

UNIVERSIDAD NACIONAL

Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional (SEPUNA)

Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar (FCTM)

Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT)

Maestría en Apicultura Tropical (MAT)

Evaluación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los propóleos provenientes de varios pisos altitudinales en Nicoya, Guanacaste

Frederick Lawrence Arias Allen

Trabajo Presentado para optar al grado de Master en Apicultura Tropical. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional (SEPUNA)

Campus Pbo. Benjamín Núñez

Heredia, Costa Rica

Agosto, 2017

Tutores:

Dr. Johan Van Veen

M.Sc. Eduardo Umaña

Asesores:

Dr. Gabriel Zamora Fallas

Este trabajo se realizó bajo el auspicio del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT),  
de la Universidad Nacional

## Tabla de Contenidos

AGRADECIMIENTOS.....	1
1. Resumen .....	3
2. Introducción.....	4
3. Propóleos en Costa Rica.....	4
4. Objetivos .....	7
4.1 Objetivo general .....	7
4.2 Objetivos específicos.....	7
5. Justificación.....	8
5.1 Flavonoides .....	9
5.2 Variación en la coloración de los propóleos.....	10
5.3 Composición de los Propóleos .....	10
6. Hipótesis.....	11
7. Materiales y Métodos .....	11
7.1 Método de recolección de las muestras .....	11
7.2 Obtención de los extractos .....	13
7.3 Compuestos fenólicos totales .....	14
7.4 El valor <i>ORAC</i> (capacidad de absorción del radical oxígeno). .....	15
7.5 Determinación de Sólidos o rendimientos.....	15
7.6 Metodología estadística.....	16
8. Resultados y discusión .....	16
8.1 Contenido de Fenólicos Totales .....	16
8.2 Capacidad Antioxidante .....	17
9. Discusión.....	22
10. Conclusiones .....	22
11. Recomendaciones .....	23
12. Bibliografía.....	24
12.1 Bibliografía de imágenes.....	26
13. Anexos.....	26

## Tabla de Figuras

Figura 1. Estructura química de los compuestos fenólicos. ....	15	Figura 5. Trozos de propóleos en placas Petri. ..	19
Figura 2. Principales componentes de los propóleos a nivel general.....	16	Figura 6. Resultados de la prueba de correlación entre las variables de Valor ORAC Y Fenólicos Totales.....	24
Figura 3. Ubicación y distribución de los apiarios muestreados en el cantón de Nicoya. ....	17	Figura 7. Resultados de la prueba de relación entre las variables de valor ORAC y altura.....	25
Figura 4. Vial con muestra de propóleos, etiquetado y envasado. ....	18	Figura 8. Prueba de relación entre las variables de Fenólicos totales y altura.....	26

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento primero a Dios.

A mis padres Susana Allen Artavia y Víctor Arias Vásquez que son mi ejemplo a seguir y se han esforzado por darme la mejor educación posible.

A mis hermanos que los amo con todo mi corazón.

Al Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT), de la Universidad Nacional, por abrirme sus puertas y brindarme la mejor de las atenciones, apoyo y otorgarme la beca de estudio de la Maestría en Apicultura Tropical.

A la Vicerrectoría de Investigación, por brindarme el apoyo por medio del otorgamiento del Fondo para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles (FOCAES).

A todos los profesores, compañeros y amigos del CINAT por su apoyo durante el tiempo compartido.

A la Msc. Jennie Vargas Cárdenas por su apoyo incondicional en la formulación de este trabajo.

A los tutores PhD. Johan Van Veen y Msc. Eduardo Umaña Rojas por sus aportes.

Al asesor Dr. Gabriel Zamora Fallas por sus enseñanzas y consejos tan valiosos.

## **Dedicatoria**

*Dedico este trabajo a mi familia.*

*A mi madre que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas.*

*Quien ha dedicado todo su tiempo para que yo esté bien y no me falte nada.*

*A mi padre que me ha enseñado que en la vida hay que trabajar duro y salir adelante a pesar de las adversidades.*

*A mis hermanos que siempre me han apoyado y han sido un gran ejemplo para mí y una motivación, por ellos me levanto cada día con ganas de ser mejor.*

*Por eso y más quiero dedicar este título a mi familia, por la cual llegue hasta donde hoy estoy y nunca me rendí, aunque me sobraron las ganas de hacerlo, siempre los tuve presente y ellos fueron la motivación extra que tuve para poder llegar hasta el final.*

## 1. Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante y la composición de fenoles totales de los propóleos provenientes del cantón de Nicoya, los cuales se recolectaron en apiarios ubicados en diferentes pisos altitudinales, tomando en cuenta que la vegetación puede variar en cuanto a la altitud. Se seleccionaron nueve apiarios en las siguientes comunidades: Quirimán, Zaragoza, Mansión, Juan Díaz, Corral de piedra, Samara, Nambí, Bosques don José y Garcímuñoz. La recolección de las muestras fue llevada a cabo por el método del raspado, se tomaron 2 muestras por apiario, para posteriormente evaluar la capacidad antioxidante de las muestras. Se utilizó la prueba del valor ORAC o capacidad de absorbancia del radical oxígeno. Para la composición de fenoles totales se utilizó el ensayo Folin-Ciocalteu.

Los resultados mostraron que la relación entre compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante es de un 96,8%, lo cual quiere decir que las muestras presentan una alta dependencia entre estas 2 variables. Además de que solamente el 9,1% de la capacidad antioxidante reflejada en todas las muestras se explica por la variable de altura por consiguiente no tiene significancia estadística.

## **2. Introducción**

Los propóleos son un material resinoso que las abejas colectan a partir de exudaciones de las yemas de los árboles y vegetales, la abeja los transporta a la colmena donde es transformado y se convierte en una combinación entre ceras, resinas, bálsamos, polen, y secreciones salivares. “Los propóleos están formados aproximadamente por un 45-55% de resinas, 30-40% de ceras y ácidos grasos, 10% de aceites esenciales, 5% polen y 5% de minerales y otros componentes. La fracción de resinas está formada principalmente por flavonoides, ácidos aromáticos y esterres” (Lacalle, 2016). Actualmente se conoce que “este material es utilizado por las abejas para desinfectar la colmena, sellar grietas, construir panales, así como para su uso como agente microbicida, desinfectante y también para embalsamar intrusos difíciles de expulsar por su tamaño”. (Bedascarrasburre & Maldonado, 2001,).

## **3. Propóleos en Costa Rica**

Se puede mencionar que en Costa Rica el tema del estudio de los propóleos es algo que aún se encuentra en etapa inicial; por lo tanto existe poca evidencia dentro de la cual se pueden encontrar los estudios realizados por parte del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT).

El primer antecedente que se tiene es la tesis de la máster Yeimy Gamboa Pérez (2011), sobre la determinación de la capacidad antioxidante de propóleos de Costa Rica, de acuerdo al contenido de flavonoides en el cual se analizaron 24 muestras de los propóleos pertenecientes a 6 apiarios ubicados en diferentes zonas apícolas importantes del país, tales como Quepos, Tarrazú, Pérez Zeledón, Los Chiles, Atenas y Liberia. En dicho estudio se evaluaron parámetros químicos mediante métodos espectrofotométricos, se determinó el contenido de fenólicos totales, flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles; en dicho estudio se encontraron diferentes características antioxidantes para un mismo apiario lo cual quiere decir que contienen una composición química diferente y se concluye que la abeja de un mismo apiario visita diferentes fuentes botánicas.

Además se encuentra la tesis del Master Eduardo Umaña Rojas, el cual en su estudio determina que, los propóleos procedentes de diferentes zonas geográficas de Costa Rica presentan gran variabilidad de poder antioxidante contra el radical DPPH. Se encontró que los propóleos del país son muy activos o de mediana y baja capacidad antiradicalaria. Por otra parte menciona que las muestras de la zona sur del país fueron todas de alta actividad. Se encontró que para Costa Rica existen tres grupos de propóleos con huella química diferente, lo que indica que las abejas *Apis mellífera* dispusieron de más de una fuente botánica. Se concluye que su composición puede variar dependiendo de la vegetación de la zona. Cabe resaltar que la composición química global, medida a través del espectro de H-RMN de los propóleos costarricenses, se correlacionó con su capacidad antioxidante.

A nivel internacional dentro de los hallazgos encontrados está el estudio realizado por investigadores de la facultad de química de la Universidad de Belgrado, Serbia; En el cual realizaron un análisis metabólicomico de los propóleos provenientes de varias especies de *Populus nigra*. En el mismo se proponen métodos espectroscópicos para determinar la composición química de las muestras provenientes de estas especies de árboles; con el fin de correlacionar la variabilidad en cuanto a composición química dependiendo del piso altitudinal del cual provenga la muestra. El origen botánico fue determinado por medio de la comparación de datos espectrales a través de una espectroscopia ultravioleta y esta huella digital fue sometida a un análisis multivariado el cual determina la variabilidad y lograr una correlación con la altitud. Se concluye que la fuente botánica depende principalmente de la ubicación geográfica y el clima.

Existen dos tipos de propóleos provenientes de las especies de populus de los cuales varían considerablemente en cuanto a composición. El más estudiado y de mayor composición variable es el de populus nigra, el cual contiene características tales como mayor cantidad en flavonoides tales como crisina y galangina; la otra variedad obtenida es la de populus tremula, el cual contiene mayor cantidad de fenólicos glicéridos.

La composición es muy importante para las compañías que se dedican a elaborar productos a base de los propóleos debido a que los efectos biológicos dependen principalmente de los componentes presentes en los mismos. Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas entre las muestras colectadas a diferentes alturas, de acuerdo a los análisis multivariados se determinó que los mayores compuestos fenólicos tales como los glicéridos se encontraron en las muestras provenientes de por encima de los quinientos metros sobre el nivel del mar; por otra parte la mayor parte de flavonoides tales como crisina y galangina fueron encontrados en las muestras provenientes de por debajo de los cuatrocientos metros sobre el nivel del mar. Cabe resaltar que las muestras provenientes de los cuatrocientos a quinientos metros sobre el nivel del mar arrojaron los resultados con menor diferencia significativa en cuanto a composición química lo que supone que en este piso altitudinal están las muestras más parecidas entre sí.

Se concluye que de acuerdo al análisis realizado la mayor composición en las muestras colectadas por encima de los 500 metros sobre el nivel del mar resultó ser de fenólicos mientras que las muestras colectadas por debajo de los 400 metros sobre el nivel del mar fueron flavonoides; y las muestras que se colectaron entre 400-500 metros se determinó que provienen de origen mixto con variaciones detectadas en la cantidad de metabolitos presentes, (Andelkovic et al, 2017).

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de los propóleos provenientes de diferentes pisos altitudinales en Nicoya, Guanacaste.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar el contenido de fenólicos totales para valorar la relación entre la actividad antioxidante y composición química.
- Determinar la capacidad antioxidante de extractos de propóleos a través de la prueba valor capacidad antioxidante del radical oxígeno para valorar su relación con la altitud.
- Determinar si existe alguna (s) zonas altitudinales que produzcan propóleos con mayor poder antioxidante.

## 5. Justificación

Se desconoce de algún estudio de este tipo que se haya realizado en la zona del Cantón de Nicoya, por lo tanto no es posible determinar si existe una correlación entre la cantidad de fenoles totales, la actividad antioxidante de los propóleos y los diferentes pisos altitudinales que presenta esta región. Por otra parte Nicoya presenta una gran biodiversidad y esto hace suponer que los propóleos en esta zona cuentan con características variables en su composición respecto al hábitat donde se encuentre la colmena.

Actualmente existe un interés en específico por parte de la comunidad científica, debido a que, al ser un producto de origen natural, se convierte en una alternativa para muchas enfermedades que generan desordenes celulares y provocan reacciones en cadena, generando radicales libres, debido a que los propóleos contienen una estructura química para contrarrestar dichos efectos este ha sido efectivo en tratamientos complementarios en varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Los propóleos son una sustancia producida por las abejas, conocida a nivel mundial, el cual posee características anti fungicidas, antibacteriales, antioxidantes además posee propiedades medicinales. Por lo anterior ha llamado la atención de la comunidad científica y se han realizado estudios para la utilización de este producto (Farré et al, 2004).

Existen algunas normativas internacionales sobre requisitos mínimos en cuanto a composición química de los propóleos en países como Argentina y Brasil; con el objetivo de utilizar los extractos como materia prima deben cumplir un mínimo estipulado.

Por otra parte los propóleos, hoy en día es un producto muy demandado en países como Japón, el mercado de los propóleos está alcanzando amplio margen gracias a los estudios realizados que han permitido determinar la importancia y magnitud de sus propiedades antioxidantes y su compuesto fenólico (Huayhua & Nina, 2009).

En Costa Rica la información referente a variabilidad en su composición y correlación de variables como los diferentes pisos con respecto a diversos tipos de ecosistemas es un tema que carece de estudios, es por ello que este estudio se enfoca en establecer si existe diferencia o no en lo que respecta a la recolección de las muestras realizándolo en un mismo cantón y en diferentes pisos altitudinales.

Nicoya cuenta con una gran biodiversidad, esta zona se caracteriza por poseer en su mayoría bosque tropical seco (Sullivan, J. 2014); Se considera que es una zona con un clima apto para la apicultura y por ende para realizar este estudio. Por otra parte el oxígeno representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, pero es responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad, conocidas como especies reactivas de oxígeno, en donde se encuentran los radicales libres. El exceso de radicales libres se ha relacionado con una mayor incidencia de diversas enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardíacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral y aceleración del envejecimiento (Mendes et al, 2006). Es por lo anterior que se tomó la decisión de realizar la prueba de capacidad de absorción del radical oxígeno.

## **5.1 Flavonoides**

En la mayoría de los estudios, la actividad antioxidante y antimicrobiana de este producto se atribuye principalmente a los flavonoides: acetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, naringenina, pinobanksina, pinocembrina y quercetina.

Los flavonoides son compuestos que en su estructura química básica (véase figura 1.) tienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos; además poseen un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde el 2 al 6. en función de sus características estructurales se pueden clasificar en: flavanos (poseen un grupo OH en posición 3 del anillo C), flavonoles (contienen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del anillo C), flavonas (tienen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo

hidroxilo en posición C3) y antocianidinas, las cuales contienen unido el grupo OH en posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Vargas et al, 2014).

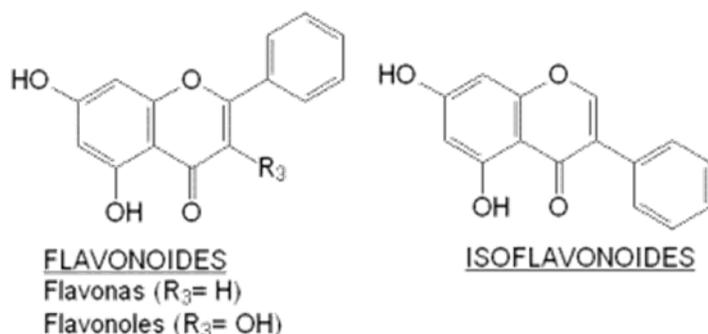


Figura 1. Estructura química de los compuestos fenólicos.  
Porras, A., López, A (2009).

## 5.2 Variación en la coloración de los propóleos

Su color puede variar enormemente. En climas templados oscila desde rangos entre amarillo o café y hasta marrón, a menudo con un tono rojizo. Los propóleos producidos en clima tropical pueden variar en su color desde un verde marrón claro en propóleos brasileños, hasta rojo oscuro como es en el caso de los propóleos cubanos. Esta sustancia tiende a oscurecerse conforme avanza su presencia dentro de la colmena. Los propóleos frescos aparecen como un tinte rojo en el nuevo panal construido por las abejas. Además el color puede variar de acuerdo a las plantas y árboles de donde lo colectan las abejas (Fearnley, 2001).

## 5.3 Composición de los Propóleos

La mayoría de investigaciones las cuales han explorado los componentes presentes en los propóleos, identifican que Resinas y cera son dos de los componentes principales encontrados (véase figura 2). La composición de los propóleos puede variar considerablemente de acuerdo a la zona del mundo donde sea colectado y las plantas y árboles que las abejas visiten además de la temporada e incluso la hora del día a la que sea colectado.

Los principales componentes encontrados son resinas 45-55%, ceras y ácidos grasos 25-35%, aceites esenciales 10%, polen 5%, otras sustancias orgánicas y minerales 5% (Fearnley, 2001).

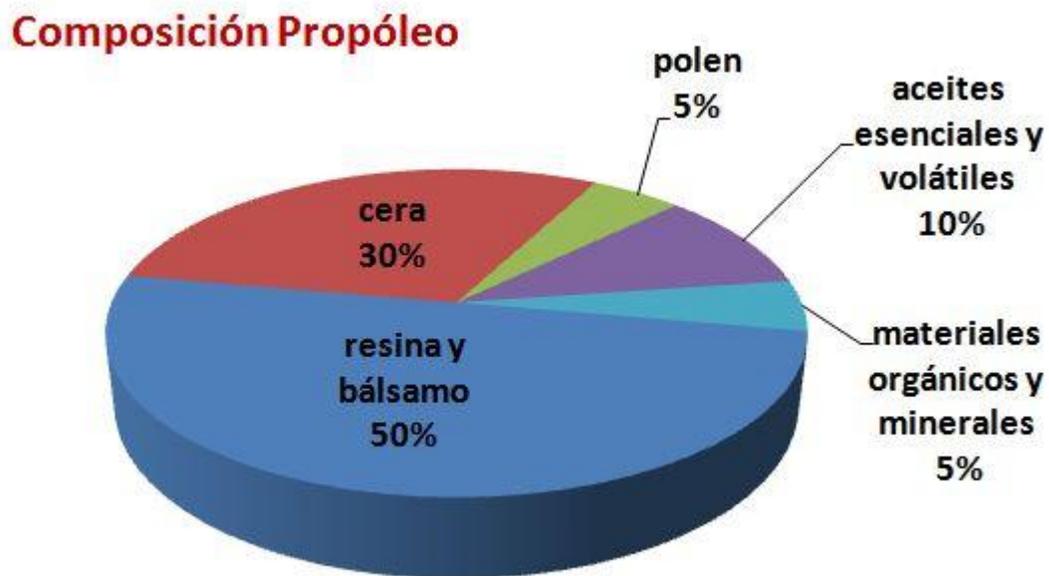


Figura 2. Principales componentes de los propóleos a nivel general. Revista Propóleos, (2011).

## 6. Hipótesis

Los propóleos colectados a mayor altitud en el cantón de Nicoya muestran mayor capacidad antioxidante.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Método de recolección de las muestras

La recolección de las muestras se llevó a cabo desde el 03 de febrero al 27 de marzo del año 2017 en nueve apiarios en Nicoya, Guanacaste. Los apiarios se ubican en las siguientes comunidades: Quirimán, Zaragoza, Mansión, Juan Díaz, Corral de piedra, Samara, Nambí, Bosques don José y Garcímuñoz como se observa en la figura 3.

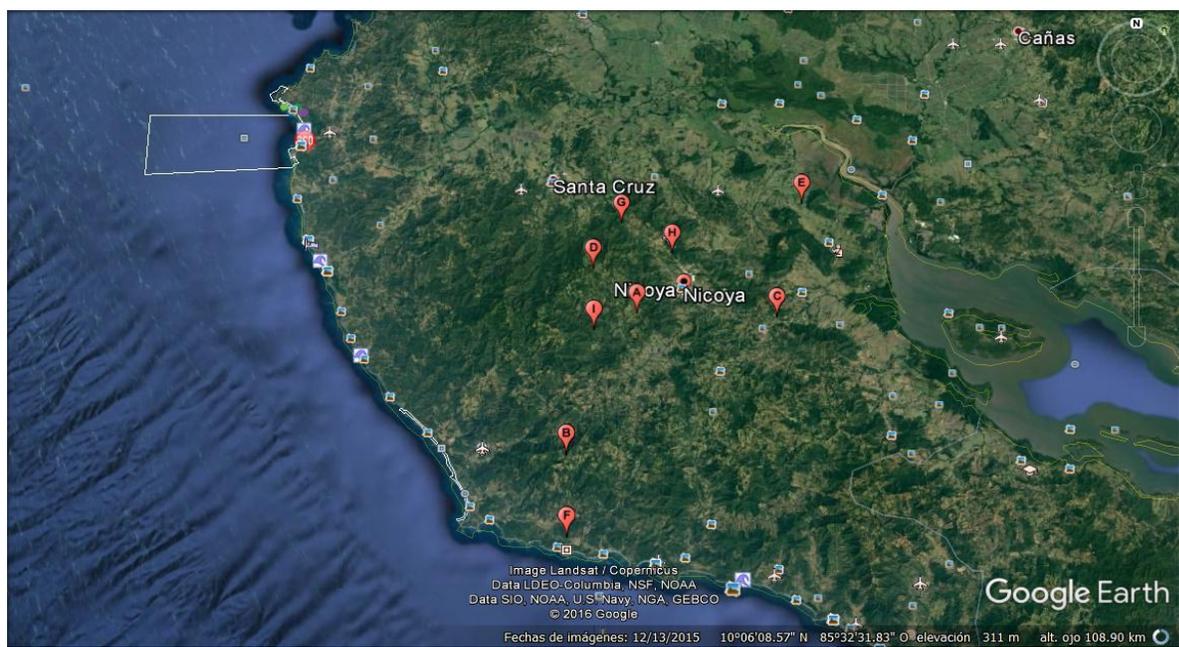


Figura 3. Ubicación y distribución de los apiarios muestreados en el cantón de Nicoya.  
Google earth (2017).

Cada apiario contiene un estimado de treinta colmenas de diversos tamaños y con buena cantidad de vegetación alrededor, cada apiario se encuentra separado por una distancia de más de cinco kilómetros.

Se seleccionaron dos colmenas por apiario, las mismas al momento de la recolección se encontraron en la mayoría de los apiarios a una cámara de cría y un alza de miel, a las colmenas se les raspó con la espátula los propóleos en la superficie de arriba de los marcos del alza melaría.

La visita a los apiarios tuvo un tiempo de cinco semanas, se realizó una recolección en cada apiario, la recolección se realizó en horas que van desde las 7 am hasta las 11 am. Las muestras se envasaron y se etiquetaron de la siguiente manera: Numero de apiario, Colmena A o B, Nombre del estudiante y Maestría en apicultura tropical 2017 (MAT 2017) como se muestra en la figura 4, posteriormente se pesaron las muestras obtenidas y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 4 grados para su conservación.



Figura 4. Vial con muestra de propóleos, etiquetado y envasado.

## 7.2 Obtención de los extractos

Para el proceso de obtención de los extractos de las muestras se siguió la metodología sugerida por Trusheva et al. (2007). se cortan las muestras en pequeños trozos y se pesan 400mg como se observa en la figura 5, luego se añaden 10 ml de metanol, posteriormente se realiza un baño de ultrasonidos durante 10 minutos, y se centrifugan a 4000 rpm durante 5 minutos a 24 grados centígrados. Los sobrenadantes se transfieren a tubos etiquetados con su respectivo código. Se le agregan a los sedimentos otros 10 ml de metanol para realizar otra extracción (siguiendo los pasos anteriores), los cuales se mezclan con los obtenidos anteriormente y se almacena a 4 grados centígrados hasta su uso posterior. (Umaña, 2013).

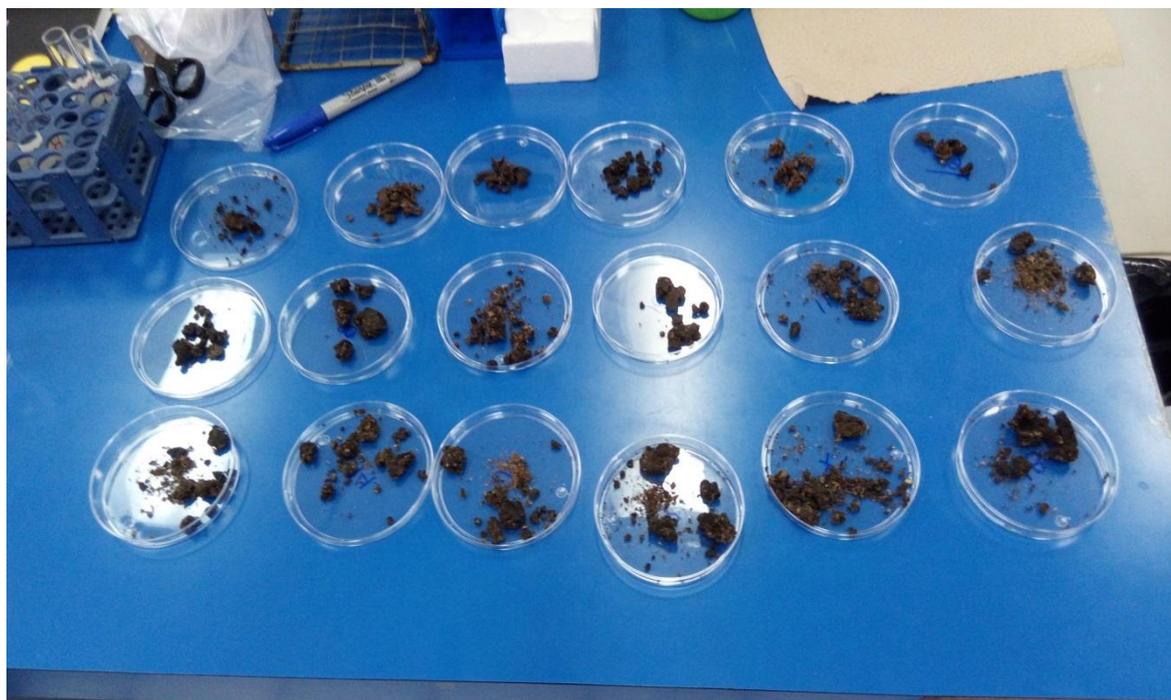


Figura 5. Trozos de propóleos en placas Petri.

### 7.3 Compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales se determinó por medio de la metodología propuesta por Singleton et al. (1999). utilizando 320  $\mu\text{l}$  de extracto de los propóleos de cada muestra, se diluyó en la microplaca con 160  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Dos diluciones con el ensayo, una serie se utilizó como blanco con 40  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Por otra parte en la microplaca se incluyó una curva de calibración de 11 concentraciones de ácido gálico (0-12,5 g/ml), se dispersó una cantidad de 160  $\mu\text{l}$  por cada solución de ácido gálico por duplicado. Los dos últimos pasos consisten en colocar 200  $\mu\text{l}$  de la solución de ácido gálico como blanco de la curva de calibración. A la curva de calibración se le añadieron 10  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de la solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a la serie de dilución y a curva de calibración después de 5 minutos. Las microplacas se dejaron en incubación por un periodo de dos horas a una temperatura de 23 grados centígrados en un agitador de microplacas. Posteriormente se realizó la lectura de cada micro placa a 765 nm en el Multiskan Spectrum los resultados se expresaron con miligramos equivalentes de ácido gálico. (Zamora et al, 2015).

#### **7.4 El valor ORAC (capacidad de absorción del radical oxígeno).**

Los valores presentes se obtuvieron por medio de la metodología propuesta por Huang et al. (2005) Se diluyen los extractos de los propóleos en serie en una microplaca oscura con 25 µl de buffer (Fosfato de sodio). Se procede a realizar una curva de calibración de seis concentraciones (6,25 a 50 µM) de 6-hidroxi 2, 5, 7, 8,- ácido tetraetilcroman-2-carboxílico (Trolox) de esta solución de Trolox, se dispensan 25 µl por triplicado. Posteriormente se añaden 155 µl de una solución de fluoresceína en todos los posos de la microplaca. El ensayo se incuba por un periodo de 10 minutos a 37 grados centígrados en el Fluorokan Asurt FI, transcurrido ese tiempo se le añade a todos los posos (con excepción del blanco) de la microplaca 20 µl de la solución de AAPH (2-methylpropionamidine-dihydrochloride), inmediatamente se mide la intensidad de fluorescencia (485 nm [excitación] /525 nm [emisión]) a 37 grados centígrados durante 60 minutos, Fluoroskan FL fluorómetro. Los valores ORAC se calculan como mol de equivalentes Trolox por 100 g de sólidos de los propóleos (mol TE/100 g). A cada muestra se le realiza tres análisis separados (Zamora et al, 2015).

#### **7.5 Determinación de Sólidos o rendimientos**

Este método se llevó a cabo antes de empezar ambas pruebas realizadas en este estudio. Como primer paso se pesó cada vial utilizado y luego se le añadió un mililitro del extracto de propóleos, posterior a esto se coloca en el rota vapor, una vez que los 18 viales pasaron por el rota vapor se introdujeron por 40 minutos en la estufa, pasado este tiempo se debieron volver a pesar por 3 rounds, hasta llegar a conseguir un peso constante por medio de la siguiente fórmula: **(Peso del vial después de la estufa – peso del vial) X 1000: mg/ml ;** (véase tabla 4 y 5).

## 7.6 Metodología estadística

Los datos de las muestras de los propóleos obtenidos (*ORAC*, *Fenólicos Totales* y piso altitudinal), se les realizó una inferencia estadística con el fin de determinar tendencias en los datos y la agrupación de estos en la zona de Nicoya, con este fin se utilizó el programa estadístico Minitab 17. Por otra parte la correlación entre las variables (*ORAC*, *fenólicos totales* y piso altitudinal), se logró determinar a través de este programa estadístico mencionado anteriormente. Luego se procedió a realizar una comparación de las zonas de donde se obtuvieron las muestras, las variables medibles en estos ámbitos fueron la media, mediana, desviación estándar y rango.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Contenido de Fenólicos Totales

Los resultados del ensayo Folin-Ciocalteu (véase tabla 1). Indican que la mayor cantidad de fenólicos totales los tuvieron las muestras 1,5 y 6 los cuales pertenecen a los apiarios de Sámara y Zaragoza respectivamente. Por el contrario las muestras 3, 8, 14, y 16 mostraron muy poca cantidad de fenólicos totales, además estos resultados demuestran que tanto en la altura de 14 metros sobre el nivel del mar se encontraron gran cantidad de fenólicos totales lo mismo que en la altura de 557 metros sobre el nivel del mar.

Tabla 1. Datos obtenidos en la prueba de Fenólicos Totales (ensayo Folin-Ciocalteu).

Muestra	Altura (msndm)	TP ( $\mu\text{g}$ Equivalentes de ácido gálico /mg de muestra)	Desviación estándar
1	14	63 / 5,5	7
2	14	30 / 3.1	3
3	80	20 / 3.6	0
4	80	30 / 5.3	3
5	557	86 / 4.3	0
6	557	143 / 6.6	3
7	222	30 / 8.3	3
8	222	20 / 4.1	0
9	749	23 / 5.2	0
10	749	40 / 6.5	0
11	9	40 / 6.2	0
12	9	33 / 6.9	0
13	335	33 / 5.6	0
14	335	20 / 4.8	0
15	158	40 / 4.8	0
16	158	10 / 5.5	0
17	168	36 / 7.9	0
18	168	36 / 7.3	0

Estos compuestos fenólicos tienen una alta relación con los valores de capacidad antioxidante, son los que explican en su mayoría de las muestras el porqué de la capacidad antioxidante, los valores se brindan en equivalentes de Ácido gálico medida establecida a nivel mundial.

## 8.2 Capacidad Antioxidante

Tabla 2. Datos obtenidos en la prueba de valor ORAC (capacidad de absorbancia del radical oxígeno).

<b>Muestra</b>	<b>Altura (msndm)</b>	<b>ORAC (<math>\mu\text{mol}</math> Equivalentes Trolox/g)</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	<b>14</b>	<b>786</b>	<b>107</b>
<b>2</b>	<b>14</b>	<b>376</b>	<b>100</b>
<b>3</b>	<b>80</b>	<b>195</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>80</b>	<b>275</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>557</b>	<b>869</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>557</b>	<b>1795</b>	<b>173</b>
<b>7</b>	<b>222</b>	<b>246</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>222</b>	<b>206</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>749</b>	<b>200</b>	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>749</b>	<b>367</b>	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>9</b>	<b>353</b>	<b>63</b>
<b>12</b>	<b>9</b>	<b>260</b>	<b>73</b>
<b>13</b>	<b>335</b>	<b>256</b>	<b>77</b>
<b>14</b>	<b>335</b>	<b>209</b>	<b>37</b>
<b>15</b>	<b>158</b>	<b>326</b>	<b>63</b>
<b>16</b>	<b>158</b>	<b>105</b>	<b>30</b>
<b>17</b>	<b>168</b>	<b>393</b>	<b>67</b>
<b>18</b>	<b>168</b>	<b>276</b>	<b>53</b>

Los resultados de la prueba de valor ORAC, arrojaron resultados muy similares exceptuando las muestras #1, #5 y #6 en las cuales sobresalen del resto debido a su alto contenido en fenólicos el cual casi en su mayoría es el responsable de los valores obtenidos, siendo la muestra 6 la de mayor capacidad antioxidante y la muestra #16 la que presentó menor actividad. Los resultados se presentan en equivalentes de Trolox, por otra parte en el ensayo de Folin-Ciocalteu las muestras presentaron ser más homogéneas por debajo de los 400 metros sobre el nivel del mar.

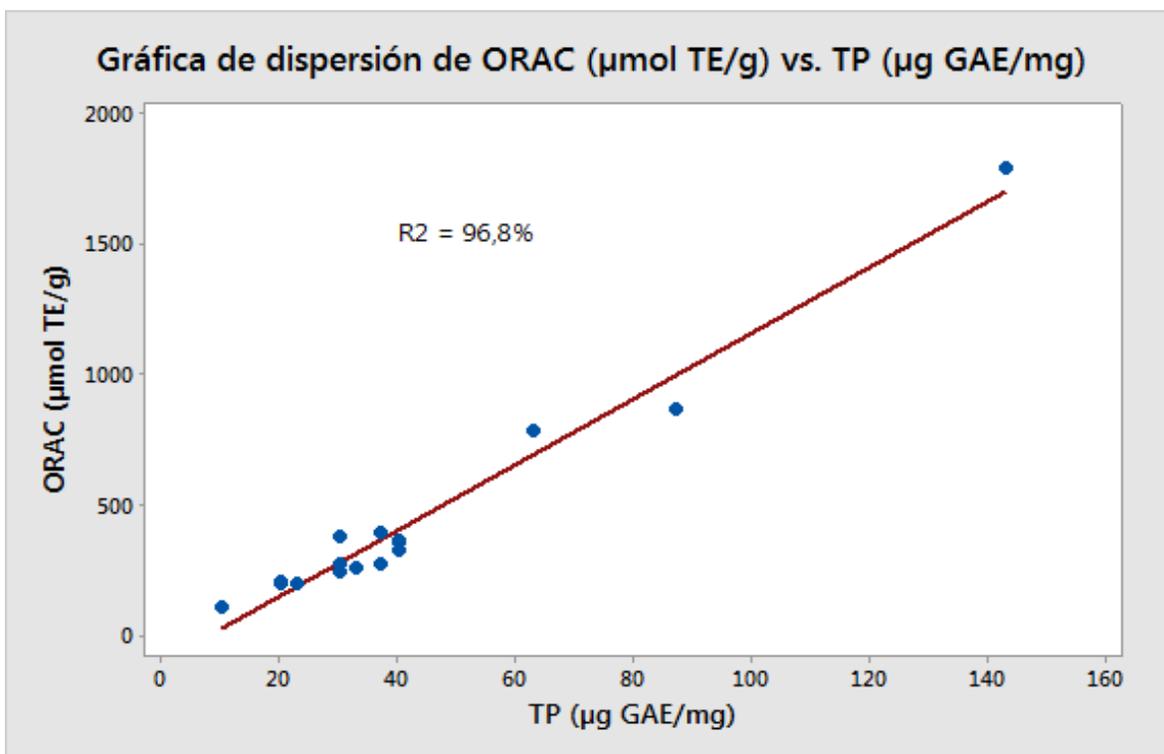


Figura 6. Resultados de la prueba de correlación entre las variables de Valor ORAC Y Fenólicos Totales.

La prueba de correlación (véase figura 6). Se puede apreciar que existe una relación muy alta entre fenólicos totales y capacidad antioxidante, se puede afirmar que casi en su mayoría las muestras, contienen fenólicos o sustancias que brindan esa capacidad antioxidante. Por otra parte el coeficiente de correlación de Pearson entre valor ORAC y fenólicos totales fue de  $r: 0.984$  con un  $p < 0.001$ , lo cual significa una alta correlación entre las variables y con una significancia estadísticamente alta.

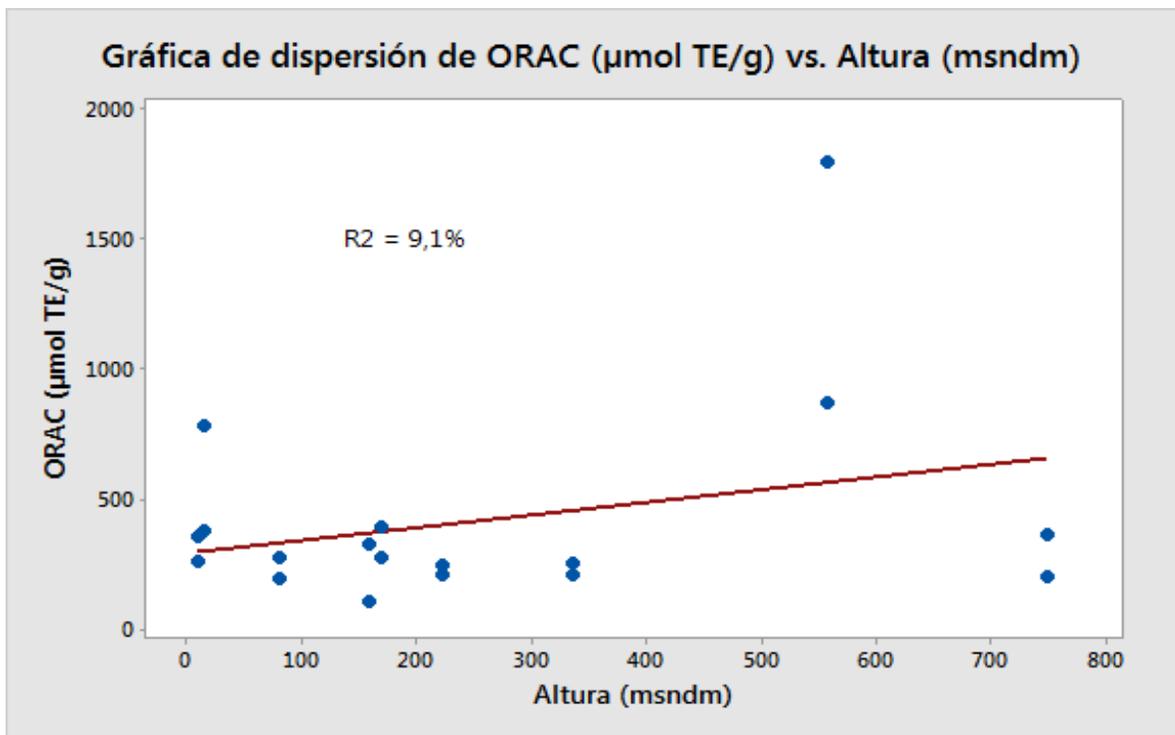


Figura 7. Resultados de la prueba de relación entre las variables de valor ORAC y altura.

Los resultados indican que no existe evidencia significativa (valor p: 9,1%), para relacionar a la variable de capacidad antioxidante con la variable de altura, cabe resaltar que solo el 9,1% de los valores obtenidos en Valor Orac se explica por la altura.

Por otra parte el coeficiente de correlación de Pearson entre ORAC y altura fue de r: 0.302 con un p: 0.224, el cual es bajo y no tiene significancia estadística, lo que a su vez significa que no hay correlación entre estas variables.

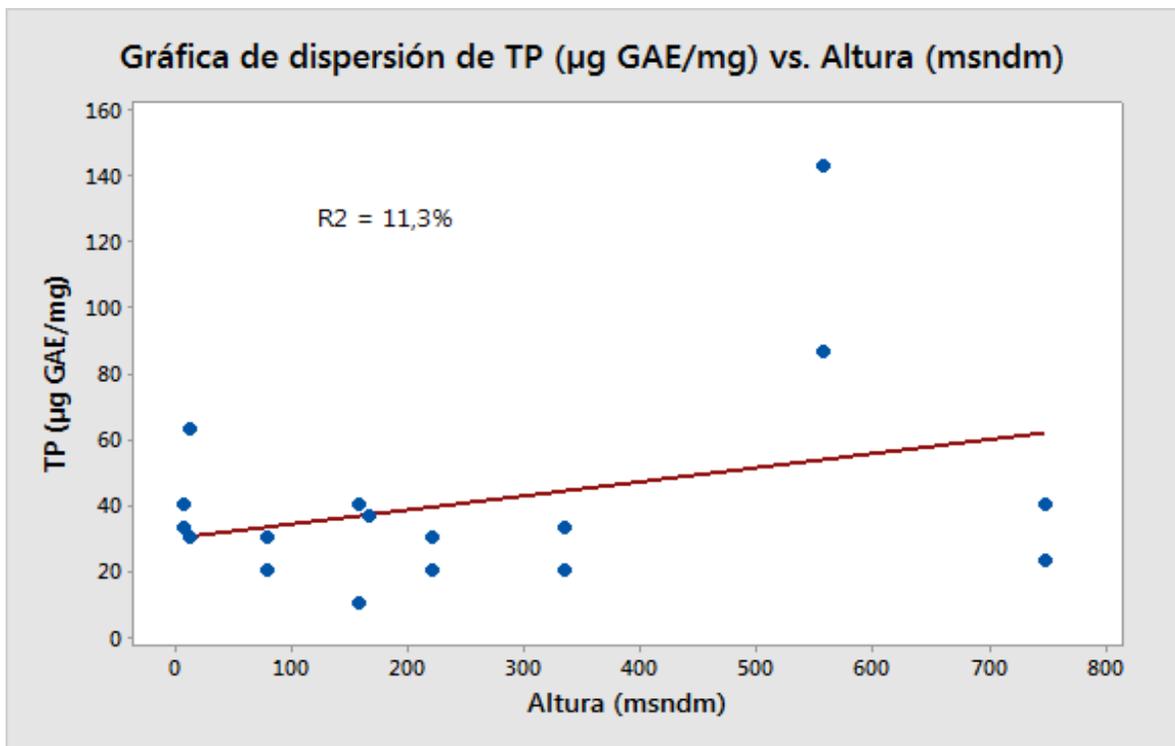


Figura 8. Prueba de relación entre las variables de Fenólicos totales y altura.

El cual muestra un valor de 11,3%, (Véase figura 8). En la cual se puede apreciar que existe una tendencia a formar grupos de valores muy similares por debajo de los 400 metros sobre el nivel del mar, que además se pueden observar en la tabla número 1; los cuales oscilan entre los 10 y 63 en equivalentes de ácido gálico.

Por lo tanto esto responde al tercer objetivo específico y en base a los resultados se puede afirmar que no hay significancia estadística para decir que existe una zona en la cual se producen propóleos con mayor poder antioxidante, la mayoría de las muestras presentan resultados muy parecidos y por encima de los 400 metros sobre el nivel del mar se puede encontrar resultados muy dispersos; por otra parte el coeficiente de Pearson entre las variables de fenólicos totales y altura fue de  $r: 0.336$ ,  $p: 0.173$  el cual es bajo y no tiene significancia estadística, lo que quiere decir que no hay correlación entre estas dos variables.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos del estudio realizado en Serbia, en donde encontraron diferencias significativas entre las muestras colectadas a partir de los 500 metros; más no una formación de grupos.

## 9. Discusión

Por medio de los resultados se puede afirmar que la relación entre Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, ha sido una de las relaciones más altas que se han encontrado en estudios realizados con propóleos a nivel de Costa Rica; La relación entre capacidad antioxidante y altura han mostrado resultados muy bajos, los porcentajes revelan que solamente el 9,1% de la capacidad antioxidante se puede explicar por la altura, lo cual quiere decir que en lo que respecta a estas muestras no se puede afirmar o definir que a mayor altura de colecta los propóleos en el cantón de Nicoya, contienen mayor capacidad antioxidante.

## 10. Conclusiones

Como primer punto cabe resaltar que este estudio es el primero que se realiza en el cantón de Nicoya, por ende se considera que es muy importante mencionar que los resultados obtenidos dan paso a que los productores de la zona puedan sacar provecho y beneficio a las bondades y propiedades de los mismos. Segundo se puede afirmar en base a los resultados que la relación entre compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante mostró un resultado de 96,8%, lo cual quiere decir que hay una alta dependencia entre las variables de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante. Como tercer punto las variables de capacidad antioxidante y altura han presentado resultados muy bajos, los porcentajes muestran que solamente el 9,1% de la capacidad antioxidante se puede explicar por la altura.

Cuarto, se puede asegurar que las muestras colectadas por debajo de los 400 metros sobre el nivel del mar tienden a homogenizarse, es decir son muy parecidas en cuanto a su valor de capacidad antioxidante y por encima de esta altura no hay formación de grupos, es decir las muestras tienden a ser heterogéneas en cuanto a la variable de

capacidad antioxidante. Lo anterior se debe a que la abeja de un mismo apiario puede visitar diferente fuente botánica, lo que se asemeja a los resultados obtenidos por el Master Eduardo Umaña Rojas, en donde se obtuvieron diferentes huellas químicas diferentes para un mismo apiario, lo que refuerza la teoría de que la abeja colecta resinas de más de una fuente botánica y dependiendo del origen botánico, varía su composición química.

Como quinto punto, La mayoría de las muestras excepto las muestras: 1, 5 y 6 no mostraron tener una capacidad antioxidante que se diferencien a las de otras zonas del país, sin embargo al ser tan homogéneas existe un valor agregado el cual permite diferenciarse.

## **11. Recomendaciones**

Como primer aspecto, a base de este trabajo se puede llevar a cabo, un estudio complementario en la época de invierno, debido a que en este momento es cuando las abejas por aspectos biológicos en la naturaleza, se encuentran en búsqueda de resinas; por ende se recomienda que para poder reafirmar los resultados se lleve a cabo, otro trabajo basado en la misma temática. Además se recomienda la época lluviosa debido a que los apicultores en época de verano están muy ocupados con la cosecha de miel y polen, esto puede generar inconvenientes a la hora de la colecta, por lo tanto la mejor etapa para realizar un estudio sobre los propóleos en lo que respecta al cantón de Nicoya es el invierno.

Por otra parte se recomienda utilizar otros métodos de recolección, tales como la malla plástica o el marco colector, existen trabajos a nivel internacional en donde el método de colección influye en la calidad de los propóleos, por ende este estudio deja las puertas abiertas para seguir investigando.

A los apicultores de la zona, se les recomienda que aprovechen las posibilidades que les brinda este estudio, debido a que las muestras resultaron ser muy homogéneas lo que da paso a la estandarización y esto es lo que buscan ya sea empresas que utilizan los propóleos como materia prima o para elaborar productos derivados de la colmena.

## 12. Bibliografía

Andelkovic, B., Vujisic, L., Vuckovic, I., Tesevic, V., Vajs, V., Godevac, D. (2016). Metabolomics study of populus type propolis journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 135 (2017) 217-226.

Benítez Álvarez, J. (2015). *Estudio de la relación entre la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos en propóleos de tetragonisca angustula de Costa Rica* (tesis de maestría inédita). Universidad Nacional, Heredia, CR.

Bogdanov, S. (April 2016) Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science*. Recuperado de: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).

Fearnley, J. (2001). *Bee Propolis, Natural healing from the hive* (p.6). London, GB: Souvenir Press Ltd.

Farré, R., Frassetto, I., Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud *Ars pharmaceutica*, 45(1), 21-43.

Gamboa Pérez, Y. (2011). Determinación de la capacidad antioxidante de propóleos de Costa Rica, de acuerdo al contenido de flavonoide. (Tesis de maestría inédita). Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, CR. (12-16).

Huang D, Ou B, Prior R L. 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric. Food Chem.* (2005 Mar) 23,53(6): 1841-56.

Huayhua, K., Nina, S., (2009). Acción antimicrobiana del própolis de *Apis Mellifera* L. y de *solanum mammosum* L (Teta de vaca) contra microorganismos de la cavidad oral (*streptococcus mutans* y *streptococcus mitis*) *Ciencia y Desarrollo*, 10(1), 11-22.

Lacalle, A., (2017). Propóleo, el “antibiótico” natural de la colmena. *IKERKETAK INVESTIGACIÓN* volumen (85) 57-61 Recuperado de: [www.researchgate.net/profile/Arrate\\_Lacalle/publication/28231320\\_Propoleo\\_el\\_antibi](http://www.researchgate.net/profile/Arrate_Lacalle/publication/28231320_Propoleo_el_antibi)

otico\_natural\_de\_la\_colmena/links/0c96053299dbc40f63000000/Propoleo-el-antibiotico-natural-de-la-colmena.pdf

Martínez, J (2009).”Caracterización Físico-Química y Evaluación de la Actividad Anti fúngica de Propóleos recolectados en el suroeste Antioqueño.” Trabajo de graduación para la facultad de Ciencias Agropecuarias, para optar al grado de Master en Ciencia y Tecnología de alimentos, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Mendes, J., De souza, M., Ramalho, S., Ribeiro, M., Nova, F., (2006). Correlation analysis between phenolic levels of brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities *food chemistry*, 99(2006) ,431-435.

[Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós M, \(1999\). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. 299\(14\), 152-178. doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Sullivan, J., (2014) ¿Que es un bosque seco tropical? (Ed.) *Área de conservación Guanacaste virtual*. Recuperado de [http://www.acguanacaste.ac.cr/bosque\\_seco\\_virtual/introduccion.html](http://www.acguanacaste.ac.cr/bosque_seco_virtual/introduccion.html)

Umaña Rojas, E. (2013). Análisis multivariado de huellas digitales de metabolitos secundarios mayoritarios de propóleos de Costa Rica empleando resonancia magnética nuclear protónica. (Tesis de maestría inédita). Universidad de Costa Rica, ciudad universitaria Rodrigo Facio, CR. (8-17).

Vaculik, P., Cardozo, B., Pérez, S., Rosende, R., & Juárez, R (2011). Aplicaciones de los propóleos en ciencias de la salud *Revista facultad de odontología*, 5(1), 2-5.

Vargas R., Torrescano G., Mendoza A., Vallejo, B., Acedo. , E., Sánchez J,... y Sánchez., A. (2014).Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana de los propóleos *Revista de ciencias biológicas y de la salud* ,16 (1), 32-37.

## 12.1 Bibliografía de imágenes.

Porras, A., López, A., (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Recuperado de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)

Revista *Propóleos* (2011). Composición Propóleo. Recuperado de <http://www.propoleos.es/propoleo/composicion-del-propoleo.html>

Recuperado de <https://www.google.es/intl/es/earth/index.html> (2017).

### 1. Anexos

Tabla 3. Peso en gramos, de los propóleos recolectados en los diferentes apiarios del cantón de Nicoya.

Muestra	Cantidad obtenida A/B	Lugar del apiario	Altitud
1	40 g / 34 g	Quiriman	222 msnm
2	32 g / 56 g	Zaragoza	645 msnm
3	30 g / 38 g	Mansión	80 msnm
4	49 g / 54 g	Juan Díaz	749 msnm
5	60 g / 81 g	Corral de piedra	9 msnm
6	77g / 59 g	Samara	51 msnm
7	63 g / 79 g	Nambí	158 msnm
8	80 g / 88 g	Bosques don José	168 msnm
9	106 g / 86 g	Garcímuñoz	335 msnm
Total	1.112 gramos		

Tabla 4. Pesos exactos de las muestras obtenidas, en la balanza analítica.

Pesos obtenidos en la balanza analítica	
Muestra	Peso (gramos)
1	0.4217
2	0.4045
3	0.4014
4	0.4518
5	0.4318
6	0.4210
7	0.4398
8	0.4183
9	0.4025
10	0.4310
11	0.4511
12	0.5001
13	0.4406
14	0.4090
15	0.4083
16	0.4929
17	0.4439
18	0.4598

Tabla 5. Ubicación por medio de GPS de los apiarios muestreados para el estudio.

<b>Código de muestra</b>	<b>Código de trabajo</b>	<b>Distrito</b>	<b>GPS</b>
FA-1	<b>1</b>	<b>Sámara</b>	<b>N: 09 54'25.0" / O: 085 32'28.5"</b>
FA-2	<b>2</b>	<b>Sámara</b>	<b>N: 09 54'25.0" / O: 085 32'28.5"</b>
FA-3	<b>3</b>	<b>Mansión</b>	<b>N: 10 06'56.52" / O: 85 21'38.72"</b>
FA-4	<b>4</b>	<b>Mansión</b>	<b>N: 10 06'56.52" / O: 85 21'38.72"</b>
FA-5	<b>5</b>	<b>Zaragoza</b>	<b>N: 09 58' 1 4.0" / O: 085 34' 05.8"</b>
FA-6	<b>6</b>	<b>Zaragoza</b>	<b>N: 09 58' 1 4.0" / O: 085 34' 05.8"</b>
FA-7	<b>7</b>	<b>Quiriman</b>	<b>N: 10 07'08.64" / O: 85 29'59.59"</b>
FA-8	<b>8</b>	<b>Quiriman</b>	<b>N: 10 07'08.64" / O: 85 29'59.59"</b>
FA-9	<b>9</b>	<b>Juan Díaz</b>	<b>N: 10 09' 54.72" / O: 85 32'36.28"</b>
FA-10	<b>10</b>	<b>Juan Díaz</b>	<b>N: 10 09' 54.72" / O: 85 32'36.28"</b>
FA-11	<b>11</b>	<b>Corral de piedra</b>	<b>N: 10 14'15.19" / O: 85 19'54.81"</b>
FA-12	<b>12</b>	<b>Corral de piedra</b>	<b>N: 10 14'15.19" / O: 85 19'54.81"</b>
FA-13	<b>13</b>	<b>Garcímuñoz</b>	<b>N: 10 06'09.72" / O: 85 32' 31.83"</b>
FA-14	<b>14</b>	<b>Garcímuñoz</b>	<b>N: 10 06'09.72" / O: 85 32' 31.83"</b>
FA-15	<b>15</b>	<b>Nambí</b>	<b>N: 10 12' 52.46" / O: 85 30' 53.88"</b>
FA-16	<b>16</b>	<b>Nambí</b>	<b>N: 10 12' 52.46" / O: 85 30' 53.88"</b>
FA-17	<b>17</b>	<b>Bosques don José</b>	<b>N: 10 10'57.71" / O: 85 27' 50.67"</b>
FA-18	<b>18</b>	<b>Bosques don José</b>	<b>N: 10 10'57.71" / O: 85 27' 50.67"</b>

Tabla 6. Datos obtenidos en gramos de los viales vacíos, y viales más extracto para obtener rendimientos.

<b>Número de Vial</b>	<b>Peso de Vial Vacío (gramos)</b>	<b>Peso de vial más extracto (gramos)</b>
<b>1</b>	<b>22,7456</b>	<b>22,7511</b>
<b>2</b>	<b>22,9476</b>	<b>22,9507</b>
<b>3</b>	<b>22,9918</b>	<b>22,9954</b>
<b>4</b>	<b>22,4582</b>	<b>22,4635</b>
<b>5</b>	<b>22,9486</b>	<b>22,9529</b>
<b>6</b>	<b>23,1271</b>	<b>23,1336</b>
<b>7</b>	<b>22,9491</b>	<b>22,9573</b>
<b>8</b>	<b>22,4681</b>	<b>22,4722</b>
<b>9</b>	<b>23,0431</b>	<b>23,0482</b>
<b>10</b>	<b>23,0432</b>	<b>23,0497</b>
<b>11</b>	<b>22,4376</b>	<b>22,4438</b>
<b>12</b>	<b>22,5963</b>	<b>22,6032</b>
<b>13</b>	<b>23,2478</b>	<b>23,2534</b>
<b>14</b>	<b>23,1105</b>	<b>23,1153</b>
<b>15</b>	<b>23,0628</b>	<b>23,0676</b>
<b>16</b>	<b>23,0931</b>	<b>23,0986</b>
<b>17</b>	<b>23,1036</b>	<b>23,1115</b>
<b>18</b>	<b>23,0313</b>	<b>23,0386</b>