterización estructural se pesó del producto purificado 5 mg, se disolvió en 600 μL de metanol-d₄ (CAS: 811-98-3, Merck, 99,8 % D) y se trasvasaron a un tubo de 5 mm (Marca Bruker) para su análisis en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

5.2.3 Aislamiento de Agatadiol: Se fraccionaron 560 mg del apiario 35, colecta 1C mediante cromatografía líquida de vacío (VLC; siglas en inglés) con dimensiones (16 x 35) cm y un volumen de cama de 135 mL. La separación se realizó con un gradiente de hexano:éter etílico: Metanol (ver **Cuadro 7**), se utilizó como fase estacionaria Kieselgur G (8129, Merck) en un relación 1/100. Se recolectaron 33 fracciones, se unieron la fracción 19 a 22 que contenía el agatadiol (49,3 mg) mayoritariamente. La fracción compuesta se separó mediante cromatografía de capa fina preparativa (PTLC, siglas en inglés), utilizando cromatofolios de vidrio de (20 x 20) cm con recubierta de silica gel (CAS# 112926-00-8, GF₂₅₄, Merck) con un sistema CH₂Cl₂:MeOH (95:5) ($R_f = 0,40$), revelando con anisaldehído en ácido sulfúrico y DPPH•. Se pesó 5 mg del producto purificado, se disolvió en 600 μ L de CDCl₃, Pureza: 99,8 % (CAS # 865-49-6, Merck) para su análisis en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

5.2.4 Aislamiento de los productos Scrobiculactona A y Scrobiculactona B: fue aislada y purificada mediante cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) a partir de una mezcla de las colectas 1-6 del apiario 48. Se pesaron 100 mg de extracto etanólico de propóleo y separaron en cromatofolios de vidrio de (20 x 20) cm recubierta con silica gel (CAS: 112926-00-8, GF₂₅₄, Merck) utilizando una fase móvil de hexano (CAS: 110-54-3, Merck) y acetato de etilo (CAS: 141-78-6, Merck) en relación 7:3, se recolectó la fracción con un $R_f \approx 0,70-0,75$. Se monitoreó la separación mediante la revelación uso de la longitud de onda corta en lámpara UV. Posteriormente se purificó mediante HPLC-UV a $\lambda = 254$ nm utilizando una columna Xterra RP18 150 x 3,9 mm de 5 μ m de tamaño de partícula. Se utilizó un flujo de 1 mL/min, isocrático, una fase móvil de (95:5) v/v de Metanol (CAS: 67-56-1, Merck) y agua desionizada respectivamente. Se pesó 5 mg del producto purificado, se disolvió en 600 μ L de metanol-d₄ (CAS: 811-98-3, Merck, 99,8 % D) para su análisis en RMN.

5.2.4 Medición de espectros RMN: se utilizó un equipo Bruker, modelo: Ascent de 400 MHz. Para la medición de la nemorosona en metanol-d₃ Pureza: 99,8 % (CAS # 811-98-3, Merck) se utilizaron las siguientes condiciones: se utilizó el pulso zg30 para ¹H y zgpg30 para ¹³C, un tiempo de adquisición de 2,72 s para ¹H y 0,90 s para ¹³C. Para la medición de la agatadiol en cloroformo-d Pureza: 99,8 % (CAS # 865-49-6, Merck) se utilizaron las

siguientes condiciones: se utilizó el pulso zg30 para ^1H y zgpg30 para ^{13}C , un tiempo de adquisición de 4,09 s para ^1H y 1,36 s para ^{13}C . Para la medición de las Scrobiculactonas A y B en cloroformo-d se utilizaron las siguientes condiciones: el pulso zg30 para ^1H y zgpg30 para ^{13}C y un tiempo de adquisición de 4,09 s para ^1H y 1,36 s para ^{13}C . La obtención de los espectros de 2D se realizó utilizando los siguientes programas de pulsos: cosygpmfppf, hmbcetgp13nd y hsqcedetgpcp.3. La temperatura de medición para todos los espectros fue de 298,1 K.

5.2.5 Preparación y medición de extractos para en GC-MS: Se preparó un extracto por cada colmena y colecta disponible. Para ello se pesó 0,400 g de propóleo seco y homogenizado y se extrajo utilizando 10 mL de Etanol absoluto (CAS # 64-17-5, Merck) en baño sónico (Fisher Scientific, modelo FD 28) por 10 min. Posteriormente se pesó 50 mg de extracto, se re-disolvió en 0,5 mL de diclorometano (CAS # 75-09-2, Merck) previamente evaporado hasta sequedad utilizando evaporador rotatorio (Buchi, modelo R-111), se pasó a través de una micro columna (pipeta pasteur con 200 mg de SiO_2 60, 230-400, CAS # 112926-00-8, Merck) utilizando 2 mL de diclorometano. El filtrado se evaporó a sequedad utilizando nitrógeno gaseoso (Grado UAP, 99,5 % Pureza) y se resuspendió en 1,5 mL de etanol para su posterior inyección en GC-MS. Se procedió de igual manera para los extractos de n-hexano (CAS # 110-54-3, Merck) y acetona (CAS # 67-64-1, Merck), cambiando únicamente el disolvente utilizado para la filtración en microcolumna; se utilizó el disolvente de extracción para cada caso (acetona y hexano). Para el análisis de las muestras en hexano se utilizó un cromatógrafo de gases marcha Shimadzu®, modelo GC-17A, con detector de masas QP5000, con una columna cromatográfica MDN-5S (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm de espesor de película). Se utilizó una temperatura de inyección de 250 °C, en modo Split, un flujo de columna de 1,3 mL/min con Helio (Grado UAP, 99,9 % Pureza), la temperatura inicial del horno fue de 60 °C, con una rampa de 15 °C min^{-1} hasta 100 °C, luego 15 °C min^{-1} hasta 310 °C (15 min), tiempo de programa: 31,67 min. Se utilizó modo de adquisición Scan, temperatura de fuente 310 °C, rango de masas adquirido (33,00-700,00) m/z con un intervalo de 0,5 s. Para el análisis de las muestras en etanol y acetona se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de masas QP2010 SE, marcha Shimadzu®, con una columna cromatográfica RTx-Wax (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm de espesor de película). Se

utilizó una temperatura de inyección de 200 °C, en modo Split, un flujo de columna de 1,69 mL/min con Helio (Grado UAP, 99,9 % Pureza), la temperatura inicial del horno fue de 50 °C (1 min), con una rampa de 20 °C min⁻¹ hasta 140 °C, luego 10 °C min⁻¹ hasta 200 °C y 10 °C min⁻¹ hasta 230 °C (16 min), tiempo de programa: 33,50 min. Se utilizó modo de adquisición Scan, temperatura de fuente 250 °C, rango de masas adquirido (50,00-480,00) m/z con un intervalo de 0,3 s. El Software utilizado para la adquisición de datos fue GC-MS Solution V 4.20. Todos los espectros fueron adquiridos utilizando una energía de ionización de 70 eV.

5.2.6 Anotaciones para GC-MS: La identificación (Annotations) se realizó mediante comparación del espectro de masas contra las bases de datos de NIST y Wiley utilizando un porcentaje de similitud mínimo de 80 % (14). Adicionalmente se estimó el índice de Kovats a partir de la inyección de un estándar de n-alcenos de C7-C30 (49451-U, Merck) y se comparó con el reportado en <https://webbook.nist.gov/chemistry/>.

5.2.7 Preparación y medición de extractos para en LC-MS/MS: Se preparó un extracto por cada colmena y colecta disponible. Para ello se pesó 0,400 g de propóleo seco y homogenizado, se extrajo utilizando 10 mL de Etanol absoluto (CAS # 64-17-5, Merck) en baño sónico (Fisher Scientific, modelo FD 28) por 10 min. Seguidamente se centrifugó (Savant, modelo: SC200) por 5 min, el líquido sobrenadante se evaporó hasta sequedad utilizando un evaporador rotatorio (Buchi, modelo R-111). Se preparó una disolución etanólica de cada extracto obtenido a una concentración de 2,0 mg/mL para el análisis por LC-MS/MS. Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo de ultra alta resolución (UPLC, siglas en inglés) modelo ACQUITY Ultra Performance LCTM de la marca Waters ® con automuestreador y detector PDA. Se utilizó un detector de masas ESI-QToF modelo Synapt, marca Waters ®, con una columna BEH C₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 µm de tamaño de partícula) conectado en serie posterior al PDA. Se utilizó un ajuste de temperatura para la columna de 70,0 °C, para el automuestreador de 10,0 °C, un volumen de inyección de 4,00 µL. La fase móvil utilizada fue [A]: 0,1 % ácido fórmico acuoso, [B]: 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo (CAS# 75-05-8, Fischer Scientific), se utilizó el siguiente gradiente escalonado en [B], t (min): 10 %, 0,05; 20 %, 1,30; 40 %, 7,00; 95 %, 20,00; 95 %, 21,10; 10 %, 25,00.

Se mantuvo un flujo de 0,950 mL/min (0,0-20,0) min, 1,00 mL/min (20,1-21,0) min, 0,950 mL/min (21,1-25,0). Tiempo total de corrida 25,00 min. El flujo de gas de desolvatación (N₂) se estableció 450 L/Hr y una temperatura de desolvatación de 200 °C, el flujo de gas de cono (N₂) fue 10,0 L/Hr y la temperatura de fuente 150 °C. El voltaje del capilar fue 1,2 kV y 45 kV para el cono de muestreo. La detección se optimizó utilizando dos funciones MS: a baja energía de colisión 4 eV para registrar masa exacta y la segunda a un rampa de (10-40) eV para registrar patrones de fragmentación en modo MseTM (mass spectrometry exploration, de Waters, modo de adquisición independiente de datos). Ambas funciones con un tiempo de scan de 0,1 s e interscan de 0,020 s. Los experimentos MS/MS se obtuvieron utilizando la función de colisión inducida por disociación (CID, siglas en inglés) con energías de colisión de (10 a 40) eV, según cada molécula. Todos los datos (modo positivo y negativo) se adquirieron utilizando Lock SprayTM, y como lock mass Leucina-encefalina ([M+H]⁺: 556, 2771), modo continuo, con una frecuencia de spray lock de 10 s, adquisición de datos promedio 10 scans. Como estándar para la medición se utilizó Quercetina (CAS #117-39-5), Tr: 2,113 min. El Software utilizado para la adquisición de datos fue MassLynx V 4.1

5.2.8 Análisis estadísticos: Los análisis quimiométricos se realizaron utilizando la plataforma en línea para análisis metabolómicos: www.metaboanalyst.ca V 5.0 (15) que utiliza como base para los cálculos estadísticos el programa R. GC-MS: Se cargó una tabla matriz (*.csv) con 28 muestras y 56 características (intensidad de picos) para las muestras extraídas utilizando Acetona/Etanol y con 40 características para las muestras extraídas con hexano. Para la revisión de integridad de los datos, se utilizó el parámetro por defecto (se sustituye por el mínimo valor positivo ceros y valores negativos). Ambas matrices se filtraron de acuerdo con la desviación estándar, se normalizaron por suma constante y se escalaron por el método de pareto (promedio centrado y dividido por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable). El análisis por componentes principales (PCA, siglas en inglés) se realizó utilizando el paquete prcomp de R, el análisis de discriminante mediante mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, siglas en inglés) se realizó utilizando la función pls del paquete pls de R (16), la clasificación y validación se realizó utilizando la función wrapper del paquete caret (17) de R. El Mapa de calor por agrupación gerárquica (Hierarchical Clustering Heatmap, nomenclatura en inglés) se realizó utilizando la función hclust del

paquete stat de R. LC-MS/MS: se cargó una matriz de 30 muestras y 760 características para ionización negativa y 204 para ionización positiva. El procesamiento y análisis estadístico se realizó de igual forma que los datos de GC-MS, utilizando la sección del cromatograma comprendida entre 4,99-14,795 min.

5.2.9 Procesamiento de datos y Redes moleculares (Feature-Based Molecular Networking, FBMN):

Los datos *.cdf de los análisis de GC/MS se procesaron en MZmine v2.53 ® de la siguiente forma: se realizó una detección de picos y selección de ruido utilizando *mass detection* con un tolerancia de 0,02 m/z y un ruido de 2,0E3, una reconstrucción cromatográfica utilizando el algoritmo ADAP chromatogram builder con una tolerancia de 1.0 m/z; un tamaño mínimo de 4 scans; un límite de agrupación (Group intensity threshold) de 3,4E2; una intensidad máxima de 2,0E3, una filtración utilizando el pico isotópico más intenso con una tolerancia de 0,05 m/z, una deconvolución utilizando el algoritmo ADAP (wavelets), una alineación utilizando el algoritmo ADAP con un tolerancia de 0,5 m/z. Los tabla procesada (feature table) fue exportada en formato *.mgf para su análisis en GNPS. Los datos *.raw de los análisis LC-MS/MS se procesaron de la siguiente manera: utilizando el software MassLynx v4.1 se realizó el centrado de los datos crudos, posteriormente se realizó la deconvolución, alineado y centrado de los datos mediante el software MSDial v1. 82, y la tabla final (features table) se exportó en formato *.mgf para su análisis en GNPS. De forma manual se eliminaron las funciones 3 y 4 de los archivos *.raw y se procedió a transformarlos en formato *.mzML utilizando el software ProteoWizard v3 para su posterior análisis en GNPS. A partir de la tabla procesada (feature table) mediante MSDial, se le dio el formato apropiado manualmente y se exportó en *.csv para su análisis en MetaboAnalyst. Las redes moleculares (molecular networks) se construyeron utilizando la herramienta en línea de GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>), utilizando la sección del cromatograma comprendida entre 4,99-14,795 min. Para GC-MS se utilizó el flujo Library Search/Molecular Networking GC (18), se definió una tolerancia para el ión precursor de 2,0 Da y una tolerancia para los fragmentos iónicos MS/MS de 0,5 Da. Se utilizó una puntuación de coseno de 0,7 para los edges (líneas que conectan los nodos de acuerdo con la similitud en el espectro de fragmentación) y más de 10 picos coincidentes. El tamaño máximo de la familia molecular se estableció en 100. Para LC-MS/MS se utilizó el flujo Feature-Based

Molecular Networking (FBMN) (19), se utilizó una tolerancia para el ión precursor y los fragmentos MS/MS respectivamente de 0,02 y 0,05 Da. Se utilizó una puntuación de coseno para los edges de 0,7 y un número mínimo de coincidencias por fragmento de 3. El tamaño máximo de la familia molecular es estableció en 100. Tanto para GC-MS como para LC-MS/MS se realizaron búsqueda para anotaciones en las bases de datos espectrales de GNPS. Para la visualización de las redes se utilizó el software Cystoscape V 3.8.0 (20).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Selección de sitios de muestreo y rendimiento de extracción.

Para la selección de los sitios de muestreo (**Figura 34**) se tomó en consideración la variabilidad en el contenido de nemorosona discutida en el **CAPITULO III**, de manera que se seleccionaron los casos que permitieran la observación de la máxima y mínima variabilidad siendo respectivamente los apiarios: 35 y 48. Se eligieron las primeras tres colectas dado que el contenido de nemorosona tiende a disminuir conforme se aproxima la época seca y además son los meses en los que se producen propóleos con el contenido más alto de nemorosona.

El rendimiento de extracción (ver **Cuadro 8**) promedio fue de 45,25 % m/m, el cual es muy semejante al observado en propóleos cubanos con alto contenido de nemorosona, pues de acuerdo con Cuesta-Rubio et al., 2002 (21) el rendimiento de extracción promedio fue de 48,08 % m/m; sin embargo al comparar la variabilidad entre los diferentes sitios de muestreo los propóleos analizados en este trabajo mostraron un 14,29 % RSD (n=15) mientras que en los del estudio citado fue de 44,61 % RSD (n=21), lo que parece indicar que los propóleos costarricenses con alto contenido de nemorosona tendrían un rendimiento de extracción más homogéneo (posiblemente una menor variabilidad química por sitio), sin embargo se debe confirmar esta hipótesis realizando un muestreo con una mayor cantidad de apiarios.

La separación del muestreo en colmenas dentro de cada apiario, ayudó a aumentar la producción de propóleo dado que permitió la rotación y redujo el desgaste por colmena, pues la producción de propóleo requiere una gran inversión de energía por parte de las abejas. Aprovechando este diseño, se seleccionaron las colmenas para cada muestreo de forma aleatoria con el fin de representar la mayor variabilidad posible asociada a cada apiario. La caracterización del rendimiento de extracción es indispensable para el aprovechamiento de los extractos de propóleos como materia prima, de manera que el protocolo desarrollado en este trabajo brinda una alternativa apropiada para su adecuada preparación.



Figura 34. Ubicación de los sitios de muestreo seleccionados para la caracterización química de apiarios ricos en nemorosona.

Cuadro 8. Descripción de muestras seleccionadas para análisis fitoquímico, (*): Rendimiento promedio de recolección por colecta y colmena de propóleo seco.

Sitio	Apiario	Colectas **	Colmenas	Mes de recolección	Propóleo (g) *	Rendimiento extracción (%)
Pérez Zeledón	35	1	A-E	Junio-Julio	16,08	40,91
		2		Julio-Agosto	23,62	39,52
		3		Agosto-Setiembre	29,78	57,01
Buenos Aires, Puntarenas	48	1	A-E	Junio-Julio	34,95	48,15
		2		Julio-Agosto	36,72	43,18
		3		Agosto-October	26,53	42,74

5.3.2 Caracterización fitoquímica tradicional

La caracterización fitoquímica de los apiarios modelo 35 (colecta 1C) y 48 Pool se realizó de acuerdo con los protocolos de separación mostrados en las **Figuras 35 y Figura 36**. Se inició con un fraccionamiento mediante VLC (cromatografía líquida al vacío, siglas en inglés) a partir de los extractos etanólicos estandarizados. La caracterización de cada fracción se hizo mediante $^1\text{H-RMN}$, pues esta técnica permite observar la totalidad de compuestos presentes por cada fracción de una forma eficiente y rápida, adicionalmente se complementó la información mediante cromatografía de capa fina de una dimensión (CCF) junto con un revelador universal no destructivo (λ : 254 nm y 366 nm). En el fraccionamiento se aplicó un gradiente con polaridad creciente y la evaluación del rendimiento se realizó mediante la distribución por fracción de masa. Para el extracto 35-1C se obtuvo una recuperación global de 90,3 % y para el extracto 48 Pool fue de 85,6 % de manera que se consideró apropiado el protocolo de fraccionamiento pues las recuperaciones fueron significativamente altas.

En la **Figura 35** se muestran los resultados de la caracterización fitoquímica para el extracto 48 Pool. El análisis por $^1\text{H-RMN}$ junto con la CCF, permitió identificar en las fracciones 1-8 una mezcla de compuestos con características estructurales semejantes a la nemorosona por lo que se procedió a separar mediante CLAR-UV obteniendo una mezcla de compuestos (que se intercombierten entre sí) con un R_f de 0,71 y 0,74, ambos metabolitos se caracterizaron mediante RMN (1D y 2D) como Scrobiculactona A y B (ver **Figuras 38 y 39** respectivamente). A partir de las fracciones 9-11 se logró recuperar la nemorosona, la cual fue posteriormente purificada mediante PTLC y caracterizada mediante RMN (1D y 2D) (ver **Figura 40**). En las fracciones de 18-24 se recuperaron compuestos lipídicos mayoritariamente ácidos grasos saturados e insaturados, en las fracciones 25-29 se identificaron principalmente grasas de tipo ceras altamente saturadas y finalmente en las fracciones 30-31 se encontraron compuestos altamente polares (funcionalizados principalmente con grupos -OH-). Las fracciones mayoritarias (mayor masa) contenía la nemorosona y ceras de alto peso molecular lo que indica que la composición principal de propóleo 48 Pool estaría dominada por estos compuestos.

En apiario 48 se aisló la nemorosona, la cual se detalla la caracterización estructural en el **CAPITULO II**, este metabolito han sido plenamente indentificado y aislado tanto de propóleos (principalmente de origen cubano) como de plantas del género *Clusia*; se le ha asociado actividad biológica anticancerígena (22, 38), cariogénica (23), antibacterial (24) y antioxidante (40). Es importante destacar que los propóleos costarricenses poseen la concentración más alta reportada hasta el momento para este metabolito, lo que refuerza la necesidad de una apropiada caracterización como materia prima, ya sea para el desarrollo de productos con fines farmacológicos o para el aislamiento y estudio de la nemorosona.

En la caracterización fitoquímica del apiario 35-1C (**Figura 36**) no se identificó la nemorosona, De las fracciones 1-13 se se trataron de compuestos lipofílicos, principalmente ácidos grasos saturados de cadena larga. En las fracciones 14 y 15-18 (mayor concentración) se observó una mezcla de compuestos alifáticos, con sistemas vinílicos y alílicos destacando el agatadiol (ambas fracciones revelaron positivo con Anisaldehído sulfúrico). En la fracción 19-22 se obtuvo como compuesto principal el agatadiol (**Figura 37**), este metabolito ya había sido aislado en propóleos de origen colombiano (25) y mediterráneo (26). A partir de las fracciones 23-25 y 26 se obtuvo principalmente ceras, las cuales al igual para en el apiario 48 Pool constituyen una de las fracciones mayoritarias en los propóleos. Finalmente, en las fracciones 27-33 se obtuvieron compuestos altamente polares, con características similares a las observadas en el extracto del propóleo 48 Pool.

En la caracterización estructural del agatadiol, mediante ^1H -RMN, se identifican claramente los tres singuletes correspondientes a los metilos de C-16, C-18 y C-20 (δ : 1.69; 0.67; 0.99), el exometileno en C-17 (δ : 4.84; 4-54) así como el protón vinílico en C-14 (δ : 5.39). En el espectro ^{13}C -RMN a campo bajo se identificaron los carbonos vinílicos C-17, C-8 (δ : 106.3; 148.3) del exometileno en el segundo anillo y C-13, C-14 (δ : 140.3; 123.1) respectivamente. Con ayuda del espectro COSY se identificó la correlación de H-15, H-14. Con HMBC se pudo definir la ubicación de los alcoholes primarios en C-19 y C-15. Con el espectro HMBC y HSQC se terminó de definir el esqueleto de labdano. Este terpeno ha sido aislado inicialmente de árboles del género *Cupressus* (conocido como ciprés) y se le asociado con actividad antifúngica principalmente (27, 28).

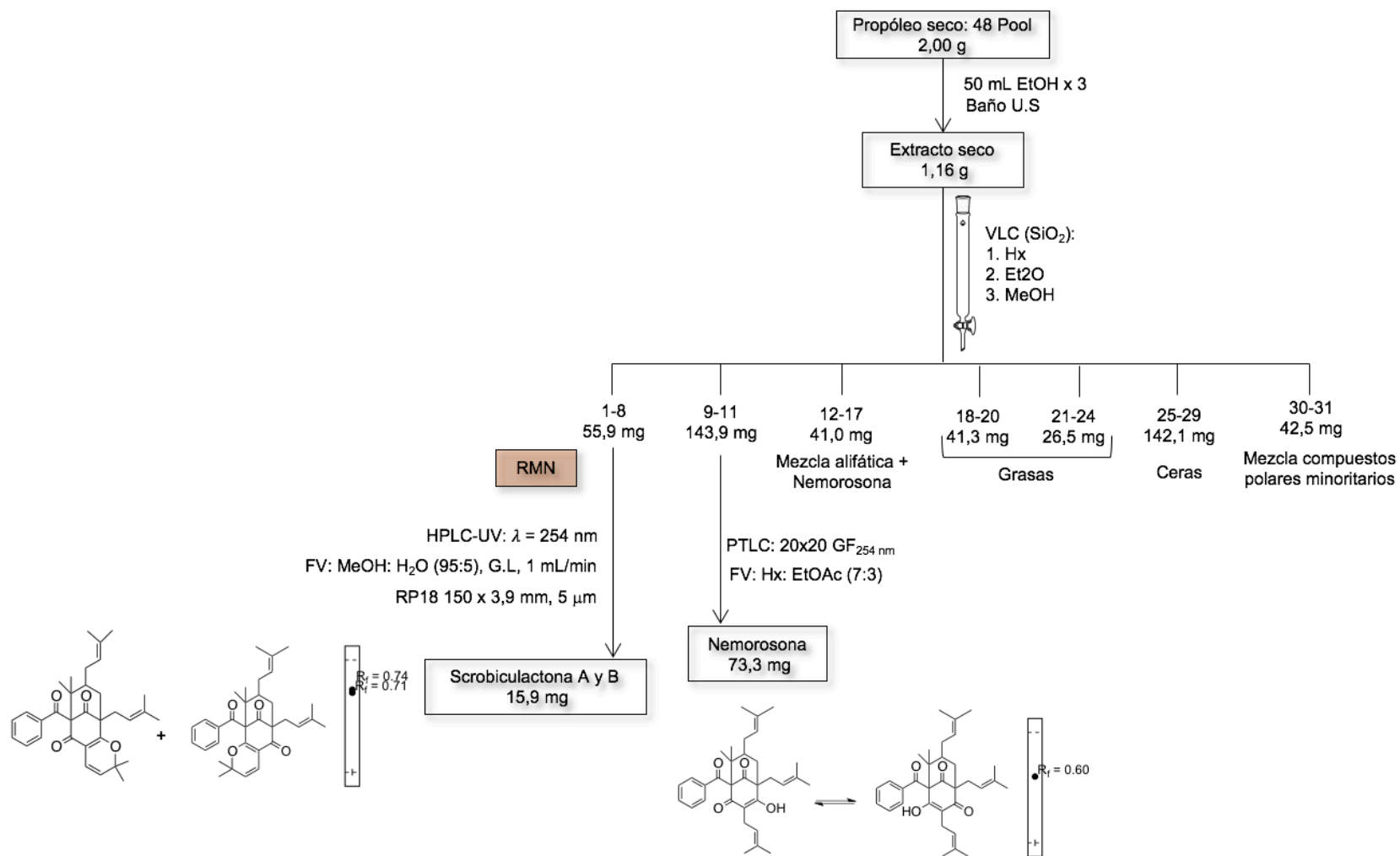


Figura 35. Esquema de separación fitoquímica utilizado para la caracterización del extracto etanólico del propóleo 48 Pool.

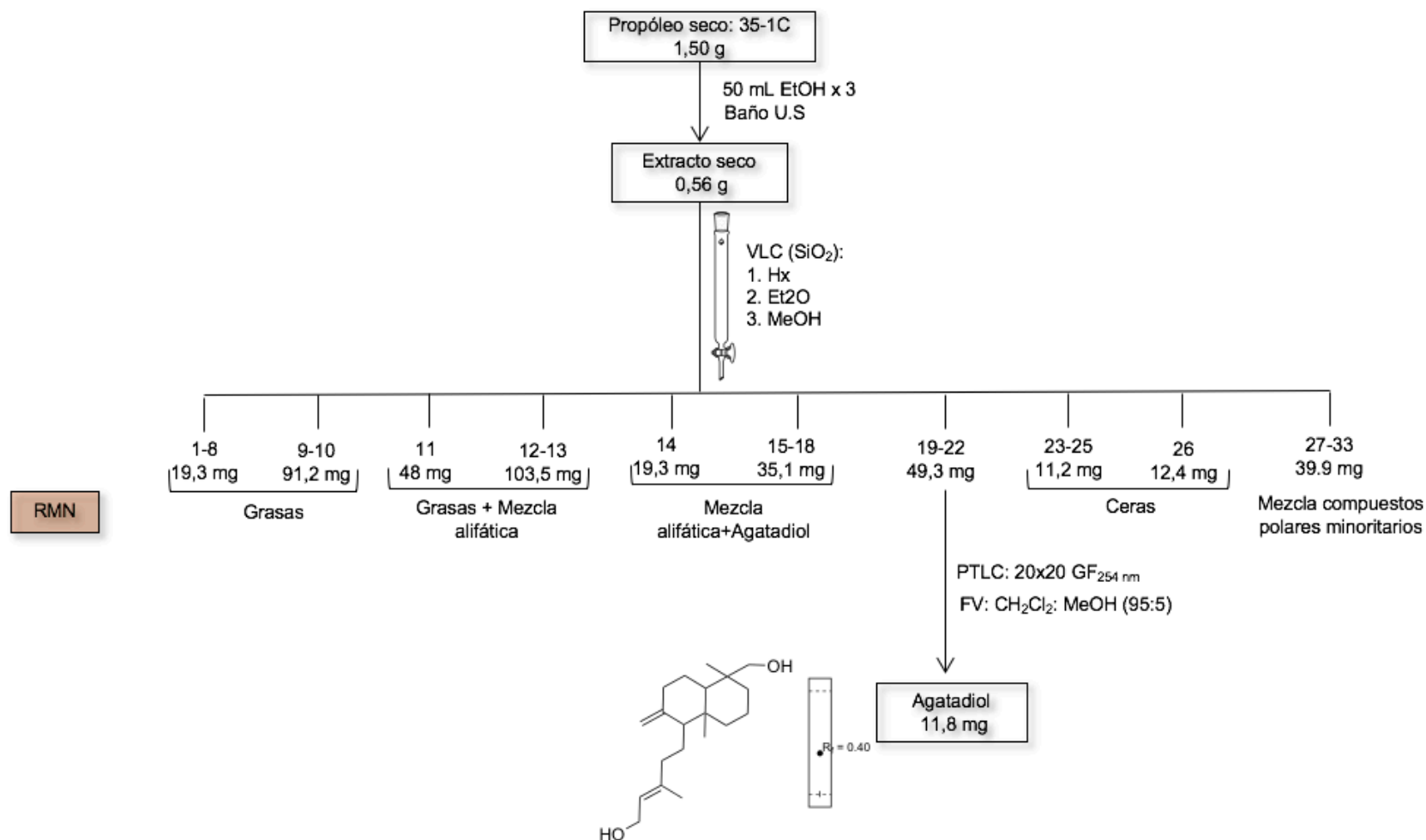


Figura 36. Esquema de separación fitoquímico utilizado para la caracterización del extracto etanólico del propóleo 35-1C.

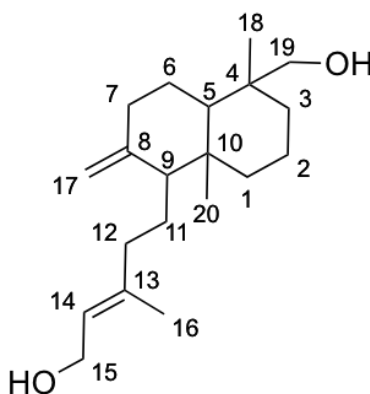


Figura 37. Estructura molecular del Agatadiol, **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃): 5.40 (1H, t, J = 6.98, H-14), 4.85 (1H, s, H-17a), 5.54 (1H, s, H-17b), 4.17 (2H, d, J = 6.93, H-15), 3.76 (1H, d, J = 10.9, H-19a), 3.42 (1H, d, J = 10.8, H-19b), 2.40 (1H, m, H-7), 1.96 (1H, m, H-12), 1.90-1.77 (6H, m, H-1, H-2, H-3, H-6, H-7, H-9), 1.69 (3H, s, H-16), 1.66-1.23 (6H, m, H-1, H-2, H-5, H-6, H-11), 0.99 (3H, s, H-18), 0.96-0.86 (1H, H-3), 0.67 (3H, s, H-20). **¹³C-RMN** (400 MHz, CDCl₃): 148.3 (C-8), 140.8 (C-13), 123.1 (C-14), 106.3 (C-17), 65.3 (C-19), 59.4 (C-15), 56.3 (C-5), 56.4 (C-9), 39.01 (C-1), 39.86 (C-12), 38.62 (C-7), 38.35 (C-4), 35.4 (C-7), 27.05 (C-18), 24.45 (C-6), 21.81 (C-11), 18.99 (C-2), 16.34 (C-16), 15.31 (C-20).

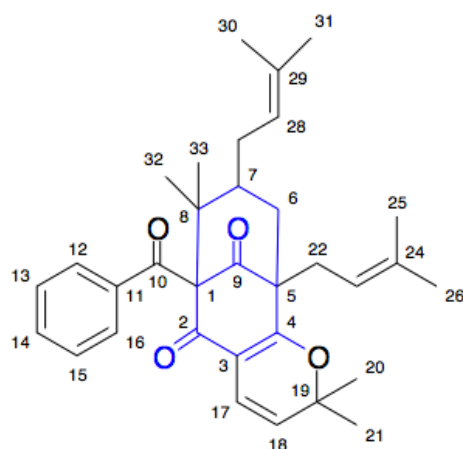


Figura 38. Estructura molecular de la Scrobiculactona A, **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃): 7.64 (2H, dd, J = 7.26, H-13, H-14), 7.52 (2H, dd, J = 7.44, H-12, H-16), 7.43 (1H, dt, J = 7.90, H-14), 6.50 (1H, dt, J = 10.18, H-17), 5.24 (1H, s, H-18), 5.05 (1H, s, H-23), 5.01 (1H, m, H-28), 2.61; 2.49 (2H, s, H-22), 2.03; 2.19 (2H, s, H-27), 2.00; 2.06 (2H, s, H-6), 1.69 (3H, s, H-25), 1.67 (3H, s, H-30, H-33), 1.57 (6H, s, H-31, H-26), 1.42 (3H, s, H-32), 1.41 (1H, s, H-7), 1.38 (3H, s, H-20), 1.23 (3H, s, H-21). **¹³C-RMN** (400 MHz, CDCl₃): 206.5 (C-9), 193.2 (C-10), 167.5 (C-2), 167.01 (C-4), 133.4 (C-11), 134.23 (C-24), 132.28 (C-29), 128.4 (C-14), 81.8 (C-19), 127.92 (C-12, C-16), 128.04 (C-13, C-15), 122.6 (C-28), 124.0 (C-18), 119.4 (C-23), 112.73 (C-3), 65.44 (C-1), 72.01 (C-5), 48.16 (C-8), 43.8 (C-7), 42.24 (C-6), 26.93 (C-27), 29.0 (C-22), 25.92 (C-31), 24.7 (C-26), 24.6 (C-21), 24.05 (C-32), 114.52 (C-17), 18.16 (C-30), 28.40 (C-20), 18.0 (C-25), 25.86 (C-33).

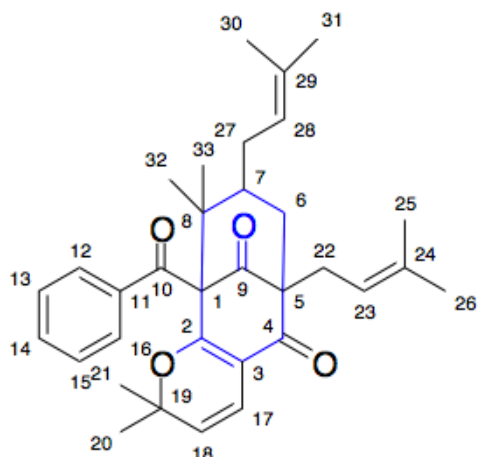


Figura 39. Estructura molecular de la Scrobiculactona B, $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 7,64 (2H, dd, $J = 7.26$, H-13, H-14), 7,52 (2H, dd, $J = 7.44$, H-12, H-16), 7,43 (1H, dt, $J = 7.90$, H-14), 6,46 (1H, dt, $J = 10.06$, H-17), 5,41 (1H, s, H-18), 5,05 (1H, s, H-23), 5,04 (1H, m, H-28), 2,60 (2H, s, H-22), 2,15 (2H, s, H-27), 2,00; 2,06 (2H, s, H-6), 1,69 (6H, s, H-25, H-30), 1,59 (6H, s, H-26, H-31), 1,57 (6H, s, H-31, H-26), 1,56 (3H, s, H-20), 1,15 (3H, s, H-32), 1,41 (1H, s, H-7), 1,27 (3H, s, H-21). $^{13}\text{C-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 206.6 (C-9), 193.0 (C-10), 191.79 (C-2), 170.28 (C-4), 133.4 (C-11), 133.5 (C-24), 132.02 (C-29), 128.4 (C-14), 83.4 (C-19), 128.38 (C-12, C-16), 128.44 (C-13, C-15), 120.0 (C-28), 123.6 (C-18), 119.4 (C-23), 1124.27 (C-3), 79.39 (C-1), 57.64 (C-5), 48.7 (C-8), 43.8 (C-7), 39.93 (C-6), 27.79 (C-27), 29.0 (C-22), 25.86 (C-31), 25.9 (C-26), 29.34 (C-21), 23.3 (C-32), 119.67 (C-17), 18.0 (C-30), 28.5 (C-20), 18.24 (C-25), 25.54 (C-33).

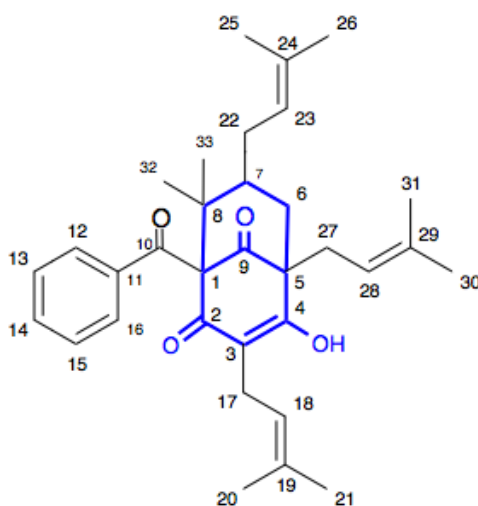


Figura 40. Estructura molecular de la Nemorosona, $^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CD_3OD): 7,57 (2H, d, $J = 7.85$, H-12, H-16), 7,43 (2H, tt, $J = 7.43$, H-14), 7,25 (2H, dt, $J = 7.51; 8.4$, H-13, H-14), 5,10 (2H, tt, $J = 7.54$; 14.52, H-18, H-28), 5,02 (1H, m, H-23), 3,10 (2H, m, H-17), 2,50 (2H, m, H-27), 2,15 (1H, m, H-22), 2,01 (1H, dd, $J = 13.34$, H-6ax), 1,77 (1H, m, H-7), 1,74 (1H, $J = 13.1$, H-22), 1,70 (6H, s, H-25, H-31), 1,68 (3H, s, H-26), 1,66 (6H, s, H-20, H-21), 1,39 (1H, s, H-6eq), 1,36 (3H, s, H-32), 1,12 (3H, s, H-33). $^{13}\text{C-RMN}$ (600 MHz, CD_3OD): 209 (C-9), 193.9 (C-10), 193.8 (C-2), 175.1 (C-4), 137.0 (C-11), 135.0 (C-24), 133.0 (C-29), 131.9 (C-14), 131.4 (C-19), 128.3 (C-12, C-16), 127.3 (C-13, C-15), 121.6 (C-28), 121.3 (C-18), 119.8 (C-23), 119.2 (C-3), 77.0 (C-1), 60.9 (C-5), 47.6 (C-8), 43.2 (C-7), 41.4 (C-6), 29.3 (C-27), 27.1 (C-22), 25.1 (C-31), 25.0 (C-26), 24.9 (C-21), 23.1 (C-32 eq), 22.8 (C-17), 17.1 (C-30), 17.0 (C-20), 16.8 (C-25), 14.9 (C-33).

5.3.3 Caracterización metabólica mediante cromatografía de gases con detección de Masas (GC-MS)

La fracción de compuestos no polares y volátiles (FNPV) de los propóleos es de gran importancia para una adecuada caracterización, pues definen propiedades organolépticas que influyen directamente en las preferencias de los consumidores (7). La composición de esta fracción es considerablemente compleja, pues incluye una diversidad de compuestos tales como: aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, terpenos, entre otros (8, 29). La combinación de GC-MS con herramientas estadísticas multivariadas y una adecuada dereplicación brinda información integral de la composición y relaciones entre componentes dentro de cada propóleo, tal y como se verá a continuación en los apiarios modelo.

Se eligieron los apiarios 35 (Pérez Zeledón) y 48 (Buenos Aires, Puntarenas) por su diversidad química pues de acuerdo con el análisis del contenido de nemorosona y a la caracterización mediante fraccionamiento en CC el apiario 35 mostró la mayor variabilidad de compuestos y contenido de nemorosona, mientras que el apiario 48 mantuvo un comportamiento homogéneo en cuanto a contenido de nemorosona y la diversidad de compuestos observados no fue alta. Se analizaron las colectas 1, 2 y 3 para ambos apiarios (correspondieron a las de mayor variación en el contenido de nemorosona). Cada colecta se compone de 5 colmenas diferentes elegidas aleatoriamente.

El procesamiento de los datos se realizó siguiendo el esquema detallado en la **Figura 41**, a partir de la obtención de los cromatogramas de iones totales (TIC, siglas en inglés), se procedió con la dereplicación utilizando las bases de datos de NIST y Wiley. La calidad de las asignaciones se evaluó utilizando el algoritmo de distancia Manhattan para similitud de búsqueda (14) y en los casos adonde fue posible adicionalmente se comparó la correlación entre el índice de retención (Kovats) calculado con respecto al reportado en la literatura (ver **Figura 42**), esto con el fin de mejorar la calidad de la anotación (30).

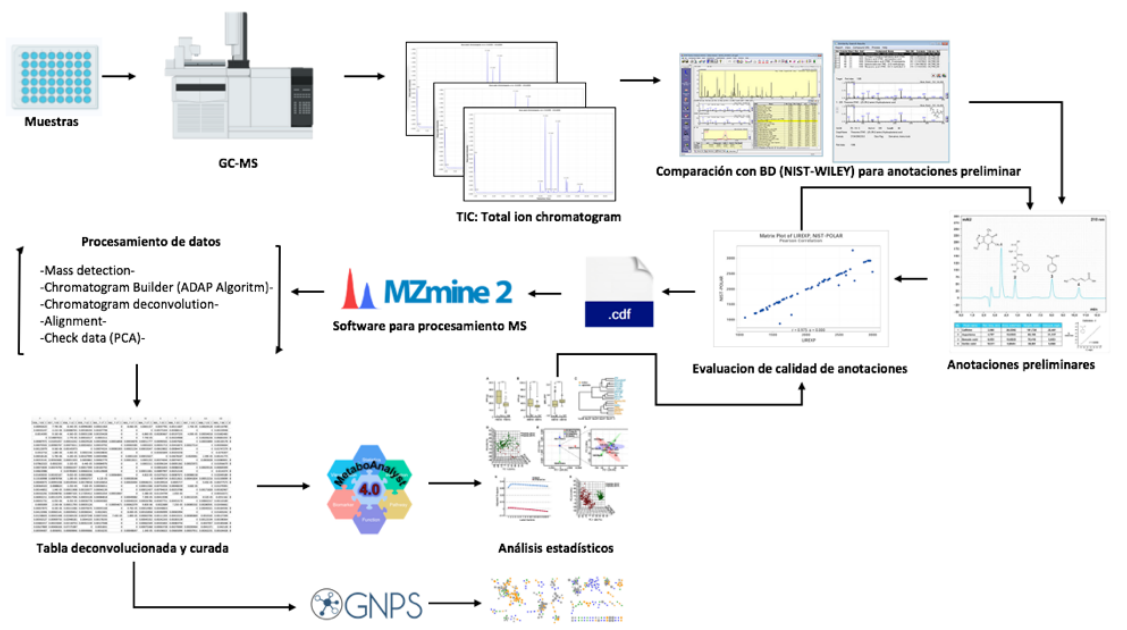


Figura 41. Esquema de trabajo para el procesamiento de datos de GC-MS para análisis estadístico multivariado e identificación de compuestos.

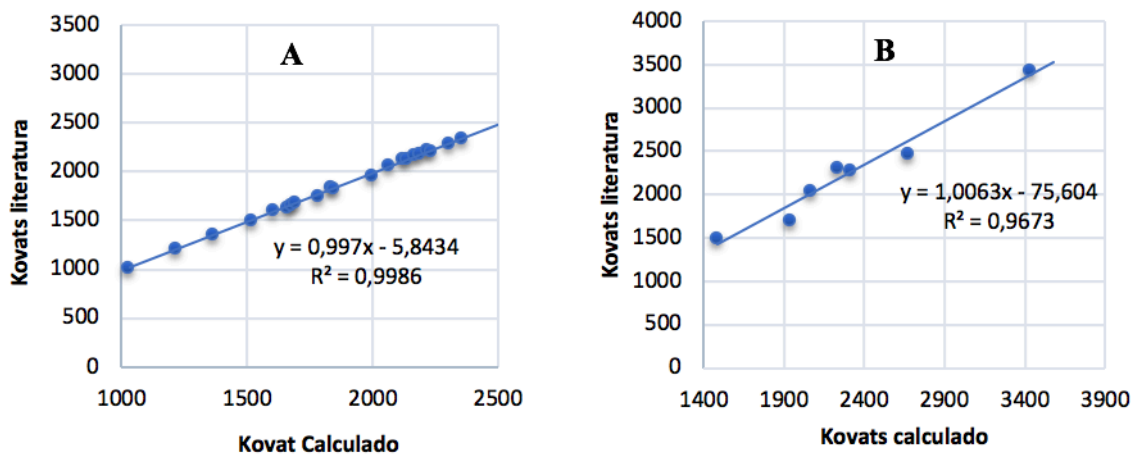


Figura 42. Calidad de las anotaciones evaluadas mediante la correlación entre el índice de Kovats calculados y el reportado en la literatura para los datos generados de los extractos de acetona y etanol (A) y Hexano (B).

Finalmente se procedió a generar dos tablas deconvolucionadas y alineadas utilizando el Software de código abierto MzMine ® 2.53, con 40 scans para el análisis de la fracción en hexano (apiario 35 y 48, colectas:1-3) y 56 scans para las fracciones de Acetona y Etanol (Apiario 35, colectas 1-6). La posibilidad de generar tablas con variables alineadas con el formato necesario para el procesamiento estadístico hace de MZmine una herramienta de código abierto versátil y robusta para el procesamiento de datos MS. El procesamiento de los TIC's se realizó mediante el algoritmo de reconstrucción cromatográfica conocido como ADAP el cual ha sido especialmente diseñado para datos metabolómicos no dirigidos (Untargeted metabolomics) (31).

La cantidad de compuestos que conforman la FNPV fue amplia (ver **Figura 43**), por lo que la extracción utilizando disolventes con diferentes polaridades (hexano, acetona, etanol) resulta una excelente estrategia, pues la recuperación es más exhaustiva y selectiva. Se pudo identificar la presencia de compuestos terpénicos altamente volátiles como eucaliptol y alfa-pineno que han sido reportados en propóleos, pero utilizando herramientas de captura para GC como el Headspace (29). El uso de condiciones moderadas de extracción también influyó en la recuperación pues redujo la posibilidad de alteraciones estructurales que dificultara la identificación (32).

El perfil cromatográfico de la FNPV extraída con hexano para los apiarios 35 y 48 se muestra en la **Figura 44**. Las fracciones mayoritarias se trataron de un 43 % de hidrocarburos saturados, 23 % de terpenos bicíclicos y 22 % de hidrocarburos insaturados. Como parte de los hidrocarburos saturados se obtuvo un perfil n-alcános desde C24-C26 (ver **Cuadro 9**) que junto con los terpenos y olefinas (hidrocarburos insaturados) se incluyen dentro de lo que se conoce como “resinas”, las cuales se originan en los árboles y plantas que tienen a su disposición las abejas y de acuerdo con la literatura corresponde a la fracción mayoritaria de los propóleos, siendo aproximadamente un 50 % de estos (9).

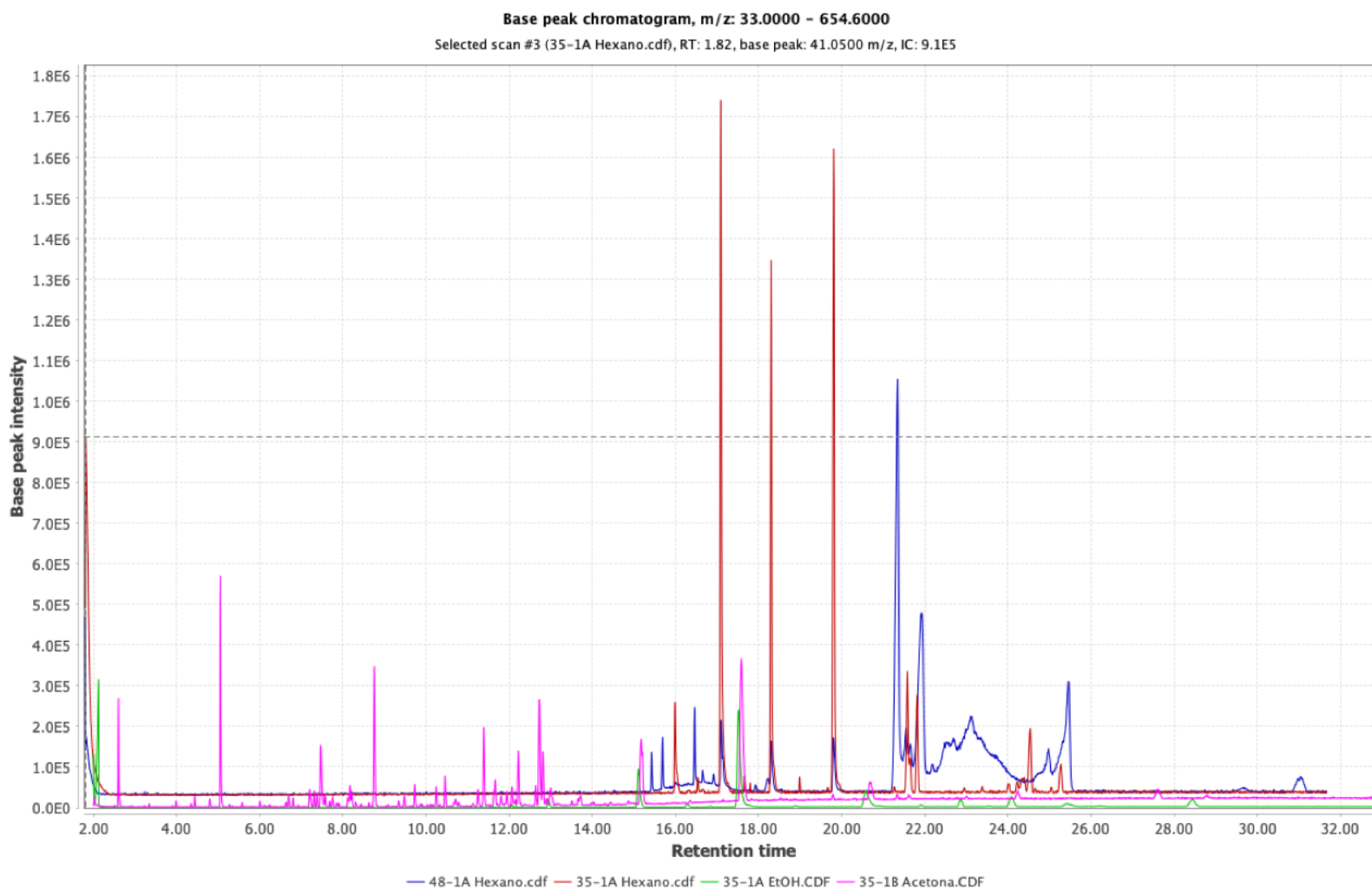


Figura 43. Cromatogramas GC-MS representativos de la variabilidad observada en los diferentes disolventes utilizados para el análisis de composición: hexano, etanol y acetona.

La fracción de acetona y etanol del apiario 35 mostró de igual forma los hidrocarburos saturados como fracción mayoritaria, siendo un 53,3 % del total de compuestos identificados (**Figura 45**). Destaca una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga (6,57 %) que en el caso de las extracciones en hexano. De acuerdo con el perfil obtenido utilizando etanol y acetona es posible recuperar una mayor diversidad de compuestos, tal y cómo se muestra en la **Cuadro 10**. Todas las familias de compuestos indetificados en los tres disolventes utilizados ya fueron previamente reportados en propóleos (8, 32).

Los resultados del perfil químico de la FNPV de los propóleos de ambos apiarios muestra una distribución consistente con la literatura predominando las resinas como componentes principales. Sin embargo es importante destacar que la fracción correspondiente a compuestos terpénicos es alta en comparación con lo reportado por la literatura pues, en promedio un propóleo está constituido por un 10 % de aceites esenciales (33), convencionalmente dentro de esta fracción se han incluido diferentes tipos de terpenos tales cómo: sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenos, entre otros.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el contenido de estos compuestos en los propóleos costarricenses sería cercana a un 20 %, es importante aclarar que esto no es extraño ya que al tratarse de propóleos tropicales la fracción de estos metabolitos es mayor que otros propóleos, cómo el caso de los europeos adonde predominan principalmente flavonoides (33). Esta fracción aporta importantes actividades biológicas y cómo se mencionó anteriormente su presencia tiene un importante papel en la percepción sensorial (aroma) de los propóleos.

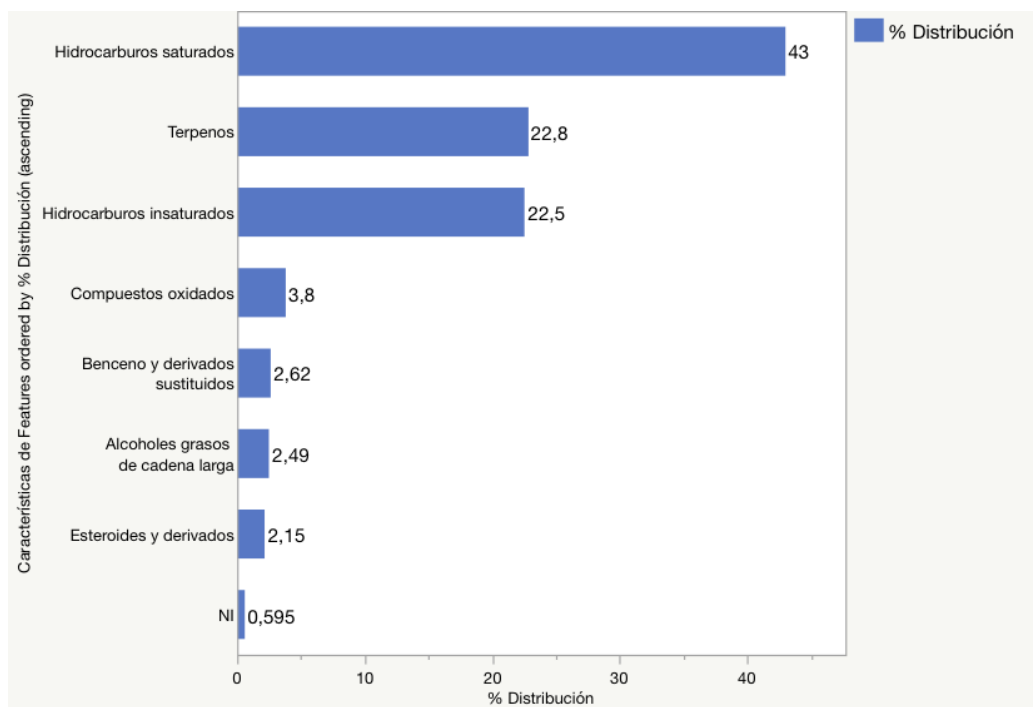


Figura 44. Distribución porcentual por clase de compuestos identificados en los extractos de las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48 (Disolvente: Hexano).

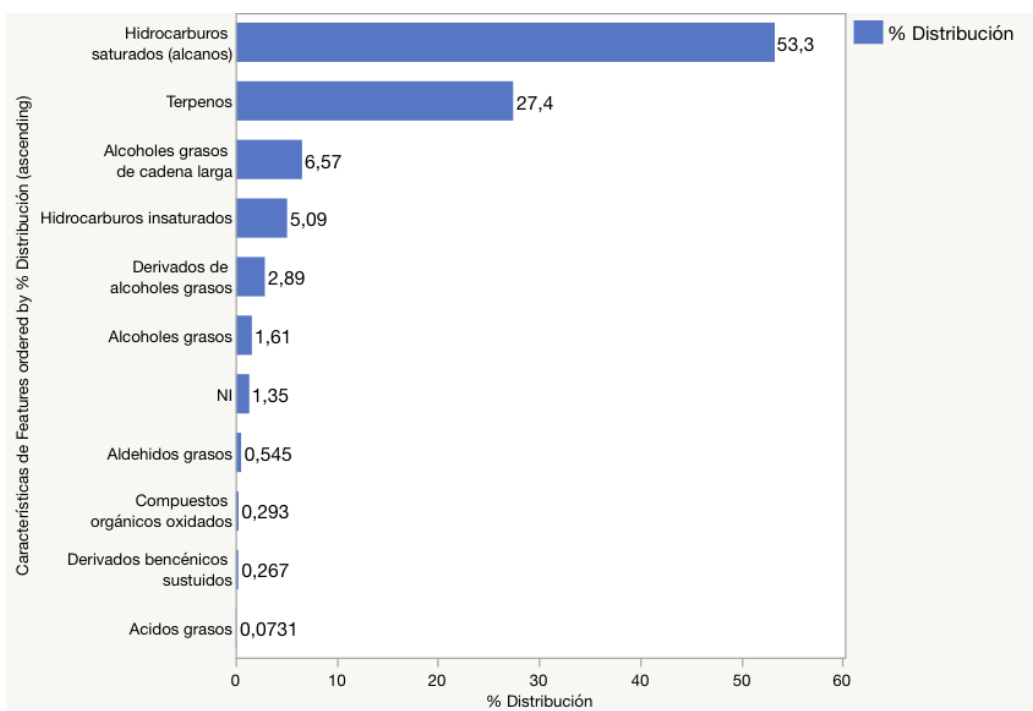


Figura 45. Distribución porcentual por clase de compuestos identificados en los extractos de las colectas 1-3 del apiario 35 (Disolvente: Etanol y Acetona).

Cuadro 9. Compuestos identificados en los extractos preparados en hexano a partir de los propóleos seleccionados 35 y 48 para las colectas 1-3.

Tiempo de Retención (min)	Identificación	Formula molecular	Peso Molecular (g/mol)	Indice de Kovats ^{Exp}	Indice de Kovats ^{Lit}	Similitud (%)
12,62	Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1936	1702	75
13,53	Kaureno	C ₂₀ H ₃₂	272	2063	2043	80
14,66	2-cis-geranilgeraniol	C ₂₀ H ₃₄ O	290	2236	2301	84
15,15	Totarol	C ₂₀ H ₃₀ O	286	2314	2278	77
15,99	Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	339	2456	2456	95
17,11	Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	367	2651	2651	97
18,30	Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	395	2844	2844	98
19,81	Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282	3041	3041	97
21,60	Nonacosanol	C ₂₉ H ₆₀ O	425	3221	N.I	95
21,83	Hexatriacontano	C ₃₆ H ₇₄	507	3240	3240	94
24,57	Olean-12-en-3-ona	C ₃₀ H ₄₈ O	425	3433	3438	89

Tabla 10. Compuestos identificados en los extractos preparados en Etanol y Acetona a partir para las colectas 1-3 del apiario 35.

Tiempo de Retención (min)	Identificación	Formula molecular	Peso Molecular (g/mol)	Indice de Kovats ^{Exp}	Indice de Kovats ^{Lit}	Similitud (%)
2,61	Alfa-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	1031	1020	97
3,99	Eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1218	1215	94
6,11	Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	204	1513	1510	85
6,80	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1606	1600	93
7,20	4(15),5-Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	204	1658	1642	89
7,47	Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	1692	1678	91
8,18	Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	204	1778	1745	95
8,63	Acido hexanoico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	1831	1851	97
8,75	Calameneno	C ₁₅ H ₂₂	202	1845	1832	95
10,10	Oxido de Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1996	1960	87
10,71	Cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2064	2063	90
11,25	Cedrol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2123	2127	93
11,35	Acorenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2135	2123	91
11,65	Tau-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2168	2169	90
11,80	Alfa-cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2185	2188	88
12,12	Palmitato de metilo	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	2219	2213	93
12,20	Tau-muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2227	2200	86
12,99	Isofítol	C ₂₀ H ₄₀ O	297	2308	2282	96
13,47	Oxido de Manoilo	C ₂₀ H ₃₄ O	290	2353	2331	86
14,44	Totarol	C ₂₀ H ₃₀ O	286	2444	N,I	91
16,33	Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	409	2607	N,I	94
17,58	Tetracontano	C ₄₀ H ₈₂	563	2708	N,I	96

Para explorar las diferencias de composición entre los apiarios 35 y 48 se realizó un análisis por componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) a partir de la tabla deconvolucionada y centrada de los datos generados en las extracciones en hexano (34). Utilizando las componentes PC1 y PC2 el modelo obtenido explica un 60,2 % de la varianza observada por lo que se puede considerar confiable (35). En el PCA: Score-plot (**Figura 46**) se observa dos grupos claramente diferenciables, lo que indica que con la extracción en hexano se obtiene una composición diferenciable entre ambos apiarios. En el apiario 35 se observa una mayor dispersión, altamente influenciada por el tiempo de recolección (representado en PC2) mientras que el apiario 48 todas las colectas muestran una composición similar, lo que confirma su alta homogeneidad.

En el Hierarchical Clustering Heatmap (**Figura 48**) se observa que la colecta 35-3C posee una concentración significativamente alta de eicosano, octacosano, hexacosano y hexatriacontano por lo que su composición se asemeja más al apiario 48, y de ahí su ubicación en el dendrograma. Para las colectas 48-3B la diferencia con respecto a las demás del mismo apiario es una concentración significativamente mayor de compuestos terpénicos y alcanos saturados, que además es una tendencia en las muestras correspondientes a la tercera colecta del apiario 48. Es posible que con el aumento en la época lluviosa la disponibilidad de resinas de plantas y árboles (adonde se originan los alcanos mencionados) sea mayor, pues tendrían como fin ayudar a las abejas a proteger la colmena mediante impermeabilización contra la humedad; esto podría contribuir a explicar la tendencia observada.

Para explorar más exhaustivamente las diferencias observadas en el PCA, se realizó análisis de discriminante mediante mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, por su siglas en inglés), el cual maximiza la covarianza entre los datos y los grupos observados (42) facilitando así la interpretación de la variabilidad observada. En el PLS-DA Scores Plot (**Figura 47:A**) nuevamente la muestra 35-3C se encuentra fuera del clúster del apiario 35, pero las diferencias en la colecta 3 para las muestras del apiario 48 desaparecen.

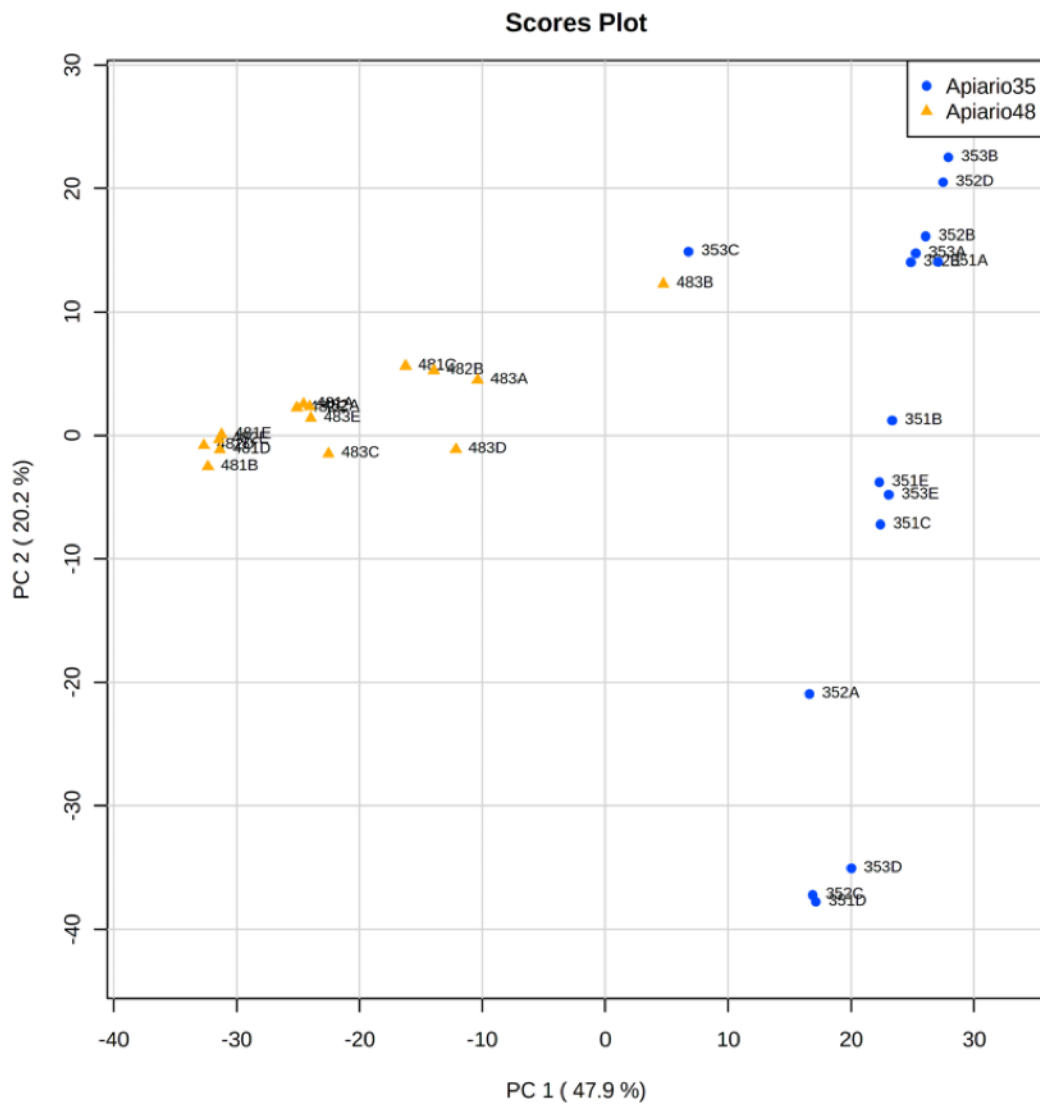


Figura 46. PCA Scores plot de PC1 vs PC2 de los apiarios 35 y 48 extraídos con Hexano (colectas 1-3).

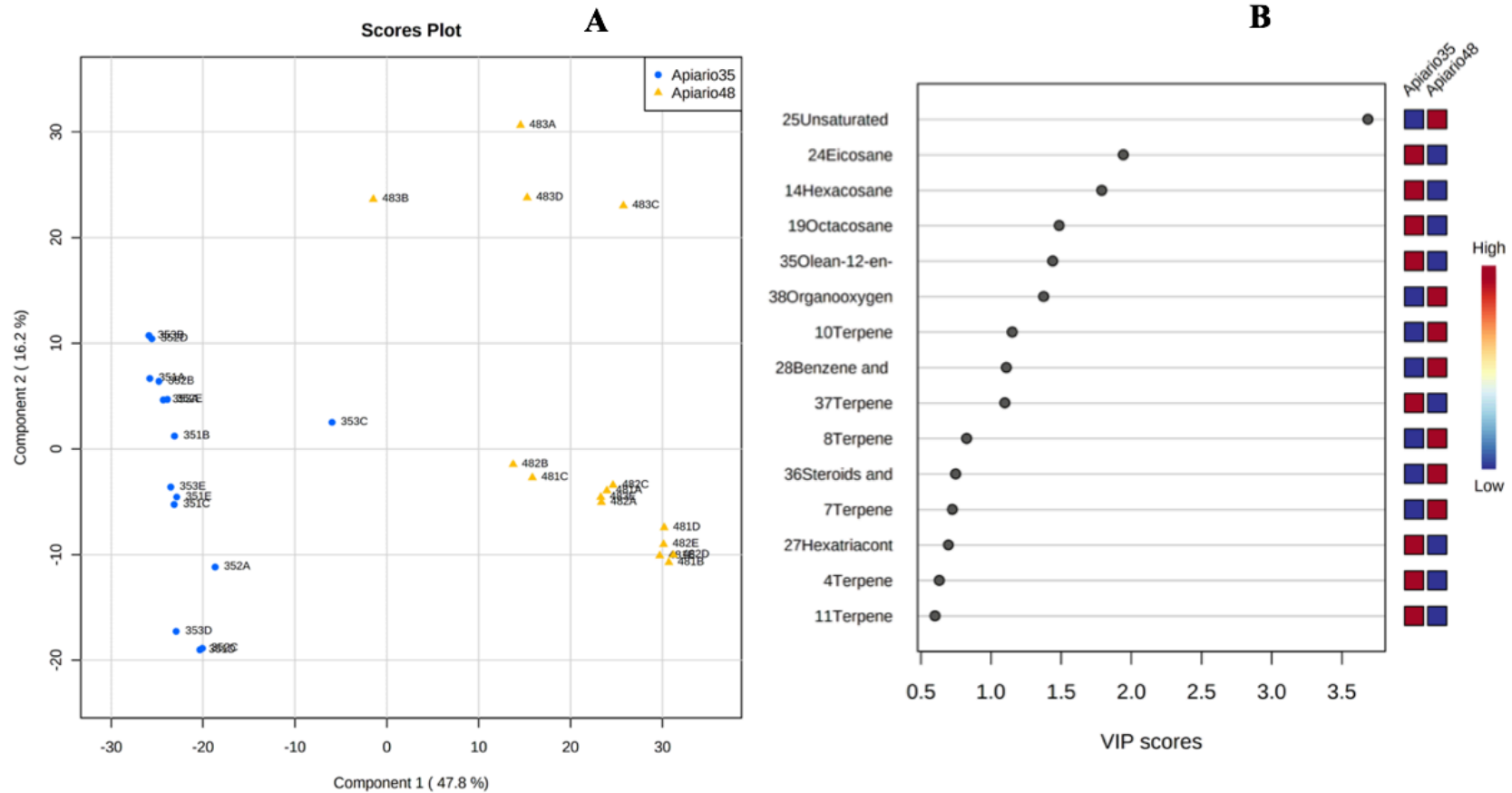


Figura 47. A: PLS-DA Score Plot de PC1 vs PC2, **B:** 15 puntuaciones de mayor diferenciación (VIP Score Plot) para PC1, de los apiarios 35 y 48 extraídos con Hexano (colectas 1-3) (Los nombres de los compuestos se incluyen en inglés).

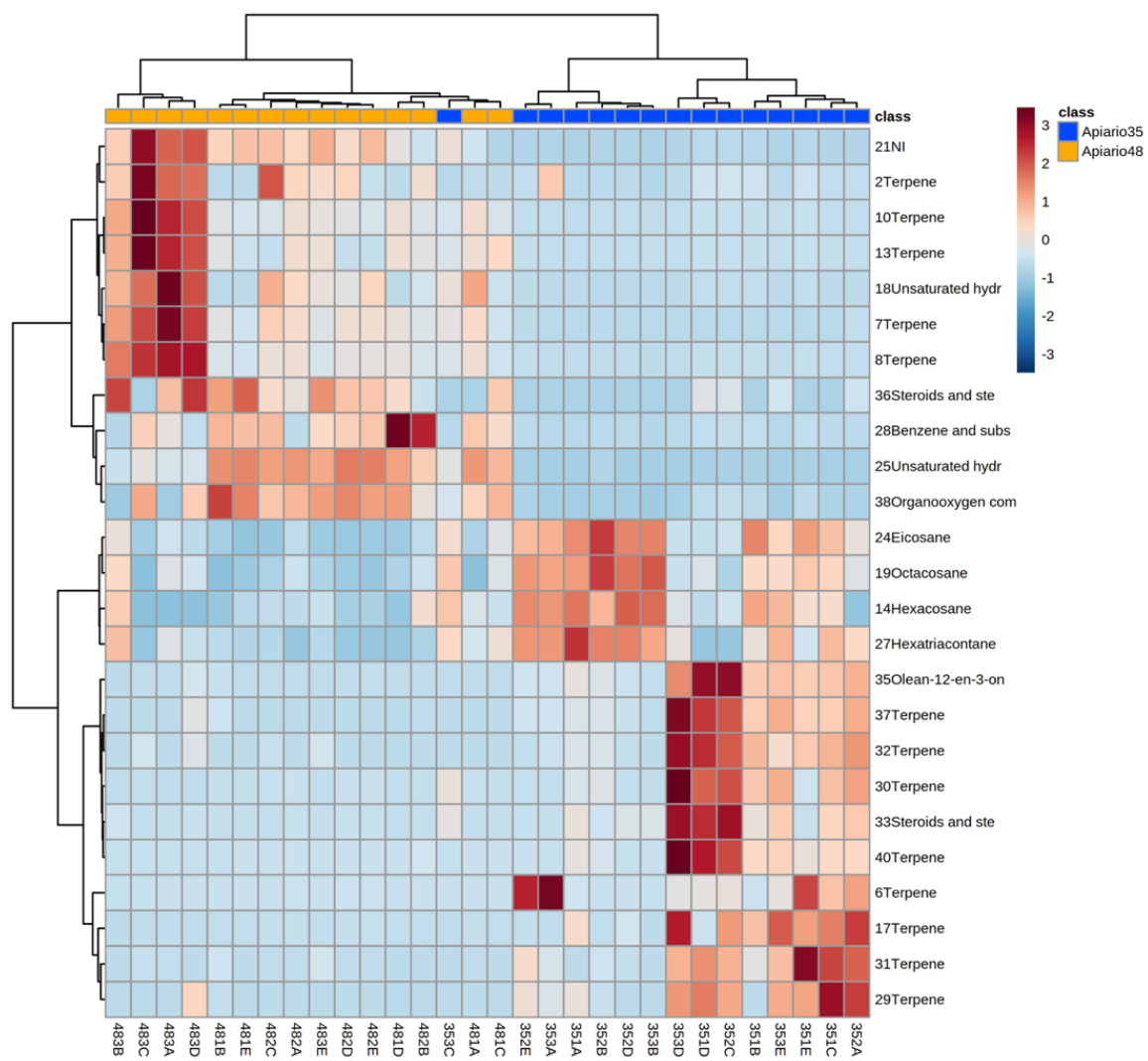


Figura 48. Hierarchical Clustering Heatmap (Mapa de calor por agrupación gerárquica) para 25 anotaciones de las colectas 1-3 extraída con hexano de los apiarios 35 y 48. Autoescalado de acuerdo al peso de cada compuesto (features), agrupado de acuerdo con distancia euclidiana (algoritmo de clusterizado: Ward)

De los cinco primeros metabolitos con el VIP Score mayor y por lo tanto más influyentes en el modelo (**Figura 47:B**), el primero se ubica principalmente en el apiario 48 en el scan 25 (Tr: 21,95 min) se trataría de una olefina que no fue posible identificar, los restantes cuatro metabolitos se ubican en el apiario 35 y sus identidades serían: scan 24 a Tr:19,81 min /eicosano ($C_{20}H_{42}$), scan 14 a Tr:17,11 min/hexacosano ($C_{26}H_{54}$), scan 19 a Tr:18,30 min/octacosano ($C_{28}H_{58}$) y scan 35 a Tr: 24,57 min/ Olean-12-en-3-ona. Por lo tanto, el perfil de n-alcenos para el apiario 35 sería la causa principal de variabilidad que además no muestra relación particular con el tiempo de colecta. Para el apiario 48, a pesar de ser un solo metabolito el causante de la diferenciación, la concentración se mantiene constante en todas las colectas realizadas lo que confirma la homogeneidad ya vista en este apiario.

Finalmente para la exploración de la relación estructural entre los patrones de fragmentación de los espectros deconvueltos se construyeron redes moleculares (Molecular Networks) a partir de los datos de hexano, acetona y etanol para cada apiario. Esta herramienta permite visualizar la similitud en los patrones de fragmentación y con la respectiva identidad poder asociarse a precursores (metabolitos) comunes, siendo una forma eficiente y novedosa de explorar perfiles metabólicos de mezclas complejas (43, 44, 45).

Para las muestras extraídas con hexano se identificaron dos clústers, en la **Figura 49** se puede observar que la similitud espectral se relaciona con terpenos e hidrocarburos insaturados en el clúster 1 e hidrocarburos saturados en clúster 2. En la distribución porcentual de cada nodo con respecto a las colectas (**Figura 50**), se observa que en el clúster 1 el apiario 48 agrupa la mayoría de los compuestos insaturados, mientras que el apiario 35 se agrupan la mayor parte de los terpenos y derivados. Esta diferenciación puede estar relacionada con la ubicación de los apiarios y el tipo de flora cercana. En cuanto al clúster 2, la distribución porcentual del aporte por cada colecta se distribuye uniformemente en cada nodo lo que significa que esta familia de compuestos se encuentran distribuidos de forma similar en ambos apiarios.

De forma general es posible indicar que en el apiario 35 y 48 existe una similitud estructural con respecto al tipo de hidrocarburos saturados, y a su vez es independiente al sitio y tiempo de muestreo, mientras que la abundancia de compuestos terpénicos e hidrocarburos insaturados se vería afectada por la ubicación de cada apiario. Los extractos preparados a

partir del apiario 35, colectas 1-3 utilizando acetona y etanol generaron la red molecular que se muestra en la **Figura 51**. No hubo agrupación en clusters, lo que indica una alta similitud estructural y poca variabilidad biosintética entre los compuestos que integran ambos extractos (acetona y etanol). Los nodos de enlace (Blottleneck node) con anotaciones fueron el oxido de cariofileno y hexadecanal, ambos se tratan de estructuras que podrían actuar como intermediarios ante una conversión de n-alcanos, la cual podría ocurrir durante la fabricación de los propóleos por parte de las abejas, sin embargo se debe explorar más al respecto. La distribución de los metabolitos en el tiempo (**Figura 52**) no sigue ningún patrón particular lo que es consecuente con una composición base asociada con la ubicación de cada apiario y poco influenciada por la variación temporal.

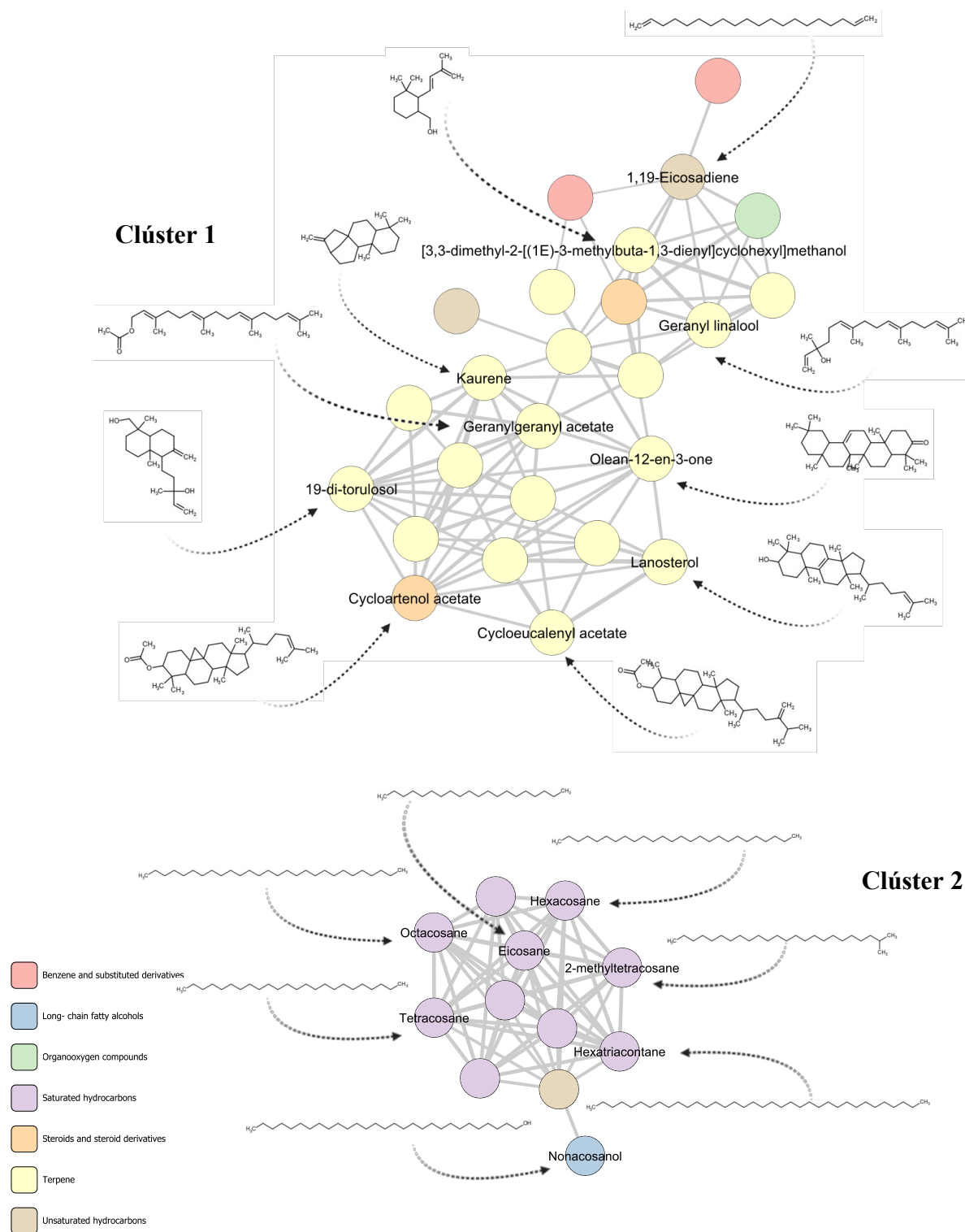


Figura 49. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de hexano de las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48. Cada nodo representa un compuesto detectado. Los nombres mostrados corresponden a las identidades de los compuestos (estos se indican en inglés). Los colores representan las diferentes clases químicas para los iones detectados. El grosor de las líneas es proporcional a la similitud espectral entre nodos.

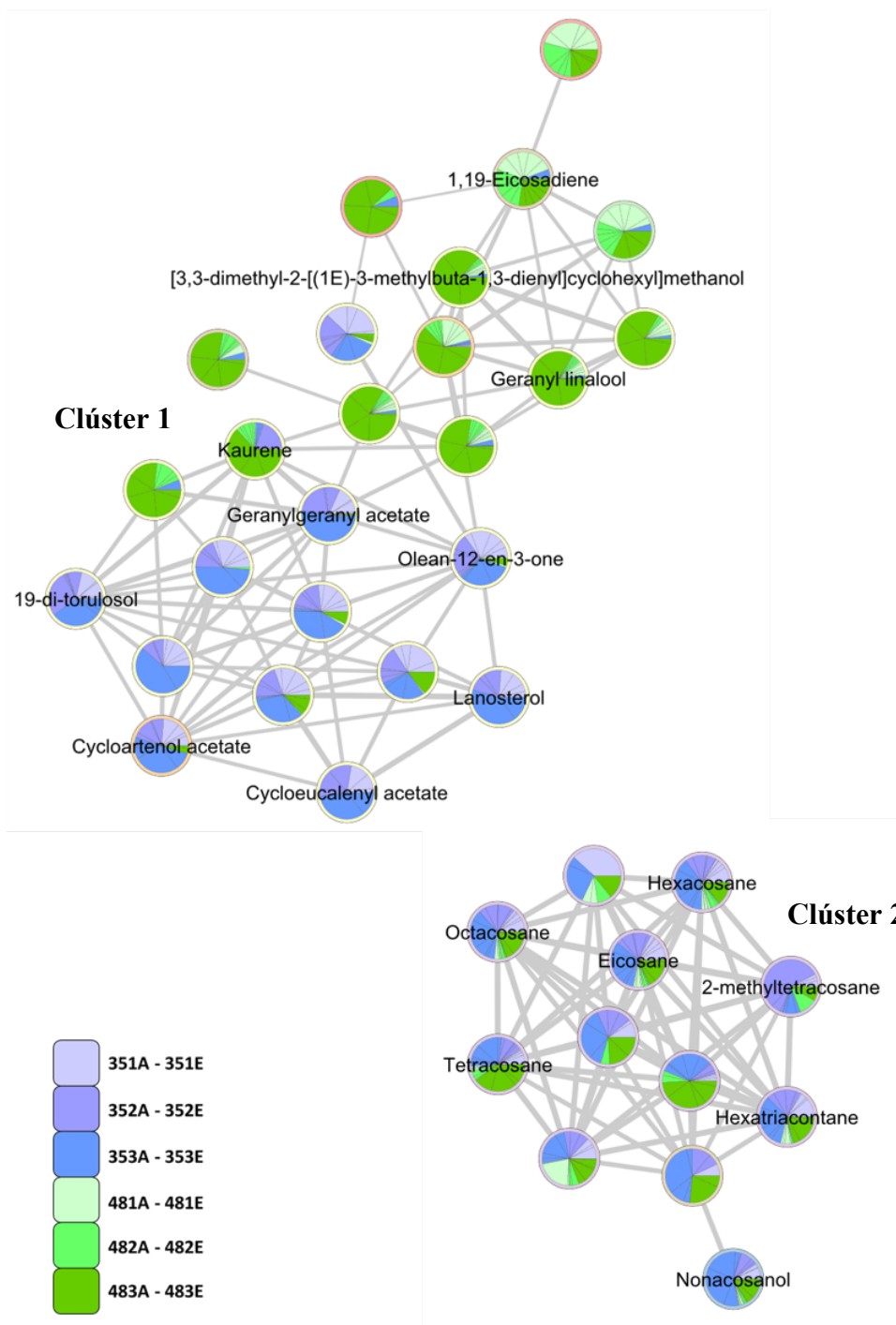


Figura 50. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de hexano de las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48. Cada nodo representa un compuesto detectado. Los nombres mostrados corresponden a las identidades de los compuestos (estos se indican en inglés). Los colores representan la presencia porcentual de cada ion en los diferentes extractos. El grosor de las líneas es proporcional a la similaridad espectral entre nodos.

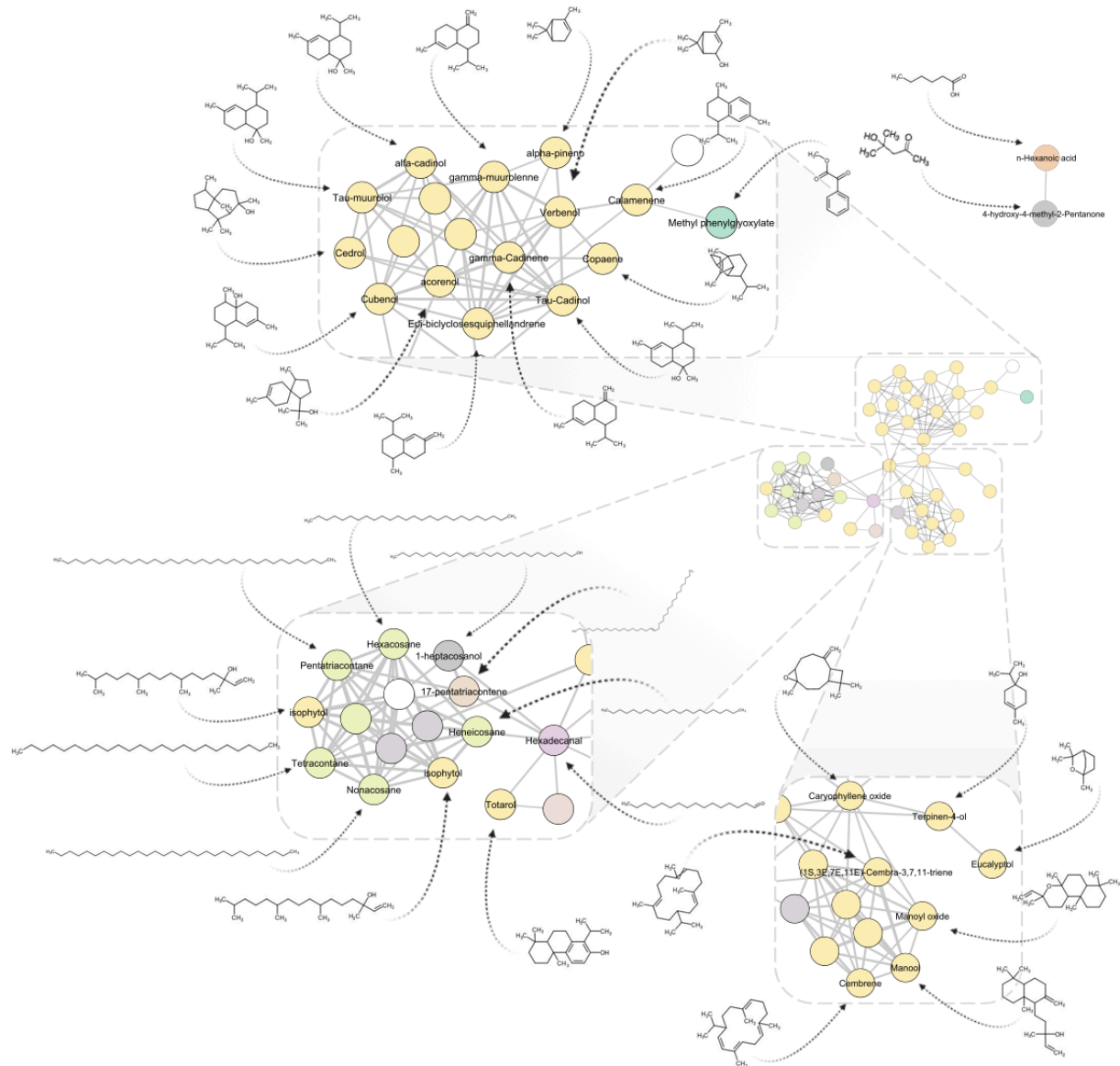


Figura 51. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de acetona y etanol de las colectas 1-3 del apiario 35. Cada nodo representa un compuesto detectado. Los nombres mostrados corresponden a las identidades de los compuestos (estos se indican en inglés). Los colores representan las diferentes clases químicas para los iones detectados. El grosor de las líneas es proporcional a la similitud espectral entre nodos.

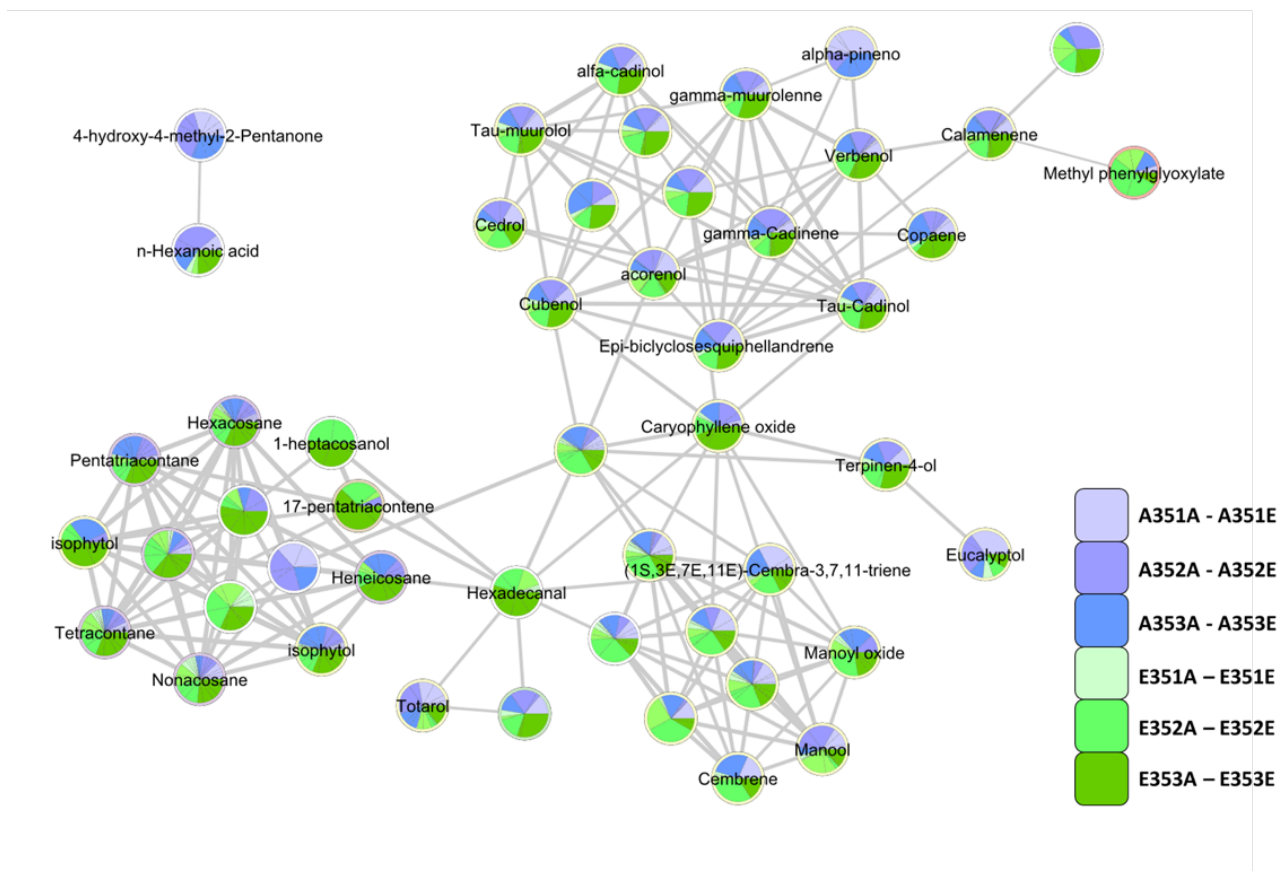


Figura 52. GC-MS Molecular network creada con los perfiles de los extractos de acetona y etanol de las colectas 1-3 del apiario 35. Cada nodo representa un compuesto detectado. Los nombres mostrados corresponden a las identidades de los compuestos (estos se indican en inglés). Los colores representan la presencia porcentual de cada ion en los diferentes extractos. El grosor de las líneas es proporcional a la similitud espectral entre nodos.

5.3.4 Caracterización mediante cromatografía líquida con detección de Masas (LC-MS/MS)

De acuerdo con el experimento $^1\text{H-DOSY}$ (**CAPÍTULO IV**) las moléculas presentes en mayor concentración se tratarían de metabolitos altamente saturados y peso molecular alto (> 600 Da). De manera que para tener una visión completa del perfil metabolómico de los propóleos es necesario explorar su composición mediante un análisis no dirigido (Untargeted analysis), siendo ideal la técnica de LC-MS/MS que brinda información tanto cuantitativa (rango dinámico de abundancia de iones exitosamente producidos) cómo estructural de todos aquellos metabolitos que no pueden ser vistos apropiadamente mediante GC-MS. Para la adquisición de los datos se utilizó el modo DIA (Data Independent Acquisition, siglas en inglés), que permite recopilar información tanto del ion precursor como sus fragmentos simultáneamente aumentando el rango de moléculas observables así cómo la abundancia mínima detectable en comparación con otros modos de adquisición tales como DDA (Data Dependent Acquisition) o Full-Scan (12, 36).

Cómo se muestra en la **Figura 53** posterior a la adquisición de los datos (Modo MSe, es la nomenclatura utilizada por la empresa Waters® para el modo DIA), se debe realizar una transformación de los datos a modo centroide con el fin de obtener valores discretos que sean mas sencillos de trabajar y consuman menos recursos informáticos durante su procesamiento. Para aprovechar al máximo la herramienta de procesamiento que brinda la plataforma GNPS para la generación de redes moleculares y anotaciones y a su vez realizar análisis estadísticos en plataformas cómo MetaboAnalyst, se debe realizar primero una apropiada deconvolución, alineación y normalizado de los datos pues de éste depende la correcta asignación de los fragmentos a los iones principales (información que se exporta posteriormente en formato *.mgf).

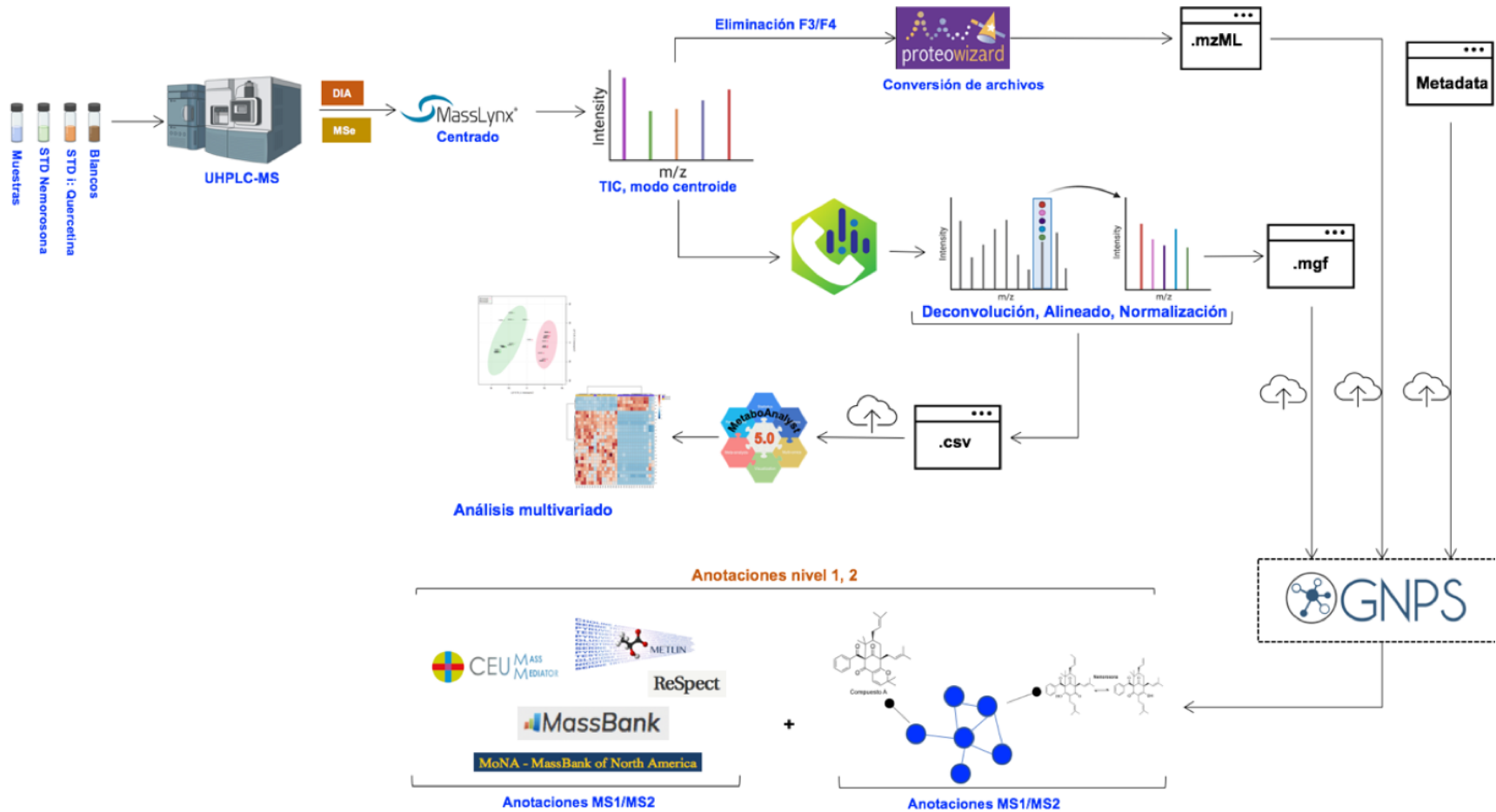


Figura 53. Esquema de trabajo para el procesamiento de datos de LC-MS/MS para análisis estadístico multivariado y dereplicación utilizando GNPS.

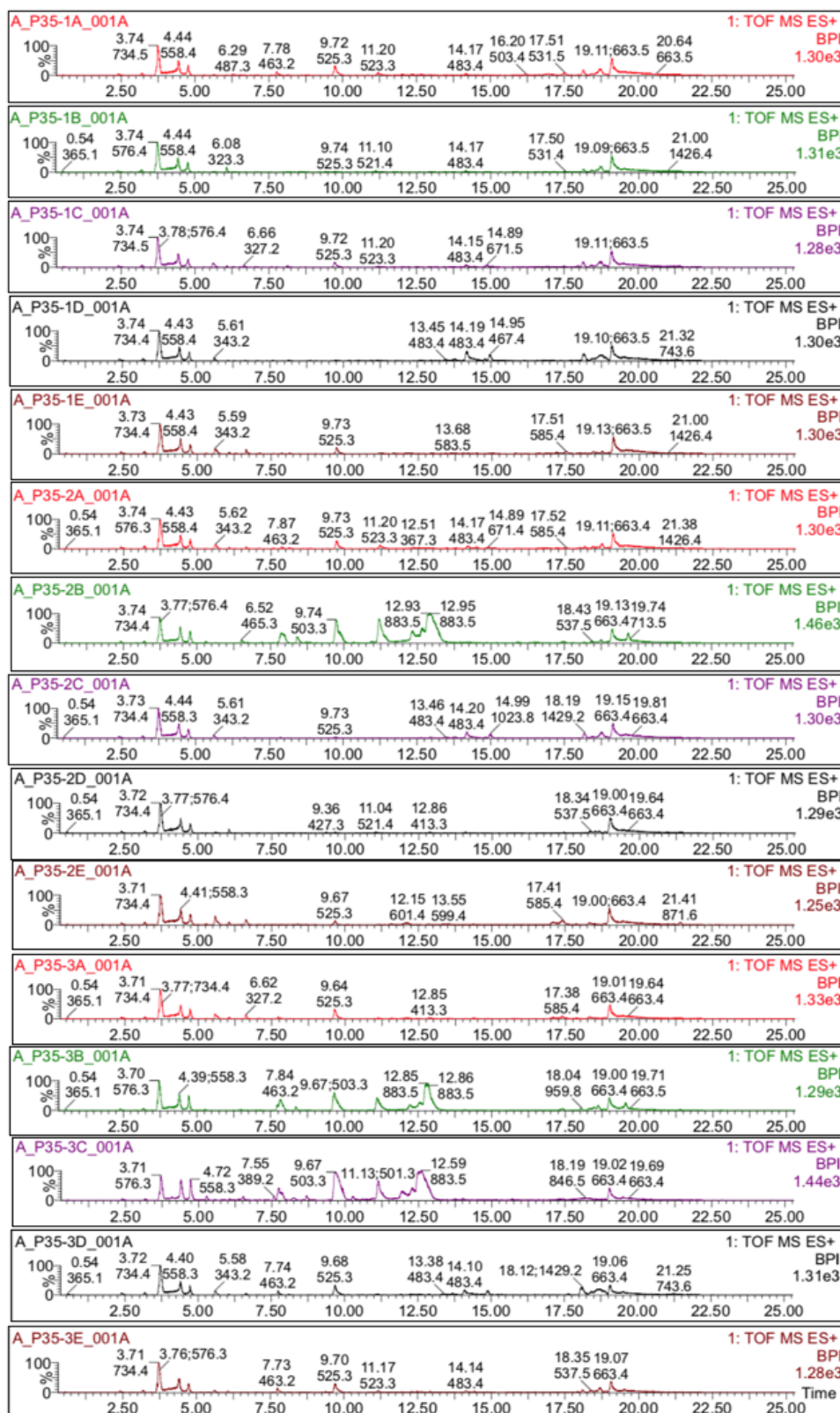


Figura 54. Perfil LC-MS/MS, ESI+ para la colectas 1-3, colmenas A-E del apiario 35.

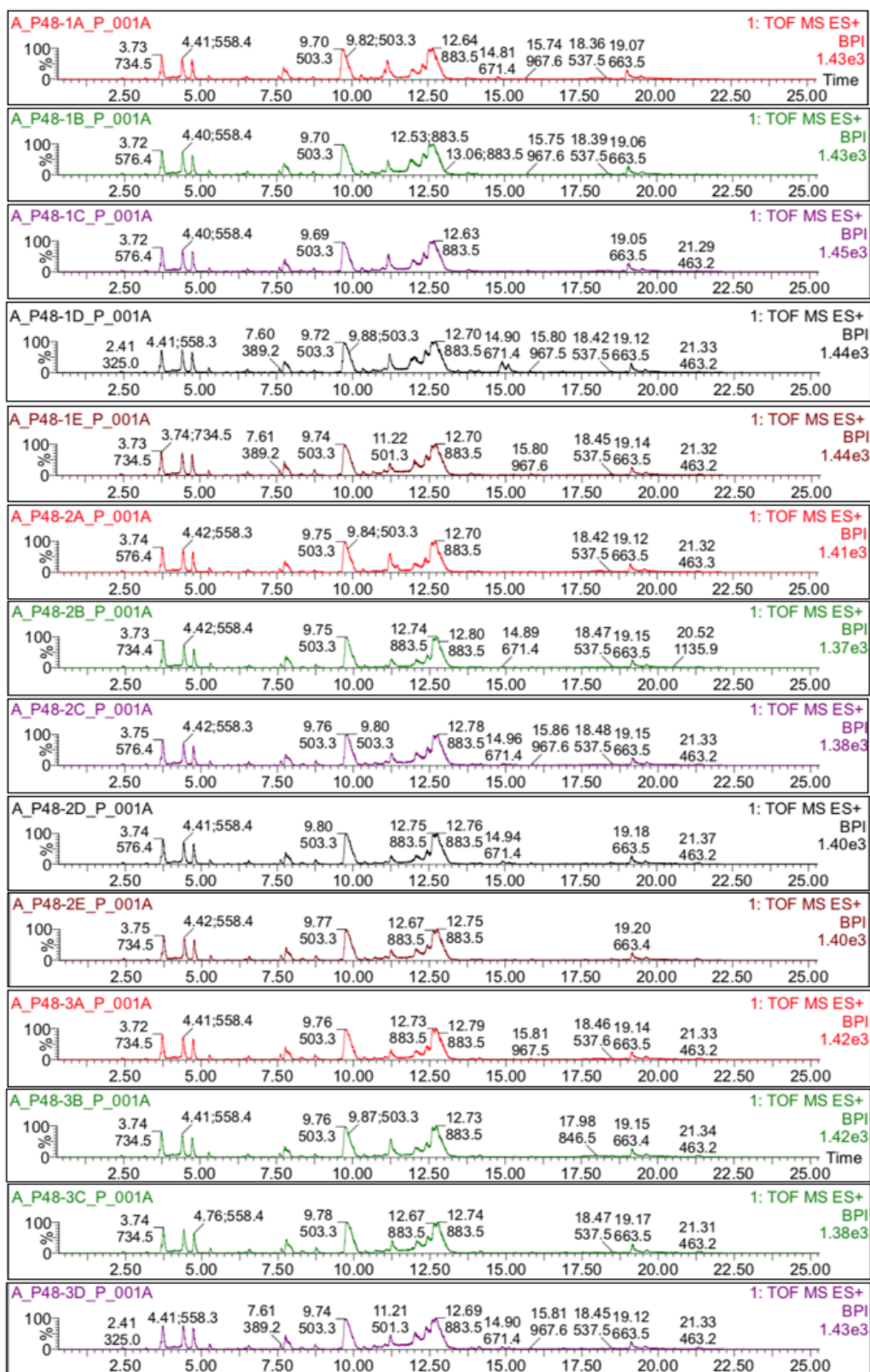


Figura 55. Perfil LC-MS/MS, ESI+ para la colectas 1-3, colmenas A-E del apiario 48.

El software MS-DIAL® resulta una excelente opción pues además de contar con un algoritmo de deconvolución altamente robusto (36), también permite importar datos con la extensión *.raw (utilizada por la empresa Waters®) así como la exportación de las tablas de abundancias relativas (formato *.csv) para realizar los análisis estadísticos posteriores. La plataforma GNPS solicita además de la información de fragmentación MS/MS, la inclusión de los archivos originales (formato *.mzML) lo cual fue realizado mediante el software de código abierto Proteowizard®. Esto permite una exploración directa sobre los espectros de masas con las anotaciones obtenidas una vez finalizado el procesamiento.

Todos los archivos mencionados junto con información descriptiva de las muestras (ejemplo: tipo de muestra, código de sitio, fecha, etc) que permita una mejor exploración de las relaciones existentes (metadata) se sube a la plataforma GNPS para su análisis (37). Al finalizar el procesamiento, GNPS proporciona anotaciones putativas de acuerdo con las bases de datos internas y una red molecular, la cual permite proponer relaciones estructurales entre los metabolitos identificados que ayuden a interpretar mejor su biosíntesis. En este contexto el uso de herramientas de estadística multivariada (PCA, PLS-DA, entre otros) es vital para establecer conclusiones generalizables y confiables.

Al comparar los perfiles LC-MS/MS para los apiarios 35 y 48 (**Figura 54 y 55**) se puede observar una variación principalmente ubicada en la abundancia de las señales ubicadas a (9,30-9,80) min identificada como nemorosona y (10,75-11,10) min identificada como Scrobiculactona A y B (ver **Cuadro 11**), las cuales en el apiario 35 se presentan únicamente en las colectas 2B, 3B y 3C, mientras que en apiario 48 se presenta en todas las colectas con variaciones muy pequeñas de intensidad. El apiario 48 posee un perfil más homogéneo en términos de diversidad y concentración de metabolitos, lo que resulta consistente con los resultados observados mediante GC-MS, mientras que en el caso del apiario 35 la variación principal en términos de variedad química se ubica en el contenido de nemorosona y las Scrobiculactonas A y B (las cuales no se resuelven cromatográficamente bajo las condiciones de medición utilizadas) con respecto a los demás compuestos que constituyen el perfil observado. Por lo que dentro de un mismo apiario el perfil químico

parece variar principalmente en términos de concentración de los compuestos mayoritarios mas que en la variedad en el tiempo.

Para explorar dicha hipótesis se realizó un PCA (ver **Figura 56**), tanto en modo positivo como negativo con el fin de indentificar el modo de ionización que mejor refleje la variabilidad existente. La varianza explicada para el modo ESI- fue de 57,0 mientras que para ESI+ fue de 47,2; si bien la ionización negativa se podría considerar cómo la más apropiada pues explica un mayor porcentaje de varianza observada, la ionización positiva recupera mayor información relacionada con intensidad y fragmentación dado la naturaleza de los metabolitos principales previamente identificados, siendo la más apropiada para los análisis multivariados. Tanto en modo positivo cómo negativo se observa una dispersión mayor para el apiario 35 principalmente localizada en PC2 lo que significa una mayor variabilidad en la intensidad mas que en la diversidad de metabolitos; para el caso del apiario 48 se observa una mayor homogeneidad en su composición y abundancia. Para ambos apiarios no parece presentarse ninguna agrupación relacionada con las colectas, reforzándose la hipótesis de que el perfil químico varía poco con el tiempo.

Las colectas 3B, 3C y 2B correspondientes al apiario 35 se agrupan cerca del cluster formado por el apiario 48, confirmando su similitud química en términos de abundancia relativa y variedad de compuestos, cómo se mencionó anteriormente. Una visualización alternativa sobre las diferencias entre los apiarios 35 y 48 se muestra en la **Figura 57**, mediante un análisis de conglomerados gerárquicos (Hierarchical Clustering) el cual agrupa por similitud (utilizando la distancia Euclídea y correlación de Pearson) las características o variables (features), lo que permite analizar el origen de las diferencias observadas, adicionalmente la inclusión de un mapa de calor (Heatmap) permite correlacionar cada una con la intensidad correspondiente. De las 25 características de mayor abundancia presentadas en el gráfico (**Figura 57**) destacan ID: 34 (Tr: 9,388 min), ID:13 (Tr: 9,376 min) los cuales se tratan aductos derivados estructuralmente con la nemorosona. Es importante mencionar que estas características son significativamente abundantes en las muestras 35-3C, 35-3B, 35-2B, lo que explica el comportamiento observado de estas muestras en el PCA realizado (**Figura 56, ESI+**).

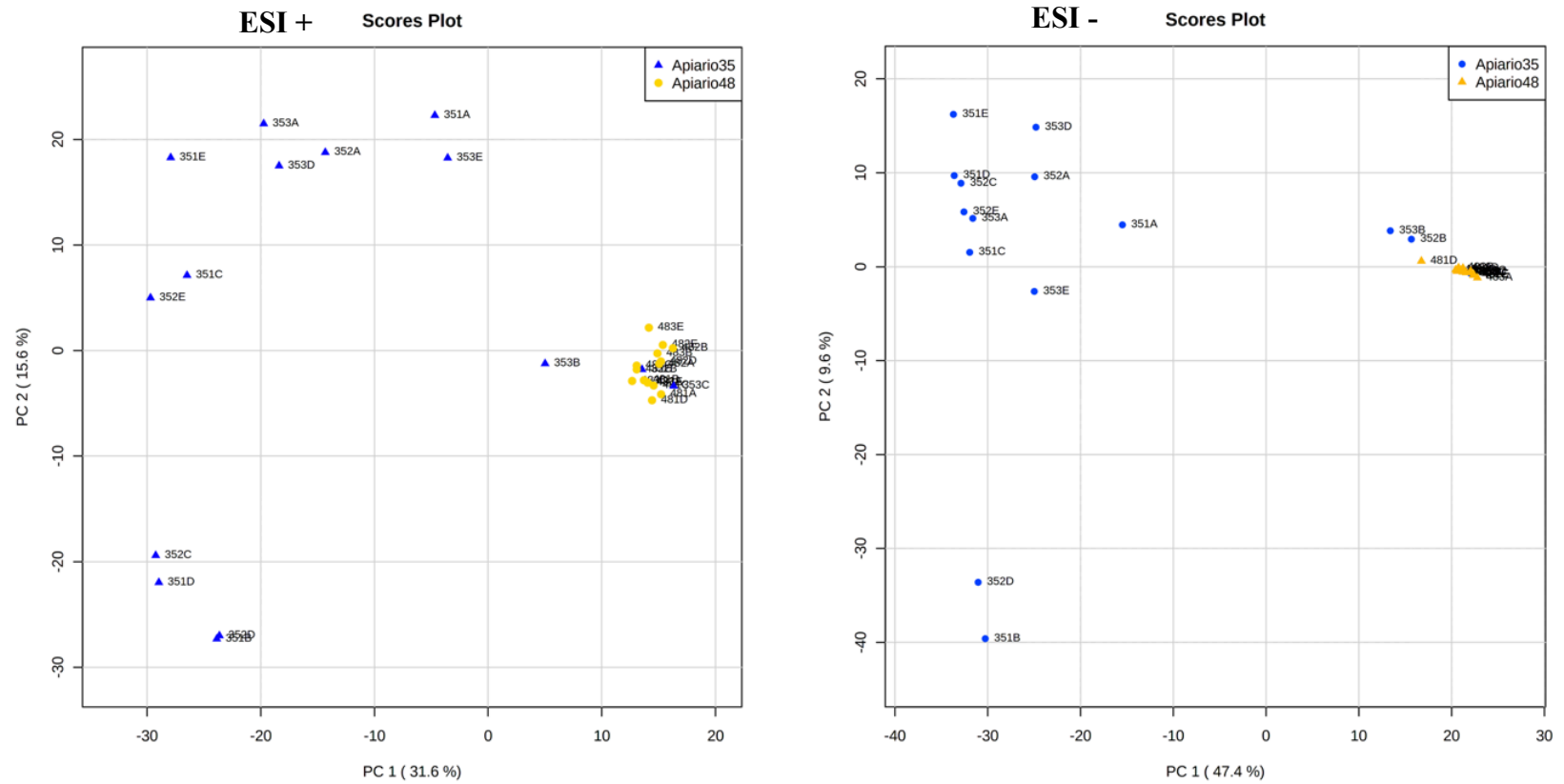


Figura 56. PCA-Score plot para PC1 y PC2 de las colectas 1-3, colmenas A-E de los apiarios 35 y 48 (la varianza explicada se muestra en paréntesis).

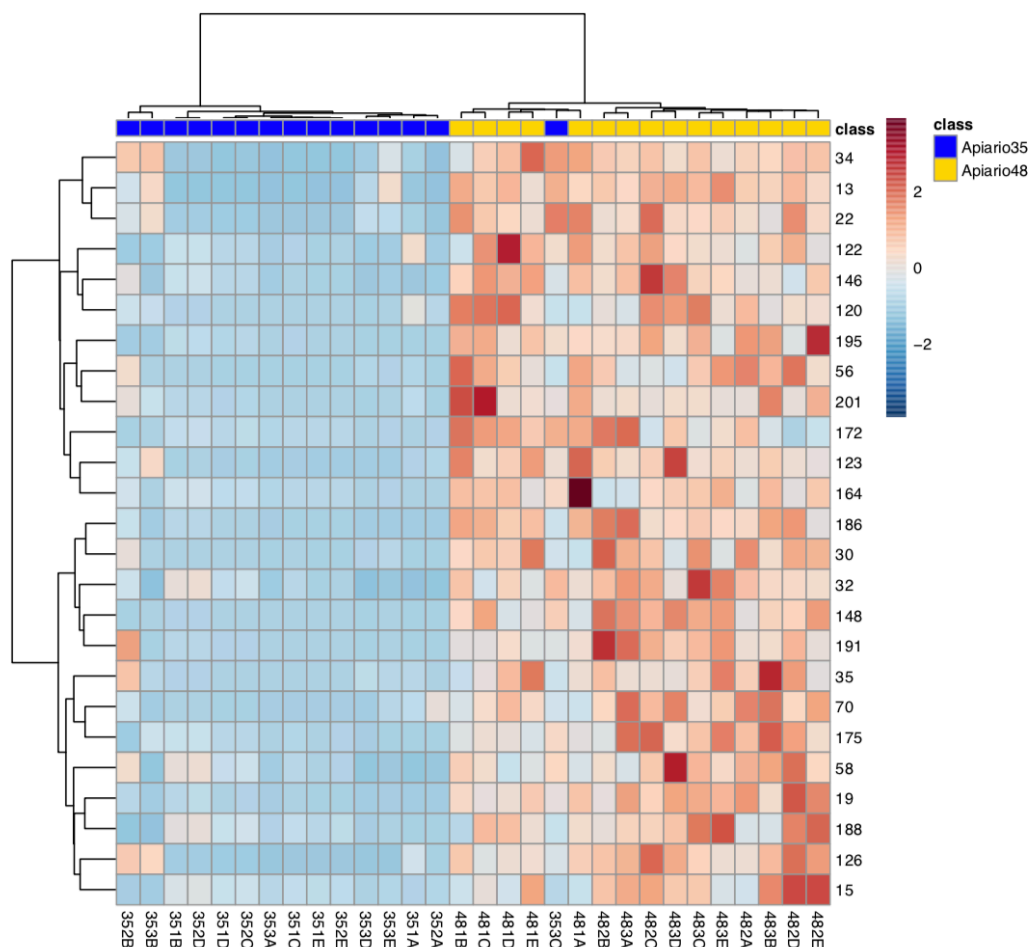


Figura 57. Hierarchical Clustering Heatmap para 25 anotaciones de las colectas 1-3, colmenas A-E de los apiarios 35 y 48 (ESI+). Autoescalado de acuerdo al peso de cada compuesto (features), agrupado de acuerdo con distancia euclidiana (algoritmo de clusterizado: Ward).

Tal y cómo se procedió para GC-MS se realizó un PLS-DA (**Figura 58**) para explorar la agrupación observada en el análisis por componentes principales; en el cual se aprecian dos clústers bien definidos, ambos agrupados de acuerdo con el apiario muestreado. La varianza acumulada con PC1 y PC2 fue 39,2 %, si bien es baja, aún resulta apropiada para explicar la variación en cada clústers. La capacidad predictiva del modelo (Q^2) fue de 0,68091, la suma cuadrada de los errores (R^2) fue de 0,74756 y la exactitud del modelo (Accuracy) fue de 0,92857. Se puede observar una diferenciación significativa en PC1 para las muestras 35-3C, 35-2B y 35-3B, esto se debe a la presencia de la nemorosona en dichas muestras, confirmando así la conclusión derivada del PCA y de la exploración de los perfiles cromatográficos.

La causa principal de la diferenciación entre clústers se categoriza de acuerdo con puntaje denominado VIP Score, a mayor valor, mayor efecto en la varianza explicada. En la **Figura 59**, se aprecia que los ID:14 (Tr: 5,304 min) y ID:67 (Tr: 9,37 min) corresponden con las características de mayor efecto en el modelo, se trata de un compuesto de naturaleza terpénica y un aducto de sodio de la nemorosona respectivamente, ambos son significativamente abundantes en el apiario 35. Para el apiario 48 las características de mayor efecto en el modelo son el ID:148 (Tr: 12,32 min), 56 (Tr: 9,457 min), su ubicación en la red molecular las relaciona estructuralmente con fosfolípidos de identidad desconocida y un aducto de la nemorosona. Es importante destacar que el número tan alto de nodos en comparación con las señales observadas en el perfil cromatográfico se deben a una optimización inadecuada en la rampa de ionización lo que causó la detección de fragmentos y iones principales simultáneamente lo que ocasiona la formación de una mayor cantidad de nodos con respecto a lo observado en los perfiles cromatográficos.

En la **Figura 60** se observa la red molecular basada en los datos obtenidos tras el análisis de GNPS de la tabla de variables (ESI+), usando la plataforma Feature based molecular networking, FBMN, y graficados con el software Cytoscape (19, 37). Se destacan cuatro clústers importantes, el identificado como A destaca la anotación de nemorosona, nivel 1, en el nodo ID:55 se observa una clara influencia del apiario 48 en todos los nodos relacionados (ID:68, ID:53). En el clúster C se destaca la anotación en el nodo ID:52, nivel 1, correspondiente a las Scrobiculactonas A y B, los nodos asociados se presentan principalmente en el apiario 48 al igual que el clúster A. Este comportamiento es esperable dada la mayor abundancia de la nemorosona en este apiario. Para el clúster B con anotaciones nivel 5 (39), se trataría de fosfolípidos presentes principalmente en el apiario 48 con pesos moleculares que oscilan entre (400-900) m/z. Finalmente el clúster D, con anotaciones nivel 5, se trataría de fosfolípidos y compuestos terpénicos de alto peso molecular presentes en el apiario 35. A partir de la red molecular en conjunto con el PLS-DA se puede deducir que en la composición de los propóleos analizados destacan dos grupos de compuestos principales: Grupo 1: nemorosona y sus productos de oxidación, Grupo 2: fosfolípidos y terpenos de alto peso molecular cuya composición y abundancia relativa se ve influenciada por la zona de recolección.

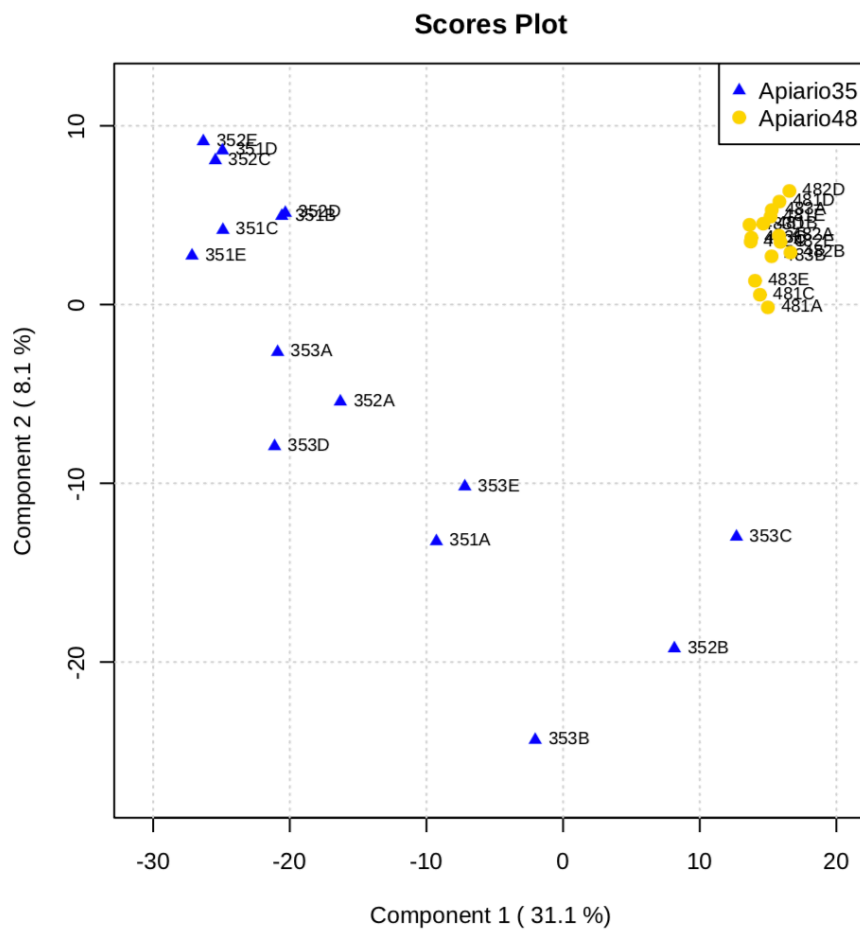


Figura 58. PLS-DA Score Plot de PC1 vs PC2 de los apiarios 35 y 48 (la varianza explicada se muestra en paréntesis) (ESI+).

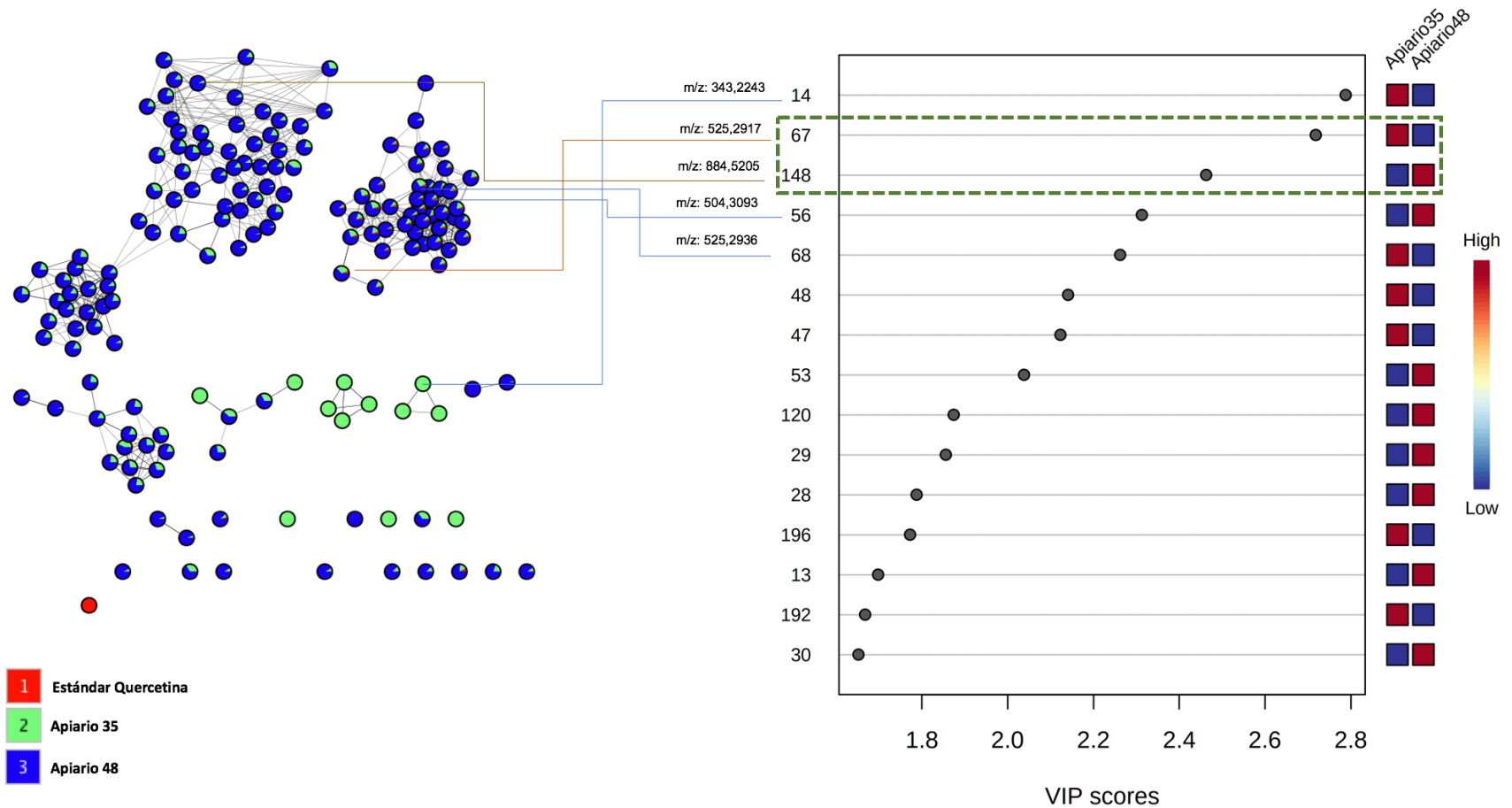


Figura 59. Características (features) más importantes identificados (VIP, por siglas en inglés) en el PLS-DA (ESI+). Las cajas coloreadas a la derecha indican la concentración relativa del correspondiente metabolito en cada apiario analizado. Se indica la posición en la red molecular de las principales características con anotaciones relacionadas. Se marca en el recuadro verde las características diferenciadoras de mayor peso para ambos apiarios de acuerdo con el PLS-DA; se indica su ubicación en la red molecular.

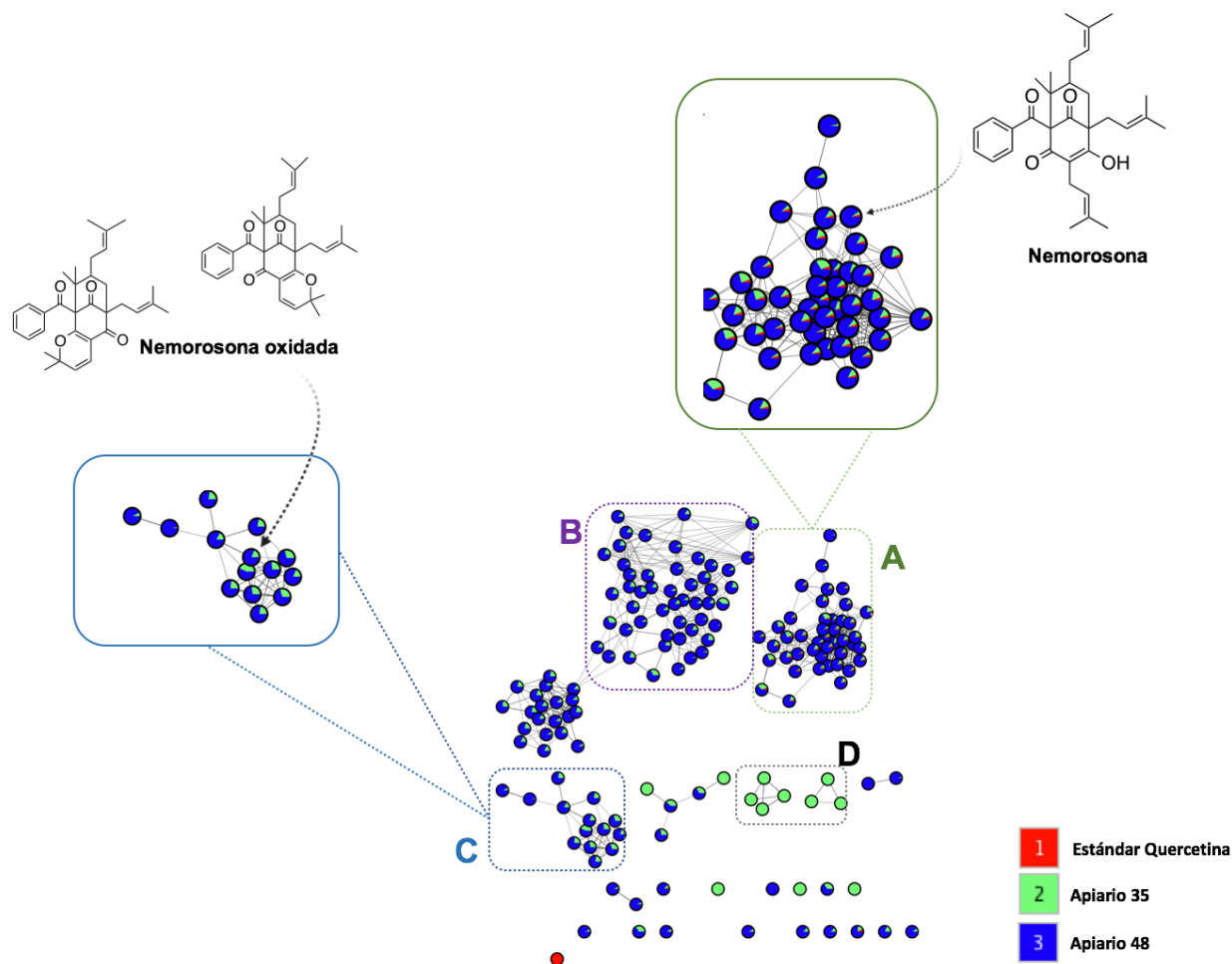


Figura 60. LC-MS/MS Red molecular creada con los perfiles de las colectas 1-3 del apiario 35 y 48. Se resaltan los nodos anotados con su respectiva identidad. Los colores representan la presencia porcentual de cada ion en los diferentes extractos. El grosor de las líneas es proporcional a la similaridad espectral entre nodos (ESI+).

Cuadro 11. Datos CLAR-MS/MS para las anotaciones realizadas sobre las colectas 1-3 de los apiarios 35 y 48, Para los fragmentos (-) y (+) se indica la intensidad de cada uno separada por “:”

ID ESI+	ID ESI-	Tr (min)	ESI+ (m/z)	MS/MS ESI+ (m/z)	Aducto		ESI- (m/z)	MS/MS ESI- (m/z)	Anotación	Nivel	ERROR (-) (ppm)	ERROR (+) (ppm)
-	12	2,113	-	-	-	[M-H]-	301,02518:6 45 302,02853:1 71 303,03189:4 1	107,01526:8 151,00087:76 178,99472:61 273,04016:11 299,00967:23 301,02518:818 301,23026:26 301,32645:37	Quercetina (estándar)	1	32,06	
3	-	5,307	303,22943:360 304,23278:88 305,23614:0	247,17137:9 257,22702:40 258,23022:12			-	-	Terpeno desconocido	5	-	-
-	117	5,308	-	-			439,25778:3 9 440,26113:8 441,26449:0	83,02123:12 103,01179:28 229,02945:11 319,22089:28 387,20673:12 404,20233:15 439,22678:21	Desconocido	-	-	-
-	389	5,297	-	-	-		661,39215:4 6 662,3955:22 663,39886:4	61,99033:10 83,0221:20 103,01952:12 146,96704:11 319,23138:74 320,23532:21 404,19614:57 405,19931:19 417,22147:10 425,25003:22	Desconocido	-	-	-

							439,24997:81 440,25696:21 441,27289:13 445,22363:20 446,24521:13 461,22623:43 462,23425:13 661,43964:75					
-	328	5,606	-	-			605,40491:6 3 606,40826:2 2 607,41162:0	603,38879:520 604,39642:243 605,39587:63	Desconocido	-	-	-
	377	5,776	-	-	-	[M-H]-	651,45251:2 2 652,45586:6 653,45922:1 1	317,20532:13 321,24438:485 321,43643:10 322,25156:164 323,24698:25 324,23727:10 343,2384:37 379,21515:50 380,2229:19 381,18866:22 382,19904:10 389,22879:12 406,20822:162 407,23624:33 409,04968:11 647,4234:14 649,51166:17 651,41479:16 651,47144:19	Fosfolípido desconocido	5	-	-

-	370	6,149	-	-			645,4043:23 646,40765:9 647,41101:6	83,02283:13 103,01089:22 187,99396:10 229,01892:12	Desconocido	-	-	-
-	187	6,233	-	-	-		479,25214:4 1 480,25549:1 3 481,25885:4	103,01603:13 123,046:10 151,03188:12 393,2507:20 395,24573:41 396,25989:15 411,26056:40 412,26501:11 427,24979:19 437,19507:11 437,2337:20 439,25208:52 440,24359:14 455,22739:56 456,22098:10 456,26834:14 457,26309:45 458,23523:10 461,24506:10 477,22446:19 478,21756:16 479,25214:48	Desconocido	-	-	-
90	742	6,264	629,41168:161 630,41503:70 631,41839:0	611,39899:51 629,401:77	[M+H] +	[2M-H]-	1291,79749: 423 1292,80084: 408 1293,8042:1 41	443,26382:8 456,25253:9 457,27097:20 645,38007:285 645,82123:19 646,40338:236 647,40869:112 648,42419:28	Fosfolípido desconocido	5	-	-

								681,3894:17 713,37512:57 714,38184:20 771,39996:9 1291,7843:376				
10	-	6,348	327,22791:192 328,23126:0 329,23462:0	327,22961:136	[M+N a]+		-	-	Fosfolípido desconocido	5	-	-
-	248	7,072	-	-	-	-	517,30499:5 2 518,30834:2 4 519,3117:9	103,01199:28 229,01038:10 517,27142:44	Fosfolípido desconocido	5	-	-
-	62	7,34	-	-	-	-	365,17529:4 4 366,17864:1 0 367,182:1	61,98616:12 83,02431:17 103,01476:26 229,02496:10 365,17529:44	Fosfolípido desconocido	5	-	-
162	579	7,54	903,51239:326 904,51574:173 905,5191:131	153,05528:120 313,21429:147 423,25012:266 424,26047:104 425,26907:146 441,26233:172 442,27325:117 443,28119:129 463,24384:579 464,24838:250 465,26419:292 466,27448:96 903,51447:141	-	-	903,52136:1 26 904,52471:7 9 905,52807:3 44	204,07147:2 379,27063:0 383,26675:2 395,25577:3 396,25522:2 424,27289:12 442,50592:5 442,76242:0 442,80905:7 443,59454:10 443,84354:8 447,26669:5 462,20993:16 463,23508:25 518,31476:2 881,47125:25 882,54639:11	Fosfolípido desconocido	5	-	-

								883,50153:77 883,55634:153 885,60004:12 886,58972:7 903,49915:10				
-	647	7,864	-	-	-	-	943,6087:37 944,61205:2 1 945,61541:1 3	301,2135:111 302,22726:32 386,17883:89 387,20303:21 609,45441:12 625,41595:263 626,41394:12 627,4314:35 943,61993:15	Fosfolípido desconocido	5	-	-
38	107	8,452	457,23508:230 458,23843:78 459,24179:0	177,01866:50 255,0668:65 311,12866:57 388,16727:56 457,23624:168	-	-	433,21292:8 36 434,21627:5 88 435,21963:1 91	145,02817:13 218,08521:17 227,03458:10 228,03758:22 241,05405:23 243,08287:19 253,04892:116 254,05478:31 279,10214:19 280,09668:12 286,10693:10 295,10556:43 296,10266:59 307,10455:24 309,11465:96 310,12219:26 321,10773:390 321,40564:22 322,12128:169 323,12985:27	Fosfolípido desconocido	5	-	-

								336,18118:25 345,20859:27 346,19763:12 349,13873:23 363,15045:31 364,16489:149 365,17361:50 381,15009:10 389,24109:39 425,2764:40 426,26733:17 433,21292:843 433,46667:13 433,5744:176				
67	-	9,3-9,8	525,29883:183 526,30218:62 527,30554:0	-	[M+N a]+	-	-	-	Nemorosona	1	-	-
55	222	9,3-9,8	503,3114:790 504,31475:392 505,31811:93	177,01562:483 178,02406:109 219,10217:130 255,06041:542 256,07224:177 257,07901:45 311,12302:506 312,1312:188 333,11014:83 343,22424:241 344,23102:49 379,18393:568 380,19482:262 381,20352:55 413,17664:36 435,25125:375	[M+H] +	[M-H]-	501,30463:6 08 502,30798:3 00 503,31134:8 6	61,98518:19 83,02583:11 103,01205:18 271,13596:10 305,06561:10 327,18188:47 363,12943:18 363,17871:24 377,17874:10 417,18375:59 432,19452:38 432,23291:98 432,27899:26 433,23184:27 475,26089:14 501,27979:391	Nemorosona	1	8,3	9,4

				436,25537:140 447,25568:198 448,2569:76 456,23065:77 457,23654:70 503,31485:302								
66	-	10,75- 11,10	523,28088:530 524,28423:225 525,28759:52	217,08627:72 231,06551:144 309,10629:589 310,11667:180 331,09384:120 341,20911:101 433,2373:174 434,24426:58 439,19043:141 445,23648:60 454,21289:188 455,2179:99 501,29837:175 502,30453:53 523,27893:581	[M+N a]+	-	-	-	Scrobiculact ona A y B	1	-	-
52	209	10,75- 11,10	501,29279:844 502,29614:421 503,2995:110	217,08463:81 231,06247:203 309,10425:681 310,11462:220 331,09225:147 341,21594:80 433,23636:129 439,19189:178 440,19305:55 445,23856:97 454,21219:241 455,21869:122 501,29846:213	[M+H] +	[M-H]-	499,28659:9 3 500,28994:4 0 501,2933:67	61,9851:28 83,02624:20 146,96841:49 168,98566:11 430,22751:13 432,22189:19 461,23846:15 499,29483:62	Scrobiculact ona A y B	1	3,5	15,3

122	504	11,73	881,513:772 882,51635:574 883,51971:227	845,50049:72 863,51361:101 864,52417:63 881,51917:564			879,4776:12 56 880,48095:9 91 881,48431:4 67	439,24109:14 441,24091:14 479,27396:92 480,28543:44 481,29794:18 483,2774:12 501,30887:61 502,31842:22 523,26422:41 524,27026:18 527,29425:16 545,28448:104 546,29431:55 547,27899:12 589,27808:17 611,27081:18 669,40051:14 773,49896:11 791,50012:25 817,4953:39 818,52026:34 835,50732:381 836,51129:264 837,51599:97 838,53192:32 861,4939:20 877,49579:34 878,45898:10 878,53564:12 879,4776:1165 879,83917:21	Fosfolípido desconocido	5	-	-
-----	-----	-------	---	--	--	--	---	---	----------------------------	---	---	---

120	503	12- 12,25	881,50934:103 9 882,51269:741 883,51605:311	845,50525:107 846,51392:64 863,5144:126 864,5094:66 881,51483:730	-	-	879,47687:1 370 880,48022:1 152 881,48358:6 08	437,21964:12 501,30182:11 545,29193:39 546,27582:11 589,26532:12 817,50861:15 835,53033:62 836,54504:127 837,52826:14 837,58173:10 861,50507:15 879,4549:474	Fosfolípido desconocido	5	-	-
142	521	12,3- 12,53	883,50421:142 1 884,50756:120 7 885,51092:639	441,26459:74 557,29407:74 829,51013:110 830,50726:68 845,50867:58 847,51331:573 848,52032:389 849,52252:122 865,53156:249 866,53369:143 881,52185:421 882,52911:292 883,50995:128 6	-	-	881,50458:1 379 882,50793:1 139 883,51129:5 94	397,30737:15 439,23019:18 441,26859:168 442,26236:64 501,32666:26 545,2746:19 545,31781:31 546,2843:14 547,31219:17 589,26532:16 591,29364:29 592,30908:12 817,49799:12 817,56146:10 835,50897:126 835,59442:24 836,51294:92 837,52826:29 837,61371:11 838,52277:14 839,52856:10 861,47247:12	Fosfolípido desconocido	5	-	-

								861,64587:12 863,50116:20 864,45667:10 865,45618:14 865,55389:28 866,54327:14 867,50037:12 867,56567:14 868,49066:12 879,48773:856 879,93695:26 880,0246:12 880,49597:606 880,84674:13 881,06592:14 881,28528:10 881,48273:141 9 881,81177:13 881,87756:20 881,9873:41				
91	403	14,6	671,42932:507 672,43267:262 673,43603:71	177,01839:76 233,0806:57 343,11642:77 411,17944:100 671,43567:189	-	-	669,39185:1 376 670,3952:10 88 671,39856:3 94	108,01984:11 109,02813:249 110,03336:22 203,0051:15 341,21078:22 363,17099:13 417,20291:28 432,22305:37 433,2374:20 449,20624:15 465,4162:14 477,23749:58 478,23068:23	Fosfolípido desconocido	5	-	-

								493,30099:10 499,22623:12 501,29184:132 502,31799:47 507,32297:18 533,41095:102 534,40955:36 643,36584:112 644,37823:60 645,33514:16 667,4054:182 668,39825:70 668,45551:19 669,26758:12 669,39185:117 8 669,68823:21 669,82202:33 669,86987:17				
--	--	--	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--

5.4 Conclusiones

Gracias al crecimiento de herramientas bioinformáticas de acceso libre como GNPS o Metabonalyt y el desarrollo software de código abierto dirigido para la optimización en el procesamiento de datos, la metabolómica ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años agilizando la dereplicación de metabolomas complejos, cómo el del caso de los propóleos.

A partir de los análisis LC-MS/MS se pudo determinar que en la composición de los propóleos analizados destacan dos grupos de compuestos principales: Grupo 1: nemorosona y sus productos de descomposición, Grupo 2: fosfolípidos y terpenos de alto peso molecular cuya composición y abundancia parece verse influenciada por la zona de recolección y en menor grado por la época de recolección.

A partir de los análisis GC-MS se pudo determinar que en el apiario 35 y 48 existe una similitud estructural en los hidrocarburos saturados la cual es independiente al sitio y al tiempo de muestreo, mientras que los compuestos de tipo terpénicos y hidrocarburos insaturados se verían afectados de acuerdo con la ubicación de cada apiario.

El apiario 35 posee una mayor diversidad química que el apiario 48, a pesar de encontrarse ambos en la zona del Pacífico sur de manera que la caracterización en función de la zona de colecta es indispensable para realizar una adecuada estandarización de los propóleos cómo materia prima.

5.5 Referencias

1. Bankova V., de Castro S., Marcucci M., Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, **2000**, 31: 3-15.
2. Bogdanov S., Propolis: Composition, Health, Medicine: A review, *Bee Product Science*, **2012**.
3. Frion-Herrera Y., Gabbia D., Díaz-García A., Cuesta-Rubio O., Carrara M., Chemosensitizing activity of Cuban propolis and nemorosone in doxorubicin resistant human colon carcinoma, *Fitoterapia*, **2019**, 136: 104173.
4. Guilherme da Cunha M., Franchin M., Paula-Eduardo L., Almeida Freires I., Beutler J., Matias de Alencar S., Ikegaki M., Machado Tabchoury C., Mattar C.T., Rosalen P., Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis, *Journal of Functional Foods*, **2016**, 26: 27-35.
5. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S., Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 64: 235-240.
6. Sturm L., Ulrich N., Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review, *eFood*, **2020**, 1(1): 24-37.
7. Bankova V., Popova M., Trusheva B., Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review., *Journal Chemistry Central*, **2014**, 8:28.
8. Cheng H., Qin Z., Guo X., Hu X., Wu J., Geographical origin identification of propolis using GC-MS electronic nose combined with component analysis, *Food Research International*, **2013**, 51: 813-822.

9. Salatino A., Fernandez-Silva C., Righi S., Salatino M., Propolis research and the chemistry of plant products, *Nat.Prod.Rep.*, **2011**, 28: 925-936.
10. Chang R., Piló-Veloso D., Morais S., A. Nascimento E., Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS, *Brazilian Journal of Pharmacology*, **2008**, 18(4): 549-556.
11. Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods*, **2021**, 18:747–756.
12. Guo J., Huan T., Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, Data-Independent Acquisition modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics, *Analytical Chemistry*, **2020**, 97: 8072-8080.
13. Yang J., Sanchez L., Rath C., Liu X., Boudreau P., Bruns N., Glukhov E., Wodtke A., Felicio R., Fenner A., Ruth Wong W., Linington R., Zhang L., Debonsi H., Gerwick W., Dorrestein P., Molecular Networking as dereplication strategy, *Journal of Natural Products*, **2013**, 76: 1686-1699.
14. Samokhin A., Sotbezova K., Lashin V., Revelsky I., Evaluation of mass spectral library search algorithms implemented in commercial software, *Journal of Mass Spectrometry*, **2015**, 50: 820-825.
15. Pang Z., Chong J., Zhou G., Lima Morais D., Chang L., Barrete M., Gauthier C., Jacques P., Li S., Xia J., MataboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights, *Nucleic Acids Research*, **2021**, 49: 388-396.
16. Ron Wehrens and Bjorn-Helge Mevik.pls: Partial Least Squares Regression (PLSR) and Principal Component Regression (PCR), **2007**, R package version 2.1-0.

17. Max Kuhn. Contributions from Jed Wing and Steve Weston and Andre Williams.caret: Classification and Regression Training, **2008**, R package version 3.45.
18. Wang M., Carver J., Phelan V., et al., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking, *Nat. Biotechnol.*, **2016**, 34: 828-837.
19. Nothias L.F., Petras D., Schmit R., *et al.*, Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment, *Nature Methods*, **2020**, 17: 905-908.
20. Shannon P., et al., Cytoscape: A Software Environment for Integrated Modelos of Biomolecular Interaction Networks., *Genome Res.*, **2003**, 13: 2498-2504.
21. Cuesta-Rubio O., Frontana-Uribe B., Ramirez-Apan T., Cárdenas J., Polyisoprenylated Benzophenone in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone, *Z. Naturfosch*, **2002**, 57c: 372-378.
22. Reis F., Pardo-Andreu G., Nuñez-Figueroa Y., Cuesta-Rubio O., Marin-Prida J., Uyemura S., Curti C., Alberici L., Clusianone, a naturally occurring nemorosone regiosomer, uncouples rat liver mitochondrial and induces HepG2 cell death, *Chemico-Biological Interactions*, **2014**, 212: 20-29.
23. Castro Ishida V., Negri G., Salatino A., Bandeir M., A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria, *Food Chemistry*, **2011**, 125: 966-972.
24. Lokvam J., Braddock J., Reichardt P., Clausen T., Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae), *Phytochemistry*, **2000**, 55: 29-34.

25. Meneses E., Durango D., García C., Antifungal activity against postharvest fungi by extracts Colombian propolis, *Quim. Nova.*, **2011**, 32 (8): 2011-2017.
26. Bankova V., Bertelli D., Borba R., Conti B., Silva Cunha B., Danert C., Nogueira M., Soraia F., Isla M., Moreno M., Papotti G., Popova M., Basso K., Salas A., Sawaya A., Schwab N., Sforcin J., Simone-Finstrom Mn, Spivak M., Trusheva B., Boas M., Wilson M., Zampini C., Standard methods for *Apis Mellifera* propolis research, *Journal of Apicultural Research*, **2016**, 58 (2): 1-49.
27. Mohareb A., Sirmah P., Desharnais L., Dumarcay S., Petrisans M., Gerardin P., Effect of extractives on conferred and natural durability of *Cupressus lusitanica* hearwood, *Ann. For Sci.*, **2010**, 67: 504.
28. Conner A., Rowe J., Neutrals in Southern pine tall oil, *Journal of the American oil Chemist's Society*, **1975**, 52 (9): 334-338.
29. Pellati F., Prencipe F., Benvenuti S., Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2013**, 84: 103-111.
30. Lucero M., Estell R., Tellez M., Fredrickson E., A Retention Index Calculator Simplifies Identification of plant volatile organic compounds, *Phytochemical Analysis*, **2009**, 20: 378-384.
31. Du X, Smirnov A, Pluskal T, Jia W, Sumner S. Metabolomics Data Preprocessing Using ADAP and MZmine 2. *Methods Mol Biol.* **2020**, 2104:25-48.
32. Yang H., Huang Z., Dong W., Pan Z., Wang L., Characterization of Chinese crude propolis by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2015**, 113: 158-164.

33. Negri G., Marcucci M., Salatino A., Salatino M., Comb and Propolis Waxes from Brazil (States of Sao Paulo and Pararná), *J. Braz.Chem.Soc.*, **2000**, 11(5): 453-457.
34. Werner E., Heiler J., Ducruix C., Ezan E., Junot C., Tabet J., Mass spectrometry for the identification of the discriminant signals from metabolomics: current status and future trends., *J. Chromatogr.*, 2008, 871: 143-163.
35. Zelterman, D, Applied multivariate statistics with R. New York, **2015**, Springer.
36. Tsugawa H., Cajka T., Kind T., Ma Y., Higgins B., Ikeda K., Kanazawa M., VanderGheynst J., Fiehn O., Arita M., MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis, *Nature Methods*, **2015**, 12 (6): 523-531.
37. Aron A.T., Gentry E.C., McPhail K.L, et al., Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS, *Nature Protocols*, **2020**, 15: 1954-1991.
38. PrzybyLek I., Karpinski M.T., Antibacterial Properties of Propolis, *Molecules*, **2019**, 24(11): 2047.
39. Shymanski E., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H., Hollender J., Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communication confidence, *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, 48: 2097-2098.
40. Aravind A., Asha K., Rameshkumar K., Phytochemical analysis and antioxidant potential of the leaves of *Garcinia travancoria* bed, *Natural Products Research*, **2015**, 30 (2): 232-2326.
41. Everitt, B., & Hothorn, T., An introduction to applied multivariate analysis with R. New York, **2011**, Springer.

42. Kalivodá A., Hron K., Filzmoser P., Najdekr L., Janeckova H., Adam T., PLS-DA for composition data with application to metabolomics, *J. Chemometrics*, **2015**, 29: 21-28.
43. Aksenov AA, Laponogov I, Zhang Z, et al. Algorithmic Learning for Auto-deconvolution of GC-MS Data to Enable Molecular Networking within GNPS. *bioRxiv*, **2020**.
44. Gomes P., Quirós-Guerreo L., Silva C., Pamplona S., Boutin J., Eberlin M., Wolfender J, Silva M., Feature-Based Molecular Network-Guided Dereplication of Natural Bioactive Products from Leaves of *Struphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr, *Metabolites*, **2021**, 11: 281.
45. Gomes P., Quirós-Guerreo L., Muribeca A., Pamplona S., Lima A., Trindade M., Silva C., Souza J., Boutin J., Wolfender J., Silva M., Constituents of *Chamaecrista diphylla* (L.) Greene Leaves with Potent Antioxidant Capacity: A Feature-Based Molecular Network Dereplication Approach, *Pharmaceutics*, **2021**, 13: 681.

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

La estandarización de propóleos costarricenses de acuerdo con un principio activo principal es posible con un alto grado de exactitud y control en el tiempo. Para ello se debe primero estandarizar el uso de un protocolo de extracción exhaustivo y reproducible, que se pueda aplicar a cualquier tipo de propóleo. La caracterización del principio activo se debe realizar considerando el efecto del tiempo y el sitio de muestreo.

La identificación y caracterización de metabolitos secundarios de interés biológico en propóleos puede realizarse bajo el enfoque de la metabolómica, pues ofrece un análisis integral de la composición, a la vez que facilita la interpretación de la información mediante el uso de herramientas bioinformáticas. El análisis de la composición a partir de aislamiento de moléculas individuales puede conducir a interpretaciones erróneas respecto al origen botánico o la actividad biológica.

La composición de los propóleos costarricenses ricos en nemorosona posee algunas diferencias significativas con lo reportado en la literatura. Dentro de la fracción convencionalmente denominada “resinas” se encontraron dos grupos de compuestos mayoritarios: terpenos (y otros lípidos saponificables) y n-alcenos. Su abundancia parece estar influenciada por el sitio de recolección y en menor grado la época, se debe profundizar al respecto pues pueden existir otras variables que influyan en su composición.

Los propóleos costarricenses poseen la concentración más alta reportada hasta el momento para la nemorosona, así como con rendimientos de extracción significativamente altos y con una variación muy baja según la época, con respecto a la literatura existente a la fecha de este trabajo. Todos estos aspectos refuerzan la necesidad de profundizar en el estudio de estos materiales, ya sea para el desarrollo de productos con fines farmacológicos o para el aislamiento y estudio de la nemorosona.

APÉNDICE

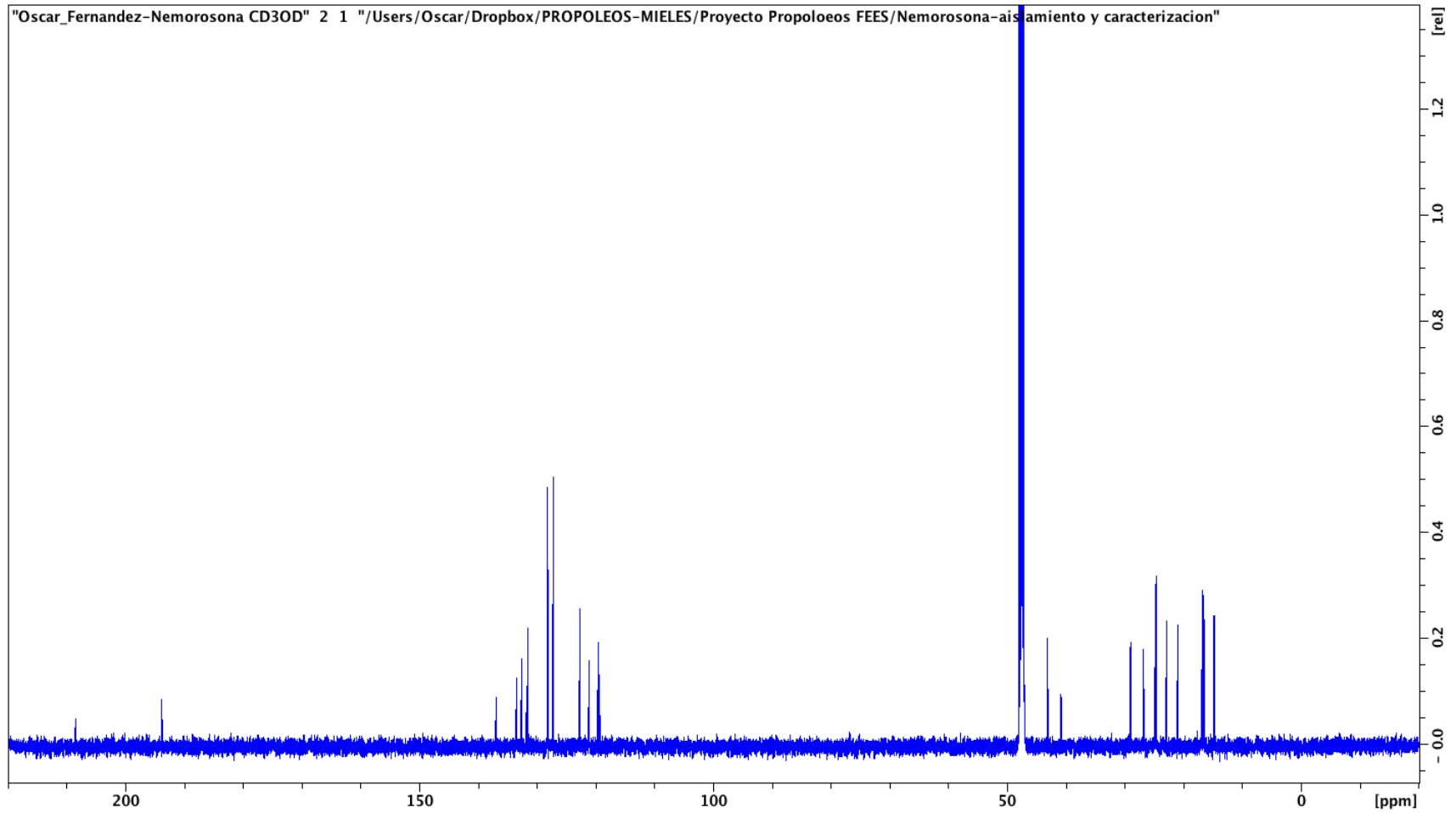


Figura 61. Espectro ^{13}C de la nemorosona (Metanol- d_4 ; 600 MHz; 298,15 K).

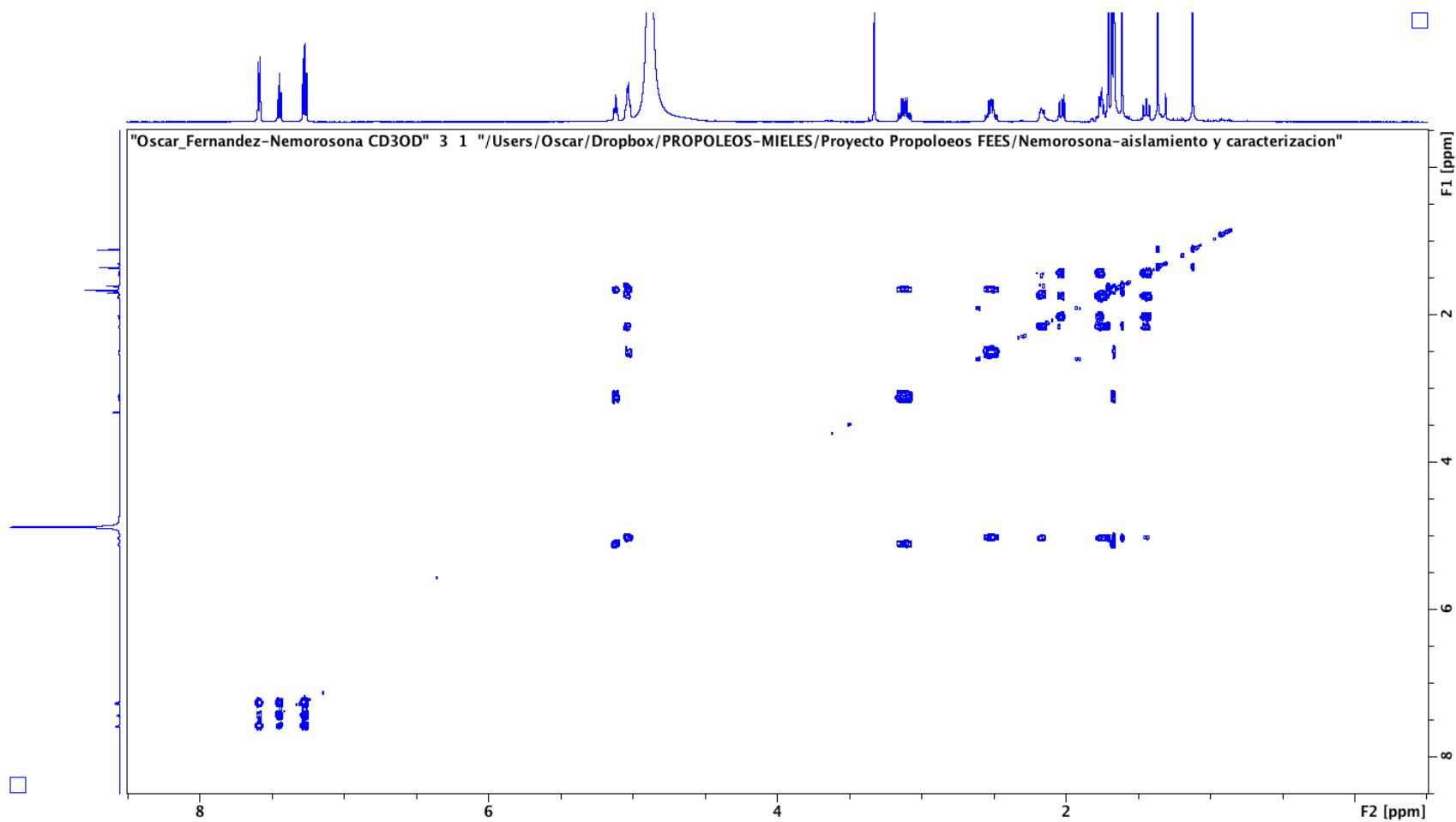


Figura 62. Espectro COSY de la nemorosona (Metanol- d_4 ; 600 MHz; 298,15 K),

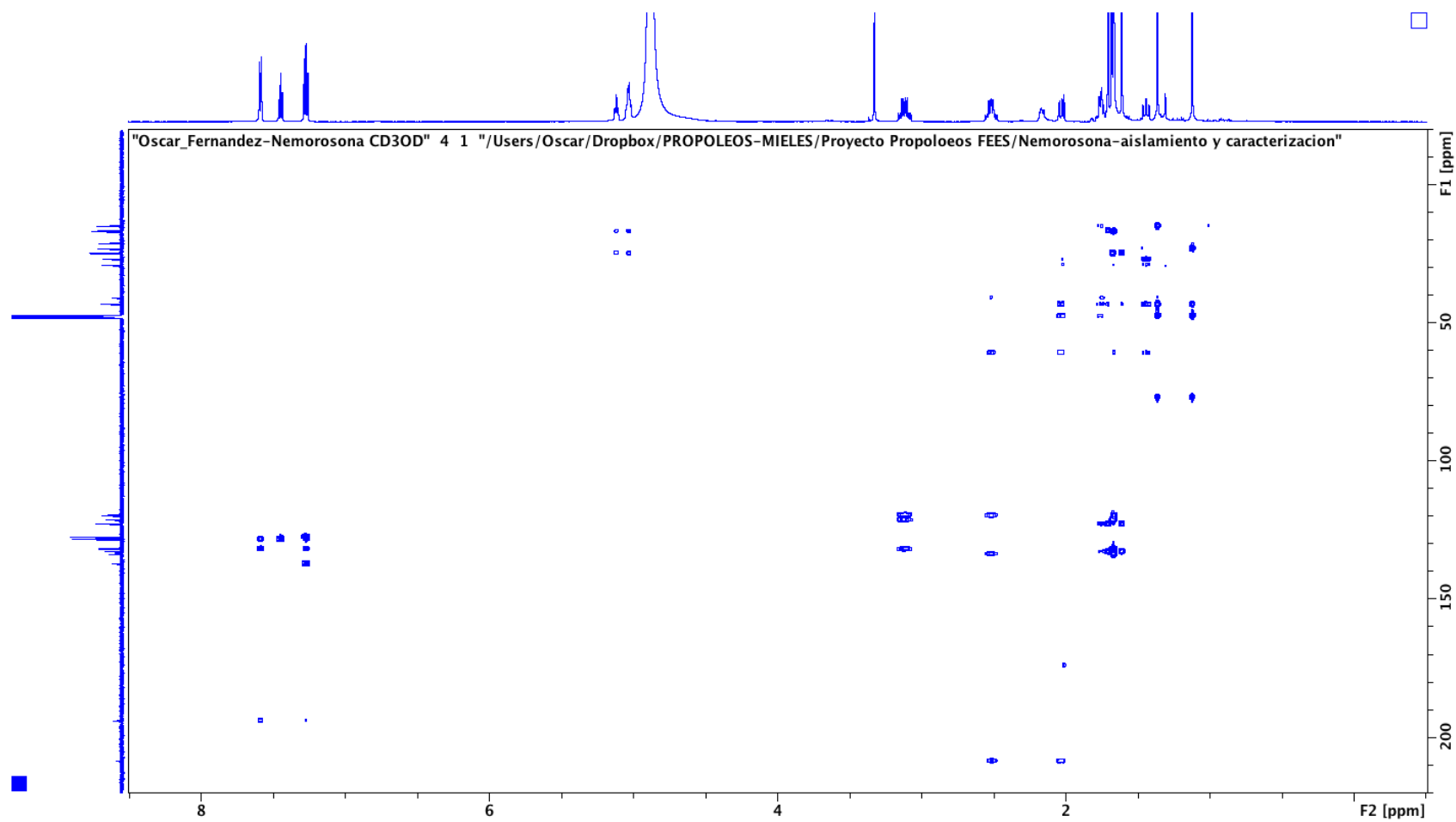


Figura 63. Espectro HMBC de la nemorosona (Metanol-d₄; 600 MHz; 298,15 K).

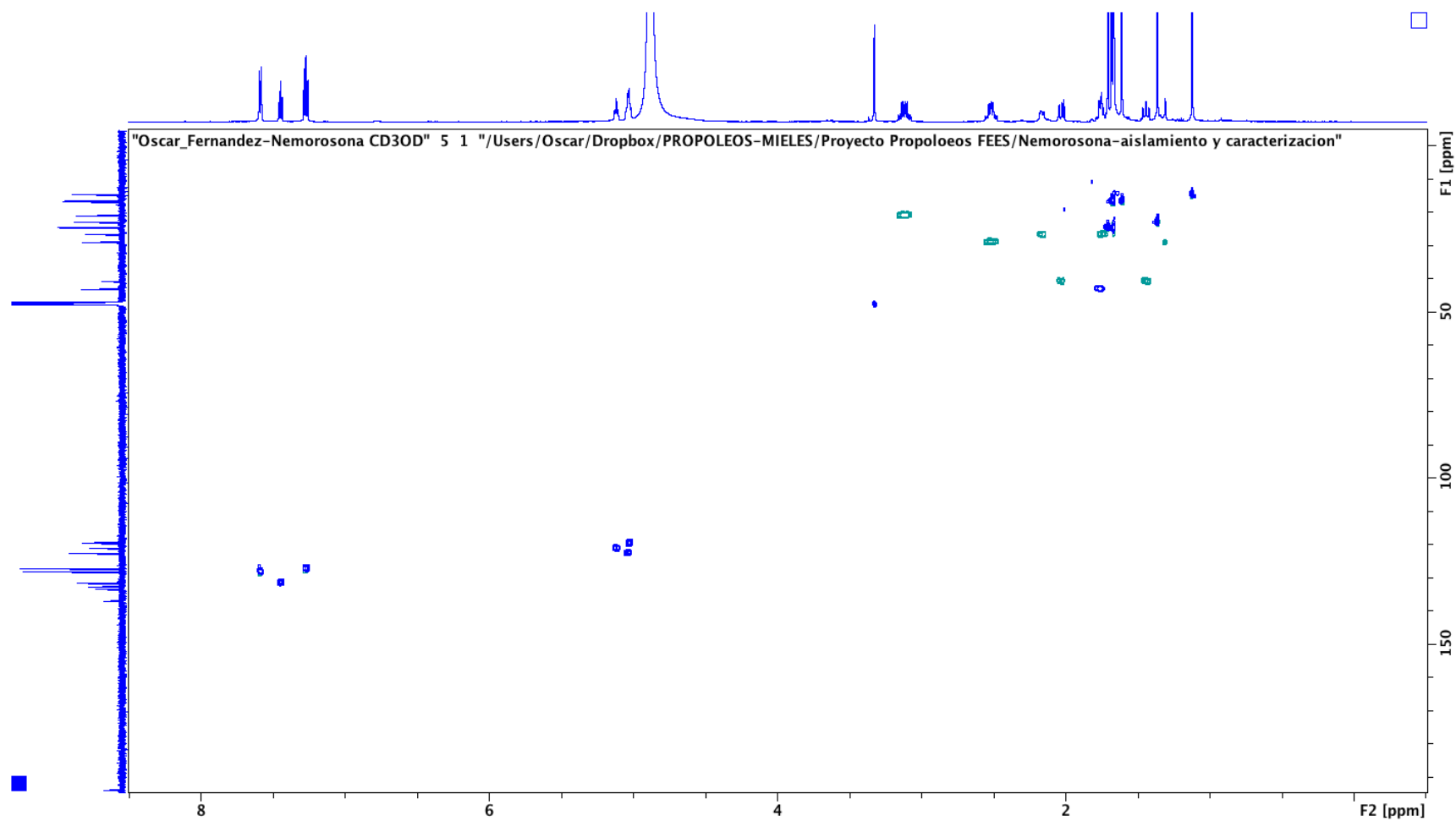


Figura 64. Espectro HSQC de la nemorosona (Metanol- d_4 ; 600 MHz; 298,15 K).

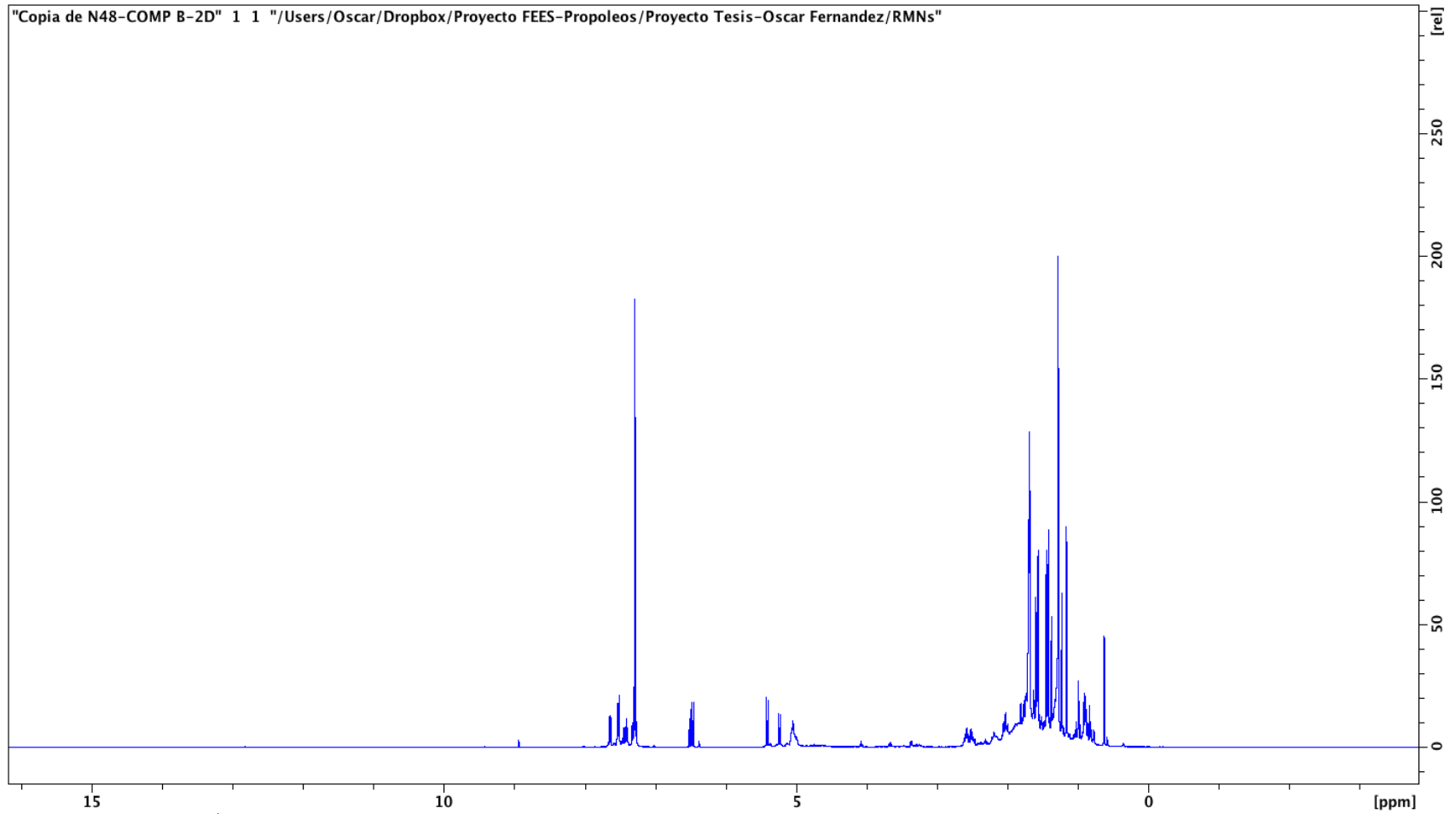


Figura 65. Espectro ^1H de la Scrobiculactona A y B (CDCl_3 ; 400 MHz; 298,15 K).

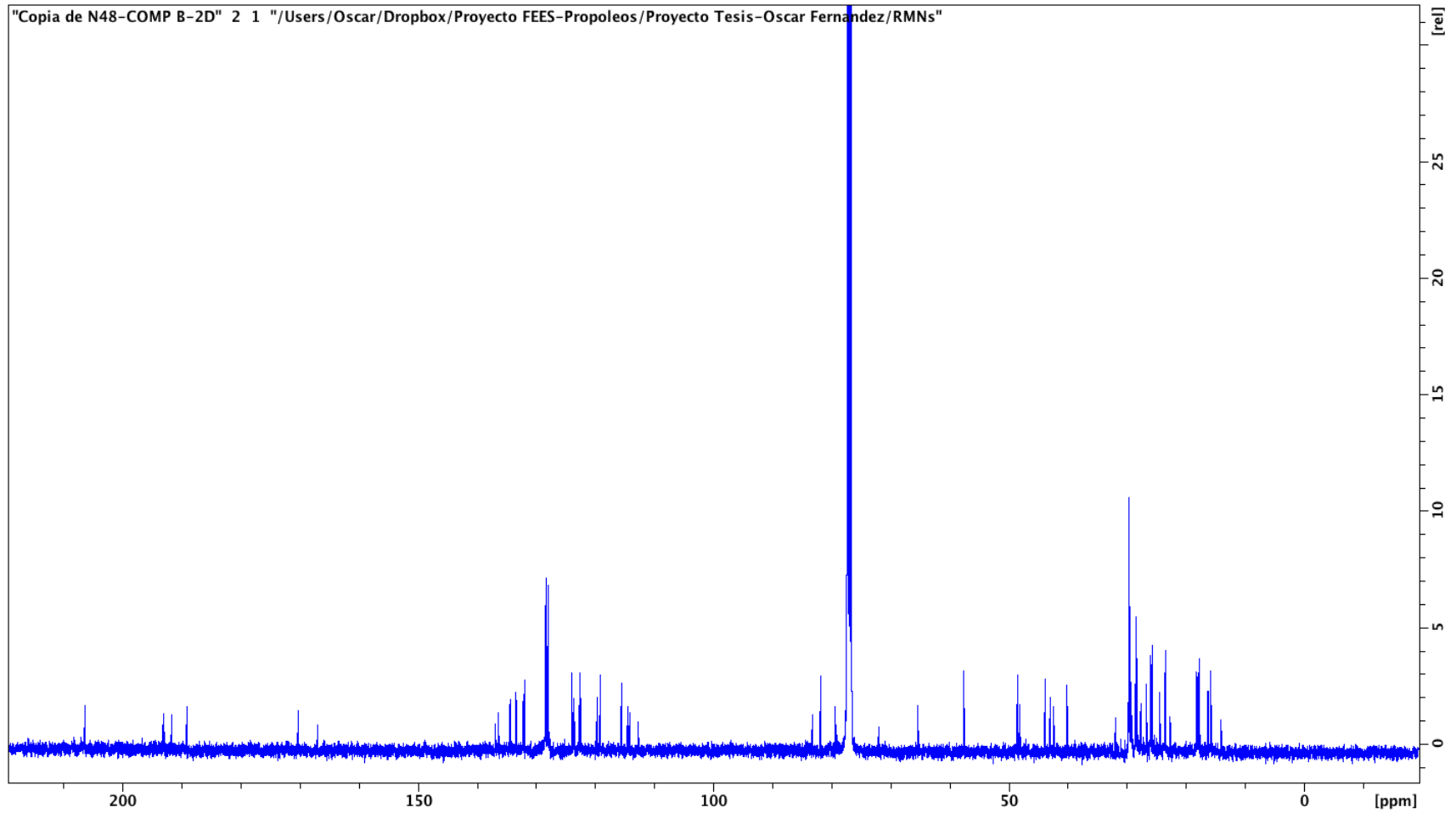


Figura 66. Espectro ^{13}C de la Scrobiculactona A y B (CDCl_3 ; 400 MHz; 298,15 K).

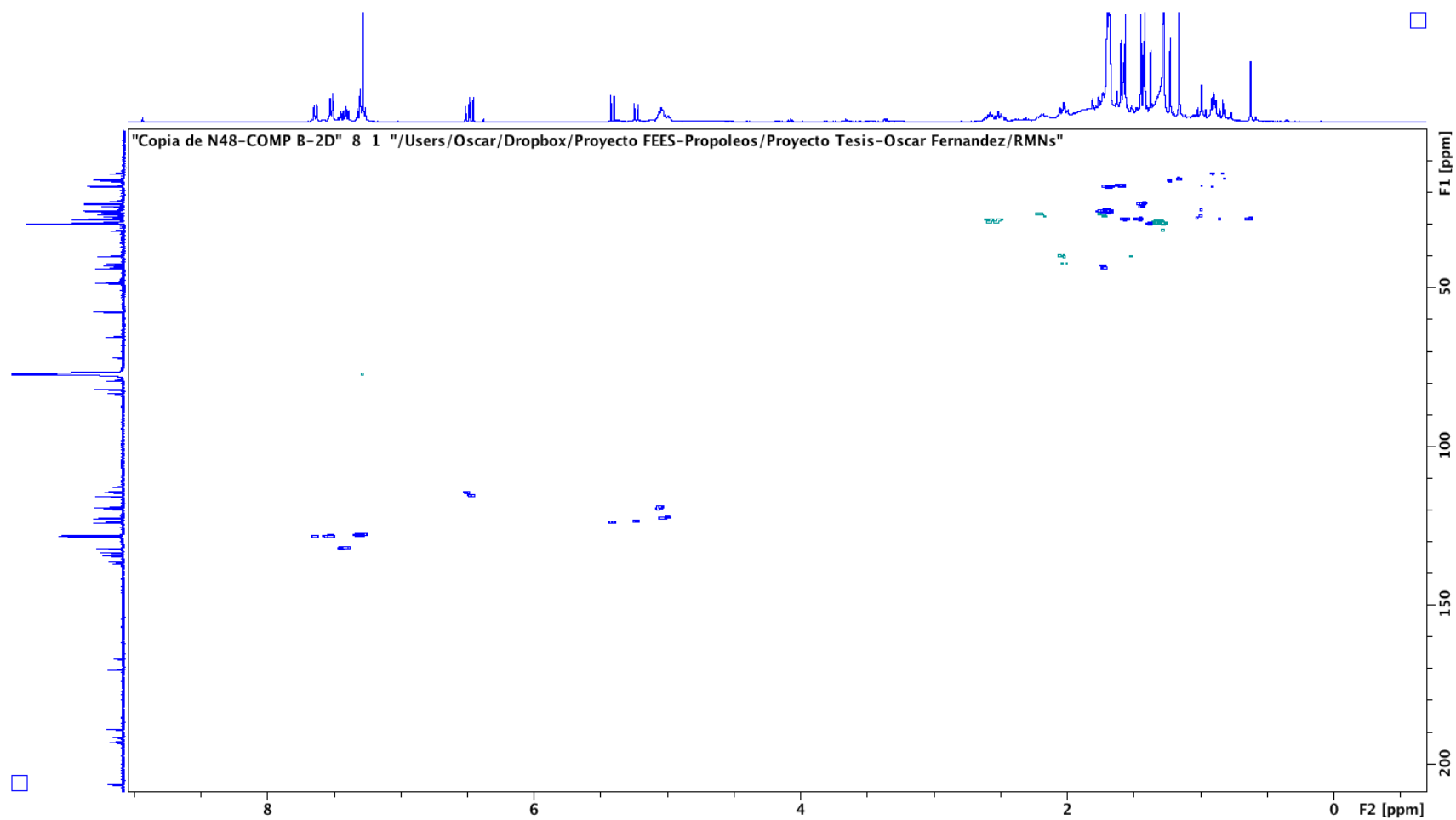


Figura 67. Espectro HSQC de la Scrobiculactona A y B (CDCl_3 ; 400 MHz; 298,15 K).

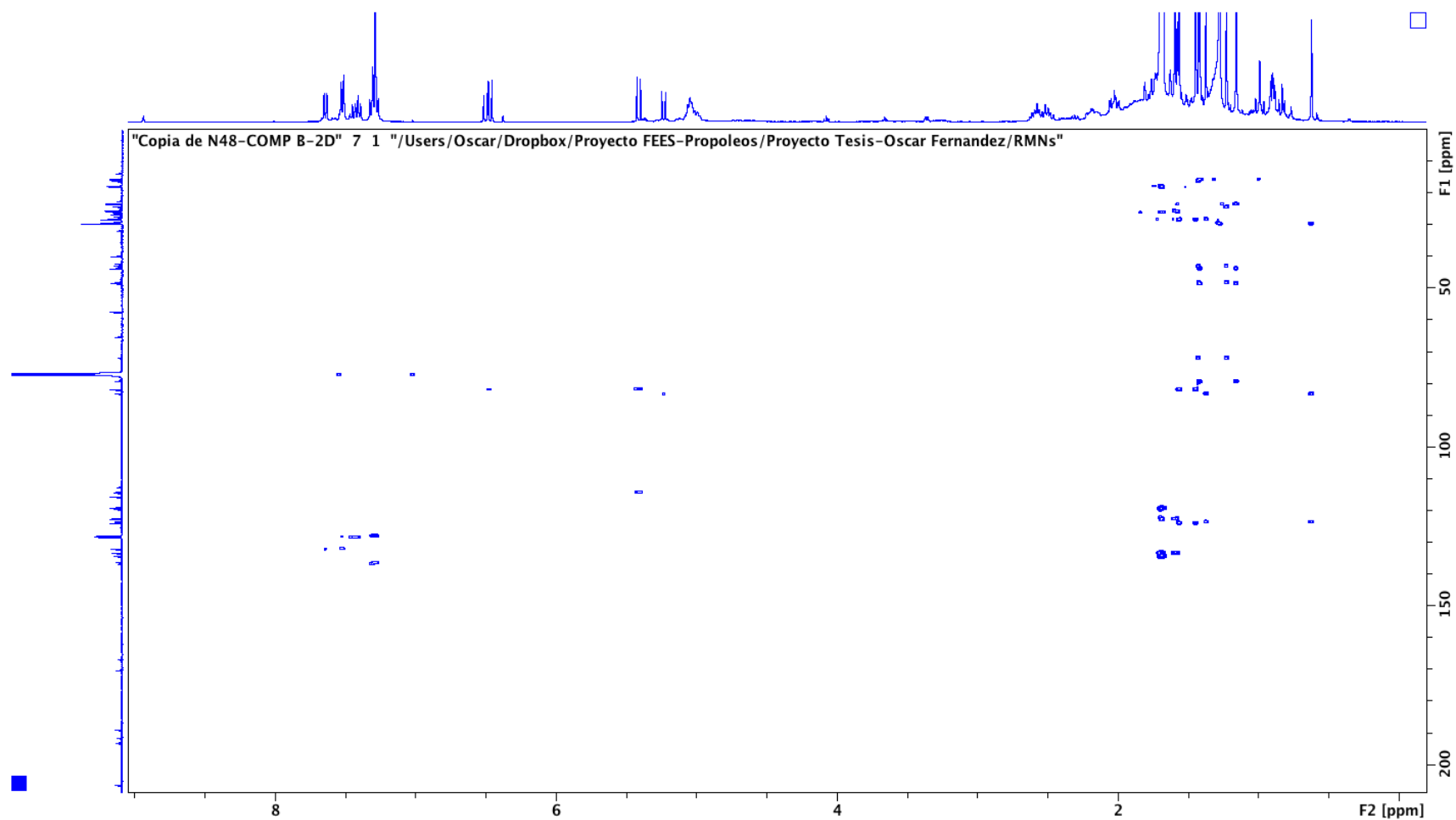


Figura 68. Espectro HMBC de la Scrobiculactona A y B (CDCl_3 ; 400 MHz; 298,15 K).

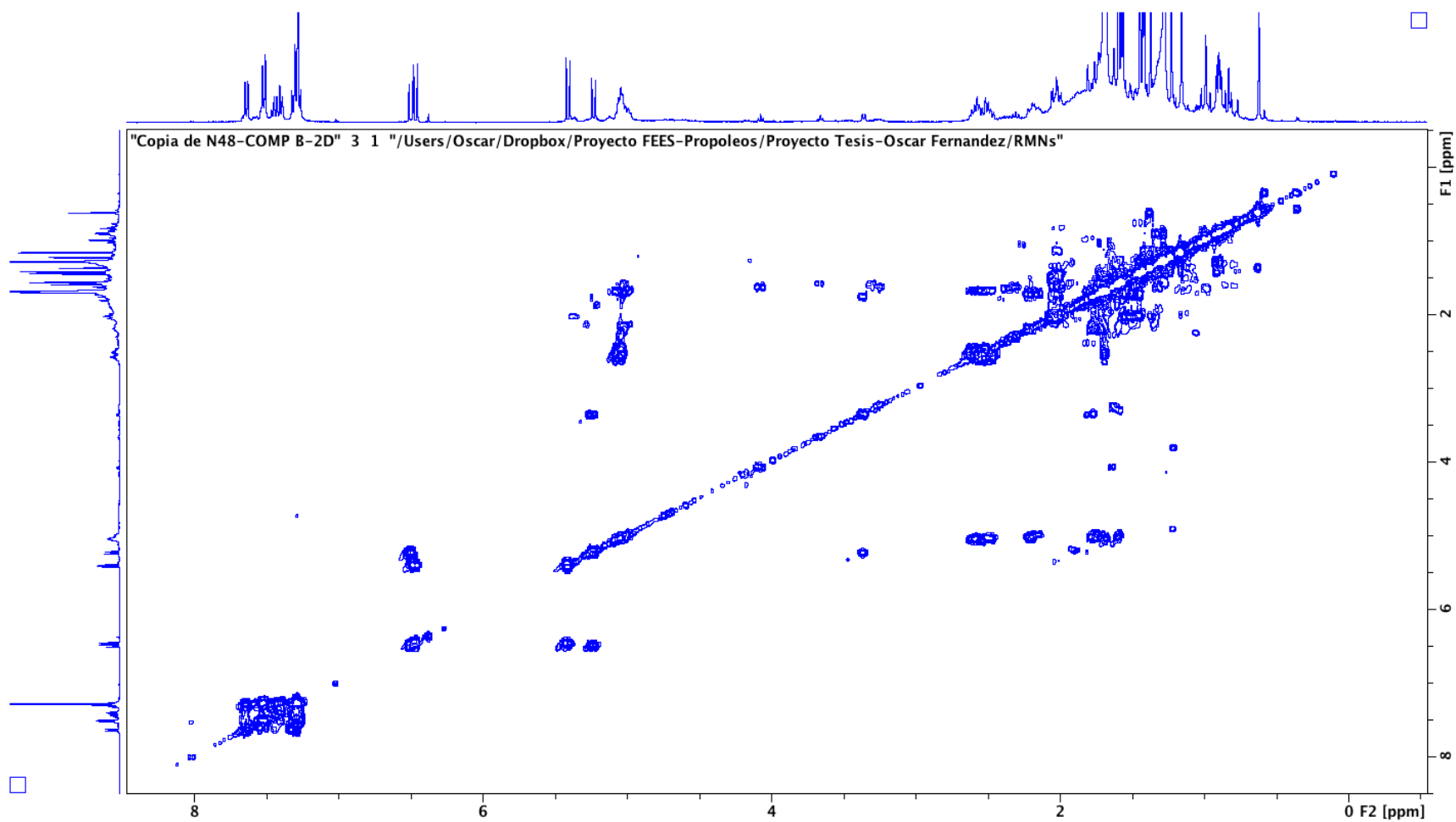


Figura 69. Espectro COSY de la Scrobiculactona A y B (CDCl_3 ; 400 MHz; 298,15 K).

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 3.0 PPM / DBE: min = 0.0, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

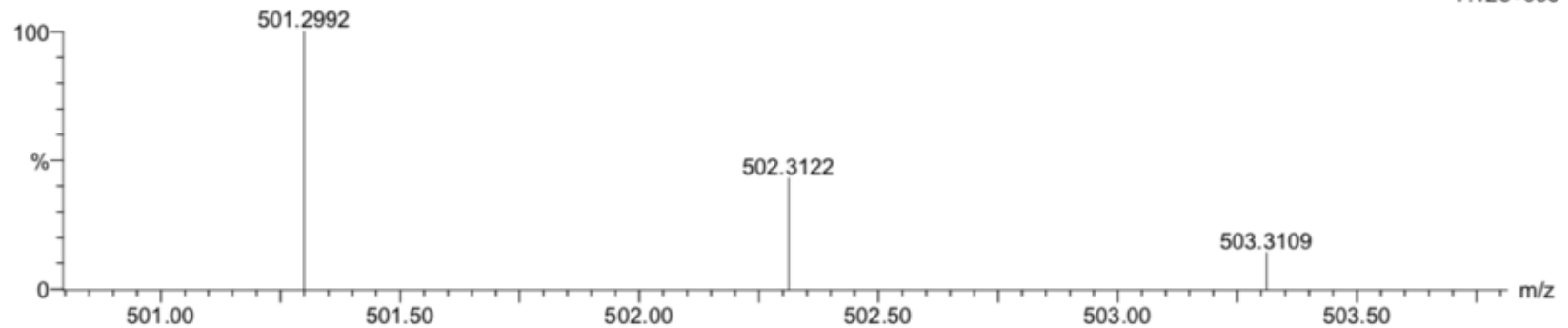
192 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-100 H: 0-200 O: 0-20 Na: 0-1

TAMAYO/PROTYECTOVIRAL

48-2C_P_PM 2549 (10.977) Cm (2543:2556)

1: TOF MS ES+
7.12e+003

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
501.2992	501.3005	-1.3	-2.6	13.5	23.9	0.3	C33 H41 O4
	501.2981	1.1	2.2	10.5	25.2	1.5	C31 H42 O4 Na

Figura 70. Espectro de LC-MS/MS (ESI+) del la Scrobiculactona A y B, Fórmula molecular: $C_{33}H_{42}O_4$

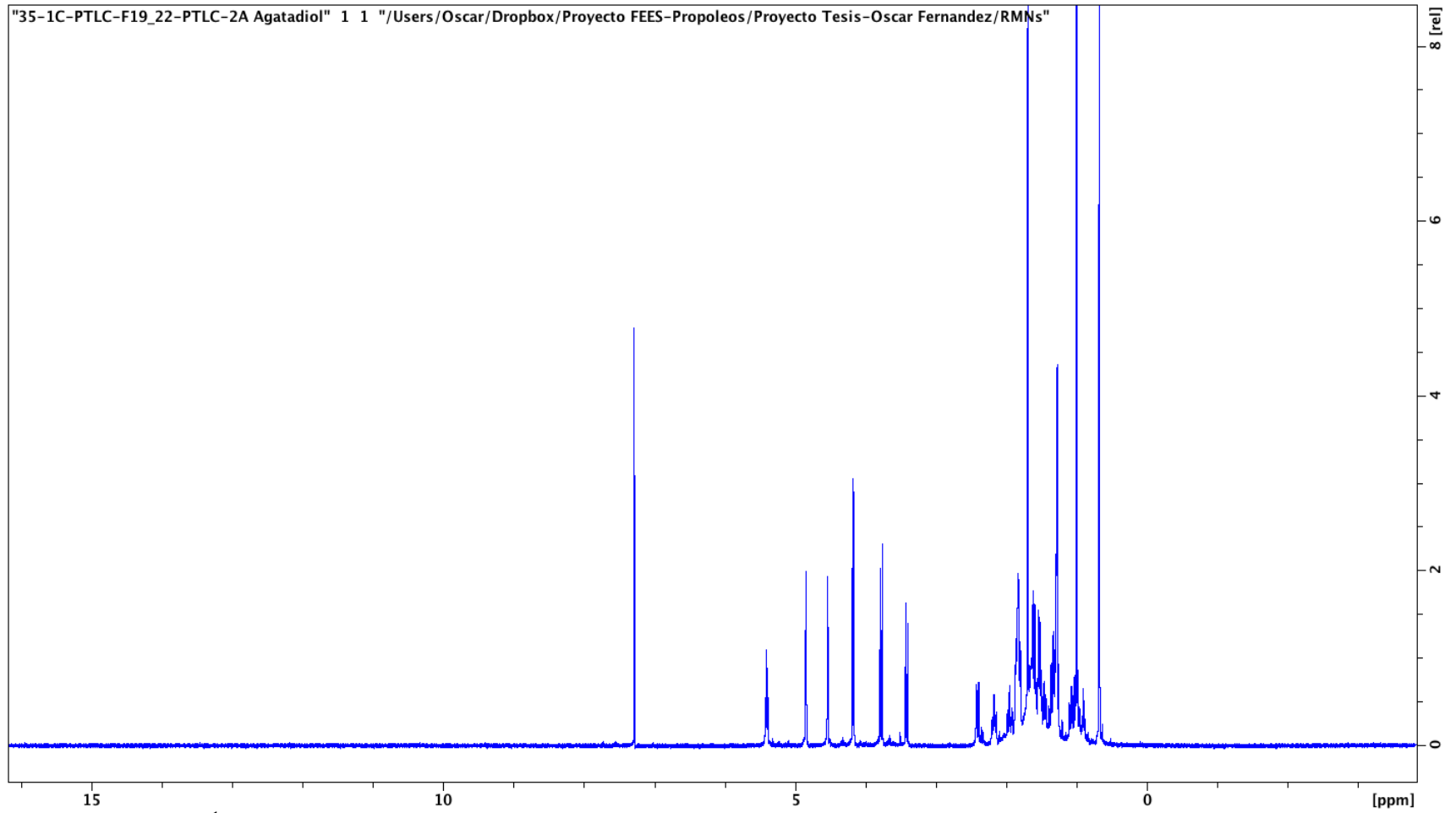


Figura 71. Espectro ^1H -RMN del Agatadiol (CDCl_3 , 600 MHz).

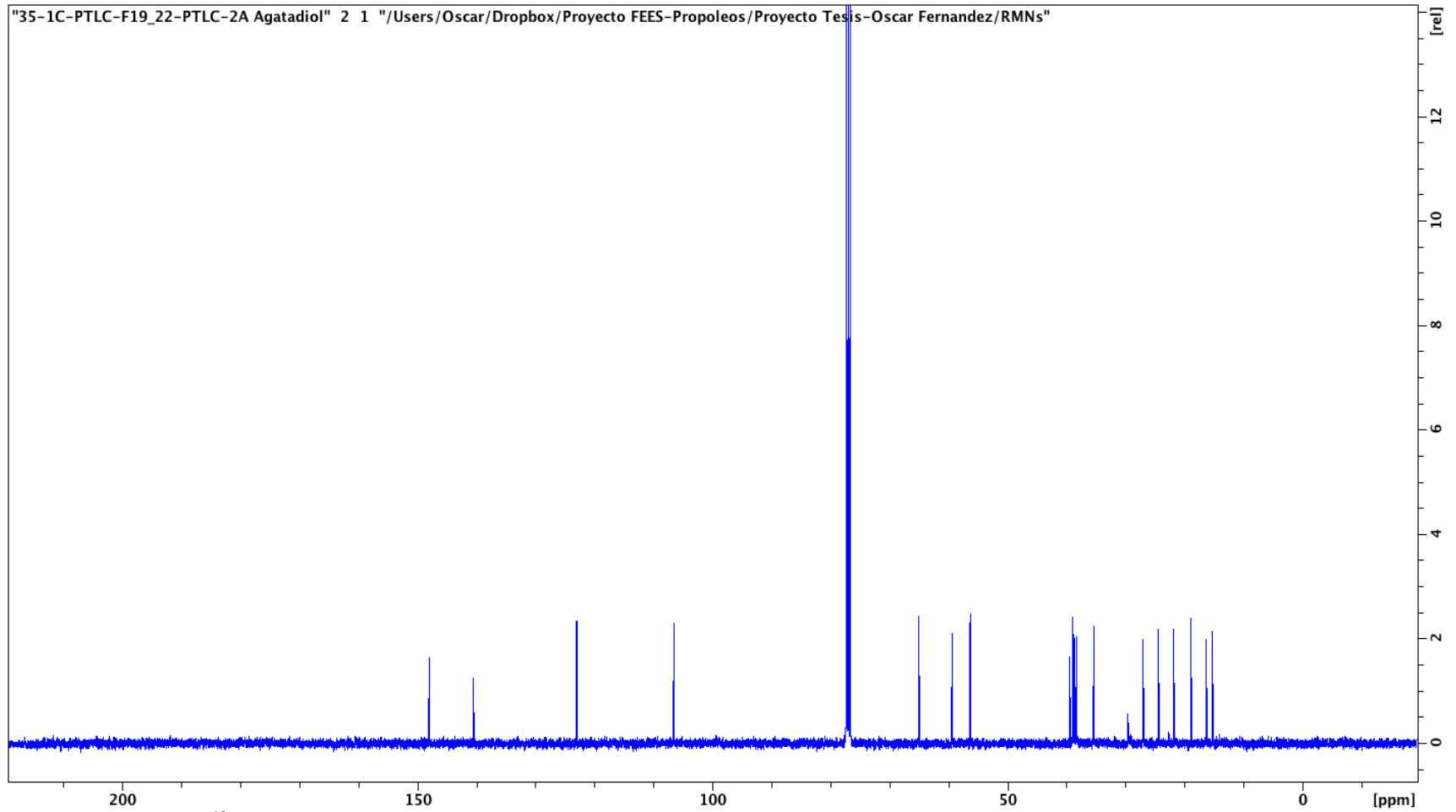


Figura 72. Espectro ^{13}C -RMN del Agatadiol (CDCl_3 , 600 MHz).

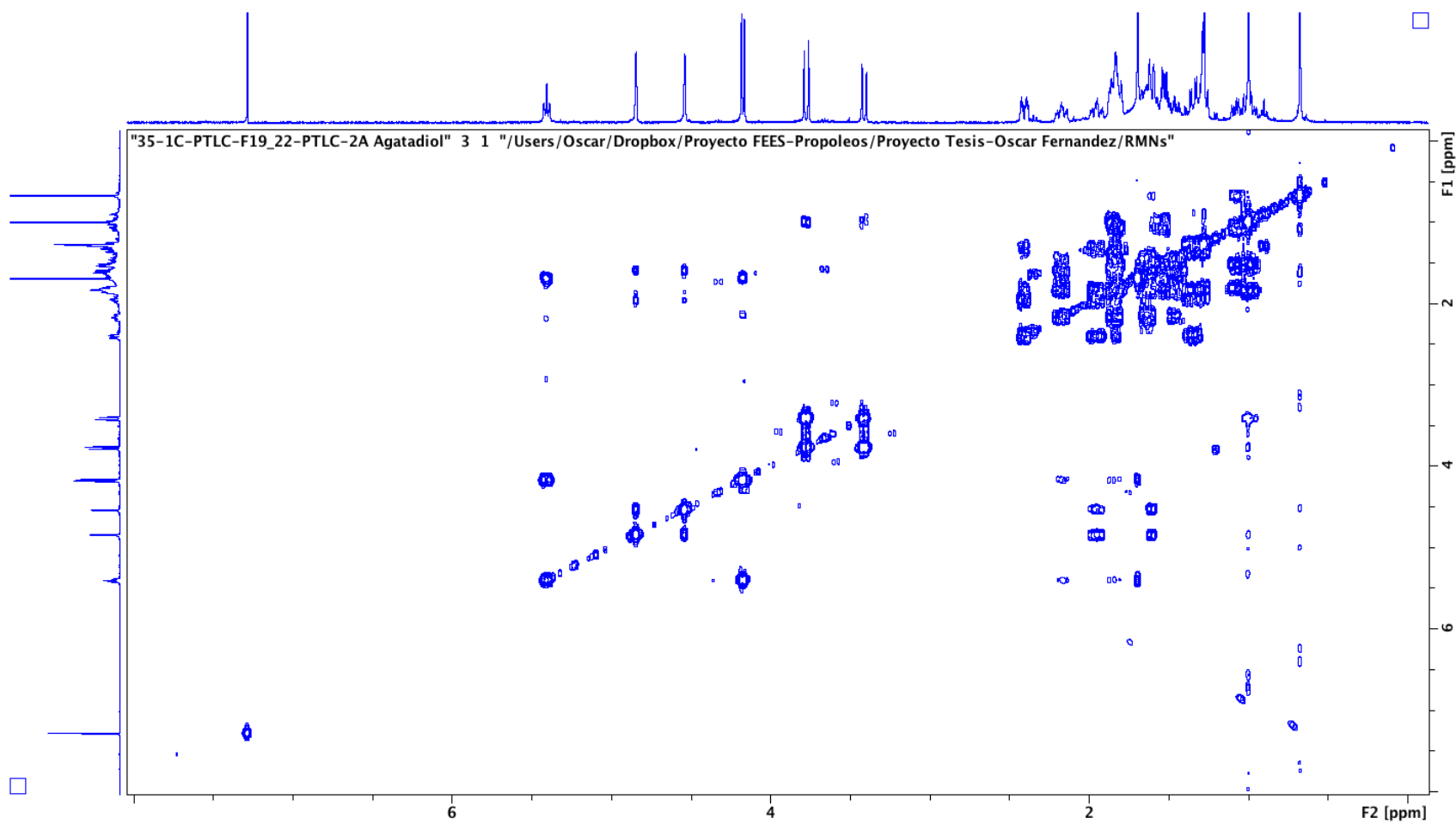


Figura 73. Espectro COSY del Agatadiol (CDCl₃, 600 MHz).

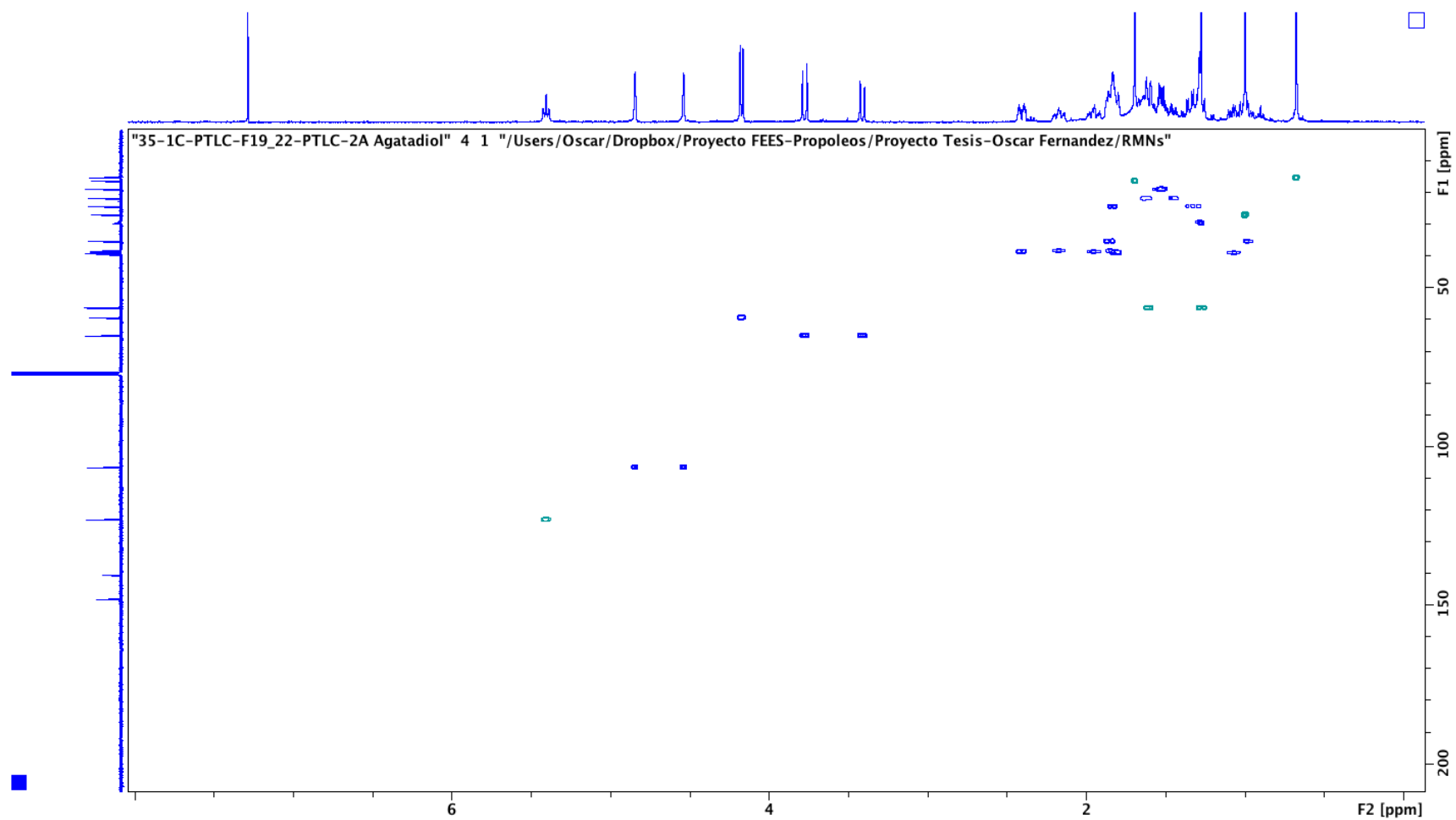


Figura 74. Espectro HSQC del Agatadiol (CDCl_3 , 600 MHz).

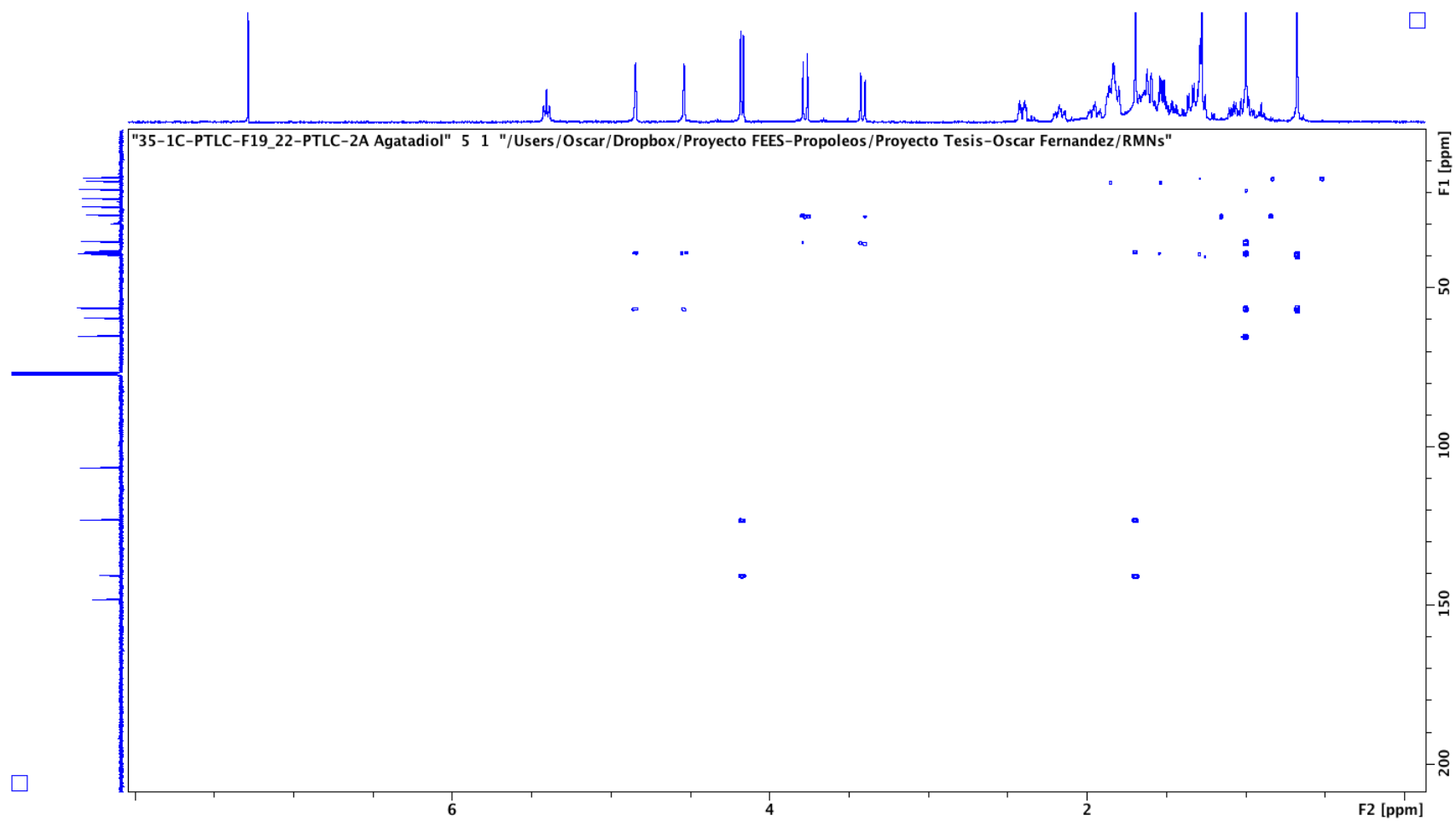


Figura 75. Espectro HMBC del Agatadiol (CDCl_3 , 600 MHz).

Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = 0.0, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

31 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

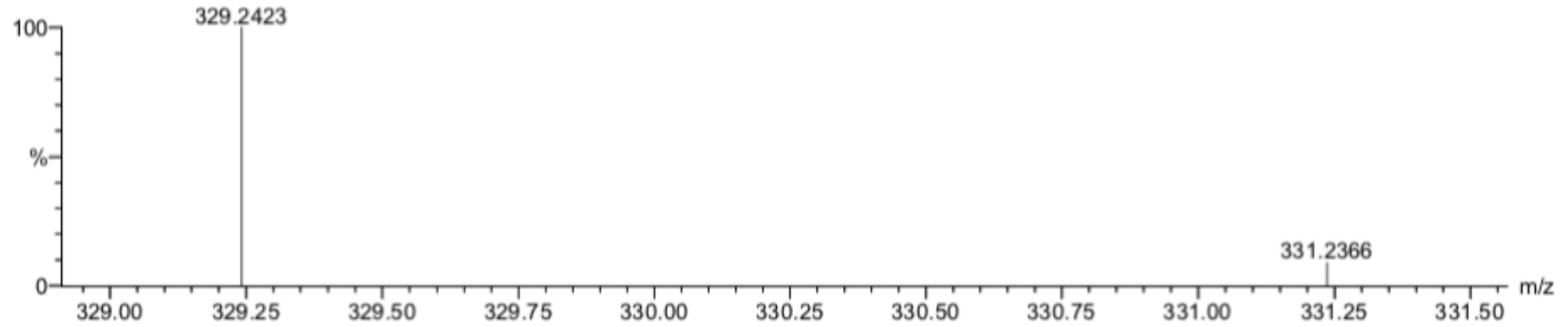
Elements Used:

C: 0-25 H: 0-40 O: 0-4 Na: 0-1

TAMAYO/PROTYECTOVIRAL

A_P35-1C_001A 1248 (5.381)

1: TOF MS ES+
3.75e+001



Minimum: 0.0
Maximum: 5.0 20.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
329.2423	329.2457	-3.4	-10.3	3.5	13.4	0.4	C20 H34 O2 Na
	329.2481	-5.8	-17.6	6.5	14.3	1.2	C22 H33 O2

Figura 76. Espectro de LC-MS/MS del agatadiol.

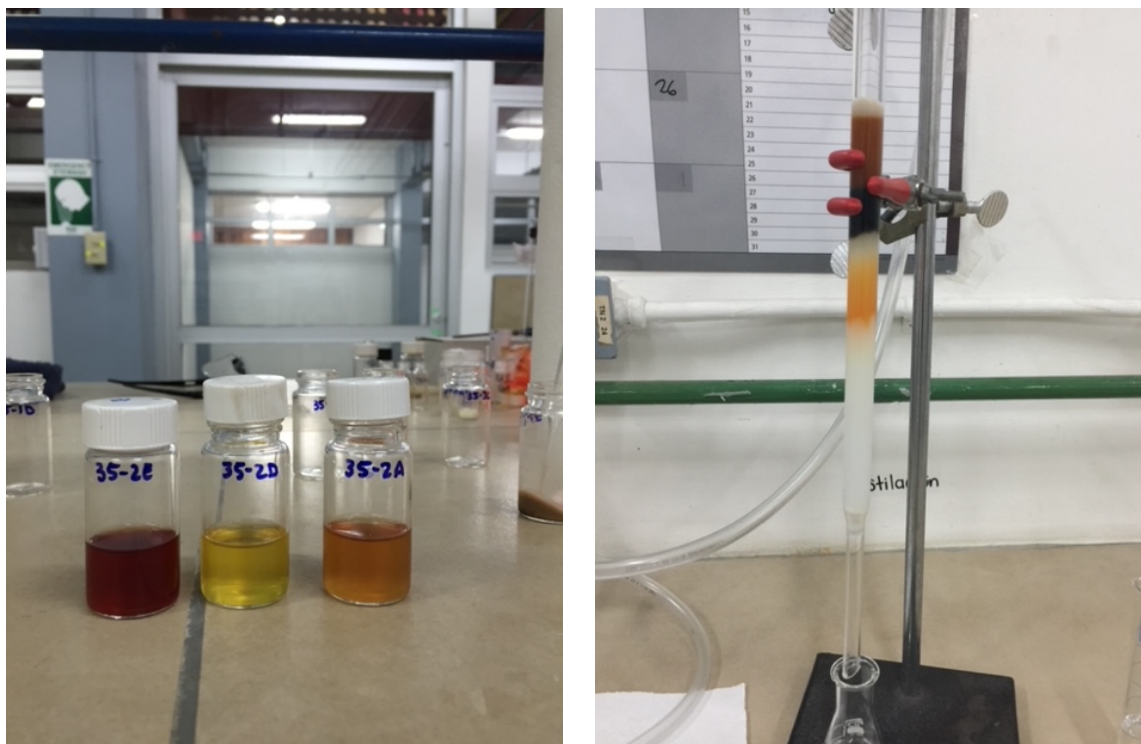


Figura 77. Extractos etanólicos de propóleos costarricenses pertenecientes al apiario 35, así como su fraccionamiento mediante CC.

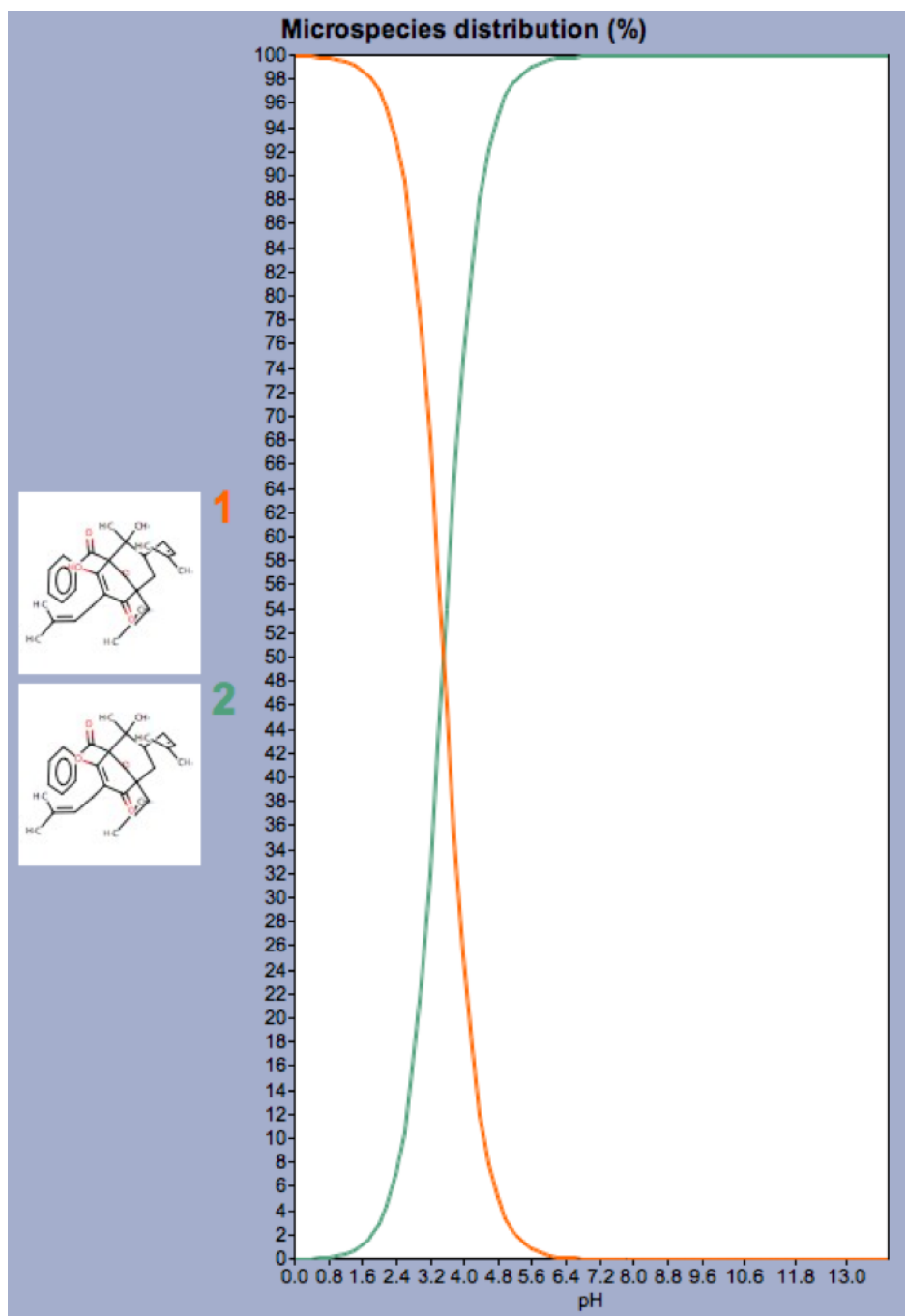


Figura 78. Estimación teórica de la distribución porcentual de la nemorosona de acuerdo con su protón más ácido.

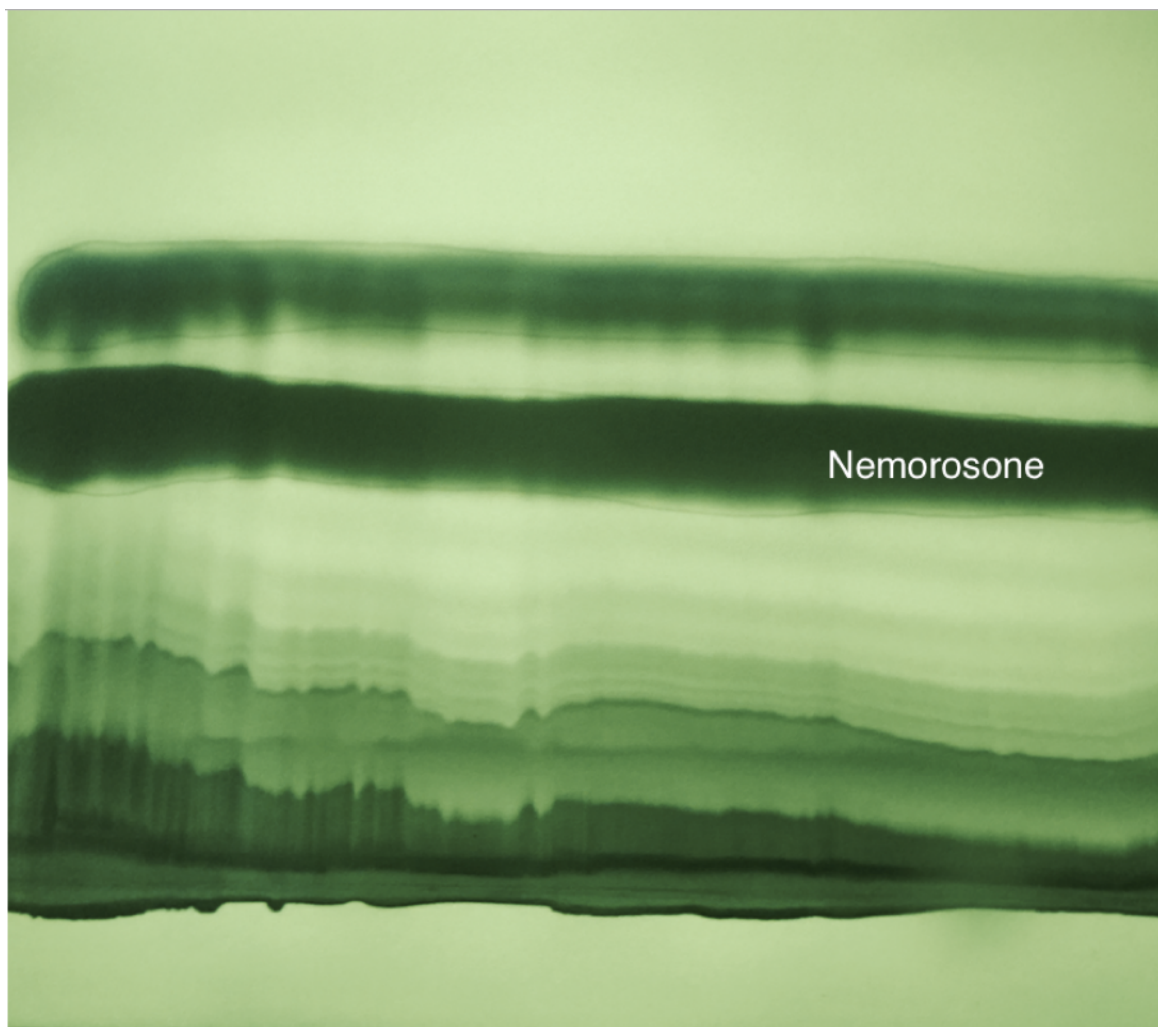


Figura 79. PTLC característica de la nemorosona durante su aislamiento, FV: Hexano: Acetato de Etilo (7:3). Revelada a $\lambda = 254$ nm.

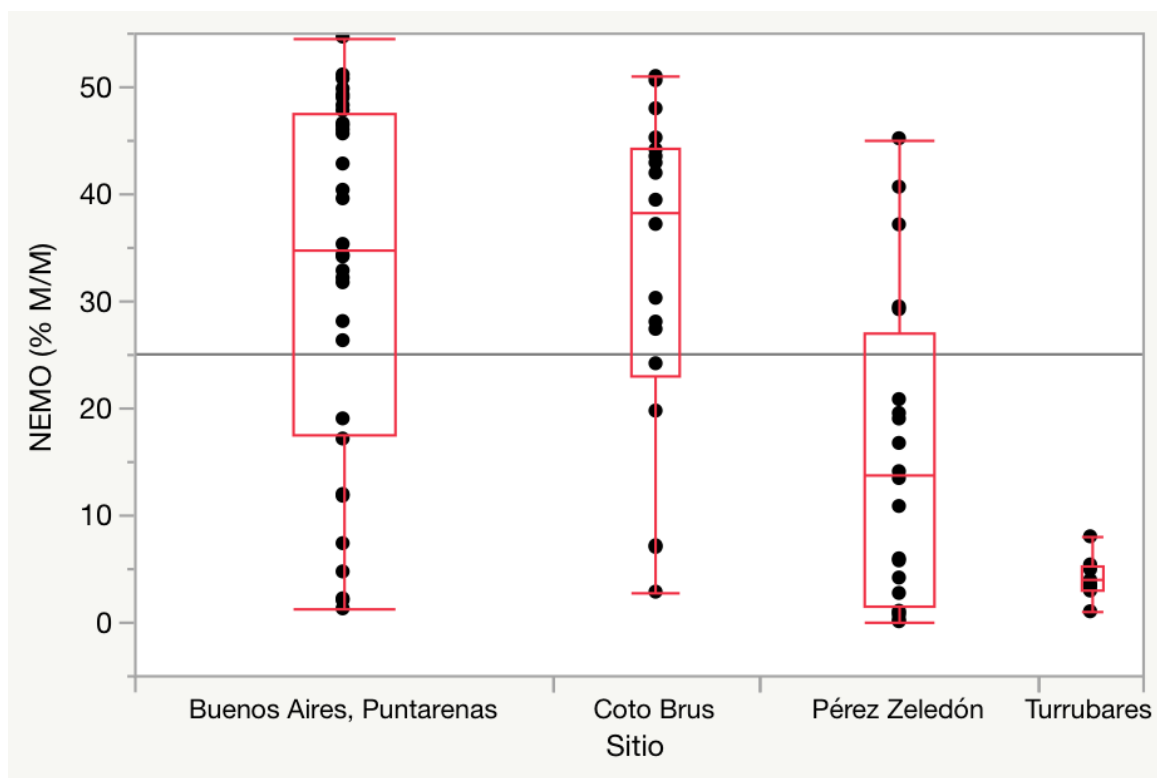


Figura 80. Análisis univariante del contenido de nemorosona (% m/m) con respecto al sitio de muestreo.