

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Perfil fitoquímico de subproductos apícolas de abejas alimentadas por el arbusto Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*)

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica.

Autoras:

Evelyn Alexandra Sari Uguña

CI: 015008417-6

Correo electrónico: eve.sari19997@gmail.com

Karol del Rosario Zúñiga Durazno

CI: 115032991-8

Correo electrónico: karolzunigad@gmail.com

Tutor:

Ing. David Enrique Vanegas Jácome

CI: 010404605-7

Cuenca, Ecuador

14-octubre-2022

Resumen:

Introducción: En Ecuador el sector apícola ha presentado un gran auge en los últimos años, sin embargo, la escasa información sobre las fuentes apícolas de la vegetación nativa del país, así como la falta de regulación sobre la calidad de productos apícolas diferentes a la miel, han limitado el desarrollo de esta industria.

Objetivo: Asociar el perfil fitoquímico de la planta Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*) con los productos apícolas generados en la parroquia El Valle-Cuenca, Azuay.

Metodología: Se realizó un estudio experimental, con muestras vegetales (hojas y flores) y muestras de productos apícolas (miel y propóleo) de productores de la zona de El Valle-Cuenca. Se realizaron extracciones por percolación con solventes polares y apolares de la planta, miel y propóleo. En los extractos se realizaron ensayos de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, cuantificación de carotenoides y detección de metabolitos mediante TLC. Posteriormente se compararon los metabolitos secundarios de las flores y hojas obtenidos mediante extracción polar y apolar, y se estimó los metabolitos secundarios de la planta presentes en los productos apícolas.

Resultados y discusión: El arbusto Cótag posee compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos en gran cantidad, mientras que la miel y el propóleo presentan polifenoles en concentraciones inferiores a las encontradas en la planta. A pesar de eso, la miel y el propóleo podrían ser considerados como productos nutracéuticos.

Conclusión: La planta Cótag fue una fuente importante de ácidos fenólicos, mismos que son aportados a la miel y el propóleo producido por las abejas de la zona de “El Valle”, por lo que se podría considerar a estos productos de colmena como posibles nutracéuticos.

Palabras claves: *Ferreyranthus verbascifolius*. Miel. Propóleo. TLC. Folin-Ciocalteu. Carotenoides.

Abstract:

Introduction: In Ecuador the beekeeping sector has presented a big boom in recent years. However, the scarce information available on the beekeeping sources of native vegetation in our country, as well as the lack of regulation on the quality of beekeeping products other than honey, have limited the development of this industry. **Objective:** The present project seeks to associate the phytochemical profile of the "Cótag" plant (*Ferreyranthus verbascifolius*) with the bee products generated in the parish of El Valle-Cuenca, Azuay. **Methodology:** An experimental study was carried out with plant samples of the aerial part (leaves and flowers) of Cótag (*F. verbascifolius*) and samples of bee products (honey and propolis) from producers in the area of El Valle-Cuenca. Methanolic, chloroformic, and supercritical fluids (FSC) extractions were performed on the plant. Honey was extracted with ethyl acetate, and propolis was extracted with hexane. The extracts were tested for total polyphenol content by Folin-Ciocalteu, carotenoid quantification, and metabolite detection by TLC. Subsequently, the secondary metabolites of flowers and leaves, obtained by polar and apolar extraction, were compared, and the secondary metabolites of *F. verbascifolius* present in the bee products were estimated. **Results and discussion:** We found that the Cótag shrub (*F. verbascifolius*) possesses phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids in large quantities, while honey and propolis did it with polyphenols, although in lower concentrations than those found in the plant. Nevertheless, honey and propolis can be considered nutraceutical products. **Conclusion:** "Cótag" plant was an important source of phenolic acids. These compounds are transferred to honey and propolis produced by bees in the area of "El Valle", so these bee's products could be considered as potential nutraceuticals.

Keywords: *Ferreyranthus verbascifolius*. Honey. Propolis. TLC. Folin-Ciocalteu. Carotenoids.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Antecedentes	18
1.2 Planteamiento del Problema	19
1.3 Objetivo General	20
1.4 Objetivos Específicos	20
1.5 Justificación del Trabajo	20
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	22
2.1 Cótag (<i>Ferreyranthus verbascifolius</i>)	22
2.1.1 Características Botánicas.....	22
2.2.2 Distribución Ecológica	22
2.2 Productos Apícolas	23
2.2.1 Miel de Abeja.....	23
2.2.1.1 Características Generales	23
2.2.1.2 Características Organolépticas	23
2.2.1.3 Humedad.....	23
2.2.1.4 Composición Química	24
2.2.1.5 Propiedades de la Miel.....	25
2.2.2 Propóleo	26
2.2.2.1 Características Generales	26
2.2.2.2 Características Organolépticas	27
2.2.2.3 Composición Química	27
2.2.2.4 Propiedades Biológicas	28
2.3 Metabolitos con Actividad Biológica	28
2.3.1 Ácidos Fenólicos	28
2.3.2 Polifenoles.....	30
2.3.3 Flavonoides	31
2.3.4 Cumarinas	32
2.3.5 Alcaloides	33
2.3.6 Carotenoides	34
3. CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	36
3.1 Diseño de Estudio	36
3.2 Área de estudio y muestreo	36

3.2.1 Georreferenciación de los Sitios de Muestreo.....	36
3.2.2 Muestras.....	36
3.2.2.1 Vegetales	36
3.2.2.2 Productos Apícolas	37
3.3 Operaciones Preanalíticas	37
3.3.1 Muestras Vegetales.....	37
3.3.1.1 Operaciones Pre-extractivas	37
3.3.1.2 Extracción.....	37
3.3.1.2.1 Percolación.....	37
3.3.1.2.2 Liofilización	38
3.3.2 Productos Apícolas	38
3.3.2.1 Preparación de los Extractos Polares y Apolares de la Miel de Abeja	38
3.3.2.2 Preparación de los Extractos Polares y Apolares del Propóleo.....	38
3.4 Operaciones Analíticas	39
3.4.1 Análisis Mediante Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatographic o TLC)	39
3.4.1.1 Preparación de las Soluciones Vegetales y de Origen Apícola.....	39
3.4.1.2 Preparación de las Placas para TLC.....	39
3.4.1.3 Aplicación de las Muestras y Patrones.....	39
3.4.1.4 Elución Sobre la Placa	39
3.4.1.5 Revelado Post-cromatográfico	39
3.4.2 Cuantificación de Polifenoles y Carotenoides por Métodos Espectrofotométricos.....	41
3.4.2.1 Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu	41
3.4.2.2 Cuantificación de Carotenoides Mediante Técnica de Microplacas y Lector de ELISA	42
3.5 Análisis Estadísticos.....	42
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1.1 Identificación de Ácidos Fenólicos Mediante TLC	44
4.1.2 Identificación de Flavonoides Mediante TLC.....	46
4.1.3 Identificación de Ceras y Resinas Mediante TLC.....	47
4.1.4 Identificación de Cumarinas por TLC	48
4.1.5 Identificación de Alcaloides por TLC	48

4.2 Cuantificación de Polifenoles y Carotenoides por Métodos Espectrofotométricos	49
4.2.1 Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu ..	49
4.2.2 Cuantificación de Carotenoides Mediante Técnica de Microplacas y Lector de ELISA	58
4.2.2.1 Muestras vegetales	59
4.2.2.2 Productos Apícolas	64
4.3 Propiedades Nutraceuticas	66
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
5.1 Conclusiones.....	68
5.2 Recomendaciones.....	69

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Evelyn Alexandra Sari Uguña, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Perfil fitoquímico de subproductos apícolas de abejas alimentadas por el arbusto Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*)**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 14 de Octubre de 2022



Evelyn Alexandra Sari Uguña

C.I.: 0150084176

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Karol del Rosario Zúñiga Durazno, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Perfil fitoquímico de subproductos apícolas de abejas alimentadas por el arbusto Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*)**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 14 de Octubre de 2022



Karol del Rosario Zúñiga Durazno

C.I.: 1150329918

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Evelyn Alexandra Sari Uguña, autora del trabajo de titulación "**Perfil fitoquímico de subproductos apícolas de abejas alimentadas por el arbusto Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*)**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 14 de Octubre de 2022



Evelyn Alexandra Sari Uguña

C.I.: 0150084176

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Karol del Rosario Zúñiga Durazno, autora del trabajo de titulación "**Perfil fitoquímico de subproductos apícolas de abejas alimentadas por el arbusto Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*)**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 14 de Octubre de 2022



Karol del Rosario Zúñiga Durazno

C.I.: 1150329918

DEDICATORIA

A toda mi familia, por cuidarme y apoyarme durante mi preparación profesional. En especial a mi mamá Luz y mi hermana Ruth por ser un pilar fundamental en la elaboración de este trabajo.

Evelyn S.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres, cuyo amor y apoyo incondicional hicieron posible la culminación de esta importante etapa en mi vida.

Y de manera especial, a mi persona, por no rendirme a pesar de las dificultades y malos momentos a lo largo de la carrera, los mismos que me ayudaron a crecer personal y profesionalmente.

Karol Z.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de Titulación realizado en la Universidad de Cuenca es un esfuerzo en el cual participaron distintas personas, a quienes deseamos agradecer en este apartado.

En primer lugar, a nuestras familias, que con todo su amor nos incentivaron a continuar a pesar de las dificultades en nuestra formación académica y personal, confiando y apoyándonos en las decisiones que tomamos.

Al Ing. David Vanegas y al Dr. Fabián León, por brindarnos su conocimiento y ser nuestros guías en este proyecto.

Un agradecimiento especial a las doctoras Jéssica Calle y Salomé Zea, por abrirnos las puertas del Laboratorio de Investigación de Biociencias y ser una luz en el desarrollo de nuestra tesis, facilitándonos su ayuda mientras realizábamos los análisis de laboratorio. Y por ser personas que nos han enseñado mucho en el poco tiempo que hemos trabajado juntas.

Y queremos extender un agradecimiento sincero a la Asociación de Pequeños Ganaderos San Judas Tadeo de la parroquia “El Valle”, quienes nos acogieron desde el primer día que socializamos el proyecto y formaron parte del mismo.

Y finalmente, gracias a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han influido en nuestras vidas y nos han enseñado valiosas lecciones, como que “*Ser débil significa que hay espacio para crecer*” -H.S.

Atentamente,

Las autoras.

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius.

µL: microlitros.

A. cafeico: ácido cafeico.

A. clorog.: ácido clorogénico.

A. gálico: ácido gálico.

a.C.: años antes de Cristo.

ABA: fitohormonas ácido abscísico.

ANOVA: análisis de la varianza.

bar: bar (unidad de presión).

CAPE: éster fenílico del ácido cafeico.

Cl. Berb.: cloruro de berberine.

Cl. Harm.: cloruro de harmaline.

cm: centímetros.

DMAE: degeneración macular asociada a la edad.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

Escop.: escopoletina.

g: gramos.

h: horas.

Isohar.: isorhamnetin.

Kaemp. 3-gluco.: Kaempferol 3-glucorónido.

km: kilómetros.

KOH: hidróxido de potasio.

Luteol.: luteolina.

m: metros.

UCUENCA

M1: miel recolectada dentro del punto A (miel 1).

M1AE: miel 1 en acetato de etilo.

M1M: miel 1 en metanol.

M2: miel recolectada dentro del punto B (miel 2).

M2AE: miel 2 en acetato de etilo.

M2M: miel 2 en metanol.

M3: miel recolectada dentro del punto B (miel 3).

M3AE: miel 3 en acetato de etilo.

M3M: miel 3 en metanol.

mbar: milibar.

MC: miel comercial.

MCAE: miel comercial en acetato de etilo.

MCM: miel comercial en metanol.

mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico.

mg: miligramos.

min: minutos.

mL: mililitros.

mm: milímetros.

mM: milimolar.

msnm: metros sobre el nivel del mar.

nm: nanómetros.

P1: propóleo recolectado dentro del punto A (propóleo 1).

P1H: propóleo 1 en hexano.

P1M: propóleo 1 en metanol.

P2: propóleo recolectado dentro del punto B (propóleo 2).

P2H: propóleo 2 en hexano.

UCUENCA

P2M: propóleo 2 en metanol.

P3: propóleo recolectado dentro del punto B (propóleo 3).

P3H: propóleo 3 en hexano.

P3M: propóleo 3 en metanol.

PA: planta A.

PA:C=planta A en cloroformo.

PAC: planta A en cloroformo.

PAFSC: planta A en fluidos supercríticos.

PAM: planta A en metanol.

PB: planta B.

PB:C=planta B en cloroformo.

PBC: planta B en cloroformo.

PBFSC: planta B en fluidos supercríticos.

PBM: planta B en metanol.

PC: planta control.

PC:C= planta control en cloroformo.

PCC: planta control en cloroformo.

PCFSC: planta control en fluidos supercríticos.

PCM: planta control en metanol.

pH: potencial de hidrógeno.

PN: revelador de productos naturales.

Querc. 3-gluco.: quercetina 3-glucorónido.

Rev.: revelador.

Rf: relación de frente o factor de retención.

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundos.

UCUENCA

SL: estrigolactonas.

THF: tetrahidrofurano.

TLC: Cromatografía en Capa Fina (**Thin Layer Chromatographic**)

Umbelif.: umbeliferona.

Vainillina I: vainillina 1% en etanol.

Vainillina II: H₂SO₄ 2% en etanol.

λ: longitud de onda.

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La apicultura constituye una actividad de micro emprendimiento que genera empleos y brinda beneficios para la conservación, protección y mejoramiento del medio ambiente. Se encuentra presente en casi todas las regiones del mundo, permitiendo una estrecha relación entre el hombre y la abeja (Garry, Parada & Salido, 2017). Según la Real Academia Española (s.f.) la apicultura constituye un conjunto de técnicas y conocimientos relativos a la cría de las abejas. Dentro de los diferentes productos que nos brinda esta actividad encontramos: miel, propóleo, cera, jalea real, polen y apitoxina, los cuales pueden tener diversos fines, desde un uso alimenticio y nutracéutico, hasta su empleo en el área de la medicina y cosmetología (Granoble, Ávila & Mora, 2022).

La miel es el producto apícola más conocido y el cual ha conservado su estatus especial durante varios milenios. Consiste en una sustancia natural y dulce producida por las abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores y de las secreciones de las partes vivas de la planta, o a partir de algunos insectos que se alimentan de estas partes. Los componentes de la miel son relativamente diferentes y dependen principalmente de la fuente floral, no obstante influyen algunos factores externos, como los estacionales y ambientales, al igual que el método de procesamiento (Akbari, Baigabaei & Shahidi, 2020).

Además de la miel, otros subproductos como la cera y jalea real son resultado del metabolismo de las abejas, mientras que el polen es un producto natural generado en la recolección durante la temporada de floración, y el cual es llevado a la colmena por su adhesión al cuerpo de las abejas, generalmente en sus patas. Por otro lado, el propóleo consiste en una mezcla tanto de resinas de diferentes plantas, como de cera proveniente de las propias abejas (Paredes & Parrales, 2020). Su origen se suele determinar mediante un análisis químico comparativo del propóleo y de la resina de la fuente botánica. Algunos investigadores utilizan el análisis del polen para determinar el origen botánico del propóleo, sin embargo, este método no suele ser aceptable, puesto que el polen recogido por las abejas para sus necesidades nutricionales puede mezclarse con el propóleo dentro de la colmena (Bogdanov & Bankova, 2016).

En Ecuador, fueron los indígenas quienes iniciaron la actividad apícola dentro del país en una escala pequeña. No es sino hasta el siglo XIX que se da un auge gracias a misioneros que iniciaron la actividad en conventos de la ciudad de Cuenca, siendo este lugar uno de los primeros en consolidar la apicultura como una actividad económica, gracias al mayor conocimiento y promoción del consumo de la miel como un endulzante natural con grandes beneficios para la salud. Posteriormente, otras

ciudades como Guayaquil, Quito, Manabí y Loja se unieron a la producción, siendo de las primeras ciudades en establecer apiarios privados (Rosillo, Vivanco, Reyes &Rodriguez, 2020).

Actualmente, la región Sierra es la más importante en cuanto a producción apícola, sobre todo gracias a la amplia flora melífera de la cual se han reportado 197 especies, la mayoría de ellas nativas. Las principales familias con especies apícolas, en orden decreciente, corresponden a la Asteraceae (42), Fabaceae (16), Solanaceae(12), Lamiaceae (8) y Myrtaceae (8) (Cabrera, 2012). En cuanto al resto de regiones, la producción apícola de la Costa corresponde al 23 % del total, mientras que el Oriente representa solamente el 7 %. Dentro de los diferentes subproductos apícolas, la miel ocupa el primer lugar en representatividad con un 85 %, seguida del propóleo en un 6 %, cera de abeja en un 5 %, polen en un 3 % y jalea real 1 % (Rosillo et al., 2020).

1. 2 Planteamiento del Problema

La apicultura en el Ecuador, a pesar de ser una actividad practicada desde la época colonial, no ha sido debidamente considerada ni desarrollada como un sector generador de ingresos, sino que se ha destinado al autoconsumo (Rosillo et al., 2020). La falta de apoyo por parte del estado, poca intervención de los apicultores y la elevada tasa de deforestación (94.353 hectáreas por año (FAO, 2015)), son factores que han influido significativamente para que no se explote su máximo potencial (Vásconez, 2017). De hecho, se ha llegado a la necesidad de importar mieles de países como Argentina, Chile y hasta China, con el fin de suplir la demanda interna de este producto. Y sumado a esto, la comercialización de mieles adulteradas con glucosa de maíz y vendidas como miel 100 % de abeja, inclusive de marcas con registro sanitario, ha tenido un impacto negativo en el desarrollo y aceptación de los productos apícolas por parte de los consumidores (Cabrera, 2012).

En los últimos años, el Gobierno Central del Ecuador, a través del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) ha buscado impulsar el potencial apícola del país a través del Programa Nacional del Desarrollo de la Apicultura (PRONAPIS), con el fin de aumentar el ingreso económico de los productores y la conservación del medio ambiente, mediante el proceso de polinización que llevan a cabo las abejas (Ministerio de Agricultura y Ganadería, s.f.). Para obtener un certificado como apicultor por parte de MAG, se requiere un mínimo de 3 años de experiencia con conocimientos sobre tecnificación, control de enfermedades y manejo de colmenas, así como la aplicación de buenas prácticas apícolas. Sin embargo, la mayoría de los apicultores del país (aproximadamente 98 %) practica la apicultura como un pasatiempo. Por tal motivo resulta necesario el fortalecer las capacidades productivas mediante capacitaciones, desarrollo organizacional, alianzas, comunicación y educación, que conlleven a que los productores vean a la apicultura como una fuente económica sustentable y sostenible.

Otro factor importante a tener en cuenta es la flora melífera del país, en virtud de que la mayoría de la producción a pequeña escala se realiza en la región Sierra, que es el lugar con las mejores características ambientales y geológicas para el crecimiento de millares de plantas nectaríferas y poliníferas. Paralelamente, del total de las explotaciones apícolas, alrededor de un 10 % se ubica en zonas urbanas, mientras que el 90 % lo realiza en zonas rurales propicias para esta actividad (Rosillo et al., 2020). No obstante, a pesar del potencial que presenta nuestra flora autóctona, el 90 % de la producción procede de especies introducidas como el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), el trébol (*Trifolium repens*), el laurel (*Laurus nobilis*), el manzano (*Malus domestica*), entre otras (Cabrera, 2012). En consecuencia, se estaría desperdiciando una amplia variedad de especies melíferas nativas, como el Cótág (*Ferreyranthus verbascifolius*); debido tanto a la falta de estudios sobre el perfil fitoquímico de especies vegetales endémicas con potencial melífero, como a la falta de divulgación de la poca información disponible y del impacto que tiene esta sobre la producción apícola.

Es por eso que, dentro del país, surge la necesidad de ampliar el conocimiento disponible, tanto sobre el potencial de los diferentes productos apícolas, como de la flora melífera autóctona a partir de la cual se los obtiene, como un instrumento de diferenciación y valoración en su producción y comercialización.

1.3 Objetivo General

Asociar el perfil fitoquímico de la planta Cótág (*Ferreyranthus verbascifolius*) con los productos apícolas generados en la parroquia El Valle-Cuenca, Azuay.

1.4 Objetivos Específicos

- Comparar los metabolitos secundarios de las flores y hojas de *Ferreyranthus verbascifolius* obtenidos mediante extracción polar y apolar.
- Estimar los metabolitos secundarios de *F. verbascifolius* presentes en los productos apícolas, aplicando estrategias cromatográficas y espectrofotométricas.
- Asociar la composición de fitocompuestos de *F. verbascifolius* con las posibles propiedades nutraceuticas de los productos apícolas.

1.5 Justificación del Trabajo

Ecuador es un país que cuenta con un gran potencial apícola, tanto por la diversidad de sus especies florales, como por sus características ambientales y geográficas. Esto permite que sus productos cuenten con características particulares y apreciadas por los consumidores locales, los cuales buscan sobre todo un producto de calidad garantizada (Granoble et al., 2022). Puesto que la composición química de la miel y el propóleo, y en consecuencia sus propiedades, se ve determinada por su origen botánico, resulta de especial relevancia el contar con información pertinente sobre

flora melífera de la región de producción. Sin embargo, en el Ecuador es muy poca la información disponible sobre plantas útiles para las abejas, a excepción de las especies introducidas y más comunes. Es por esto que se tiene la imperiosa necesidad de generar nuevo conocimiento en cuanto a especies vegetales con potencial apícola, sobre todo de las plantas endémicas, como el Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*), un arbusto asiduamente visitado por las abejas de la zona de “El Valle”, cantón Cuenca, provincia del Azuay y del cual no se tiene ningún tipo de información, aparte de la taxonómica, con la cual poder correlacionar su composición con la de los productos obtenidos de las abejas que lo frecuentan.

En la miel y el propóleo los polifenoles son los principales componentes bioactivos. Por lo que su determinación en estas fuentes naturales resulta relevante (García et al., 2022). Los compuestos bioactivos dietéticos de diferentes alimentos funcionales pueden mejorar o incluso prevenir enfermedades, razón por la cual los nutracéuticos constituyen una gran promesa para mejorar la salud y prevenir enfermedades crónicas relacionadas con el envejecimiento (Ferrari, 2004). Además de dilucidar la composición y relación entre la planta y el producto apícola, la información generada permitirá a los productores conocer y garantizar las propiedades nutracéuticas y autenticidad de su producto, con una proyección a futuro para la posibilidad de obtener una denominación de origen, generando así un valor agregado y expandiendo sus posibilidades en el mercado local, regional y nacional (García, 2018).

2.CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cótag (*Ferreyranthus verbascifolius*)

2.1.1 Características Botánicas

La especie botánica *Ferreyranthus verbascifolius* (Fig.1), comúnmente conocida como “Cótag”, es un arbusto de 2 a 6 m de alto perteneciente a la familia *Asteraceae*. Presenta una ramificación abierta con ramitas cuadrangulares, nudos visibles y entrenudos de 3 a 6 cm de largo, cuyos tallos poseen una superficie pubescente blanca característica. Sus hojas, de haz bulloso y envés blanco tomentoso-pubescente, son simples opuestas de bases fusionadas en una vaina de 1 cm de largo, lámina ovada de 6 a 20 cm de largo por 3 a 9 cm de ancho con borde serrulado y ápice que puede variar de agudo a estrechamente redondeado. En cuanto a sus flores, poseen una corola amarilla y se encuentran reunidas en una panícula terminal de 10 a 30 cm de largo, compuesta por cabezuelas de 6 a 8 mm de alto. Su involucreo es ampliamente campanulado y formado por cinco series de brácteas. Por lo general presenta de 10 a 12 flósculos radiales con un largo de 4 mm, mientras que los flósculos centrales lo hacen de 10 a 25 y poseen un largo de 5 mm. Su fruto se encuentra como una cipsela de 1,5 a 2 mm de largo provista de papus o vilanos de 3 a 4 mm de largo (Minga & Verdugo, 2016).

2.2.2 Distribución Ecológica

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en bosques andinos del sur del Ecuador y norte del Perú entre los 1000 y 3500 msnm de altitud. Puede crecer tanto en pendientes como barrancos puesto que se adapta bien a los terrenos secos y pedregosos. Dado que es un arbusto pionero con alta producción de hojarasca se lo recomienda en labores de conservación y recuperación de suelos degradados, además del uso tradicional para producción de leña que se le han atribuido a sus ramas y tallos. Por otro lado, sus flores son visitadas por abejas con mucha frecuencia, a raíz de lo cual se le ha atribuido también un uso apícola (Minga & Verdugo, 2016).



Figura 1. Arbusto Cótag (*F. verbascifolius*) (Minga, 2017).

2.2 Productos Apícolas

Las abejas, mediante la polinización, desempeñan un papel vital para la reproducción de las especies vegetales y mantenimiento del ecosistema, y a la vez, obtienen de las plantas sus principales fuentes de alimento: el néctar, la materia prima para la producción de miel y fuente de energía para los individuos, y el polen, cuya función principal es satisfacer la demanda proteínica de las abejas en estado larval. Del mismo modo, obtienen las resinas y gomas necesarias para la elaboración de propóleos, material importante para la construcción y desinfección de nidos, así como las cavidades para el establecimiento de estos en estado natural (Miranda, Palmera & Seúlveda, 2014).

2.2.1 Miel de Abeja

2.2.1.1 Características Generales

La miel es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* o por diferentes subespecies, a partir del néctar de las flores o de otras secreciones extra florales que las abejas liban, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en panales (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz & Rosas, 2010).

Es un alimento rico en carbohidratos, minerales, vitaminas, razón por la cual se lo considera como un excelente suplemento nutricional que aporta energía, refuerza el organismo, ayuda a prevenir algunas enfermedades y forma parte de una alimentación más saludable (Ulloa et al., 2010).

2.2.1.2 Características Organolépticas

El aroma de la miel, color y sabor dependen de su origen botánico. Generalmente la miel con un alto contenido de fructosa es más dulce que una miel con una alta concentración de glucosa, mientras que el aroma dependerá en gran medida de los ácidos y aminoácidos presentes. El color de la miel varía desde extra clara, pasando por tonos ámbar y llegando a ser casi negra, algunas con luminosidad amarilla típica, verdosa o tono rojizo, y se relaciona con el contenido de minerales, polen y compuestos fenólicos. Las mieles oscuras tienen un alto contenido de fenoles y consecuentemente una alta capacidad antioxidante (Satarupa & Subha, 2014; Ulloa et al., 2010).

La composición de la miel depende de diversos factores tales como la contribución de la planta, suelo, clima y condiciones ambientales, principalmente (Ulloa et al., 2010).

2.2.1.3 Humedad

El contenido de humedad es una de las características más importantes de la miel y se encuentra en función de ciertos factores tales como los ambientes y del contenido de humedad del néctar. La miel madura tiene normalmente un

contenido de humedad por debajo del 18,5 % y cuando se excede de este nivel es susceptible a fermentar, particularmente cuando la cantidad de levaduras osmofílicas es suficientemente alta. Además, el contenido de agua en la miel influye en su viscosidad, peso específico y color (Lobos & Currián, 2021).

2.2.1.4 Composición Química

• Carbohidratos.

Constituyen el principal componente de la miel, siendo los principales los monosacáridos fructosa y glucosa. Estos azúcares simples representan el 85 % de sus sólidos, ya que la miel es esencialmente una solución altamente concentrada de azúcares en agua. Además, puede contener entre 25 azúcares complejos, pero algunos de ellos están presentes en niveles muy bajos y todos están formados por la unión de la fructosa y glucosa en diferentes combinaciones (Miranda et al., 2014).

• Proteínas

Aproximadamente un 0,5 % de la miel son proteínas, principalmente enzimas y aminoácidos, los que a su vez son el reflejo del contenido de nitrógeno, el cual es variable y no supera el 0,04 %. Entre el 40-80 % del nitrógeno total de la miel es proteína. Se han identificado cerca de 20 proteínas no enzimáticas, muchas de las cuales son comunes en distintas mieles y cuyo origen puede deberse a las abejas mismas o al néctar de la planta. Los ácidos conforman otro 0,5 % de la miel, siendo los ácidos orgánicos los responsables de su bajo pH (3.5-5.5) y de la excelente estabilidad de la misma. Contiene varios ácidos orgánicos, siendo el predominante el ácido glucónico, el cual se origina de la glucosa a través de la acción de la glucosa oxidasa añadida por las abejas. El efecto combinado de su acidez y el peróxido de hidrógeno ayudan a la conservación del néctar y la miel. Otros ácidos orgánicos contenidos en menor proporción son: el fórmico, acético, butírico, láctico, oxálico, succínico, tartárico, maleico, pirúvico, piroglutámico, α -cetoglutámico, glicólico, cítrico y málico (Satarupa & Subha, 2014; Ulloa et al., 2010).

• Vitaminas y Minerales

La cantidad de vitaminas presentes en la miel es variable y dependiente de la cantidad de polen, se ha encontrado sobre todo vitaminas del complejo B, vitamina C y vitamina K, además de la presencia de otros compuestos como folatos, ácido fólico y biotina. En cuanto a sus minerales, predomina el potasio, sodio y calcio, y en menor proporción se encuentra el hierro, cobre, fósforo, zinc, entre otros (García-Chaviano et al., 2022; Jiménez, 2016).

• Enzimas

Son las responsables tanto de la complejidad, como de la maduración de la miel a partir del néctar. Dentro de las enzimas que juegan un papel principal en este producto podemos encontrar:

- α -Glucosidasa: encargada de convertir la glucosa en gluconolactona.
- Invertasa: convierte la sacarosa en glucosa y fructosa.
- Diastasa: convierte el almidón en dextrinas y es empleada como indicador de aplicación de calor.
- Catalasa: descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno.
- Fosfatasa: descompone glicerofosfatos.

(Jiménez, 2016).

Tabla 1. *Composición química de la miel.*

Compuesto	Cantidad presente en miel
Glúcidos	95-99 %
Proteínas	0,04 %-0,26 %
Minerales	0,1-0,2 % (potasio, calcio, sodio, magnesio, silicio, hierro, fósforo, etc.)
Oligoelementos	Zinc, molibdeno, yodo.
Vitaminas	Vitaminas del grupo B y vitamina C.

2.2.1.5 Propiedades de la Miel

Las propiedades físicas, químicas y biológicas que presenta la miel se encuentran estrechamente relacionadas con sus componentes, dentro de los cuales, los polifenoles han sido de gran interés dado que aparte de conferir propiedades antioxidantes, muy importantes para la salud, también actúan a manera de marcador químico para la identificación del origen botánico de la miel, sobre todos los flavonoides como la quercetina y luteolina, los cuales permiten la determinación de los distintos perfiles botánicos (García, 2018).

En la miel, cabe destacar su poder antibacteriano, atribuido principalmente a inhibinas (peróxido de hidrógeno, flavonoides y ácidos fenólicos) y demás sustancias aún no identificadas. Además, Arroyo & Arroyo, (2017) atribuyen la capacidad antibacteriana de miel a la combinación de propiedades tales como su alta osmolaridad, bajo pH, presencia de sustancias volátiles y bajo valor de actividad de agua. También se ha demostrado que la miel sirve como una fuente

natural de antioxidantes, los cuales son efectivos para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas, del sistema inmune, cataratas y diferentes procesos inflamatorios (Arroyo & Arroyo, 2017).

Actualmente se acepta que la miel puede ser además un alimento nutracéutico, ya que contiene un gran número de sustancias con dicha propiedad, incluyendo el ácido ascórbico, péptidos pequeños, flavonoides, tocoferoles y enzimas, pudiendo ser una alternativa natural al uso de aditivos alimentarios para controlar el pardeamiento enzimático durante el procesamiento de frutas y verduras, así como ingrediente en la elaboración de jugos y conservas alimenticias, y en muchos otros alimentos para conferirles propiedades sensoriales propias de la miel (Arroyo & Arroyo, 2017; Schencke et al., 2016).

Por último, existe evidencia científica acerca de que los polisacáridos que componen la miel poseen un efecto prebiótico, consiguiendo un aumento de las poblaciones intestinales de bifidobacterias y lactobacilos, y confiriéndole a su vez un índice prebiótico de entre 3,38 y 4,24 (García, 2019), el cual describe la relación entre los cambios en la microflora beneficiosa con los de los microbios no deseados asociados a la concentración inicial, dando una puntuación cuantitativa que describe el efecto prebiótico (Chamidah, 2018).

2.2.2 Propóleo

2.2.2.1 Características Generales

El propóleo es uno de los productos apícolas provenientes de la colmena que ha sido empleado desde tiempos remotos con un fin principalmente medicinal debido a sus grandes propiedades terapéuticas. Su uso se remonta al menos al año 300 a.C. y ha sido utilizado por egipcios, persas, griegos y romanos (Šturm & Poklar, 2020).

Consiste en una sustancia resinosa recolectada por las abejas ya sea a partir de néctar floral o de secreciones de hojas y brotes del vegetal, como resinas y látex, los cuales mezclan con sustancias propias (secreciones salivares y enzimáticas) para enriquecerlo y emplearlo en la construcción o reparación de la colmena (Fidelmar, 2012; Lastiri, Tabera & Basualdo, 2018).

Debido a su compleja estructura, el propóleo no se puede utilizar directamente, por lo que resulta necesario extraerlo con la ayuda de un disolvente adecuado. La mayoría de los componentes del propóleo son solubles en agua o alcohol, por lo que los disolventes más utilizados para la extracción han sido el agua, metanol, etanol y otros como el cloroformo, el diclorometano, éter y la acetona. El disolvente debe preservar los principales componentes del propóleo y sus propiedades biológicas, eliminando al mismo tiempo los componentes no deseados (Ahangari, Naseri & Vatandoost, 2018).

Se puede clasificar de diferentes maneras, una de ellas es según sus "recolectores", obteniendo así el propóleo "normal" que recogen las abejas melíferas y el llamado geopróleo que recogen las abejas sin aguijón, que también añaden tierra a sus mezclas de propóleos, confiriéndole una consistencia dura. Según las fuentes vegetales, el propóleo se ha clasificado en siete tipos principales, dentro de los cuales se encuentran el propóleo de álamo, que es el tipo de propóleo más extendido (Europa, América del Norte, regiones no tropicales de Asia), el propóleo verde de *Baccharis*, el propóleo rojo de *Clusia*, el propóleo de eucalipto, el propóleo verde de *Macaranga*, el propóleo de abedul y el propóleo mediterráneo (Šturm & Poklar, 2020).

2.2.2.2 Características Organolépticas

El color del propóleo depende de su edad y de la fuente vegetal primaria, llegando a variar desde el amarillo y verde, hasta el rojo y el marrón oscuro. Según Šturm & Poklar (2020) incluso se ha informado de propóleos transparentes.

En cuanto a su olor, resulta igualmente variable, desde un aroma agradable que en algunos casos permite identificar fácilmente su origen botánico, hasta un olor predominante a cera, relacionado a compuestos volátiles. Estos últimos corresponden en su mayoría a compuestos alifáticos de bajo peso molecular, como alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres. Su aroma se ha visto asociado también a monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, característicos de especies pertenecientes a familias como la *Lamiaceae*, *Pinaceae* y *Apiaceae* (Sosa, Cabrera & Álvarez, 2017).

2.2.2.3 Composición Química

La composición del propóleo depende en gran medida de su fuente vegetal principal y de la estación del año, así como de la especie de abeja; sin embargo, en general se compone de un 50 % de bálsamo y resina vegetal, un 30 % de cera de abeja, un 10 % de aceites esenciales y aromáticos, un 5 % de polen y un 5 % de otras moléculas orgánicas e inorgánicas (Ahangari et al., 2018; Becerril et al., 2021)).

Los investigadores han demostrado que las distintas especies de abejas tienen un gran impacto en la composición química y la calidad del propóleo, razón por la cual su composición química es muy variada. De hecho, según mencionan Šturm & Poklar (2020), hasta 2012, se han registrado más de 500 constituyentes en los propóleos de diferentes fuentes vegetales y hasta 2018 este número aumentó en al menos 305.

Dentro de las moléculas que más varían acorde al tipo de propóleo se encuentran los ácidos y ésteres fenólicos, varios tipos de flavonoides y otras moléculas fenólicas, terpenos, cetonas, aldehídos y alcoholes aromáticos, proteínas, ácidos grasos, ácidos cerosos, aminoácidos, esteroides, estilbenos,

azúcares, vitaminas del complejo B, vitamina C y vitamina E, minerales e incluso enzimas, como la β -glucosidasa. Además, el propóleo también puede contener derivados del ácido cinámico, como el ácido cafeico y sus ésteres, además de quinonas y cumarinas. Muchos estudios han demostrado que los efectos observados del propóleo podrían ser el resultado de la acción sinérgica de sus complejos componentes (Ahangari et al., 2018; Berretta et al., 2017; Šturm & Poklar, 2020).

2.2.2.4 Propiedades Biológicas

El propóleo contiene más de trescientos compuestos, abarcando tanto vitaminas, minerales, aminoácidos, aceites esenciales, flavonoides, compuestos fenólicos y aromáticos, entre otros; los cuales le brindan diversas propiedades biológicas, dentro de las que destacan su poder antioxidante, antiinflamatorio y recientemente se ha encontrado incluso un efecto anticancerígeno por la presencia de compuestos con actividad anticancerosa, como el éster fenílico del ácido cafeico (CAPE) y Artepillin C (Ácido 3, 5-diprenil-4-hidroxicinámico) (Fidelmar, 2012; Lipovka, Alday & Velázquez, 2021).

Otro de los efectos biológicos más apreciados que poseería el propóleo, es su capacidad inmunomoduladora, ya sea potenciando o suprimiendo el sistema inmunitario. Este efecto contradictorio se debe probablemente a su compleja variedad química, a la presencia en distintas regiones geográficas y a las diferentes formas de extracción (Berretta et al., 2017).

2.3 Metabolitos con Actividad Biológica

2.3.1 Ácidos Fenólicos

El nombre "ácidos fenólicos", en general, describe los fenoles que poseen una funcionalidad de ácido carboxílico. Sin embargo, al describir los metabolitos de las plantas, se refiere a un grupo distinto de ácidos orgánicos. Estos ácidos fenólicos naturales, biosintetizados en las plantas por medio de rutas como la del ácido shikímico y la del acetato-malonato, contienen dos estructuras constitutivas de carbono distintas: las estructuras hidroxicinámicas e hidroxibenzoicas. Aunque el esqueleto básico sigue siendo el mismo, el número y la posición de los grupos hidroxilos en el anillo aromático crean la variedad de compuestos (Fig. 2). En muchos casos, los análogos de los aldehídos también se agrupan y se denominan ácidos fenólicos (por ejemplo, la vainillina) (Robbins, 2003).

Los ácidos hidroxicinámicos, que son derivados del ácido cinámico con una estructura C6-C3, son más frecuentes en la naturaleza que los ácidos hidroxibenzoicos, que en cambio son derivados del ácido benzoico con una estructura C6-C1. Los ácidos hidroxicinámicos también son antioxidantes más eficaces que los hidroxibenzoicos debido a la presencia en su estructura del

grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, en lugar del grupo $-\text{COOH}$. Dentro la mayoría de las plantas podemos encontrar al ácido cafeico, p-cumárico, vainílico, ferúlico y protocatéquico. Otros ácidos que se pueden encontrar en alimentos o plantas son el ácido genticóico o siríngico (Marchica et al., 2020; Robbins, 2003).

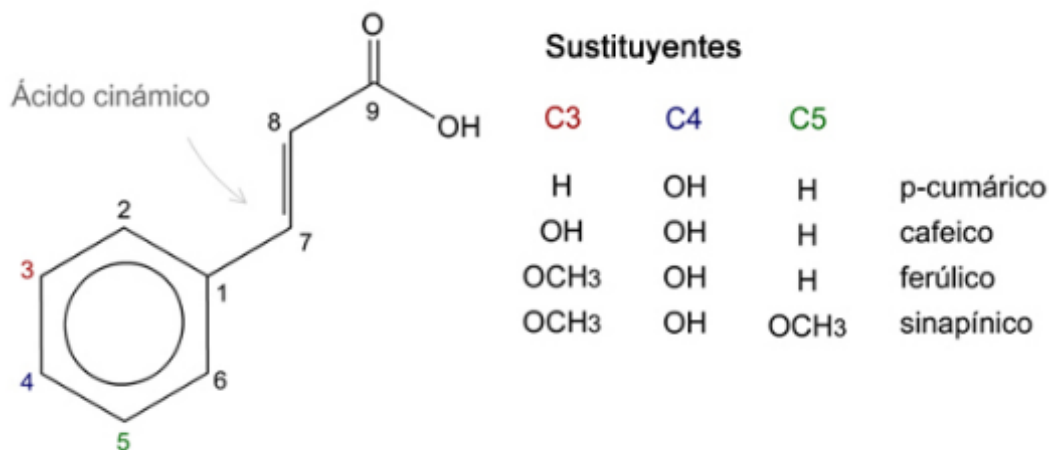


Figura 2. Ácidos hidroxicinámicos.

Puesto que su estructura se encuentra estabilizada mediante resonancia, la donación de átomos de hidrógeno resulta en una propiedad antioxidante a través de un mecanismo de eliminación de radicales. Otros modos, como la extinción de radicales a través de la donación de electrones y la extinción de oxígeno singlete, también son conocidos por la actividad antioxidante que confieren a estos compuestos. Además, los ácidos fenólicos se encuentran en todas partes y están bien documentados para otros efectos protectores de la salud como antimicrobianos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antimutagénicos, entre otros (Kumar & Goel, 2019). Un hecho importante es que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos; razón por la cual los ácidos hidroxicinámicos son más efectivos en términos de la actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos.

Dentro de los productos apícolas, la miel es rica en ácidos fenólicos y flavonoides, que presentan una amplia gama de efectos biológicos y actúan como antioxidantes naturales, confiriendo a este producto una actividad antioxidante algunas veces comparable con la de algunas frutas y vegetales frescos. El análisis de los compuestos fenólicos también se ha considerado una forma muy prometedora de estudiar los orígenes florales y geográficos de las mieles. Por ejemplo, la hesperetina se ha utilizado como marcador para la miel de cítricos, el kaempferol para la miel de romero y la quercetina para la miel de girasol. Algunos ácidos fenólicos (por ejemplo, el ácido elágico en la miel de brezo y los hidroxicinamatos (ácido cafeico, p-cumárico y ferúlico) en la miel de castaño) también se han utilizado como marcadores florales (Pyrzynska &

Biesaga, 2009). Por otro lado, los principales compuestos fenólicos del propóleo que se han reportado en la literatura corresponden al ácido clorogénico, ferúlico, cafeico y gálico (Narimane, Demircan, Salah, Özçelik & Salah, 2017).

2.3.2 Polifenoles

Los polifenoles son compuestos naturales sintetizados exclusivamente por las plantas, con características químicas relacionadas con las sustancias fenólicas y con bioactividades reportadas para modular el estrés oxidativo e inflamatorio, para alterar la digestión de macronutrientes y para ejercer efectos similares a los prebióticos en la microbiota intestinal. Son casi omnipresentes en las plantas, concentrándose en el tejido de las hojas, la epidermis, las capas de la corteza, las flores y los frutos. Se encuentran implicados en la atracción de polinizadores, la ejecución de funciones estructurales, la defensa contra la radiación ultravioleta y la protección de las plantas contra la invasión microbiana y los herbívoros (Bertelli et al., 2021).

En cuanto a su estructura, contienen al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático en la molécula (Fig. 3); pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, moléculas con un anillo fenólico, como los ácidos y alcoholes fenólicos entre otros.

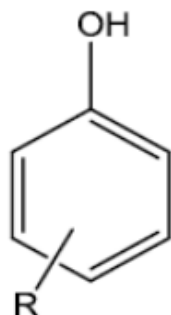


Figura 3. Estructura básica de un fenol (Cenusa, 2016).

Recientemente, los compuestos polifenólicos ocupan un lugar único en la ciencia medioambiental como clase importante de productos naturales bioactivos en todo el mundo, siendo los más abundantes los taninos condensados. Su división consta de al menos 18 clases: fenoles simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas e isocumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, lignanos, neolignanos, ligninas y taninos condensados. Además, se conocen más de 8.000 estructuras fenólicas, de las cuales la gran mayoría pertenecen a la subclase de los flavonoides (5.000) (Šturm & Poklar, 2020).

Las propiedades biológicas de los polifenoles incluyen efectos anticancerígenos, antiinflamatorios y antioxidantes. Este último es uno de los principales beneficios que se puede mencionar, puesto que los polifenoles son abundantes en la dieta

del hombre al incluir a la misma cereales, verduras, frutas, legumbres secas, chocolate y bebidas comunes como el vino, la cerveza y el té. Además, pueden actuar como agentes antiinfecciosos contra los patógenos humanos resistentes a los antibióticos (Bertelli et al., 2021).

2.3.3 Flavonoides

Los flavonoides pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de las plantas que tienen una estructura polifenólica y que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, verduras y ciertas bebidas. Debido a sus estructuras químicas especiales, los flavonoides poseen una amplia gama de efectos fisiológicos y bioquímicos en las células de mamíferos y otros tipos de animales. Tienen diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados a diversas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer (EA), la aterosclerosis, la inflamación, entre muchos otros (Feng, Hao & Li, 2017; Panche, Diwan&Chandra, 2016).

Generalmente su estructura básica es C₆-C₃-C₆. La mayoría de ellos son derivados de la cromona con una estructura central de 2-fenil-cromona y están formados por tres anillos de A/B/C como se muestra en la Fig. 4 (Feng et al., 2017). Los flavonoides pueden dividirse en diferentes subgrupos en función del carbono del anillo C al que se une el anillo B y del grado de insaturación y oxidación del anillo C. Los flavonoides en los que el anillo B está enlazado en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 4 se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: las flavonas, los flavonoles, las flavanonas, los flavanonoles o las orcatequinas, las antocianinas y las chalconas (Fig. 5).

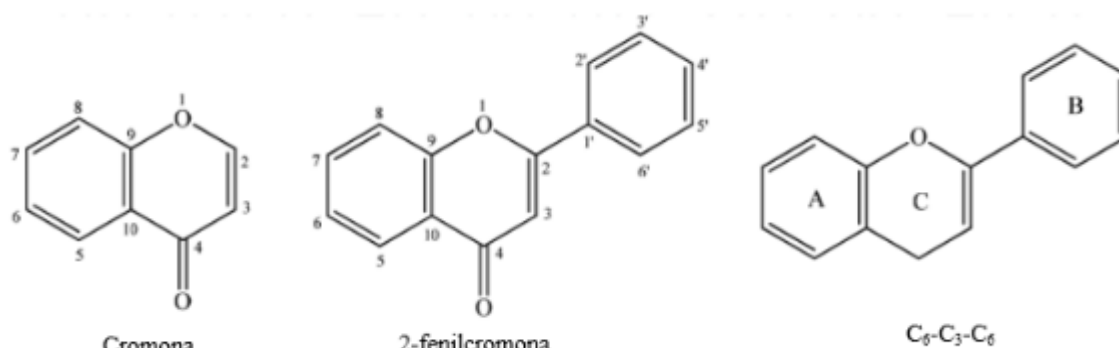


Figura 4. Estructura básica de flavonoides (Feng et al., 2017).

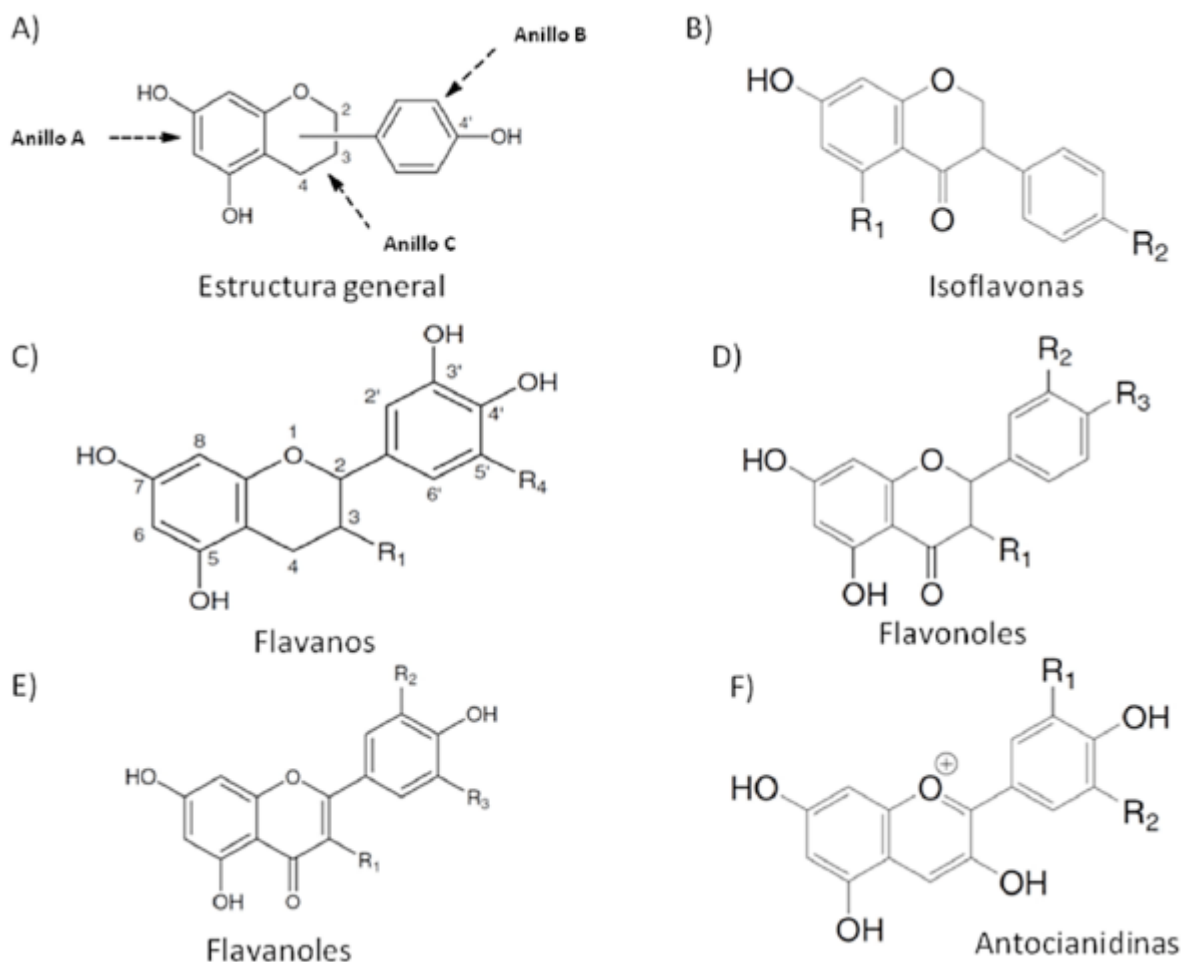


Figura 5. Estructura básica de flavonoides y tipos (Limon et al., 2010).

Los compuestos fenólicos son unos de los numerosos grupos de compuestos de los productos apícolas, sobre todo la miel, donde una gran parte corresponde a los flavonoides, principalmente en forma de glucósidos. Los flavonoides detectados en la miel suelen proceder del propóleo, mientras que el polen no es una buena fuente de estos compuestos, ya que su contenido es bastante bajo (Šarić, Vahčić, Kovačević, & Putnik, 2020). En cuanto al propóleo, estos compuestos son considerados como un criterio para evaluar su calidad, aparte de contribuir en gran medida a la actividad farmacológica del mismo, dado su amplio espectro de propiedades biológicas (Huang, Zhang, Wang, Li & Hu, 2014).

2.3.4 Cumarinas

Las cumarinas son una familia de benzopironas (1,2-benzopironas o 2H-1-benzopiran-2-onas) ampliamente distribuidas en la naturaleza. Representan una importante familia de heterociclos oxigenados naturales y/o sintéticos, con una estructura típica de benzopirona (Fig. 6) (João et al., 2015). Las cumarinas naturales pueden dividirse en seis grupos básicos: cumarinas simples, furanocumarinas (de tipo lineal y angular), piranocumarinas (de tipo lineal y angular), bisoumarinas, benzocumarinas y coumestanos (Lončar et al., 2020).

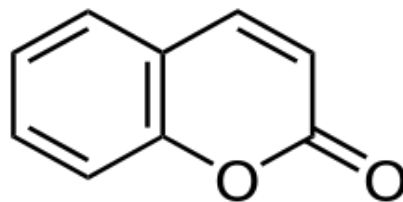


Figura 6. Estructura química básica de las cumarinas.

Son considerados metabolitos secundarios que protegen a la planta frente a infecciones, con un importante papel en la bioquímica y la fisiología de las plantas, actuando como antioxidantes, inhibidores de enzimas y precursores de sustancias tóxicas; además de intervenir en la actividad de las hormonas y reguladores del crecimiento, al igual que en el control de la respiración y en la fotosíntesis. Dentro de sus funciones biológicas para el ser humano, actualmente se están estudiando activamente muchos compuestos cumarínicos como candidatos a fármacos con gran actividad farmacológica, baja toxicidad y efectos secundarios, menor resistencia a los medicamentos, alta biodisponibilidad, amplio espectro, mejores efectos curativos, entre otros, para tratar diversos tipos de enfermedades. Resulta de especial interés su papel en el desarrollo de agentes anticoagulantes, antioxidantes, antimicrobianos (antivirales, antifúngicos y antiparasitarios), anticancerígenos, antidiabéticos, analgésicos, antineurodegenerativos y antiinflamatorios (João et al., 2015; Lončar et al., 2020; Stringlis, De Jonge&Pieterse, 2019).

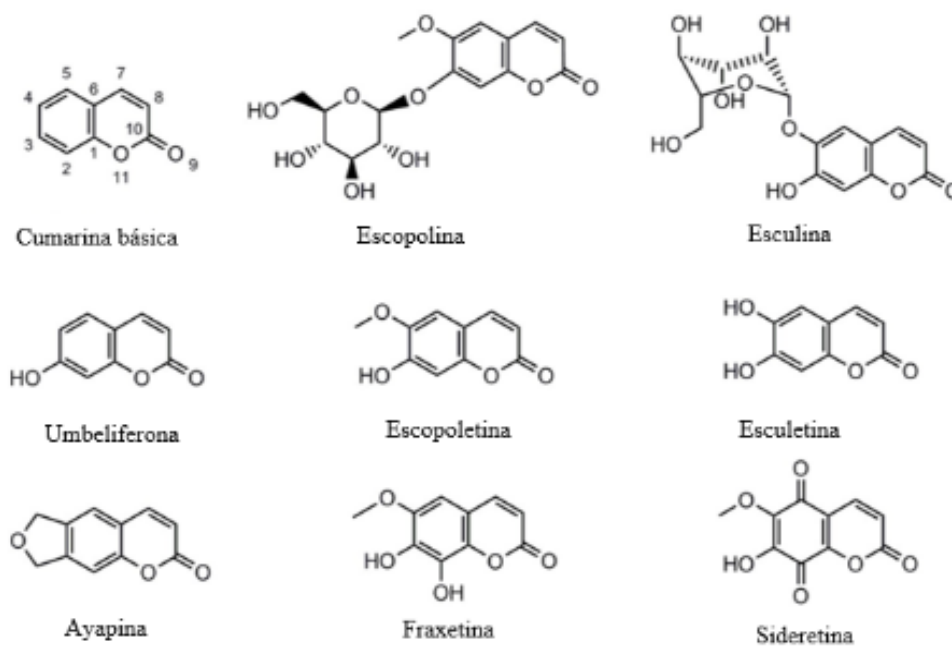


Figura 7. Estructuras químicas de cumarinas simples representativas derivadas de plantas (Stringlis et al., 2019).

2.3.5 Alcaloides

Los alcaloides son uno de los mayores grupos de metabolitos secundarios de las plantas, y están presentes en varias familias de plantas económicamente relevantes, como la *Papaveraceae*, *Rubiaceae*, *Ranunculaceae*, *Solanaceae*, etc. (Matsuura & Fett-Neto, 2015). Tradicionalmente se definen como constituyentes orgánicos básicos (de tipo alcalino) que se encuentran principalmente en las plantas y contienen un nitrógeno unido heterocíclicamente, que se deriva del metabolismo de los aminoácidos (Fig. 8). La biosíntesis de los alcaloides suele seguir vías complejas e incluye pasos estereoespecíficos. Dado que el esqueleto del aminoácido suele conservarse en gran medida en la estructura, los alcaloides que se originan a partir del mismo aminoácido muestran características estructurales similares y pueden clasificarse según su origen biosintético (Fester, 2010).

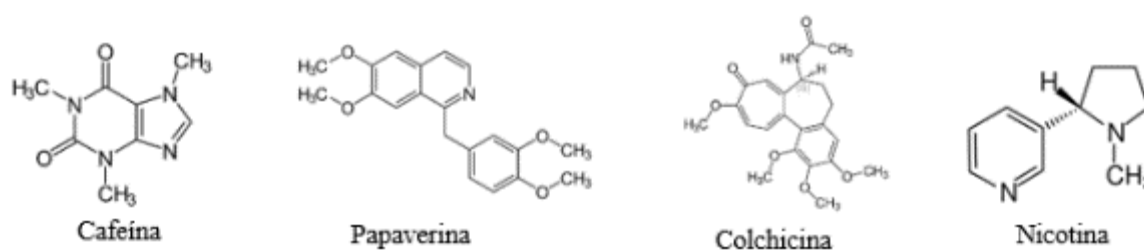


Figura 8. Ejemplos de alcaloides y su estructura química.

Suelen presentar pronunciadas bioactividades y, por tanto, se cree que desempeñan un papel importante en la interacción de las plantas con su entorno, así como en el ser humano y animales. Los alcaloides y los extractos de plantas que contienen alcaloides se han utilizado a lo largo de la historia de la humanidad como remedios, venenos y drogas psicoactivas por sus diferentes componentes activos, los cuales le otorgan actividades fisiológicas únicas con respecto a cualquier otro grupo de productos naturales. Muchos fármacos utilizados por el hombre con fines médicos y no médicos se producen en la naturaleza en forma de alcaloides, por ejemplo, la atropina, la estricnina, la cafeína, la nicotina, la morfina, la codeína, la cocaína, entre otros (Eguchi et al., 2019; Hussain et al., 2018).

2.3.6 Carotenoides

Los carotenoides son una clase importante de pigmentos naturales coloreados, que van desde el amarillo, el naranja y el rojo de muchas frutas, verduras, flores y hojas, hasta incluso los colores de las mariposas y los cangrejos de río. Estos colores brillantes de los pigmentos carotenoides atraen a los insectos para la polinización y la dispersión de las semillas, procesos esenciales para la reproducción (Cazzonelli, Nisar, Hussain, Carmody & Pogson, 2010).

En las plantas, los carotenoides son esenciales para la fotosíntesis y la fotoprotección, dado que desempeñan un papel fundamental como pigmentos captadores de luz y componentes estructurales de los fotosistemas. Estos

compuestos también proporcionan precursores para la biosíntesis de las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas (SL). Además, los derivados de los carotenoides pueden actuar como moléculas de señalización en respuesta al desarrollo o servir como reguladores del crecimiento de las plantas (Sun, Rao, Zhou & Li, 2022).

Las propiedades y funciones de una molécula carotenoide dependen principalmente de su estructura química. Estos compuestos son la forma combinada de los carotenos, que son básicamente hidrocarburos clasificados en acíclicos (licopeno y fitoeno), cíclicos (α - y β -) caroteno y xantofilas como luteína, bixina, capsantina, zeaxantina y β -criptoxantina (Fig. 9). Los carotenoides son en su mayoría terpenoides de 40 carbonos con ocho unidades isoprenoides como unidad estructural básica, unidas de forma específica para facilitar la posición de los grupos metilo no terminales y dos grupos metilo centrales en posición 1,5 y 1,6, respectivamente (Swapnil et al., 2021).

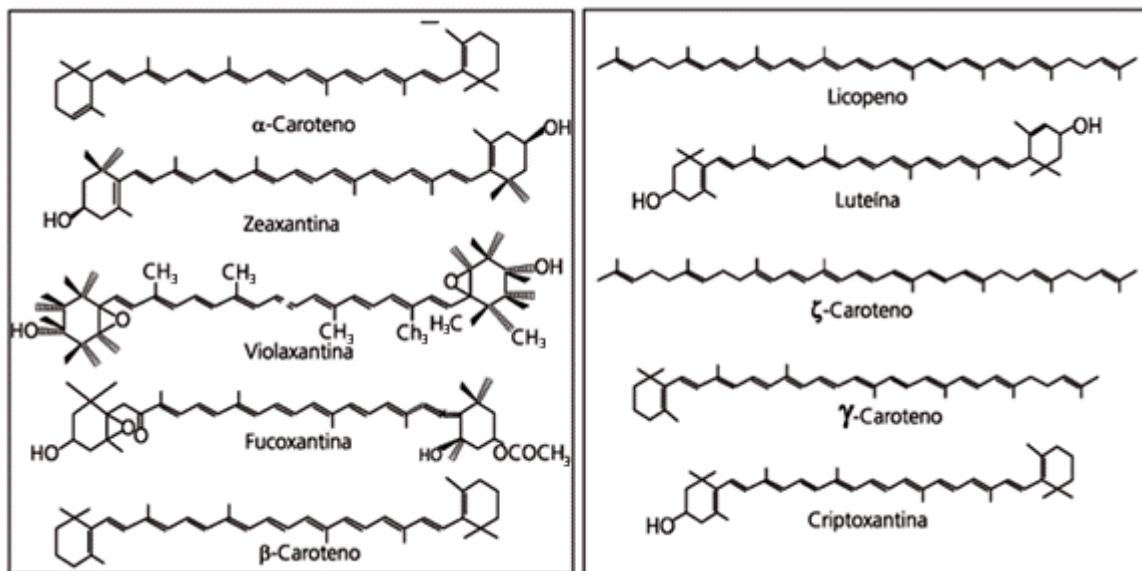


Figura 9. Ejemplos de carotenoides y su estructura química.

En el ámbito de la salud humana, existen numerosos estudios epidemiológicos los cuales asocian el consumo de alimentos ricos en carotenoides, como frutas y hortalizas, con la reducción en la incidencia de ciertas patologías como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), cataratas, inmunodepresión, entre otras. De hecho, estos estudios señalan una asociación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la incidencia de enfermedades crónicas y el cáncer, así como la mortalidad por cualquier causa (Perera & Mei, 2007; Saini et al., 2022).

3. CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Diseño de Estudio

Estudio experimental.

3.2 Área de estudio y muestreo

3.2.1 Georreferenciación de los Sitios de Muestreo

Los apiarios donde se colectaron las muestras de miel, propóleo y partes aéreas de la planta (flores y hojas), fueron georreferenciados con la aplicación “Coordenadas de mi GPS” (Android Apps & Tools), tomando los datos de altitud, latitud y ubicación. Posteriormente estos datos sirvieron para la obtención de un mapa comparativo de los puntos de obtención de las muestras botánicas.

Puntos de Muestreo Unidos

Puntos de Muestreo

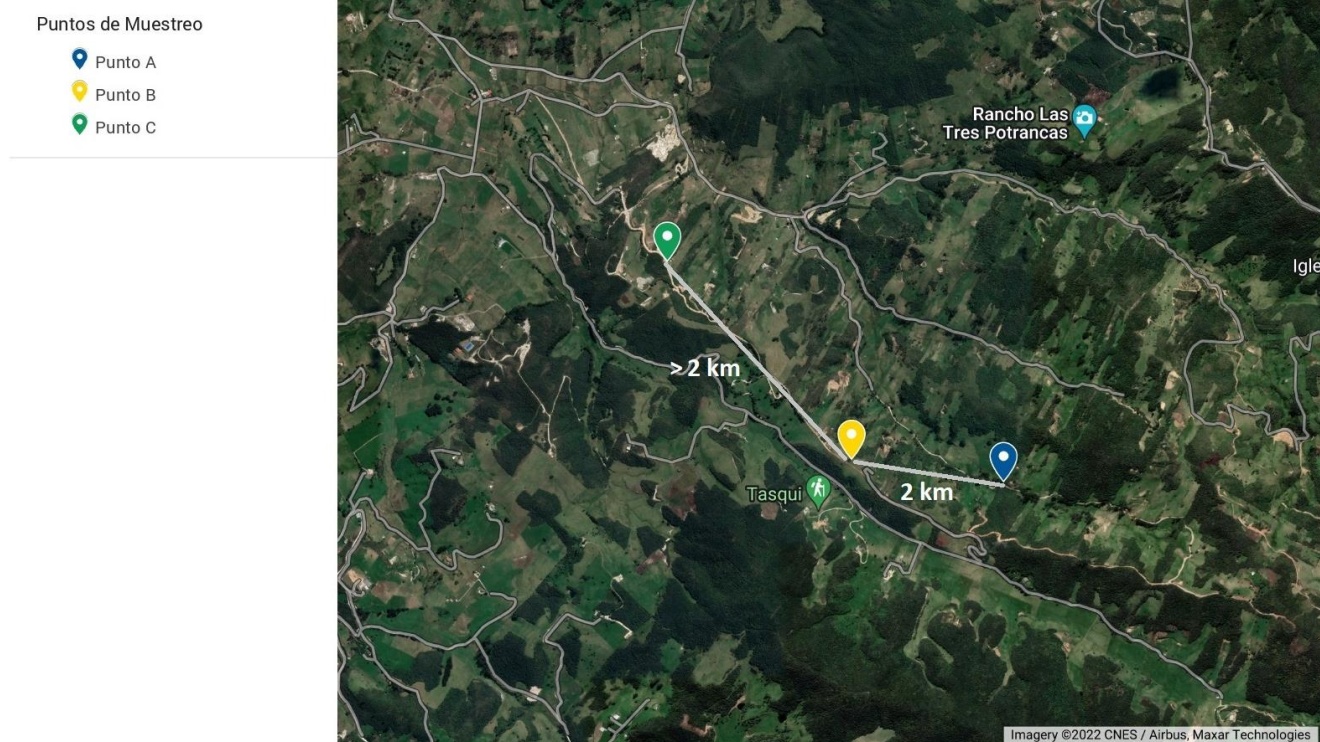


Figura 10. Geolocalización de los puntos de muestreo.

3.2.2 Muestras

3.2.2.1 Vegetales

Se recolectaron muestras compuestas de la parte aérea (flores y hojas) de *F. verbascifolius* comúnmente conocida como “Cótag”, en tres diferentes puntos,

separados aproximadamente 2 km entre cada uno, en el área entre El Valle y Tarqui en el cantón Cuenca, provincia del Azuay.

La caracterización botánica de las muestras fue realizada por el Herbario Azuay de la Universidad del Azuay.

3.2.2.2 Productos Apícolas

Se emplearon tres muestras de miel y tres muestras de propóleo seco para los análisis, las cuales fueron provistas por parte de los apicultores de la Asociación de Pequeños Ganaderos San Judas Tadeo del Valle, cuyos apiarios están dentro de las zonas de recolección de las muestras vegetales. Además, se adquirió una muestra de miel de supermercado (miel comercial) para utilizarla como control.

3.3 Operaciones Preanalíticas

3.3.1 Muestras Vegetales

3.3.1.1 Operaciones Pre-extractivas

1. **Lavado:** las muestras recolectadas se lavaron con agua potable hasta eliminación de impurezas para posteriormente dejarlas reposar por 10 min en agua destilada.
2. **Secado:** el proceso de secado se realizó por 24 h a 40 °C empleando el horno de secado PRO-3 (s.d.).
3. **Trituración:** se trituró la droga vegetal en una licuadora (Oster, USA), por periodos de 10 s para evitar alteraciones térmicas debido al calentamiento de las cuchillas, hasta conseguir un tamaño de muestra no mayor a 5 mm.

3.3.1.2 Extracción

3.3.1.2.1 Percolación

Se pesaron 9 g de droga vegetal seca, de cada uno de los puntos de recolección, en frascos herméticos de vidrio para humectarlos con su respectivo solvente de acuerdo al método de extracción (metanol y cloroformo). Luego de esto se dejó reposar los frascos cubiertos con papel aluminio por 15 h, se cargó los percoladores con la droga humectada, se añadió solvente hasta cubrir aproximadamente 3 cm sobre la muestra y se dejó en maceración por 24 h, luego de las cuales se procedió a la recolección de la **Fracción 1**, correspondiente al 75 % del peso de la droga vegetal, a una velocidad de 20 gotas/min. Los tubos con el extracto (fracción 1) se almacenaron en refrigeración. Se dejó percolar el resto de la droga por 7 h, recolectando el extracto en balones (**Fracción 2**) y renovando constantemente el solvente.

Finalizada la percolación se eliminó el solvente con el rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Alemania), llegando hasta la sequedad, para luego redissolver con la Fracción 1 empleando el baño a ultrasonido (Cole-Palmer, USA). En los extractos clorofórmicos se empleó el sistema de evaporación en seco RapidVap (LABCONCO, USA) y se almacenaron a -20 °C.

La evaporación del solvente para los extractos metanólicos se realizó con una corriente continua de nitrógeno gaseoso hasta obtener 1/4 de volumen para una posterior liofilización.

3.3.1.2.2 Liofilización

Los extractos metanólicos fueron congelados a -80 °C formando una película delgada en las paredes del tubo. Luego se procedió a la liofilización a -51 °C y 0,08 mbar por 24 h en el equipo FreeZone (LABCONCO, USA). Los liofilizados obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

3.3.1.2.3 Extracción Mediante Fluidos Supercríticos (FSC)

La obtención de los extractos lipofílicos de la planta triturada se realizó con 1,5 g de extracto en el equipo de Fluidos Supercríticos (Waters®, USA), empleando CO₂ grado alimenticio como solvente (Indura, Ecuador) y 10 % de etanol absoluto (MERCK, Alemania) como co-solvente, a una velocidad de flujo de 4,5 mL/min, 40 °C y 130 bar. Las condiciones programadas en el software del equipo fueron: 4 min de duración dinámica y 2 min duración estática, durante 7 ciclos. El extracto recolectado se concentró con una leve corriente continua de nitrógeno. Se conservaron los extractos a -20 °C hasta su análisis.

3.3.2 Productos Apícolas

3.3.2.1 Preparación de los Extractos Polares y Apolares de la Miel de Abeja

Se pesó 20 g de miel en tubos Falcon y se agregó 10 mL de solvente (metanol o acetato de etilo, respectivamente) se agitó en el vórtex hasta homogeneización y posteriormente se centrifugó a 6 rpm. Se recuperó la parte sobrenadante en un tubo de ensayo y se lo llevó a concentración en el sistema de evaporación en seco RapidVap (LABCONCO, USA) por 6 h. El extracto metanólico de la miel es el extracto polar, y el extracto en acetato de etilo es el extracto apolar.

3.3.2.2 Preparación de los Extractos Polares y Apolares del Propóleo

Se pesó 1 g de propóleo seco, previamente triturado, en un vaso de precipitación y se disolvió en 10 mL de metanol con el baño de ultrasonido (Cole-Palmer, USA), la mezcla se filtró y se colocó en un embudo de separación. A continuación, se devolvió el residuo del papel filtro al vaso para agregar 10 mL de hexano, agitar la mezcla, filtrar nuevamente y colocar en el embudo de separación junto con el metanol. El embudo de separación se agitó cinco veces

por periodos de 6 min de agitación y 10 min de reposo, para después recolectar las fases.

Los extractos fueron concentrados mediante el sistema de evaporación en seco RapidVap (LABCONCO, USA) por un lapso de 6 h. Los concentrados en metanol fueron asignados como extractos polares y los concentrados en hexano como extractos apolares, mismos que fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

3.4 Operaciones Analíticas

3.4.1 Análisis Mediante Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatographic o TLC)

Se utilizó TLC para determinar ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas y alcaloides en la planta *F. verbascifolius* y en los subproductos apícolas miel y propóleo.

3.4.1.1 Preparación de las Soluciones Vegetales y de Origen Apícola

Se pesó 5 mg de todos los extractos en tubos Eppendorf para re-disolverlos en 1 mL de su respectivo solvente de extracción. Para los extractos metanólicos de la miel se requirió disminuir la densidad de la solución para una óptima elución por lo que se empleó 2,5 mg/mL.

3.4.1.2 Preparación de las Placas para TLC

Se utilizaron placas de sílica gel 60 F 254 activadas a una temperatura de 100 °C, sobre las cuales se trazó una línea de siembra a 1 cm del borde inferior y a una distancia de 10 cm se trazó la línea de frente del solvente. En el borde superior se identificó el metabolito a investigar, fase móvil y su revelador (Tabla 2). En la parte inferior de la placa se identificaron los códigos de los extractos a analizar y los patrones empleados. Los datos específicos se encuentran en el anexo 1.

3.4.1.3 Aplicación de las Muestras y Patrones

Cada extracto se colocó a un centímetro de distancia entre sí y desde el borde inferior de la placa. Se sembraron 10 µL de cada extracto y patrón (las concentraciones se indican en el anexo 1).

3.4.1.4 Elución Sobre la Placa

Se colocó la placa de TLC en una cámara de vidrio saturada de la fase móvil correspondiente al metabolito de interés (Tabla 2). Se retiró la placa una vez que la fase móvil alcanzó la línea de frente del disolvente, para luego evaporar el solvente.

Las condiciones cromatográficas de TLC específicas para cada metabolito se detallan en el Anexo 1.

3.4.1.5 Revelado Post-cromatográfico

Para la visualización de las placas reveladas se realizó en el equipo de lectura Camag TLC visualizer 2 (CAMAG®, Suiza), el cual nos permitió apreciar la formación de bandas en las placas a diferentes longitudes de onda (Visible, 254 nm y 366 nm).

Tabla 2. *Detección de metabolitos en el revelado post cromatográfico.*

Metabolito	Revelador	Espectro de detección	
		Visible	366 nm
Ácidos fenólicos	Productos naturales	-	Amarillo fluorescente (Zamora, 2017)
	DPPH	Manchas blancas- amarillentas (actividad antioxidante)	-
Flavonoides	Productos naturales	Flavonoles: - Amarillo anaranjado/amarillo verdosos. Flavonas: - Naranja/amarillo verdoso.	Flavonoides: - Amarillo anaranjado (quercetina, miricetina y sus glicósidos) - Amarillo verdoso (kaempferol, isoharmetin y sus glicósidos) Flavonas: - Naranja (luteolina y sus glicósidos) - Amarillo verdoso (apigenina y sus glicósidos)
	DPPH	Manchas blancas (actividad antioxidante)	-
Flavonoides (Fenoles grandes)	Vainillina I y II	Marrón rojizo, amarillo marrón o verde oscuro (principios amargos, saponinas y compuestos de aceites esenciales).	-
Cumarinas	KOH 10 %	Zonas rojas	Fluorescencia: - Rojo (antraquinonas)

			<ul style="list-style-type: none"> - Azul intenso o azul verdoso (cumarinas simples). - Amarillo, café, azul o azul verdoso (furano y piranocumarinas).
Alcaloides	Dragendorff	Naranja-marrón	Fluorescencia: <ul style="list-style-type: none"> - Azul - Azul verdoso - Amarillo (colchicina, sanguinarina, berberina).

(Wagner & Bladt, 1996).

3.4.2 Cuantificación de Polifenoles y Carotenoides por Métodos Espectrofotométricos

Los ensayos analíticos se realizaron por triplicado para cada muestra con el fin de aumentar la repetibilidad y reproducibilidad de las mediciones.

3.4.2.1 Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu

Para la determinación de polifenoles totales en los extractos polares y apolares de la planta, del propóleo y de los extractos apolares de la miel, se empleó una solución del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 % y carbonato de sodio (Na_2CO_3) 700 mM. El patrón empleado se preparó a partir de una solución madre de ácido gálico de 1 mg/mL, de la cual se tomaron alícuotas para preparar la curva de polifenoles a cinco concentraciones: 0,5 mg/mL - 0,25 mg/mL - 0,125 mg/mL - 0,0625 mg/mL y 0,0315 mg/mL.

Los extractos de las muestras a analizar junto con su concentración se encuentran en la Tabla 3. Para el análisis de las muestras y patrón se procedió a colocar 100 μL de cada uno en un tubo de Eppendorf, luego se añadió 200 μL de la solución de Folin-Ciocalteu al 10 %, se agitó en vórtex y se dejó reaccionar por 5 min. Posteriormente se añadieron 800 μL de Na_2CO_3 700 mM, se agitó en vórtex y se dejó incubar las muestras por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, en caso de presentarse turbiedad, se centrifugó las muestras por 2 min. Finalmente se tomó 200 μL de cada tubo Eppendorf y se colocó en un pocillo de microplaca (96 pocillos) para realizar la lectura a 765 nm, mediante el lector de microplacas SYNERGY H1 (BioTek, USA).

Tabla 3. Muestras empleadas para determinación de polifenoles totales.

Muestras	Tipo de Extracto	Concentración
----------	------------------	---------------

		(mg/mL)
Miel	Apolar	3
Miel Comercial	Apolar	5
Propóleo	Polar- Apolar	1
Planta (Cótag)	Polar	1
	Apolar	5

3.4.2.2 Cuantificación de Carotenoides Mediante Técnica de Microplacas y Lector de ELISA

Para la cuantificación de carotenoides tanto en las muestras vegetales, como en los productos apícolas, se pesaron 5 mg de cada extracto en un tubo y se agregó 10 µL de agua destilada ultrapura para su hidratación por aproximadamente 10 minutos. Luego se agregó 8 mL de etanol al 96 %, se mezcló mediante vórtex, y se dejó reposar toda la noche cubiertos con papel aluminio. Al día siguiente se homogeneizaron las muestras mediante vórtex y se dejó reposar hasta el asentamiento de partículas. Se realizaron las mediciones a absorbancias de 470 nm, 648,6 nm, 664,2 nm y 750 nm, este último por impurezas. Las absorbancias deben encontrarse en un rango de 0,2 a 0,8. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Genesys Uv Scanning (Thermo Scientific, USA).

La fórmula empleada para la determinación de carotenoides fue la siguiente:

$$CT = \frac{(4,785A_{470} + 3,657A_{664,2} - 12,76A_{648,6}) \times 8,1}{p} \left[\frac{mg}{g} \right]$$

CT = Carotenoides totales.

A_{470} = Absorbancia de la muestra a 470 nm.

$A_{648,6}$ = Absorbancia de la muestra a 648,6 nm.

$A_{664,2}$ = Absorbancia de la muestra a 664,2 nm.

p = peso del extracto (mg).

3.5 Análisis Estadísticos

UCUENCA

Para el análisis de polifenoles totales y carotenoides por métodos espectrofotométricos se trabajó por triplicado con cada muestra. Los datos obtenidos de las mediciones fueron analizados usando el software estadístico InfoStat (Argentina), mediante el cual se aplicó el test paramétrico ANOVA de una vía conjuntamente con el test de Tukey para comparar las diferencias de todos los posibles pares de promedios. El intervalo de confianza fue del 95 % y se consideró como estadísticamente significativo cualquier valor p correspondiente al valor F , calculado mediante el software, cuyo valor sea inferior a 0,05.

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis Mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Se realizó la investigación de los metabolitos secundarios presentes en la muestra vegetal (*F. verbascifolius*) y en los subproductos apícolas (miel y propóleo) según la metodología indicada en el apartado 3.4.1. La finalidad del análisis fue determinar los metabolitos presentes en estos especímenes para asociar el perfil fitoquímico de la planta Cóttag (*F. verbascifolius*) con los productos apícolas generados en la parroquia de El Valle-Cuenca, Azuay.

4.1.1 Identificación de Ácidos Fenólicos Mediante TLC

Según los resultados obtenidos se evidenció la presencia de ácidos fenólicos en extractos polares de todas las muestras polares reveladas con productos naturales a una longitud de onda (λ) de 254 nm (Fig. 11), cuya visualización fue mejor a $\lambda = 366$ nm (Fig. 12).

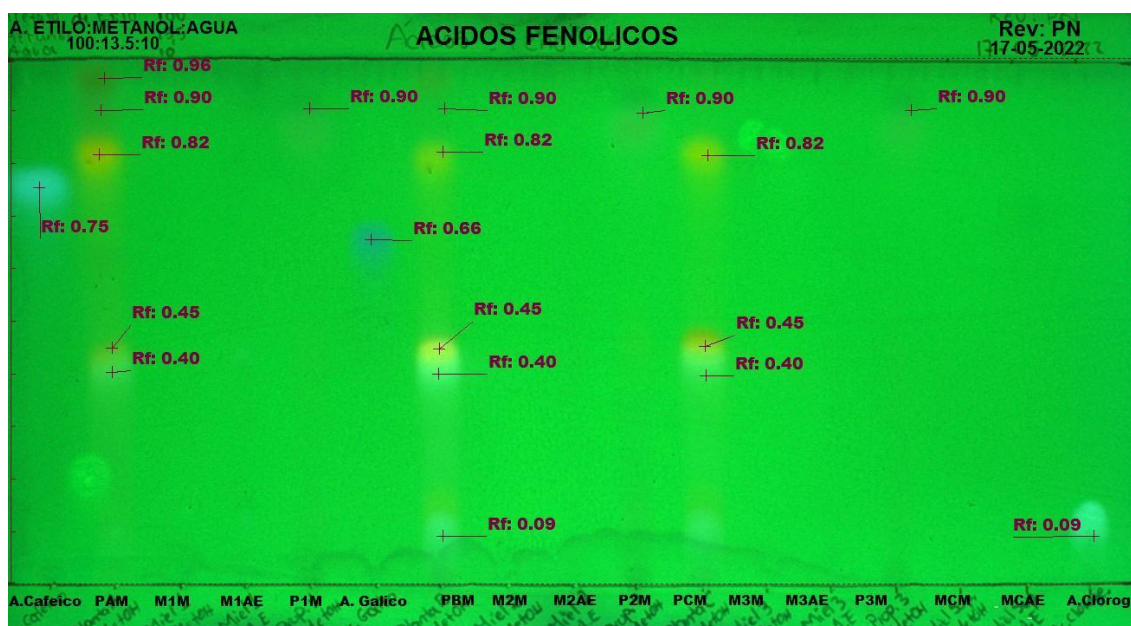


Figura 11. Ácidos fenólicos en extractos polares revelada con productos naturales a $\lambda = 254$ nm.

En la placa de ácidos fenólicos revelados con productos naturales a $\lambda = 366$ nm se observaron bandas de coloración rojiza ($R_f = 0,96$) (Fig 12). De igual forma, se encontró otras bandas, como la amarillenta ($R_f = 0,82$) y amarilla fluorescente ($R_f = 0,45$), posiblemente debida a flavonoides; la azul-celeste fluorescente ($R_f = 0,40$) y la amarilla anaranjada ($R_f = 0,16$). Por otro lado, se vislumbró coloraciones y R_f similares a las del patrón de ácido clorogénico ($R_f = 0,9$) en las muestras vegetales, por lo que se podría concluir que el extracto metanólico de *F. verbascifolius* contienen ácidos fenólicos (Fig. 12).

Los extractos apolares de la miel 1, 2 y 3, que corresponden a diferentes zonas de recolección, presentaron patrones diferentes. Las mieles 1 y 2 presentaron una banda de coloración azul-celeste ($R_f = 0,09$) semejante a la del ácido

clorogénico, sin embargo, la intensidad fue significativamente menor, debido a la baja concentración del compuesto, lo que explicaría la ausencia de banda en la miel 3 (Fig. 11, 12, 13). En las muestras de propóleo, se observó una banda verde fluorescente (Rf=0,87) en la placa revelada con productos naturales a 366 nm (Fig. 12).

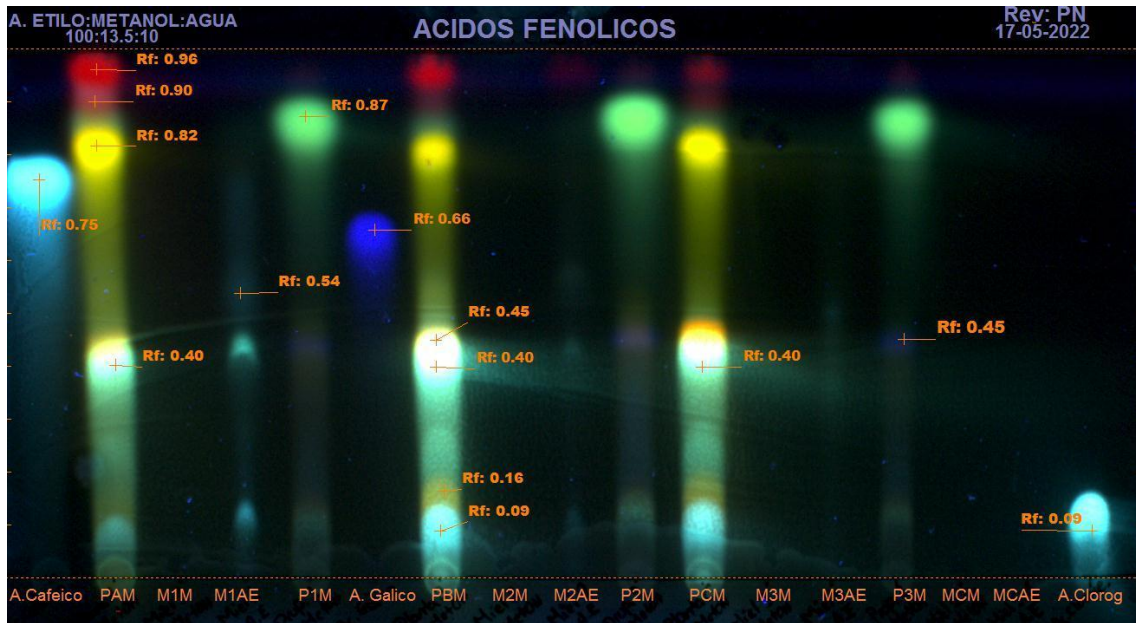


Figura 12. Ácidos fenólicos revelados con productos naturales a $\lambda=366$ nm.

La cromatografía en capa fina (TLC) combinada con detección de radicales DPPH de antioxidantes *in situ* y métodos similares se han utilizado para la detección de antioxidantes presentes en extractos de plantas (Sethiya et al., 2013).

Mediante la prueba de DPPH se puede aproximar, de acuerdo a la fluorescencia blanca amarillenta, las fracciones con mayor capacidad antioxidante. La figura 12, muestra que las fracciones metanólicas de la planta son las que presentan mayor actividad antioxidante, siendo la planta C, la de mayor actividad antioxidante (Fig. 13).

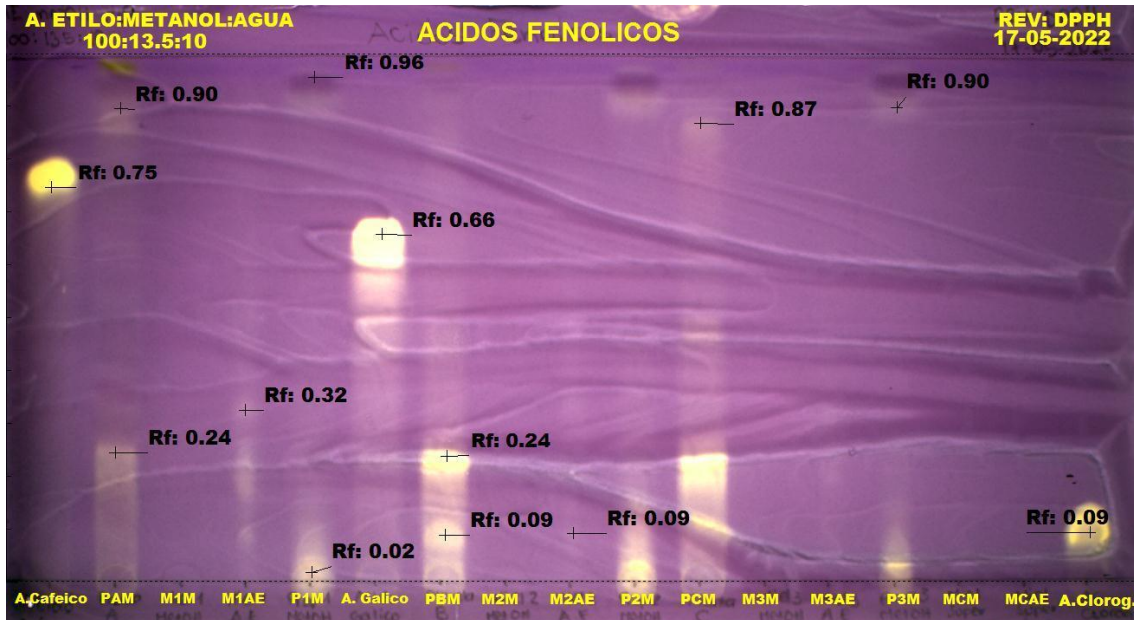


Figura 13. Ácidos fenólicos con actividad antioxidante revelada con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en el visible.

4.1.2 Identificación de Flavonoides Mediante TLC

En las figuras 14 y 15, se observaron fracciones del extracto polar para identificar la posición de los flavonoides en la miel, propóleo y la planta Cótág revelados con productos naturales a $\lambda = 366$ nm. Se pudo evidenciar que tanto las plantas, la miel y el propóleo contienen flavonoides (Fig. 14). Según la bibliografía (Zamora, 2017), los tipos de flavonoles con fluorescencia amarilla son la quercetina, miricetina y sus glucósidos; anaranjada corresponde a la flavona luteolina y la amarilla verdosa a la flavona apigenina.

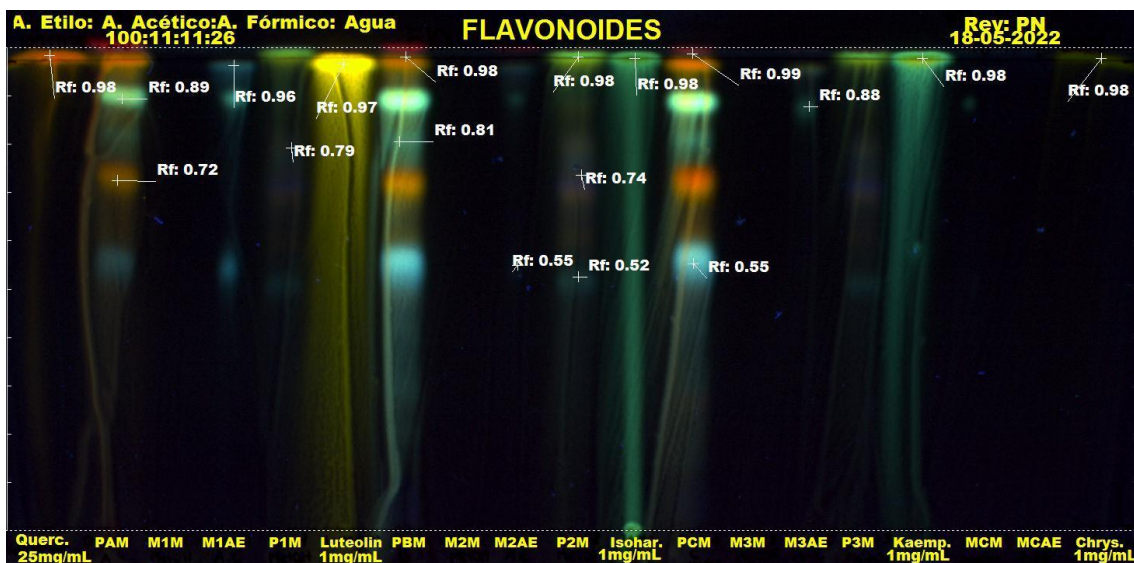


Figura 14. Flavonoides presentes en los extractos polares de miel, propóleo y la planta Cótág revelados con productos naturales a $\lambda = 366$ nm.

La prueba de DPPH para flavonoides (Fig. 15), muestra a los flavonoides que tienen actividad antioxidante, siendo las fracciones metanólicas de *F. verbascifolius* las que presentan más compuestos con esta capacidad, por lo que se puede establecer que esta planta posee mayor cantidad de flavonoides a comparación de ácidos fenólicos, los mismos que presentan gran capacidad antioxidante.

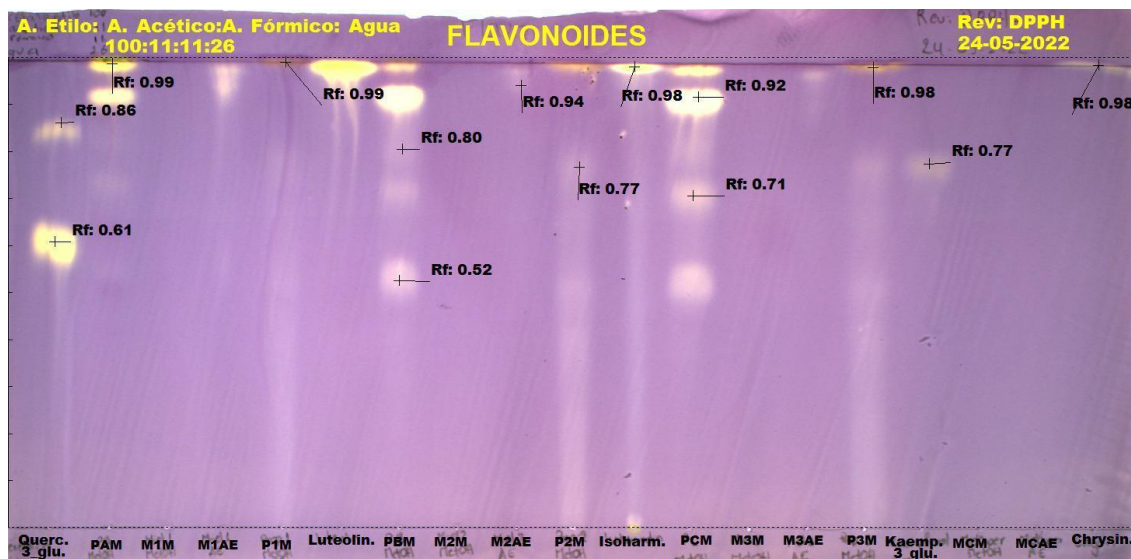


Figura 15. Flavonoides presentes en los extractos polares de miel, propóleo y planta Cótage revelados con DPPH, en el visible.

4.1.3 Identificación de Ceras y Resinas Mediante TLC

Las abejas elaboran el propóleo a partir de resinas y otros materiales vegetales que se encuentran en su entorno por lo que la composición del propóleo variará según la flora del lugar de recolección. Al ser compuestos lipófilos, para su identificación se usó los extractos apolares y las fracciones obtenidas por cloroformo y FSC. Las ceras y las resinas detectadas en extractos apolares de miel, propóleo y la planta Cótage fueron revelados con Vainillina I y II y visualizados en la luz visible. Las bandas reveladas indican que la planta y los propóleos (Fig. 16) tienen en su composición ceras y resinas, por lo que se puede estimar que la planta cótage es proveedora de estos compuestos hacia el producto apícola.

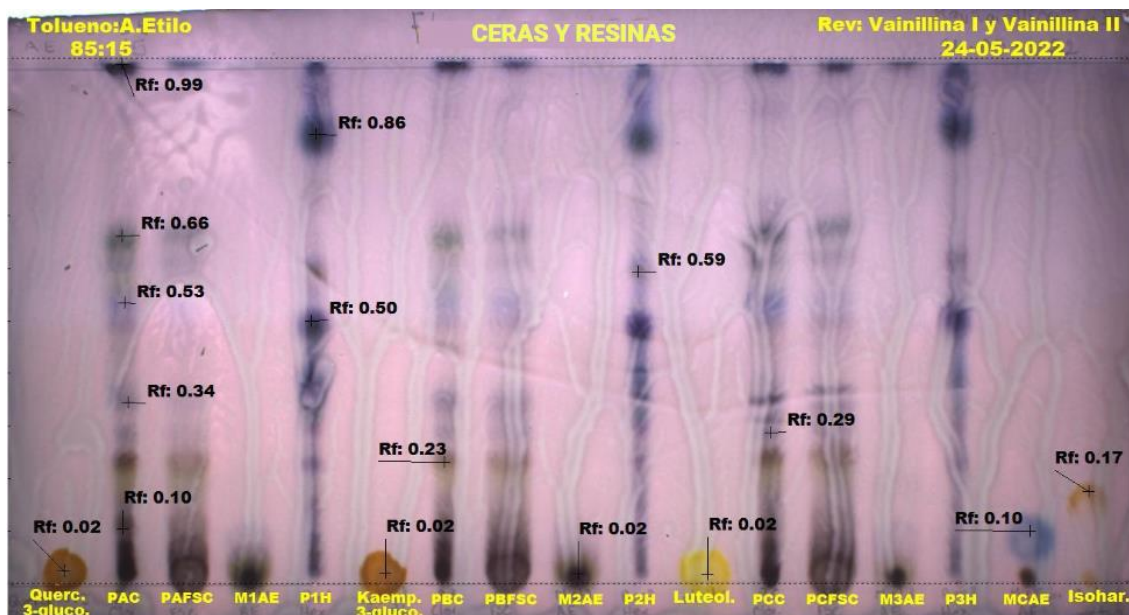


Figura 16. Ceras y resinas detectadas en extractos apolares de miel, propóleo y la planta Cótág revelados con Vainillina I y II en el visible.

4.1.4 Identificación de Cumarinas por TLC

No se observó la presencia de bandas por ninguna marcha cromatográfica realizada, lo que nos indica que probablemente tanto los extractos polares como los apolares se encuentran exentos de cumarinas (Anexo 2).

4.1.5 Identificación de Alcaloides por TLC

Además de la investigación de los polifenoles, también se desarrolló el análisis para la presencia de alcaloides en los extractos polares y apolares. De acuerdo con los resultados existiría presencia de alcaloides en los extractos polares de la planta, y trazas de estas en los propóleos (Fig. 17). La familia *Asteraceae* contiene alcaloides de tipo pirrolizidina, piridina, quinoleína y diterpenoides (Özgen et al., 2004).

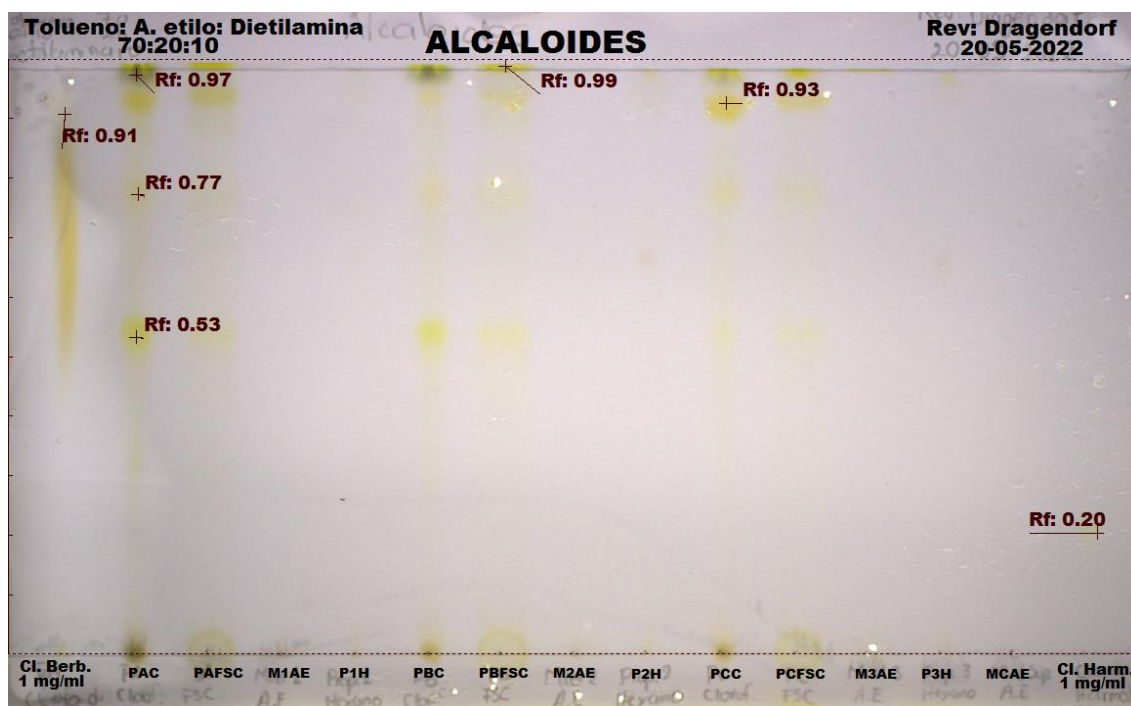


Figura 17. Alcaloides presentes en extractos polares de la miel, propóleo y la planta Cótág revelados mediante el reactivo de Dragendorff en el visible.

4.2 Cuantificación de Polifenoles y Carotenoides por Métodos Espectrofotométricos

Para la realización de las gráficas estadísticas, se consideró las letras sobre las barras (A, B o C), como indicadores de igualdad (misma letra) o diferencia estadísticamente significativa (diferente letra). El punto de corte para considerar diferencia estadísticamente significativa fue un p-value menor a 0,05.

4.2.1 Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu

La determinación del contenido total de polifenoles en la planta *F. verbascifolius*, se realizó en extractos polares y apolares según la metodología indicada en el apartado (3.4.2.1). Para la preparación de los extractos se utilizaron las partes aéreas de la planta (flores y hojas 80:20) recolectada en los puntos A, B y C (3.2.1). Los resultados mostraron que la planta se comporta de forma diferente con los solventes usados para su extracción (metanol, cloroformo y FSC).

El comportamiento en las plantas recolectadas en el punto A es igual en FSC y cloroformo, sin embargo, con metanol su rendimiento mejora significativamente (Fig. 18).

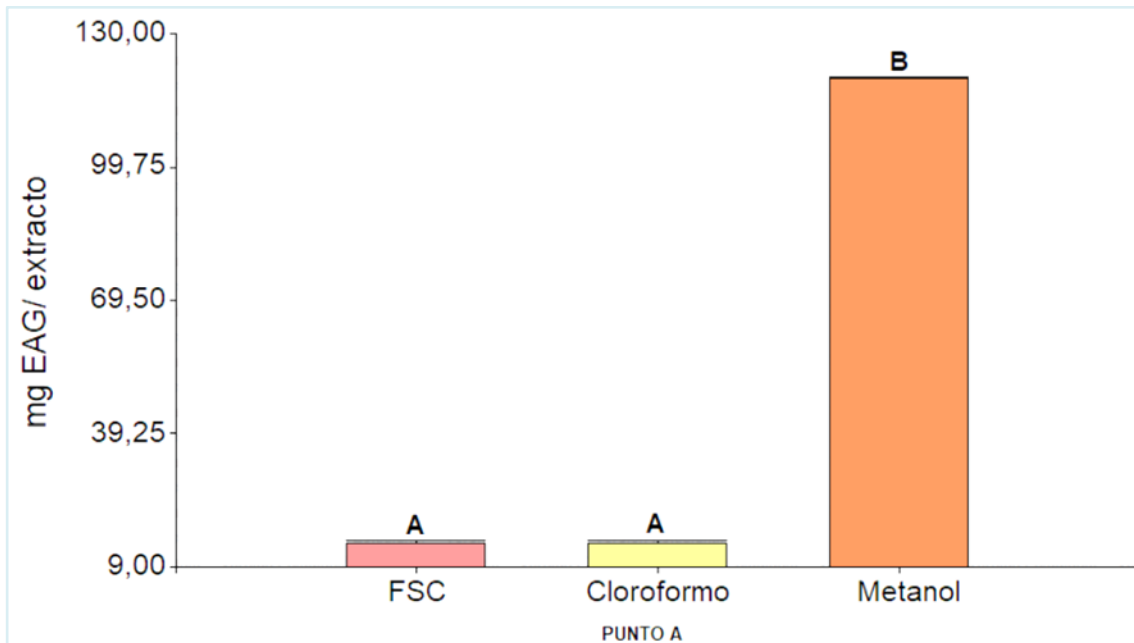


Figura 18. Representación del contenido total de polifenoles presentes en *F. verbascifolius* del punto de recolección A.

En las plantas obtenidas del punto B se observó que una extracción con cloroformo no fue efectiva. Mediante FSC su extracción mejora gradualmente. No obstante, una extracción polar con metanol demostró ser más eficiente (Fig. 19).

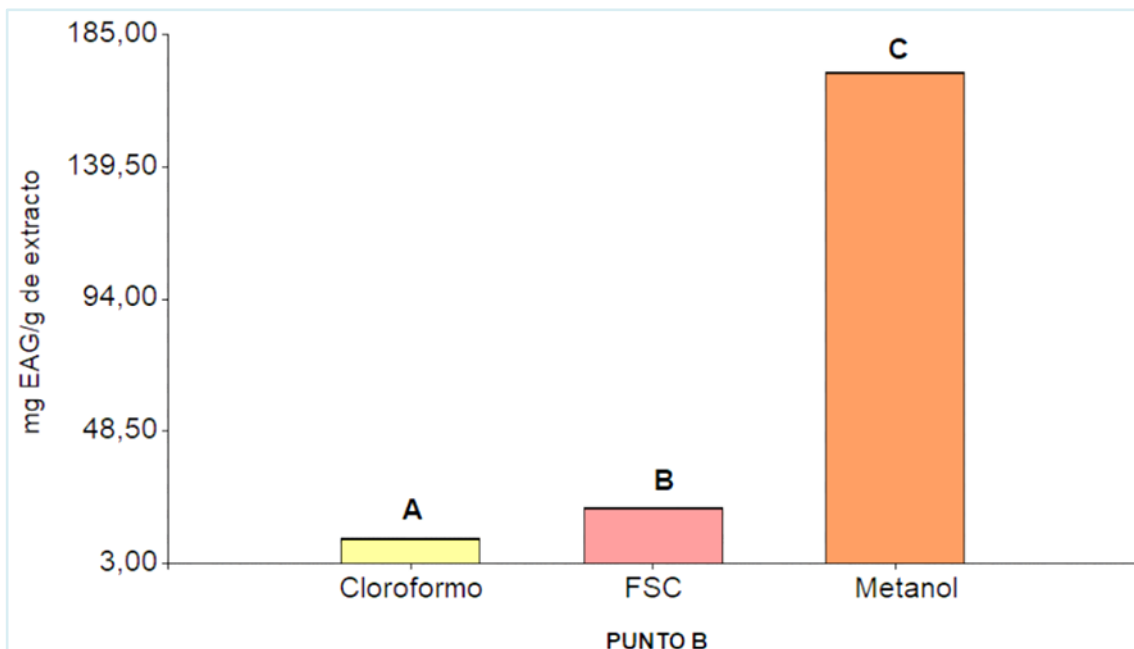


Figura 19. Representación del contenido total de polifenoles presentes en *F. verbascifolius* del punto B.

Las plantas recolectadas en punto C mostraron una extracción favorable con metanol, mientras que con cloroformo y FSC es similar su comportamiento.

Estadísticamente no presentaron diferencias significativas, sin embargo, en promedio las plantas de este punto de recolección presentaron mayor contenido de polifenoles (Fig. 20).

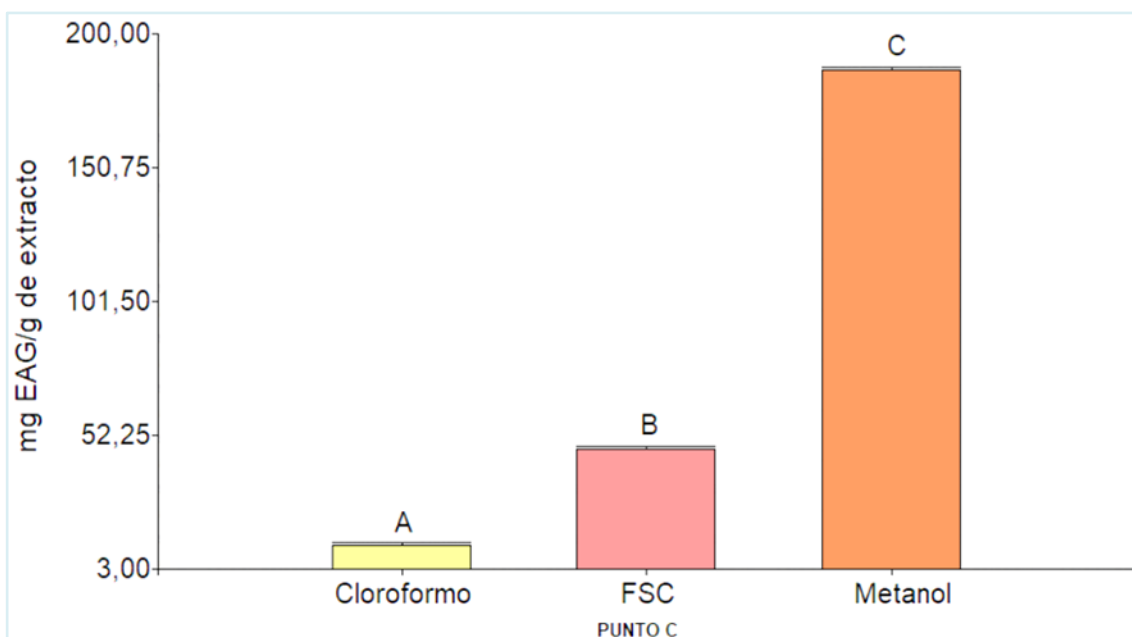


Figura 20. Representación del contenido total de polifenoles presentes en *F. verbascifolius* del punto C.

Los resultados presentados a continuación (Fig. 21) demuestran que los extractos metanólicos de las plantas poseen un mayor contenido de polifenoles totales en las plantas de los tres puntos muestreados.

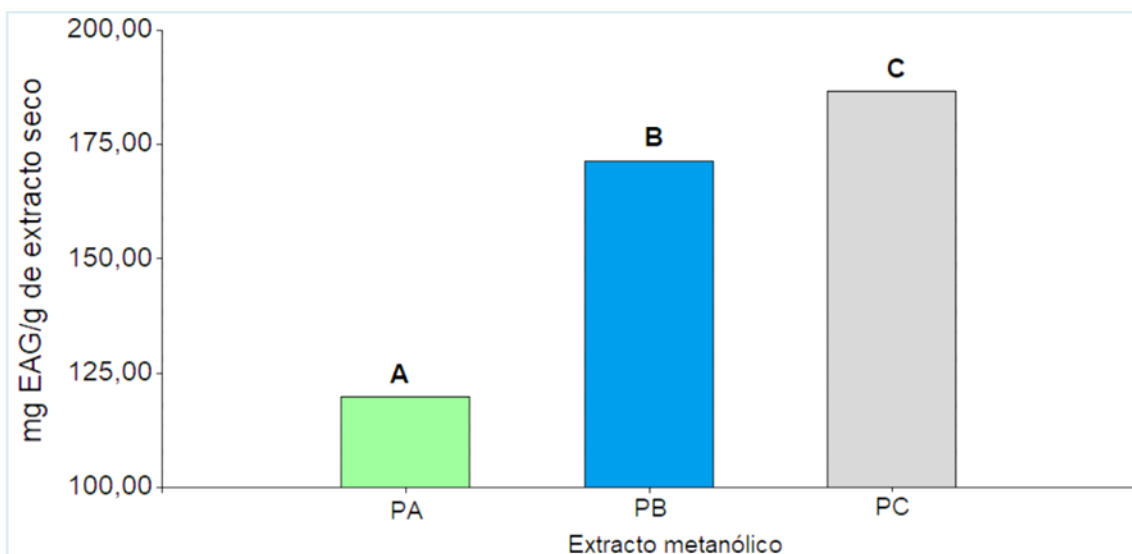


Figura 21. Representación del contenido total de polifenoles presentes en *F. verbascifolius* por extracción metanólica.

En cuanto a la extracción apolar realizada con cloroformo se obtuvo una concentración mínima de polifenoles (Fig. 22). Cabe mencionar que no se

encontró ningún estudio fitoquímico sobre *F. verbascifolius*, sin embargo, existen algunos estudios sobre la familia *Asteraceae*. Por ejemplo, un estudio realizado por Özgen et al. (2004) reporta que la extracción metanólica para 6 plantas de la familia *Asteraceae* tienen mayor rendimiento para el análisis de la capacidad antioxidante. La familia *Asteraceae* a la cual pertenece el Cótage, es la mayor familia con flores y contiene unos 900 géneros y unas 13.000 especies; lo cual indicaría la gran variedad de componentes químicos. Según nuestros resultados la concentración de polifenoles en la planta *F. verbascifolius* fue de 66,55 mg EAG/g de extracto seco.

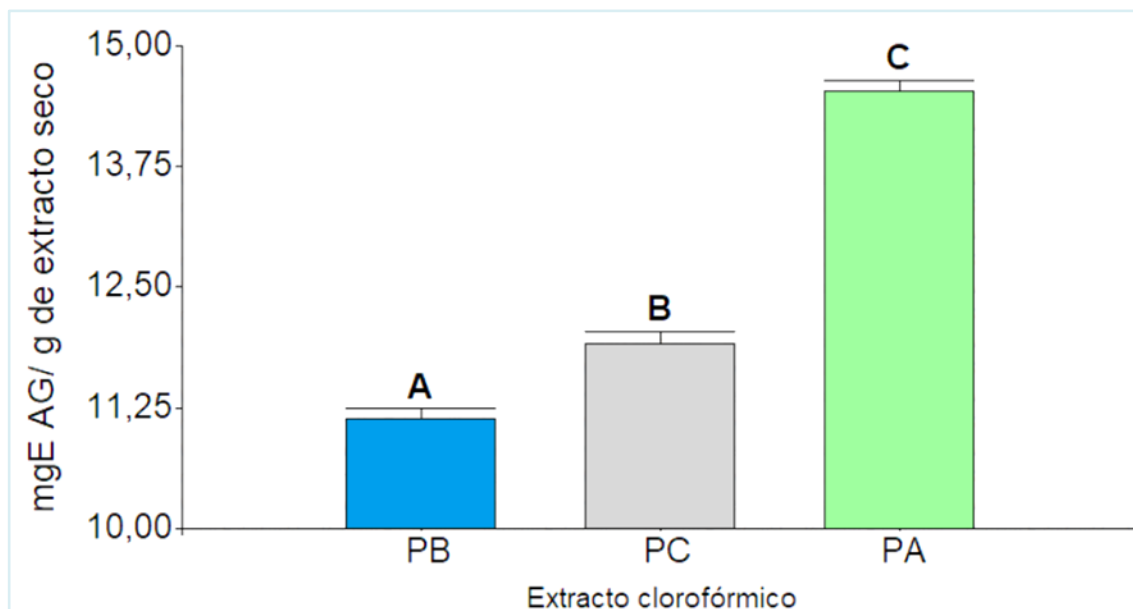


Figura 22. Representación del contenido total de polifenoles presentes en *F. verbascifolius* por extracción clorofórmica.

La extracción por fluidos supercríticos muestra un arrastre intermedio de polifenoles entre la extracción polar con metanol y la extracción apolar con cloroformo, por lo que no se consideraría como la mejor técnica para la extracción de polifenoles totales en este vegetal (Fig. 23).

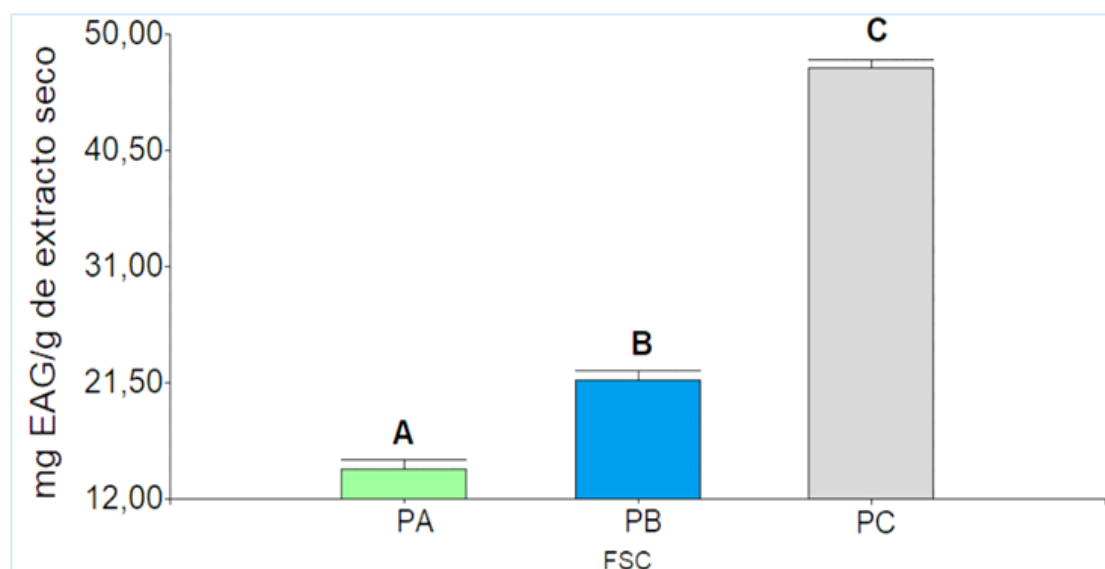


Figura 23. Representación del contenido total de polifenoles presentes en *F. verbascifolius* por extracción mediante FSC.

En base a los valores obtenidos se pudo concluir que el método de extracción polar con el solvente metanol fue el más eficiente para la indagación de polifenoles pequeños con actividad antioxidante.

Por otro lado, para la determinación de polifenoles totales en la miel se realizó una extracción apolar con acetato de etilo siguiendo la metodología explicada en (3.3.2.1). El contenido de polifenoles totales en la miel fue de 0,020 mg EAG/g de miel (Fig. 24), cuyo valor se encuentra dentro de los valores reportados en la bibliografía, según Istasse et al. (2016), la concentración de polifenoles en la miel oscilaría entre el 0,02-0,17 mg EAG/g de miel.

La miel de abeja contiene compuestos fenólicos porque, durante su producción, las abejas mezclan sus fluidos corporales con los néctares de las flores o secreciones de las plantas que están compuestos por agua, azúcares, aminoácidos y compuestos fenólicos (Jibril et al., 2019). Al igual que en las plantas, los compuestos fenólicos son compuestos claves responsables de la actividad antioxidante de la miel.

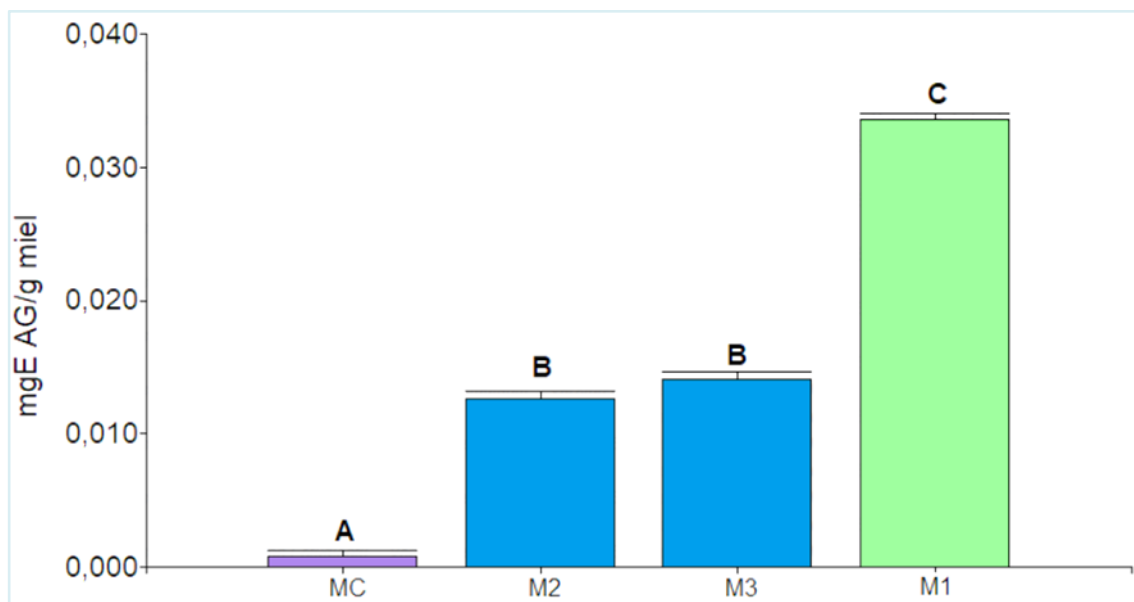


Figura 24. Representación del contenido total de polifenoles presentes en la miel.

En cuanto al análisis del contenido de polifenoles totales en el propóleo se utilizó la extracción polar con metanol según lo indicado en el apartado **3.3.2.2**. El propóleo de los apiarios localizados en el punto B, muestran variación entre ellas, por lo que se podría deber a que los apiarios estaban en diferentes ubicaciones. El propóleo obtenido del apiario localizado en el punto A, tiene una concentración de compuestos fenólicos intermedia entre los propóleos del sector B (Fig. 25). En cuanto al contenido medio de polifenoles totales en el propóleo fue de 10,26 mg EAG/g de propóleo seco.

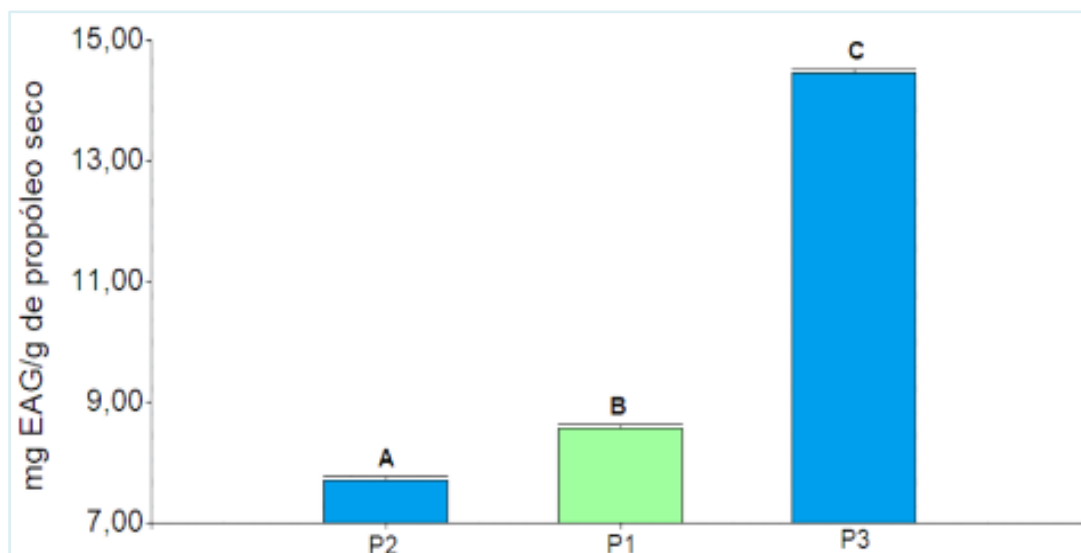


Figura 25. Representación del contenido total de polifenoles presentes en el propóleo en seco.

Para estimar la presencia de metabolitos secundarios de *F. verbascifolius* en los productos apícolas se comparó los contenidos de polifenoles totales de la planta con la miel y el propóleo. Al relacionar las plantas recolectadas del punto A con

las muestras de miel y propóleo tomadas del centro apiario que se encontraba dentro de este punto se pudo observar que no existe una relación entre el contenido de polifenoles de la planta con el de la miel y el propóleo, sin embargo, no sucede lo mismo entre estas últimas, en las cuales no hay diferencias significativas entre ellas; de igual manera sucede con las muestras tomadas del punto B, donde se presenta exactamente la misma situación (Fig. 26).

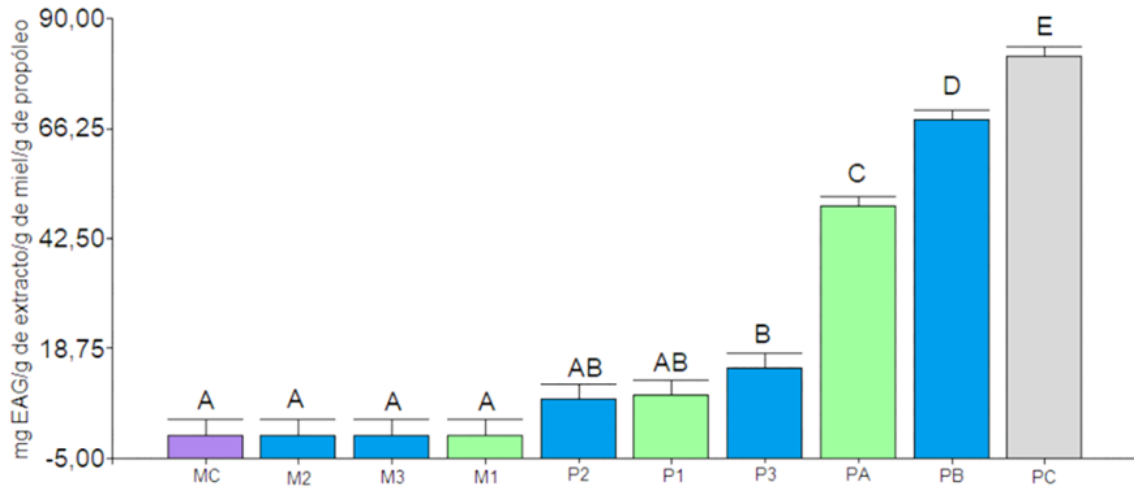


Figura 26. Representación del contenido total de polifenoles en las muestras apícolas y en la planta sin considerar solvente de extracción.

La fuente botánica de la cual la abeja sustrae el néctar es determinante para la composición y las propiedades de la miel y el propóleo (Becerril et al., 2021). La proporción de polifenoles en la miel está directamente relacionada con el tipo de vegetación, y el periodo de floración de las plantas de la región geográfica en la que se encuentra ubicado el apiario. En la tabla 4 se pueden observar las cuantificaciones de polifenoles totales. Aunque las abejas trabajan solamente en una clase de planta a la vez, es muy probable que se encuentre néctar de varios tipos de plantas en la mayoría de las mieles (Dadant, 1975). Las mieles presentan una gran variabilidad en cuanto a color, aroma, sabor, humedad, hidroximetilfurfural, enzimas, etc., características que le confieren parámetros de identidad a cada una, y de acuerdo con ellas son apreciadas en mayor o menor grado por los consumidores (Stanek, & Jasicka, 2018).

Tabla 4.

Resumen de los grupos de Tukey de los análisis de la concentración de polifenoles en las muestras vegetales y de los productos apícolas.

<p>Resumen de los Grupos de Tukey de los análisis en las muestras vegetales</p>
--

ÁREA DE RECOLECCIÓN- Método extractivo		Concentración de polifenoles (media)	Agrupación Tukey		
Punto A					
	FSC	14,468	A		
	Cloroformo	14,529	A		
	Metanol	119,793		B	
Punto B					
	Cloroformo	11,131	A		
	FSC	21,760		B	
	Metanol	171,436			C
Punto C					
	Cloroformo	11,916	A		
	FSC	47,242		B	
	Metanol	186,647			C
MÉTODO EXTRACTIVO- Área de recolección					
Metanol					
	Punto A	119,793	A		
	Punto B	171,436		B	
	Punto C	186,647			C
Cloroformo					
	Punto A	14,529			C
	Punto B	11,131	A		
	Punto C	11,916		B	
FSC					

	Punto A	14,468	A		
	Punto B	21,760		B	
	Punto C	47,242			C
Resumen de los Grupos de Tukey de los análisis en las muestras apícolas					
MIELES		Concentración de polifenoles (media)mg EAG/g (miel ó propóleo)	Agrupación Tukey		
Miel C		0,000	A		
Miel 2		0,013		B	
Miel 3		0,014		B	
Miel 1		0,033			C
PROPÓLEOS					
Propóleo 2		7,707	A		
Propóleo 1		8,579		B	
Propóleo 3		14,471			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla nueva

Representación del contenido total de polifenoles en las muestras apícolas y en la planta sin considerar solvente de extracción.

Muestra	Concentración (media)	Agrupación de Tukey				
Miel control	0,000	A				
Miel 2	0,013	A				
Miel 3	0,014	A				
Miel 1	0,033	A				
Propóleo 2	7,707	A	B			
Propóleo 1	8,579	A	B			
Propóleo 3	14,471		B			
Planta A	49,60			C		
Planta B	68,11				D	
Planta C	81,93					E

4.2.2 Cuantificación de Carotenoides Mediante Técnica de Microplacas y Lector de ELISA

Se siguió la metodología indicada en el apartado 3.4.2.2 tanto para los extractos polares y apolares de las muestras. El contenido de carotenoides, en mg/g de peso seco, para cada muestra y extracto se resume en la Tabla 5, mientras que los resultados obtenidos del análisis se presentan a continuación a manera de gráficas estadísticas.

Tabla 5. Concentración de carotenoides en las muestras.

Muestra	Tipo de Extracto	Contenido de carotenoides (mg/g de peso seco)	Agrupaciones de Tukey		
Planta A	Metanol	5,30			
	Cloroformo	3,49			
	FSC	2,43			
Planta B	Metanol	1,77			
	Cloroformo	2,46			

	FSC	2,04			
Planta C	Metanol	0,99			
	Cloroformo	1,19			
	FSC	2,00			
Miel 1	Metanol	0,21			
	Acetato de etilo	-			
Miel 2	Metanol	-			
	Acetato de etilo	-			
Miel 3	Metanol	-			
	Acetato de etilo	0,34			
Miel Comercial	Metanol	-			
	Acetato de etilo	-			
Propóleo 1	Metanol	-			
	Hexano	-			
Propóleo 2	Metanol	0,14			
	Hexano	-			
Propóleo 3	Metanol	0,12			
	Hexano	-			

-: ausencia de carotenoides.

4.2.2.1 Muestras vegetales

- **Contenido de carotenoides en solventes apolares**

Se determinó que el contenido de carotenoides difería dependiendo solamente del tipo de extracto apolar (cloroformo y FSC), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos, lo que indicaría que son

equiparables. Por lo tanto, se procedió a la comparación de la concentración del metabolito en cada una de las muestras vegetales, sin diferenciarlas de acuerdo al solvente. Lo que se pudo apreciar en los resultados (Fig. 27) fue que la planta A es la que mayor cantidad del metabolito de estudio posee, seguida de la planta B, mientras que la muestra control fue la que menos concentración reportó.

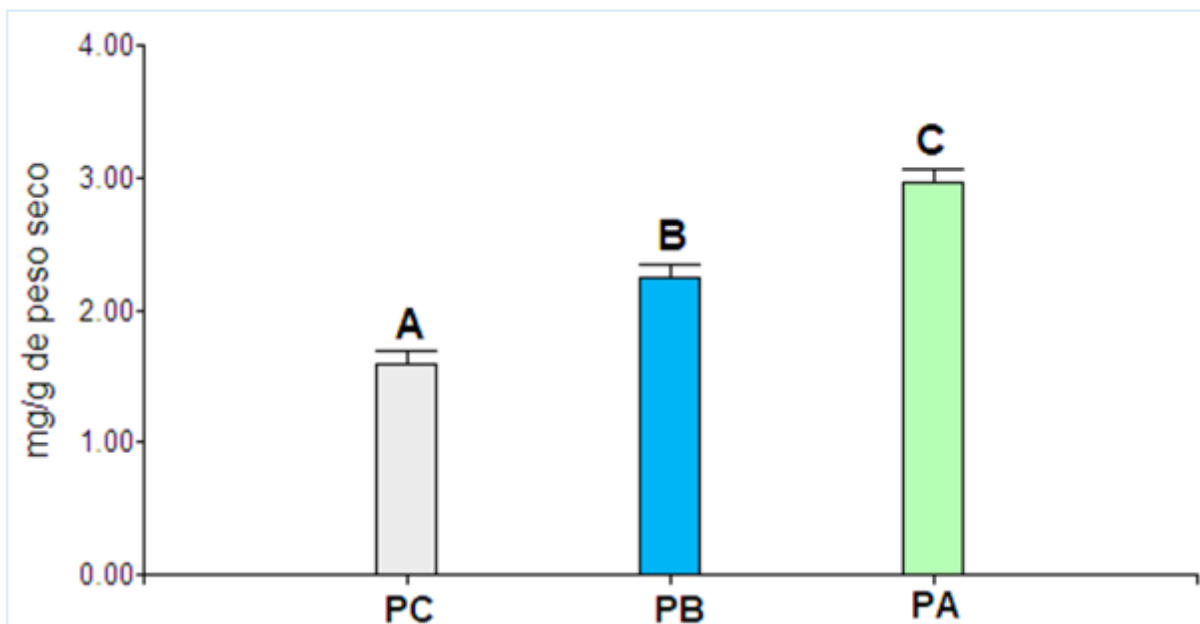


Figura 27. Contenido de carotenoides en extractos apolares de las plantas (cloroformo y FSC).

De acuerdo a lo obtenido en el apartado anterior, se decidió comparar en conjunto la cantidad de carotenoides extraídos y el tipo de solvente de cada una de las muestras, lo cual indicó que el cloroformo fue el mejor solvente de extracción apolar, seguido por fluidos supercríticos (Fig. 28). Además, la planta A en extracto clorofórmico presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a contenido a comparación con el resto de las muestras, mientras que el extracto por FSC de esta, junto con la planta B en cloroformo son estadísticamente igual, pero diferentes a los extractos por FSC de la planta B y C (estadísticamente iguales) y a la planta control en cloroformo.

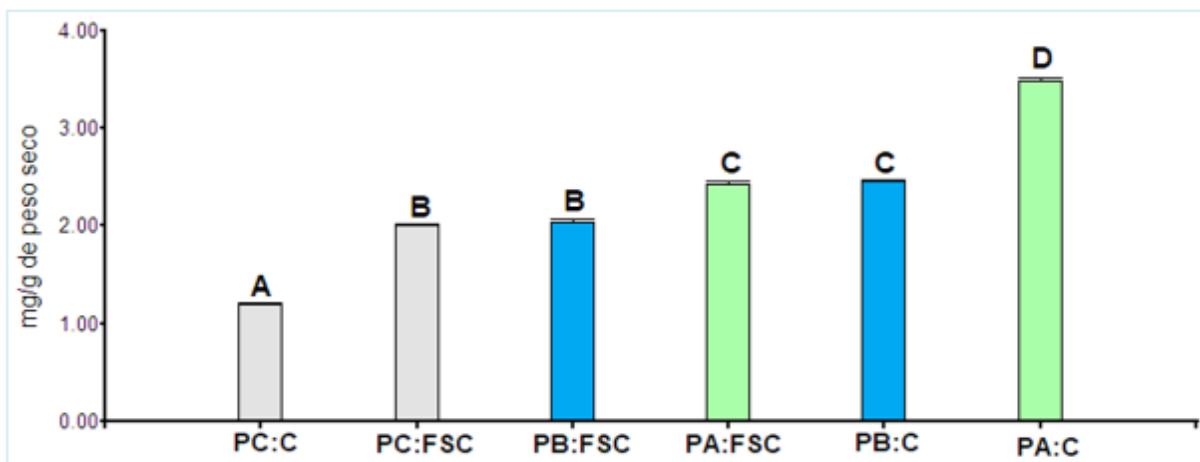


Figura 28. Contenido de carotenoides por planta y solvente de extracción.

- **Contenido de carotenoides en solventes polares**

Al comparar el contenido de carotenoides en los extractos metanólicos de las plantas, se observó que, al igual que con los extractos apolares, la planta A es la que mayor concentración del metabolito presentó, inclusive mayor que la reportada para los extractos apolares (Fig. 29). Este hecho difirió para el resto de las muestras, puesto que según la figura 30 valores más elevados de carotenoides fueron obtenidos en los extractos apolares tanto para la planta B como para el control o planta C.

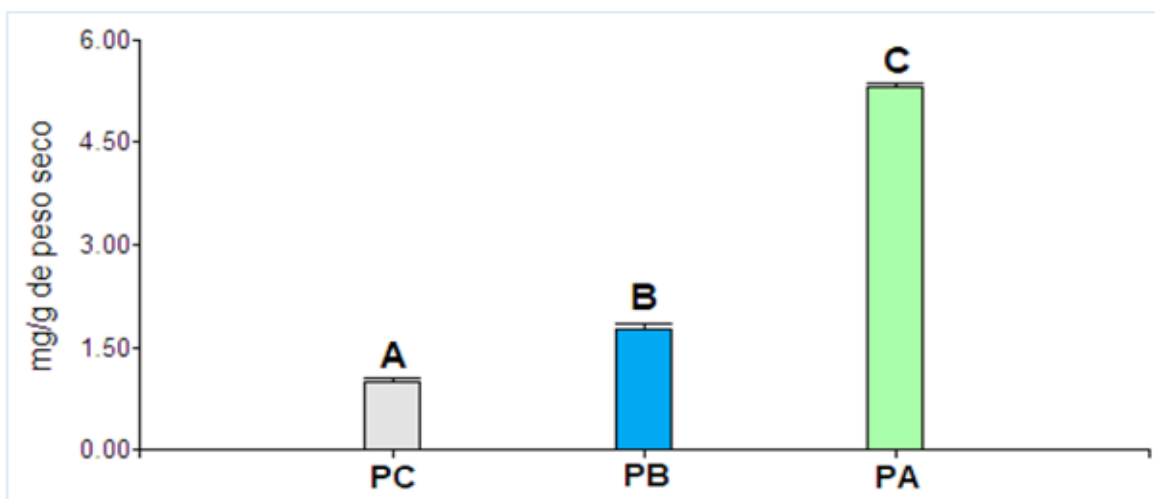


Figura 29. Carotenoides en extractos polares de las plantas.

- **Comparación del contenido de carotenoides según los tres métodos de extracción**

Se realizó una comparación en la concentración de carotenoides extraídos por tipo de solvente, sin embargo, los datos no resultaron significativos, por lo que se procedió a comparar los resultados obtenidos individualmente para cada extracto, como se detalla a continuación.

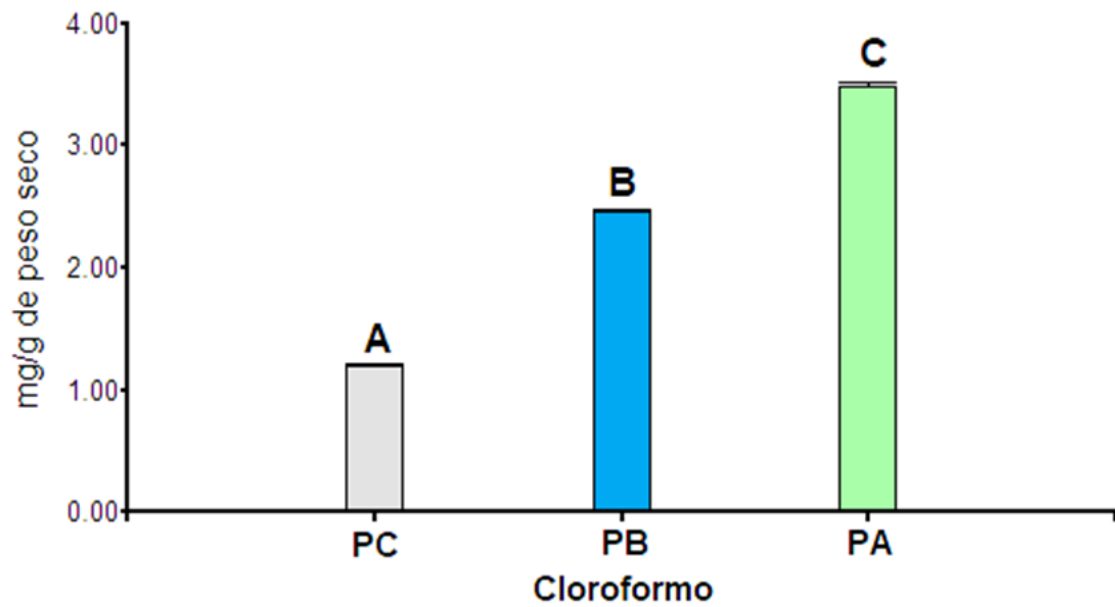


Figura 30. Contenido de carotenoides en plantas mediante extracción en cloroformo.

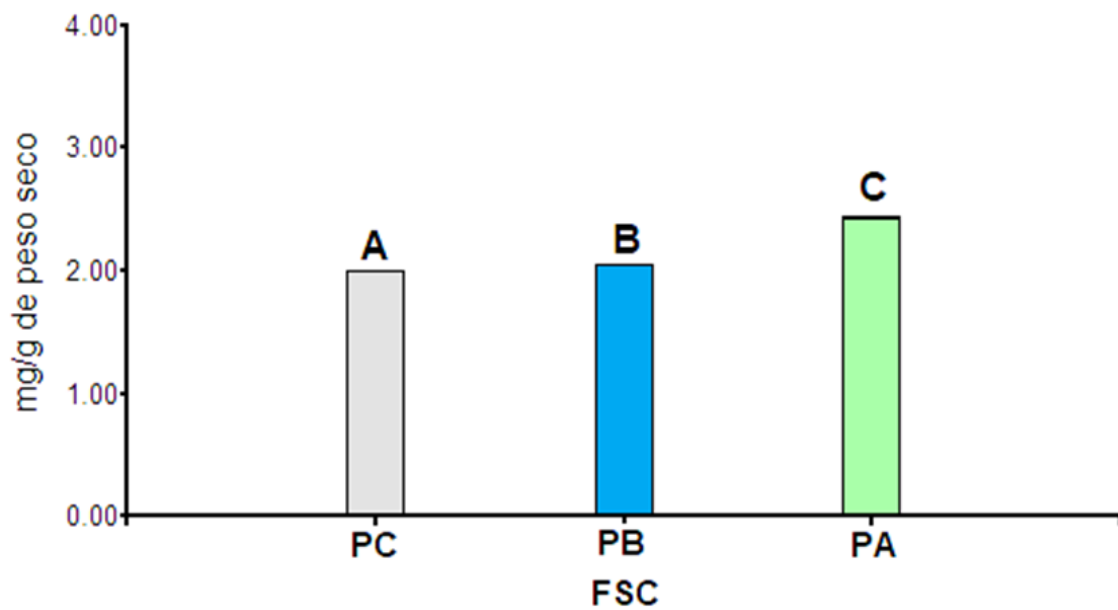


Figura 31. Contenido de carotenoides en plantas mediante extracción por FSC.

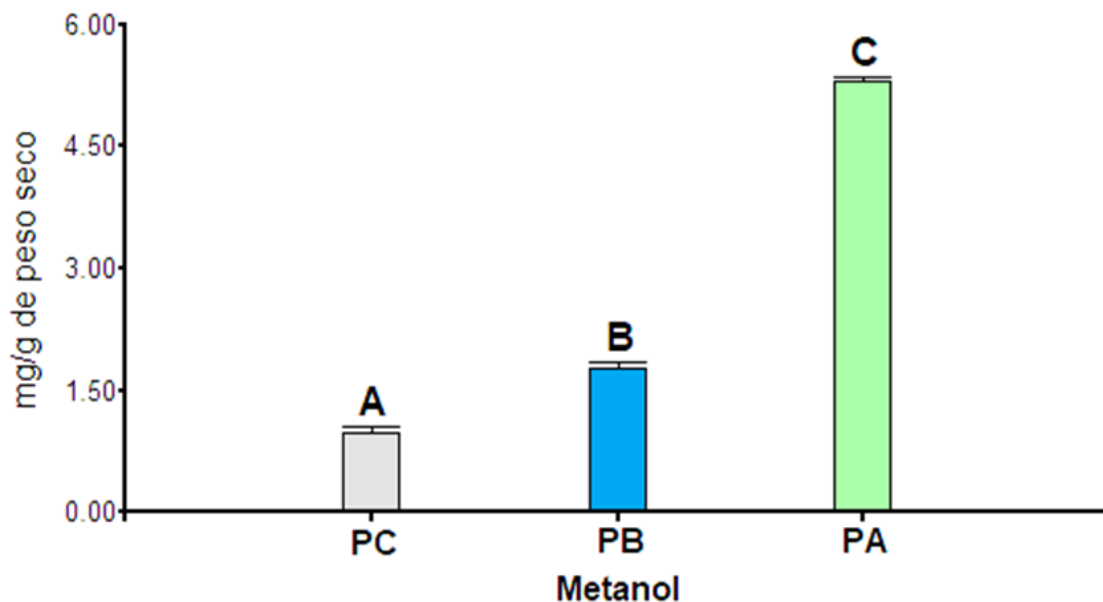


Figura 32. Contenido de carotenoides en plantas mediante extracción en metanol.

Como se puede observar, la concentración de carotenoides en las muestras vegetales varía de acuerdo con el solvente de extracción empleado, presentando la peculiaridad de que el solvente de extracción que se consideraría óptimo no es el mismo para todas las muestras. Según los datos de la tabla 5, y siguiendo las figuras 31, 32 y 33, el solvente de mayor extracción de carotenoides para la planta A fue el metanol, mientras que para la planta B fue cloroformo y para el caso de la planta C fue con CO₂.

Debido a su naturaleza hidrofóbica, los carotenoides se extraen convencionalmente utilizando disolventes orgánicos, sin embargo, para la planta A el mejor disolvente resultó ser el metanol, un compuesto polar. Esto se explica según Saini & Keum (2018), debido a la presencia de diversos conjuntos de carotenoides con distintos niveles de polaridad, razón por la cual normalmente los disolventes no polares, como el hexano, el éter de petróleo o el tetrahidrofurano (THF), son una excelente opción para la extracción de carotenos no polares o xantofilas esterificadas, mientras que los disolventes polares, como el metanol, el etanol, la acetona y el diclorometano, son más apropiados para la extracción de carotenoides polares (astaxantina y cis-astaxantina). Lo que explicaría la variabilidad en cuanto al solvente de extracción ideal en nuestros análisis.

Según estudios, la polaridad de los carotenoides genera una barrera hidrofóbica en la membrana para las moléculas polares y los iones, al igual que una barrera para las pequeñas moléculas no polares. En consecuencia, esto permite proteger las cadenas alquílicas de los efectos adversos de los oxidantes. Una de las características de los carotenoides polares consiste en anclarse en la región de la cabeza a ambos lados de la membrana celular, lo que provoca una

disminución de la fluidez, o movimientos moleculares, de las membranas biológicas (Li et al., 2022).

En las figuras 30, 31 y 32, se pudo observar la tendencia que tienen los resultados en cuanto a la planta A con el mayor contenido dentro del grupo, independientemente del solvente, seguida por la planta B y finalmente la planta de control, con el menor contenido reportado. Sin embargo, se debe recordar que las plantas al ser organismos complejos se ven afectadas por factores ambientales, edad de la planta, estrés, interacción con herbívoros, nutrición e incluso pequeños cambios en la diversidad genética, lo que puede producir cambios excepcionalmente grandes en el metabolismo secundario de cada individuo (Pais et al., 2018; Sepúlveda et al., 2018).

4.2.2.2 Productos Apícolas

- Miel

De todas las muestras de miel analizadas, la miel 1 en metanol y la miel 3 en acetato de etilo reportaron contenido de carotenoides; el resto de las muestras, como se detalla en la tabla 5, se reportó como ausencia del compuesto, puesto que los valores obtenidos mediante las absorbancias resultaron ser negativos.

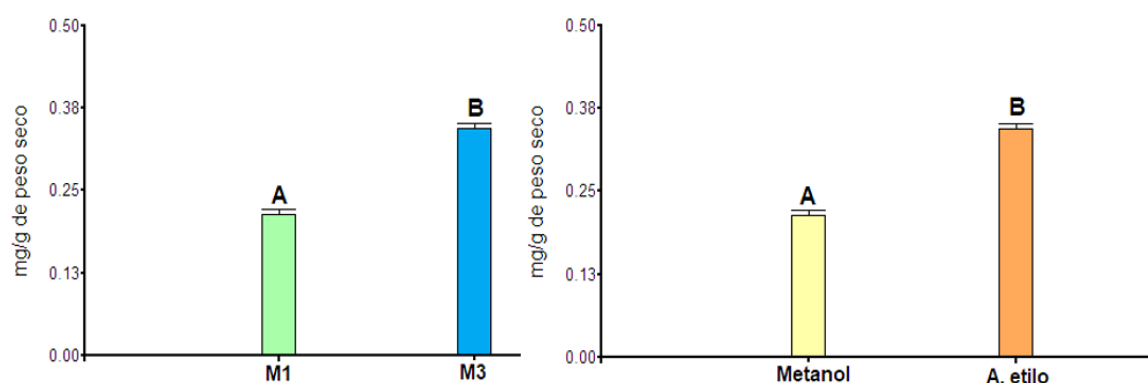


Figura 33. Contenido de carotenoides en la muestra de miel 1 en metanol y miel 3 en acetato de etilo.

El contenido de carotenoides en las muestras de miel presentó una marcada diferencia, puesto que de las muestras extraídas con solvente polar (metanol), solamente la miel 1 reportó el metabolito de interés (Fig. 33), aunque en una muy baja concentración. Por otra parte, de las mieles extraídas mediante solvente apolar (acetato de etilo), solamente la miel 3 presentó carotenoides. De esta misma figura se puede concluir de igual manera que el mejor solvente de extracción fue el acetato de etilo. Sin embargo, como en el caso del contenido de carotenoides en plantas, el hecho de que la miel 1 posea metabolitos solamente extraídos en metanol indicaría que en ella se encuentran presentes

carotenoides oxigenados, denominados xantofilas, como la luteína y la zeaxantina; mientras que en la miel 3 sucede lo contrario, puesto que los metabolitos extraídos corresponden al grupo de carotenos no oxigenados, como el β -caroteno y licopeno (Saini & Keum, 2018; Swapnil et al., 2021).

- **Propóleo**

Al igual que en las muestras de miel, del análisis de todos los extractos, solamente dos muestras, el propóleo 2 y propóleo 3 en metanol resultaron tener una baja cantidad de carotenoides, 0,14 y 0,12 mg/g de peso seco, respectivamente (Fig. 34).

- **Comparación del contenido de carotenoides en los productos apícolas**

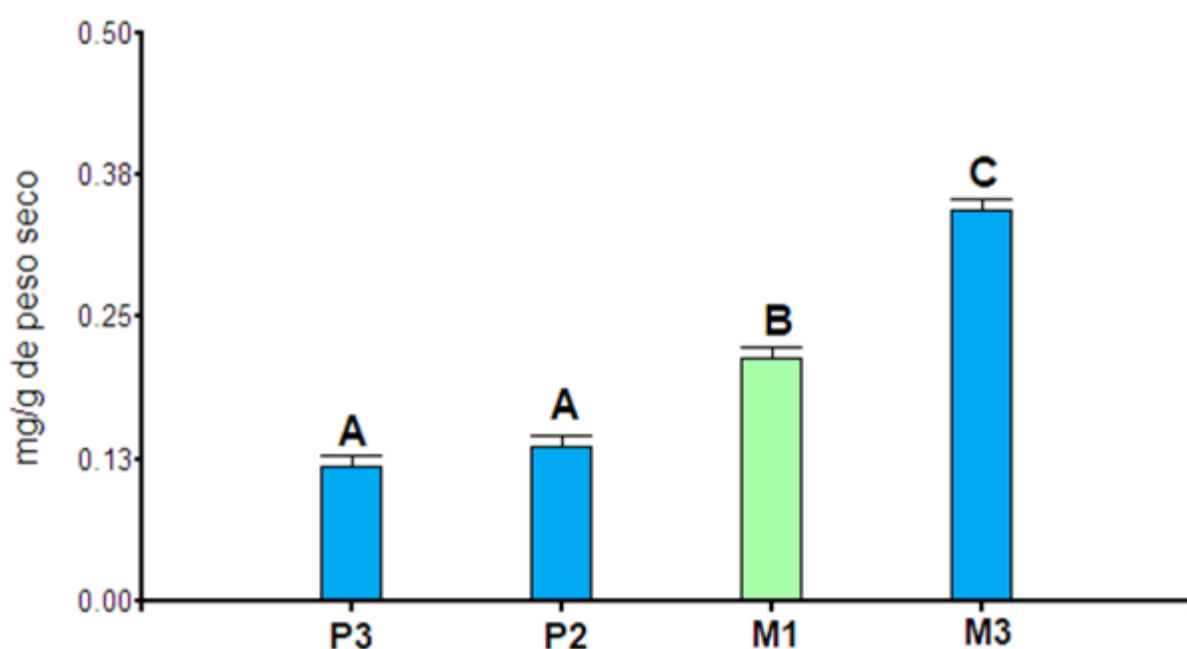


Figura 34. Contenido de carotenoides en miel y propóleo.

Al comparar los dos tipos de subproductos apícolas analizados (Fig. 35), se encontró que los propóleos no presentan diferencia significativa entre ellos, además de ser las muestras con menor contenido de carotenoides; mientras que tanto la miel 1, como la miel 3 resultaron ser diferentes tanto a los propóleos, como entre ellas, siendo la miel 3 la que más cantidad del metabolito posee.

- **Comparación del contenido de carotenoides de plantas vs. productos apícolas**

Se realizó una comparación global de las muestras de plantas junto con la miel y el propóleo (Fig. 35), donde se observó que las muestras vegetales son las que contienen mayor contenido de carotenoides, mientras que los productos apícolas

reportaron mucho menos contenido, además de no presentar diferencias entre ellos en este análisis.

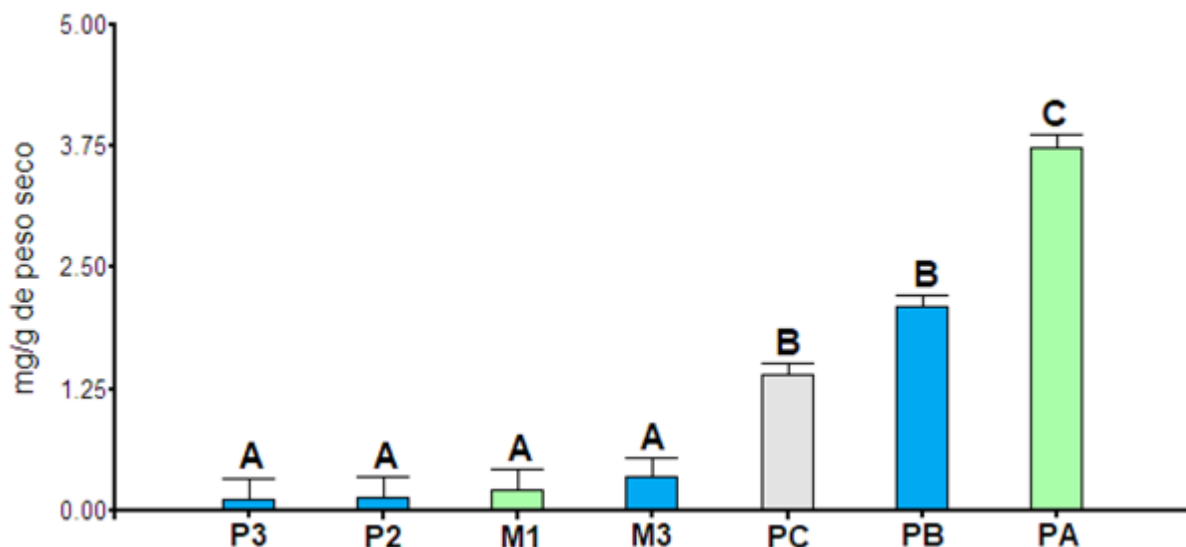


Figura 35. Contenido de carotenoides en todas las muestras analizadas, tanto vegetales como apícolas.

Relacionando cada una de las plantas con su correspondiente producto apícola, la miel 1 presentó carotenoides en el extracto metanólico y la planta A tuvo mayor concentración en ese mismo extracto, por lo que se diría que existe una correlación entre la miel 1 y la planta A. En cuanto a la planta B, solamente la miel 3 fue la que reportó carotenoides mientras que ambos propóleos pertenecientes a la zona de recolección (propóleo 2 y 3) presentaron el metabolito en concentraciones bastante similares (Tabla 5) y aunque el solvente de extracción fue diferente, tanto la miel como la planta tuvieron mayor contenido en el extracto apolar, hecho en el cual difirió el propóleo, puesto que su mejor solvente de extracción fue metanol.

4.3 Propiedades Nutraceuticas

En base a los resultados de todos los análisis anteriores, la asociación de fitocompuestos de *F. verbascifolius* con los productos apícolas resultó mayor en el contenido de polifenoles, sobre todo de la muestra de miel 1 y propóleo 3 (Tabla 6). Esto nos indicó que tanto las mieles como los propóleos producidos por abejas que se alimentan de Cótage (*F. verbascifolius*) pueden tener un potencial nutraceutico, principalmente como antioxidantes, en comparación a mieles comerciales, cuyo contenido de metabolitos secundarios como polifenoles y carotenoides resultó ser nulo.

Tabla 6. Puntos de recolección con mayor contenido de polifenoles

Método de detección	Resultados	Posible uso nutraceutico
---------------------	------------	--------------------------

Ensayo de Folin-Ciocalteu	Mayor composición de polifenoles totales en las muestras de Miel 1 y Propóleo 3.	Capacidad antioxidante.
TLC	Ácidos fenólicos: ácido clorogénico. Flavonoides.	Según la bibliografía el ácido clorogénico tiene capacidad antioxidante, hipoglicemiante, antiviral, hepatoprotectora y nutraceútica (Chaves & Esquivel, 2019).

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se asoció los componentes del arbusto Cóttag (*F. verbascifolius*) con los dos productos apícolas analizados, miel y propóleo, encontrándose probablemente compuestos del tipo ácidos fenólicos (ácido clorogénico) y flavonoides (kaempferol 3-glucurónido), tanto en las muestras vegetales como apícolas, variando solamente en su concentración, siendo mayor en las plantas, seguido de los propóleos y mínimos en las mieles. Como estas moléculas no son aportadas por parte de las abejas, y al demostrar su presencia en el arbusto Cóttag, se consideró que pasan directamente de la planta a los productos de la colmena.
- En cuanto a la comparación de los metabolitos secundarios de las flores y hojas de *Ferreyranthus verbascifolius* obtenidos mediante extracción polar y apolar, se concluyó que en los extractos polares de las muestras de Cóttag se encontraron varios compuestos como flavonoides y ácidos fenólicos, y en menor cantidad carotenoides oxigenados. Por otro lado, al evaluar los extractos apolares mediante TLC, se descubrió metabolitos apolares que no se pudieron identificar en este trabajo, pero que podrían corresponder a flavonoides grandes o glicósidos. Además, los carotenoides presentes en estos extractos hidrofóbicos corresponderían al tipo no oxigenado. Por lo tanto, como método de extracción de polifenoles pequeños con actividad antioxidante consideramos más eficiente el solvente metanol.
- Al estimar los metabolitos secundarios de *F. verbascifolius* presentes en los productos apícolas, aplicando estrategias cromatográficas y espectrofotométricas, se encontró polifenoles totales en todas las muestras analizadas, presumiblemente del tipo ácido clorogénico y el kaempferol 3- glucurónido, que están en la miel y el propóleo. Sin embargo, no se puede establecer una relación directa puesto que otras especies vegetales de la zona también podrían contener estos compuestos. En cuanto al contenido de carotenoides que aporta la planta a los productos apícolas, visto que en la mayoría de los extractos resultaron no ser detectables, se considera que la contribución se realiza a nivel de trazas.
- En base a lo anterior, se deduce que tanto la miel como el propóleo pueden ser considerados como productos nutracéuticos, sobre todo por su actividad antioxidante. Sin embargo, dada la variación en la composición evidenciada en este trabajo, resulta necesaria una estandarización del producto, con lo cual se garantizará al consumidor la

cantidad adecuada de sustancias con fines beneficiosos para el organismo.

5.2 Recomendaciones

- Se sugiere realizar más investigaciones con respecto a la optimización del método de extracción mediante fluidos supercríticos (FSC) para el arbusto Cóttag (*F. verbascifolius*), dado que la técnica empleada en este trabajo se basó solamente en un protocolo estándar para obtener y comparar resultados con otras técnicas extractivas.
- Puesto que el presente trabajo analizó solamente miel y propóleo, resultaría interesante investigar la presencia de metabolitos secundarios de *F. verbascifolius* en los demás productos apícolas disponibles en el mercado, como son el polen, la jalea real y la cera; además del empleo de técnicas analíticas mucho más específicas, como la capacidad antioxidante de carotenoides, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o un análisis integral de la huella dactilar por HPTLC (comprehensive HPTLC fingerprinting).
- De igual manera, ya que se empleó tres muestras, tanto de planta como de productos apícolas, se recomienda que en futuros trabajos se amplíe el tamaño muestral con el fin de disminuir posibles sesgos y aumentar la sensibilidad de las pruebas estadísticas.

Anexos

- Anexo 1

Marcha Fitoquímica por TLC

Ácidos fenólicos

Muestras	Código	PAM	M1M	M1AE	P1M	PB M	M2 M	M2A E	P2 M	PC M	M3 M	M3A E	P3 M	M C M	MC AE
	Concentración (mg/mL)	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	2,5	5
Patrones	Ácido caféico (PONER CONCENTRACIÓN) Ácido gálico Ácido clorogénico														
Fase móvil	Acetato de etilo: metanol: agua (100:13,5:10).														
Revelador	Productos naturales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)														

Flavonoides

Muestras	Código	PAM	M1M	M1AE	P1M	PB M	M2 M	M2A E	P2 M	PC M	M3 M	M3A E	P3 M	M C M	MC AE
	Concentración (mg/mL)	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	2,5	5
Patrones (mg/mL)	Quercetina (0,25) Luteolina (1) Isorhamnetin (1) Kaempferol (1) Chrysin (1)														
Fase móvil	Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26).														

Revelador		Productos naturales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)													
Ceras y Resinas															
Muestras	Código	<i>PAC</i>	<i>PAFS C</i>	<i>M1AE</i>	<i>P1H</i>	<i>PB C</i>	<i>PB FS C</i>	<i>M2A E</i>	<i>P2 H</i>	<i>PC C</i>	<i>PC FS C</i>	<i>M3A E</i>	<i>P3 H</i>	<i>MCAE</i>	
	Concentración (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Patrones (mg/mL)		Quercetin 3- glucorónido (1) Kaempferol 3- glucorónido (2) Luteolin (1) Isoharmetin (1)													
Fase móvil		Tolueno: acetato de etilo (85:15)													
Revelador		Vainillina 1 y Vainillina 2													
Cumarinas															
Muestras	Código	<i>PAC</i>	<i>PAFS C</i>	<i>M1AE</i>	<i>P1H</i>	<i>PB C</i>	<i>PB FS C</i>	<i>M2A E</i>	<i>P2 H</i>	<i>PC C</i>	<i>PC FS C</i>	<i>M3A E</i>	<i>P3 H</i>	<i>MCAE</i>	
	Concentración (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Patrones (mg/mL)		Escpoletina (0,25) Umbeliferona (0,75)													
Fase móvil		Tolueno: Eter (1:1)													
Revelador		KOH 10%													
Cumarinas (fracción polar)															
Muestras	Código	<i>PAM</i>	<i>M1M</i>	<i>M1AE</i>	<i>P1M</i>	<i>PB M</i>	<i>M2 M</i>	<i>M2A E</i>	<i>P2 M</i>	<i>PC M</i>	<i>M3 M</i>	<i>M3A E</i>	<i>P3 M</i>	<i>M C M</i>	<i>MC AE</i>

UCUENCA

	Concentración (mg/mL)	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	2,5	5
Patrones		Escopoletina (0,25) Umbeliferona (0,75)													
Fase móvil		Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido fórmico: Agua (100: 11: 26)													
Revelador		KOH 1%													
Alcaloides															
Muestras	Código	<i>PAM</i>	<i>M1M</i>	<i>M1AE</i>	<i>P1M</i>	<i>PB M</i>	<i>M2 M</i>	<i>M2A E</i>	<i>P2 M</i>	<i>PC M</i>	<i>M3 M</i>	<i>M3A E</i>	<i>P3 M</i>	<i>M C M</i>	<i>MC AE</i>
	Concentración (mg/mL)	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	5	2,5	5	5	2,5	5
Patrones		Cloruro de berberina (1) Cloruro de harmeline (1)													
Fase móvil		Acetato de etilo: Metanol: Agua (100: 13,5: 10)													
Revelador		Dragendorff													
Alcaloides															
Muestras	Código	<i>PAC</i>	<i>PAFS C</i>	<i>M1AE</i>	<i>P1H</i>	<i>PB C</i>	<i>PB FS C</i>	<i>M2A E</i>	<i>P2 H</i>	<i>PC C</i>	<i>PC FS C</i>	<i>M3A E</i>	<i>P3 H</i>	<i>MCAE</i>	
	Concentración (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Patrones (mg/mL)		Cloruro de berberina (1) Cloruro de harmeline (1)													
Fase móvil		Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina (70: 20: 10)													
Revelador		Dragendorff													

- Anexo 2.

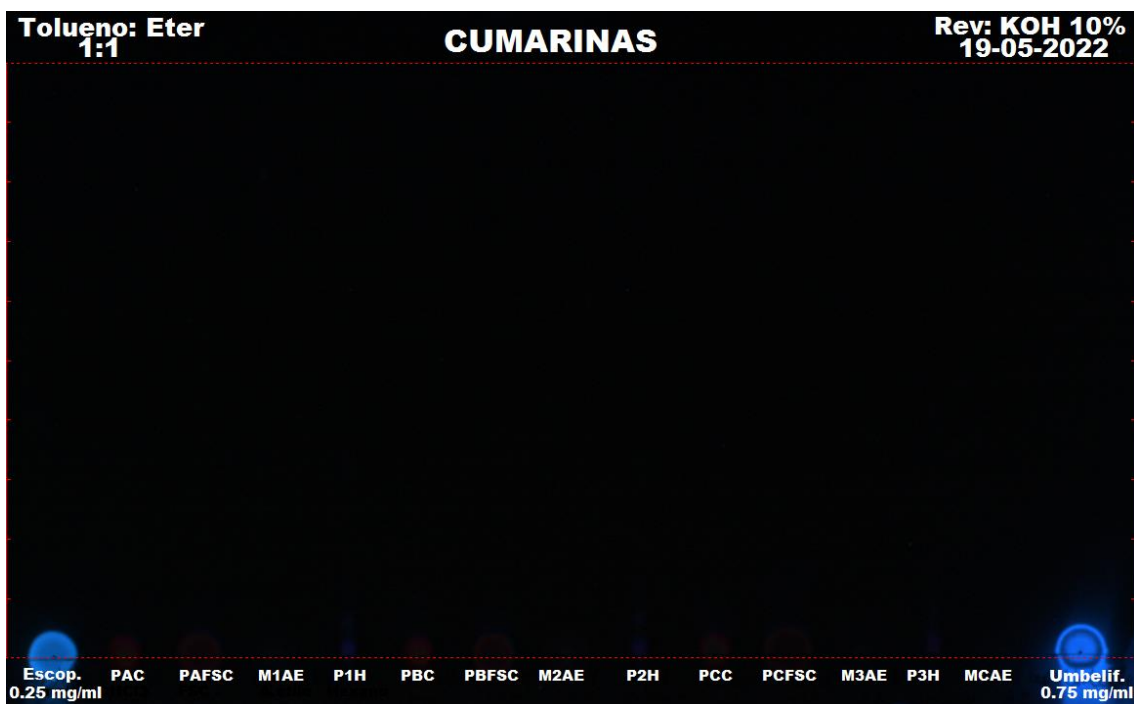


Figura suplementaria 1. Cumarinas en extractos apolares de miel, propóleo y la planta Cótág revelados con KOH 10% a $\lambda = 366$ nm.

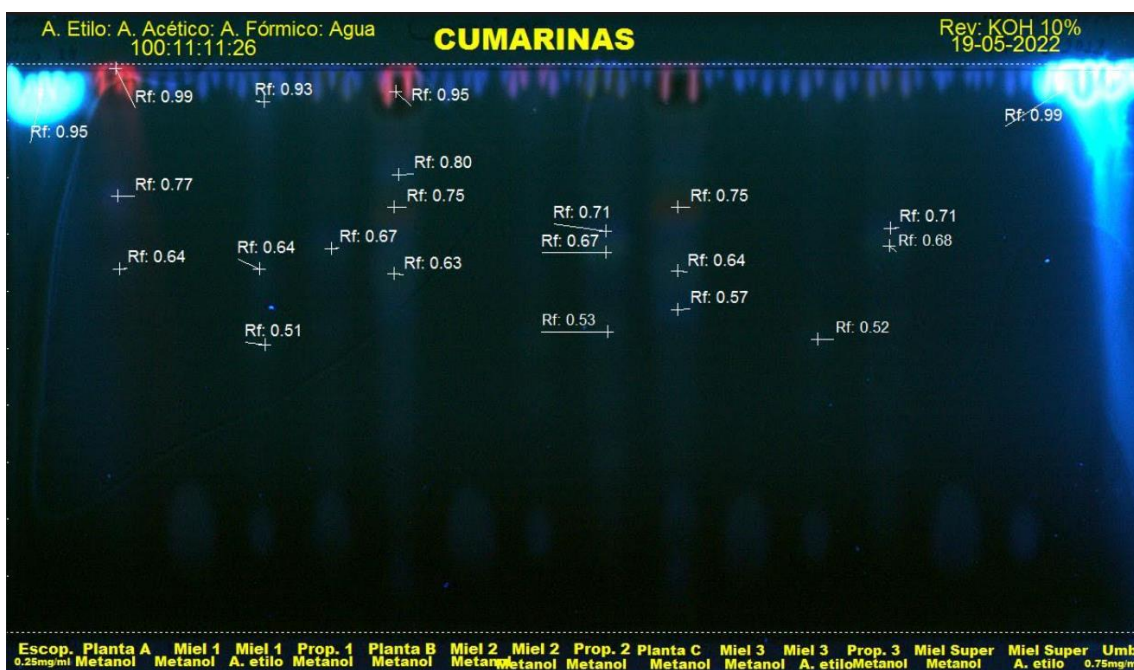


Figura suplementaria 2. Cumarinas en extractos polares de miel, propóleo y la planta Cótág revelados con KOH 10% a $\lambda = 366$ nm.

Bibliografía

- Ahangari, Z., Naseri, M., & Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical composition and its applications in endodontics. *Iranian Endodontic Journal*, 13(3), 285–292. <https://doi.org/10.22037/IEJ.V13I3.20994>
- Akbari, E., Baigbabaei, A., & Shahidi, M. (2020). Determination of the floral origin of honey based on its phenolic profile and physicochemical properties coupled with chemometrics. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 506–519. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1740249>
- Arroyo, O., & Arroyo, J. (2017). Estudio comparativo de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de la miel de abeja procedentes del departamento de Junín. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Becerril, A., Quintero, B., Dublán O., & Escalona, H. (2021). Phenolic Compounds in Honey and Their Relationship with Antioxidant Activity, Botanical Origin, and Color. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1700. <https://doi.org/10.3390/antiox10111700>
- Berretta, A., Arruda, C., Miguel, F. G., Baptista, N., Piacezzi, A., Marquele-Oliveira, F., Hori, J., Hernane da Silva, B., Damaso, B., Ramos, C., Ferreira, R., & Bastos, J. (2017). Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. En *Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/65932>
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Bains, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 10(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods10112595>
- Bogdanov, S., & Bankova, V. (2016). Propolis: Origine, Production, Composition. En *The Propolis Book. Bee Product Science*. https://www.researchgate.net/publication/304012141_Propolis_Origine_Production_Composition
- Cabrera, J. (2012). La Apicultura en el Ecuador: Antecedentes Históricos. Laboratorios La Melífera. https://www.academia.edu/43146373/La_Apicultura_en_el_Ecuador
- Cazzonelli, C. I., Nisar, N., Hussain, D., Carmody, M. E., & Pogson, B. J. (2010). Biosynthesis and regulation of carotenoids in plants - Micronutrients, vitamins and health benefits. En *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives (Vol. 2, pp. 117–137)*. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_7
- Cenusa, T. (2016). Determinación de polifenoles en vinos mediante un sensor de nanopartículas de cerio. Universidad Politécnica de València.
- Chamidah, A. (2018). Prebiotic index evaluation of crude laminaran of *Sargassum* sp. using feces of wistar rats. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 139, 12052. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/139/1/012043>

- Chaves E., & Esquivel, P. Chlorogenic acids present in coffee: antioxidant and antimicrobial capacity. *Agron. Mesoam.* 30(1):299-311. doi:10.15517/am.v30i1.32974
- Dadant C (1975) *La colmena y la abeja melífera*. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay 270 pp.
- Eguchi, R., Ono, N., Morita, A. H., Katsuragi, T., Nakamura, S., Huang, M., Altaf-Ul-Amin, M., & Kanaya, S. (2019). Classification of alkaloids according to the starting substances of their biosynthetic pathways using graph convolutional neural networks. *BMC Bioinformatics*, 20(380), 2–13. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2963-6>
- FAO. (2015). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015. Compendio de datos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Feng, W., Hao, Z., & Li, M. (2017). Isolation and Structure Identification of Flavonoids. En *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* (pp. 17–43). <https://doi.org/10.5772/67810>
- Fester, K. (2010). Plant Alkaloids. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1–35. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0001914.PUB2>
- Ferrari C. K. (2004). Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, 5(5), 275–289. <https://doi.org/10.1007/s10522-004-2566-z>
- Fidelmar, C. (2012). Propóleo: propiedades químicas, biológicas y usos en la terapia pulpar. *Revista Endodoncia Actual*, 7(1), 24–26.
- García-Chaviano, M. E., Armenteros-Rodríguez, E., Escobar-Álvarez, M. del C., García-Chaviano, J. A., Méndez-Martínez, J., & Ramos-Castro, G. (2022). Composición química de la miel de abeja y su relación con los beneficios a la salud. *Revista Médica Electrónica*, 44(1), 1–13. <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/4397>
- García, L. (2019). *Evaluación de la calidad de muestras de mieles aragonesas*. Universidad de Zaragoza.
- García, M. (2018). Estudio de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su relación con el origen floral de mieles específicas de la región andina del Ecuador [udla]. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9369/1/UDLA-EC-TIB-2018-22.pdf>
- Garry, S., Parada, Á., & Salido, J. (2017). Incorporación de mayor valor en la cadena de la miel y productos derivados de la colmena en el Pacífico Central, Costa Rica. Naciones Unidas.
- Granoble, P., Ávila, M., & Mora, R. (2022). Producción de miel de abeja y su influencia en los ingresos económicos del cantón Jipijapa. *Polo del Conocimiento*, 7(2), 2174–2187. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i2.3701>

- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2018). Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Biol. Sci*, 14(3), 341–357. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23247>
- Istasse, T., Jacquet, N., Berchem, T., Haubruge, E., Nguyen, B. K., & Richel, A. (2016). Extraction of Honey Polyphenols: Method Development and Evidence of Cis Isomerization. *Analytical chemistry insights*, 11, 49–57. <https://doi.org/10.4137/ACI.S39739>
- Jibril, F., & Manivannan, L. (2019). Aislamiento y caracterización de polifenoles en miel natural para el tratamiento de enfermedades humanas. *Bull Natl Res Cent.*43. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0044-7>
- Jiménez, I. (2016). La miel: Beneficios nutricionales y efectos terapéuticos en pacientes con heridas crónicas. UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS.
- João, M., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O., Molina, E., & Guardado, E. (2015). Coumarins. An Important Class of Phytochemicals. En *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health* (pp. 113–140). InTech. <https://doi.org/10.5772/59982>
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2019.E00370>
- Lasitiri, F., Tabera, A., & Basualdo, M. (2018). Actividad biológica de propóleos incorporados a una miel. UNCPBA.
- Li, C., Xu, Y., Li, Z., Cheng, P., & Yu, G. (2022). Transcriptomic and metabolomic analysis reveals the potential mechanisms underlying the improvement of β -carotene and torulene production in *Rhodospiridiobolus colostri* under low temperature treatment. *Food Research International*, 156(3), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111158>
- Limon, D., Días, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los Flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, 34, 143–154. https://www.researchgate.net/publication/259344548_LOS_FLAVONOIDE_S_MECANISMO_DE_ACCION_NEUROPROTECCION_Y_EFECTOS_FARMACOLOGICOS
- Lipovka, Y., Alday, E., & Velázquez, C. (2021). El propóleos, una Resina Biológica con Propiedades Curativas. *INVURNUS*, 16(1), 1–7. <https://invurnus.unison.mx/index.php/INVURNUS/article/view/38/42>
- Lobos, I., & Carrián, M. (2021). Composición nutricional y calidad de la miel producida en el territorio Patagonia verde. *Boletín INIA. Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, Región de Los Lagos*

- Lončar, M., Jakovljević, M., Šubarić, D., Pavlić, M., Služek, V. B., Cindrić, I., & Molnar, M. (2020). Coumarins in food and methods of their determination. En *Foods* (Vol. 9, Número 5). <https://doi.org/10.3390/foods9050645>
- Marchica, A., Cotrozzi, L., Detti, R., Lorenzini, G., Pellegrini, E., Petersen, M., & Nali, C. (2020). The biosynthesis of phenolic compounds is an integrated defence mechanism to prevent ozone injury in *salvia officinalis*. *Antioxidants*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox9121274>
- Matsuura, H., & Fett-Neto, A. (2015). Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. *PlantToxins*, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_2-1
- Minga, D., & Verdugo, A. (2016). Árboles y arbustos de los ríos de Cuenca. Serie Textos Apoyo a la Docencia Universidad del Azuay. Imprenta Don Bosco.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (s/f). MAG fomenta actividades para apicultores del país. <https://www.agricultura.gob.ec/mag-fomenta-actividades-para-apicultores-del-pais/#:~:text=La miel de abeja tiene,por medio de las abejas.>
- Miranda, K., Palmera, K., & Seúlveda, P. (2014). Abejas. *InfoZOA Boletín de Zoología*, 6, 1–12.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Özçelik, B., & Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 30(4), 1417–1423. https://www.researchgate.net/publication/320002454_Correlation_between_antioxidant_activity_and_phenolic_acids_profile_and_content_of_Algerian_propolis_Influence_of_solvent
- Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., & Coskun, M. (2004). Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some Asteraceae species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 203–216. https://www.researchgate.net/publication/253816549_ANTIOXIDANT_ACTIVITIES_AND_TOTAL_PHENOLIC_COMPOUNDS_AMOUNT_OF_SOME_ASTERACEAE_SPECIES
- Pais, A., Li, X., & Xiang, Q. (2018). Discovering variation of secondary metabolite diversity and its relationship with disease resistance in *Cornus florida* L. *Ecology and Evolution*, 8(11), 5636. <https://doi.org/10.1002/ECE3.4090>
- Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(47), 1–15. <https://doi.org/10.1017/JNS.2016.41>
- Paredes, O., & Parrales, X. (2020). Estudio de parámetros de calidad y perfil sensorial de la *Apis mellifera* (miel de abeja) y productos (propóleo, polen y cera) para su posterior aplicación en procesos agroindustriales. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Perera, C., & Mei, G. (2007). Functional Properties of Carotenoids in Human

- Health. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 201–230. <https://doi.org/10.1080/10942910601045271>
- Pyrzynska, K., & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015>
- Real Academia Española. (s.f.). Apicultura. En *Diccionario de la lengua española*. Recuperado el 31 de mayo de 2022, de <https://dle.rae.es/apicultura>
- Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/JF026182T>
- Rosillo, W., Vivanco, I., Reyes, E., & Rodriguez, D. (2020). Análisis de las falencias del sector apicultor en la provincia del Guayas (Ecuador). *ESPACIOS*, 41(50), 109–138. <https://doi.org/10.48082/espacios-a20v41n50p09>
- Saini, R., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.07.099>
- Saini, R., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2022). Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements. *Antioxidants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antiox11040795>
- Šarić, G., Vahčić, N., Kovačević, D. B., & Putnik, P. (2020). The changes of flavonoids in honey during storage. *Processes*, 8(943), 1–11. <https://doi.org/10.3390/PR8080943>
- Satarupa, R., & Subha, G. (2014). Physical, Chemical and Antioxidant Properties of Honey: A Review. *Asian Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 96–99. https://www.researchgate.net/publication/266423645_Physical_Chemical_and_Antioxidant_Properties_of_Honey_A_Review
- Schencke, C., Vásquez, B., Sandoval, C. & Del Sol, M. (2016). El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas. *Int. J. Morphol.*, 34(1):385-395.
- Sepúlveda, J., Torres, J., Sandoval, C., Martínez, J., & Chan, J. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 79–95.
- Sethiya, N. K., Raja, M. K., & Mishra, S. H. (2013). Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankpushpi (A MedhyaRasayana): A preliminary assessment. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4(1), 25–30.

<https://doi.org/10.4103/2231-4040.107497>

Sosa, Á., Cabrera, M., & Álvarez, M. (2017). Parámetros físicos y características organolépticas de propóleos provenientes de la Provincia de Misiones, Argentina. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(1). http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592017000100006

Stanek, N., Jasicka, I. (2018). HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Anal. Methods* 11, 2979–2989 . <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1281-3>

Stringlis, I., De Jonge, R., & Pieterse, C. (2019). The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. *Plant and Cell Physiology*, 60(7), 1405–1419. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCZ076>

Šturm, L., & Poklar, N. (2020). Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review. *eFood*, 1(1), 24–37. <https://doi.org/10.2991/EFOOD.K.191029.001>

Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, 2(3), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2>

Swapnil, P., Meena, M., Singh, S., Dhuldhaj, U., Harish, & Marwal, A. (2021). Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*, 26, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2021.100203>

Ulloa, A., Mondragón, P., Rodríguez, R., Reséndiz, J., & Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente Año*, 2(4).

Vásconez, J. (2017). Análisis de los Costos de Producción de la Miel de Abeja en Ecuador. Universidad San Francisco de Quito.

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas* (2 nd ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Zamora, F. (2017). “Estandarización de la Metodología de Cromatografía de Columna para el Aislamiento de Metabolitos Activos a partir de Extractos Vegetales”. [Tesis previo a la Obtención del Título de Bioquímica y Farmacia]. Universidad de Cuenca.