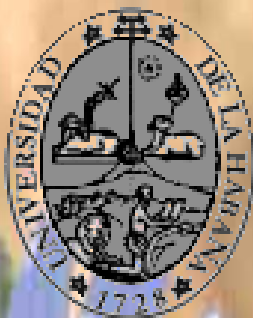


**INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS  
UNIVERSIDAD DE LA HABANA**



**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos**

**Autor: MC. Mercedes Campo Fernández**

**Tutores: DrC. Osmany Cuesta Rubio**

**DrC. Arístides Rosado Pérez**

**Ciudad de La Habana**

**2007**

## SÍNTESIS

La ciencia ha dedicado múltiples esfuerzos para demostrar los efectos biológicos del propóleo, quedando un poco rezagados los estudios de la composición química que fundamentan su actividad biológica. Para tal problema científico este trabajo se propuso el aislamiento y caracterización espectroscópica de los componentes químicos orgánicos de propóleos rojos cubanos, para demostrar similitudes o diferencias con los propóleos ya estudiados.

El estudio de caracterización estructural más exhaustivo se le realizó a una muestra de propóleos procedente de la provincia de Pinar del Río. El uso de técnicas cromatográficas y espectroscópicas permitieron el aislamiento y caracterización de doce productos naturales: la 2',4,4'-trihidroxi chalcona (isoliquiritigenina), la (-)-4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina), la 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona (formononetina), el (3*S*)-7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano (vestitol), (3*S*)-2',4'-dihidroxi-7-metoxi isoflavano (neovestitol), (3*S*)-2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano (isosativan), (6*aS*, 11*aS*)-3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano (medicarpina); (6*aS*, 11*aS*)-3,9-dimetoxi pterocarpano (homopterocarpana), (6*aR*,11*aR*)-3,10-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (vesticarpan), (6*aR*,11*aR*)-3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano, (6*aR*,11*aR*)-3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano y (6*aR*,11*aR*)-3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano. Adicionalmente, se sugirió la presencia de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxi isoflavona (biocanina A) y de la retusapurpurina A, para las cuales se precisan otros experimentos que confirmen la masa molecular deducida por técnicas de resonancia magnética nuclear. A excepción de la formononetina, del isosativan y de la medicarpina, el resto de los metabolitos identificados se aislaron por primera vez desde propóleos rojos de cualquier origen geográfico.

La GC-EM facilitó la comparación entre los propóleos rojos cubanos (siete muestras) y un propóleo de origen brasileño, confirmando la presencia de flavonoides en todos los casos. El (3*S*)-vestitol, la (6*aS*,11*aS*)-medicarpina, el (3*S*)-neovestitol y el (3*S*)-isosativan, fueron considerados los marcadores químicos de los propóleos rojos cubanos, pues constituyeron los metabolitos mayoritarios en todas las muestras de propóleos estudiadas.

Se desarrolló, además, una técnica de CCD para el estudio cualitativo de los propóleos rojos, que permitió la diferenciación con el resto de los propóleos nacionales y la determinación del Rfr de algunos de sus metabolitos mayoritarios.

Finalmente, se realizó un estudio biológico preliminar que sugirió el efecto estrogénico de los propóleos rojos, avalado por su composición mayoritaria en isoflavonoides.

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
I.1. Propóleos. Generalidades.	5
I.2. Composición química.	6
I.2.1. Flavonoides	6
I.2.2. Ácidos orgánicos, fenilpropanoides y otros compuestos aislados de propóleos.	10
I.2.3. Composición química de propóleos cubanos.	12
I.2.4. Principales métodos analíticos utilizados en el estudio del propóleos.	13
I.3. Isoflavonoides.	15
I.3.1. Extracción y fraccionamiento de isoflavonoides.	15
I.3.2. Purificación de isoflavonoides.	15
I.3.3. Características espectroscópicas.	16
I.4. Determinación de la configuración absoluta. Dicroísmo circular (DC).	19
I.5 Actividad biológica de propóleos.	21
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
II.1. Muestras de propóleos.	26
II.2. Preparación del extracto (M-A).	26
II.3. Métodos de análisis cromatográficos.	27
II.3.1. Cromatografía en Columna (CC).	27
II.3.1.1. Sephadex LH-20.	27
II.3.1.2. Columna abierta	27
II.3.1.3. Cromatografía líquida a media presión (CLMP).	27
II.3.1.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (I).	27
II.3.1.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (II).	28
II.3.1.6. Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).	28
II.3.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD).	30
II.3.2.1. CCD como prueba de identificación.	30
II.3.2.2. CCD para monitoreo de fracciones.	32
II.3.3. Análisis físico-químico.	32
II.3.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	32

II.3.3.2. Determinación de la rotación óptica ( $\alpha$ ).	33
II.3.3.3. Dicroísmo Circular (DC).	33
II.4. Ensayo uterotrófico en ratas.	33
II.4.1. Preparación de las muestras.	33
II.4.2. Descripción del ensayo.	33
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
III.1. Obtención del extracto de M-A.	35
III.2. Aislamiento y purificación del extracto de M-A.	35
III.2.1. Cromatografía en Columna sobre Sephadex LH-20.	35
III.2.2. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta.	36
III.2.3. Fraccionamiento por cromatografía líquida a media presión (CLMP).	36
III.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (I).	37
III.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (II).	38
III.3. Análisis estructural	39
III.3.1- Producto 1.	39
III.3.2- Producto 2.	42
III.3.3- Productos 3 y 4.	45
III.3.4- Productos 5, 6 y 7.	48
III.3.5- Productos 8-13.	54
III.3.6- Producto 14.	60
III.4. Análisis de la muestra M-A por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).	65
III.5. Análisis comparativo de siete muestras de propóleos por CG-EM.	71
III.6. Estudio comparativo por CG-EM de los propóleos rojos de Cuba (M-A) y Brasil.	77
III.7. Análisis por CCD.	79
III.7.1. Caracterización por CCD de los tres tipos de propóleos cubanos hasta ahora definidos.	79
III.7.2. Análisis cromatográfico de las muestras de propóleos rojos (tipo II).	82
III.7.3. Análisis de la muestra M-A contra patrones aislados.	83
III.8. Determinación de la actividad fitoestrogénica del propóleos rojo	84

(M-A)

<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>ANEXOS</b>	
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b>	

## INTRODUCCIÓN

El interés del hombre por las colmenas data de miles de años atrás. Si bien la miel es el producto apícola de más antiguo uso, existen otros de gran interés para el hombre como son: la cera, polen, jalea real, veneno y propóleos (Asis, 1989).

En el pasado el propóleos o también llamado “El oro púrpura de las abejas”, constituía un obstáculo para los apicultores dada su apariencia pegajosa. Con el tiempo su valor fue cambiando, llegando a constituir uno de los productos más valiosos que producen las abejas. Su empleo está descrito por griegos, egipcios, romanos e incas (Asis, 1989).

El propóleos es un material resinoso y aromático que las abejas elaboran a partir de exudados de diversas plantas. Su coloración varía en dependencia de su origen y edad (Banskota y col., 1998 y 2001). No solo constituye un material de construcción, su mayor importancia es ser el “arma química” de las abejas contra los microorganismos patógenos, ya que al barnizar las paredes de la colmena favorecen la desinfección (Bankova, 2005a).

Basado en el uso que las abejas le dan a este producto e independientemente de la versatilidad farmacológica que el mismo posee, la acción antimicrobiana es común para propóleos de diversos orígenes geográficos (Asis, 1989; Bankova, 2005 y 2005a). Se le han referido propiedades tales como: antibacteriana, antifúngica y antiviral. Se ha utilizado además como antiinflamatorio, antiulceroso, antitumoral, hepatoprotector, inmunoestimulante y anestésico local (Bankova y col., 2000; Bankova, 2005a).

El mayor problema que existe hoy, a pesar de contar con grandes avances tecnológicos que permiten conocer la composición química de una muestra determinada, es la variabilidad sorprendente de su composición química dependiente del sitio de colecta, de los diferentes ecosistemas y de las secreciones que sirven como fuentes de los propóleos (Bankova y col., 2000; Dos Santos Pereira y col, 2002). De lo anterior se deduce que el término “**propóleos**” no caracteriza químicamente al producto.

El conocimiento de la composición química de los propóleos se considera un aspecto muy importante, ya que permite correlacionar la composición química con la actividad biológica de los mismos. Por otra parte, permite controlar la calidad de las formas farmacéuticas desde un punto de vista químico y determinar las dosis efectivas en las mismas, así como elaborar medicamentos más eficaces sobre la base de las propiedades físico-químicas de los componentes específicos. Además, el potencial biológico de los propóleos se puede diversificar sobre la base de uno o varios componentes químicos.

Bankova (2000) manifestaba la importancia de estandarizar los propóleos según sus metabolitos, aspecto en ese tiempo poco estudiado. Las tendencias más actuales en la investigación con propóleos van dirigidas al desarrollo

de estudios biológicos con muestras caracterizadas químicamente, bioensayos realizados con principios activos aislados de los bálsamos, así como estudios biológicos comparativos de propóleos de diferente composición química y orígenes geográficos.

Estos estudios son en extremo valiosos y cada día se incrementan. Hacen posible que el propóleo sea mejor aceptado en las unidades de salud, que se puedan formular recomendaciones para su uso racional y que al final se garantice su calidad, seguridad y eficacia.

En Cuba se utilizan los propóleos como medicamentos, cosméticos y suplementos alimentarios, sin embargo, hasta el año 1989 se consideraban escasos los estudios químicos de propóleos cubanos. Sólo se había reportado la presencia de naftoquinonas y sus derivados, éteres e hidrocarburos (Álvarez y col., 1989). Más recientemente se han realizado estudios químicos en propóleos pardos con la determinación de benzofenonas preniladas (Cuesta-Rubio, 2001).

### **Problema científico.**

En Cuba se utilizan diversas preparaciones farmacéuticas utilizando el propóleo como principio activo, tanto para uso humano como animal. Para la elaboración de éstas se emplean propóleos de gran variedad en cuanto a color y origen geográfico, lo cual sugiere variaciones en su composición química y en los efectos biológicos. Considerando que ambos aspectos tributan a la calidad y eficacia de las formas farmacéuticas, así como los escasos estudios químicos desarrollados en nuestro país con propóleos rojos, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

### **Hipótesis de trabajo**

La composición química de los propóleos rojos cubanos debe diferir de la determinada para propóleos pardos cubanos.

Para el desarrollo del estudio se propone como **objetivo general**:

Aislar y caracterizar espectroscópicamente componentes químicos orgánicos de propóleos rojos cubanos, para demostrar similitudes o diferencias con los propóleos ya estudiados.

Para lo cual se trazan los siguientes **objetivos específicos**:

1. Localizar y coleccionar muestras de propóleos rojos cubanos de diferentes orígenes geográficos.
2. Desarrollar métodos de aislamiento y purificación para los compuestos químicos.
3. Caracterizar por métodos espectroscópicos modernos los compuestos aislados.

4. Desarrollar una técnica cromatográfica sencilla para la identificación de los componentes mayoritarios de propóleos rojos cubanos.
5. Realizar de forma preliminar un ensayo de bioactividad con una de las muestras estudiadas, de acuerdo con sus componentes mayoritarios.

#### **Novedad científica.**

- Se demuestran las diferencias que existen entre la composición química de los propóleos cubanos ya estudiados y del resto de los propóleos a escala internacional con respecto a los propóleos rojos.
- Se aíslan y caracterizan por técnicas espectroscópicas modernas trece flavonoides, diez de los cuales si bien no resultan nuevos productos naturales, sí se identifican por primera vez desde propóleos de cualquier origen geográfico.
- La caracterización del pigmento rojo retusapurpurina A (chalcona condensada a un isoflavano) permitió sugerir a la especie *Dalbergia ecastophyllum* como posible origen vegetal de los propóleos rojos.
- Se determinan cuatro de los isoflavonoides como componentes químicos mayoritarios en todas las muestras de propóleos rojos estudiados, los cuales pueden servir de marcadores para los propóleos rojos cubanos.
- Se realiza la caracterización de propóleos rojos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), ofreciéndose los datos espectroscópicos de la mayoría de los metabolitos. Dicha información no aparece en las bases de datos espectrales consultadas a escala internacional.
- Se propone una técnica por CCD para el estudio cualitativo de los propóleos rojos cubanos.
- Se realizó un estudio biológico “*in vivo*” preliminar que demostró la actividad fitoestrogénica de los propóleos rojos cubanos, justificado por la presencia de isoflavonoides como componentes mayoritarios.



# CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## I.1. Propóleos. Generalidades.

El término propóleos fue usado en la antigua Grecia y proviene del Latín: *pro* (por, en frente de, a la entrada de) y *poleos* (ciudad o comunidad). Es decir, material que es usado para la defensa de la ciudad o colmena (Asis, 1989).

Varias son las definiciones dadas al propóleos, la mayoría de ellas coinciden en que es un producto resinoso que se forma a partir de exudados que las abejas mastican y que luego regurgitan en la colmena, mezclándolo con pequeñas cantidades de azúcares y con cera secretada por ellas (Greenaway y col., 1987 y 1990; Ghisalberti, 1979; Banskota y col., 2001).

En 1989 Asis señaló que el propóleos puede presentar varias coloraciones, que van desde el pardo - rojizo hasta el amarillo - verdoso. Además de las ceras y los exudados vegetales, las abejas pueden contribuir a la composición química del propóleos al adicionar ácidos grasos saturados de sus secreciones mandibulares, sustancias provenientes de los granos de polen, entre otros.

Las abejas aplican el propóleos en capas finas en las paredes internas de la colmena o en otra cavidad interna. Este es usado para bloquear agujeros y grietas, para reparar y fortalecer los bordes del panal y para proteger la entrada de la colmena. También es empleado como una sustancia embalsamadora, para cubrir a los invasores de la colmena que las abejas han matado y que no pueden transportar fuera de la misma. Las abejas hacen uso de las propiedades químicas de los propóleos y de su acción biológica, pues el propóleos evita la putrefacción de los intrusos embalsamados y es el responsable de que la incidencia de bacterias y moho sea menor dentro de la colmena que en el exterior de ésta (Ghisalberti y col., 1978; Bankova y col., 2000).

## I.2. Composición química.

La composición química del propóleos es heterogénea y depende de la vegetación que predomina alrededor de la colmena (aproximadamente en un radio de 2 km), la estación del año (Midorikawa y col., 2003), así como de su origen geográfico (Asis, 1989; Trusheva y col., 2003).

Al inicio del siglo XX sólo había sido determinada la composición química general de los propóleos (resinas, ceras, componentes volátiles y material insoluble) ya que este producto no se fracciona fácilmente (Banskota y col., 1998; Sawaya y col., 2004).

En la actualidad se conoce que el propóleos es una mezcla químicamente compleja, que puede estar constituida por más de ciento cincuenta componentes (Greenaway y col., 1991; Aga y col., 1994; Bankova y col., 1995; Marcucci,

1995; Banskota y col., 1998). De manera general en el podemos encontrar: ácidos grasos, fibras, azúcares, minerales y aminoácidos (Greenaway y col., 1990; García-Viguera y col., 1992; Jeong y col., 2003). Además, contiene resinas, cera de abejas, polen, aceites esenciales, y otros compuestos orgánicos (Pietta y col., 2002).

### **I.2.1. Flavonoides**

Los flavonoides son productos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Esta pudiera ser una de las razones que justifica su abundancia en propóleos fundamentalmente de zonas templadas, aunque no son exclusivos de esta localización.

Presentan un esqueleto carbonado  $C_6-C_3-C_6$ , donde los grupos  $C_6$  se corresponden con agrupamientos bencénicos y la porción  $C_3$  se presenta formando parte de un heterociclo generalmente (Robbers y col., 1996).

Las diferentes categorías estructurales se observan en la figura 1, siendo más abundantes las correspondientes a flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas e isoflavonas. En algunos casos el anillo heterocíclico de seis miembros no se presenta y en su lugar se aprecia una cadena abierta (chalconas) (Robbers y col., 1996).

El anillo B del núcleo base de flavonoides e isoflavonoides se origina a partir del fenilpropano, una unidad de 4-coumaril-CoA; mientras que el anillo A proviene de la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA derivadas del acetil-CoA (Dixon, 1999; Bucharan y col., 2000).

Más del 50 % del peso de los propóleos de zonas templadas está constituido por flavonoides (Banskota y col., 1998; Duarte y col., 2003; Pryzyk y col., 2003). Varios estudios han empleado muestras de propóleos de diversos orígenes geográficos: China, Uruguay (Bonvehi y Col., 2000), Croacia (Kosalec y col., 2003), Brasil (De Castro, 2001; Duarte y col., 2003), Taiwán (Chen y col., 2004), Bulgaria (Pryzyk y col., 2003), Argentina, Australia, Chile, Hungría, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Tailandia, Ucrania, Uzbekistán (Kumazawa y col., 2003), Turquía (Kolankaya y col., 2002), Grecia (Melliou y Chinou, 2004), Japón (Kumazawa y col., 2004) e Italia (Bankova y col., 2002) y como resultado se han aislado flavonas (acacetina, apigenina), flavonoles (kaempferol, galangina, aromadendrina), flavanonas (pinobaksina, pinocembrina), chalconas, dihidrochalconas y otros (Marcucci y col., 2000; Mateescu, 2000; Heo y col., 2001; Nafady y col., 2003) (Tabla I).

Recientemente, se aislaron diez nuevos neoflavonoides de cadena abierta, desde propóleos procedentes de Nueva Zelanda (Awale y col., 2005).

Se ha podido comprobar que las especies de plantas del género *Populus* son la fuente principal de exudados vegetales para la elaboración del propóleos de zonas templadas. Los flavonoides encontrados en las secreciones de

*P. nigra*, *P. gemma*, *P. trichlorcarpa*, *P. canadensis*, *P. balsamifera*, *P. tremula* y *P. grandidentada* se han aislado de diferentes muestras de propóleos (Nagy y col., 1986; Wollenweber y col., 1987; Sokolov y Torgov, 1990; Kurkin y col., 1994; Bankova y col., 1995).

En otras especies de plantas, tales como *Castania sativa* (Kolankaya y col., 2002), *Plebella droryana*, *Escaptotrigonia bicuctata* (Fernández y col., 2002), *Citrus spp.*, *Vernonia polyanthes* (Dos Santos Pereira y col., 1998) se han encontrado flavonoides pero como productos minoritarios.

Los isoflavonoides, objeto de estudio de este trabajo, presentan una limitada distribución en el reino vegetal, siendo fundamentalmente encontrados en la familia Leguminosae, con mayor frecuencia en la subfamilia Fabaceae (Papilionaceae) y de forma ocasional en las subfamilias Caesalpinaceae y Mimosaceae.

En las dicotiledoneas los isoflavonoides se han informado en las siguientes familias: Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Menispermaceae, Moraceae, Myristicaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Stemonaceae, Zingiberaceae, Apocinaceae, Meliaceae, Pinaceae y Polygalaceae. En las monocotiledóneas están en los rizomas de especies del género *Iris* y en las hojas de las especies de *Patersonia* de la familia Iridiaceae. También han sido caracterizados en dos géneros de gimnospermas: *Juniperus* (Cupressaceae), *Podocarpus* (Podocarpaceae) y en la especie *Bryum capillare* (Bryaceae) (Williams y Harborne, 1989).

El núcleo base de los isoflavonoides presenta igual número de carbonos pero se corresponde con el 3-fenilcromano (Dixon, 1999).

Tahara e Ibrahim (1995) describieron la presencia de 870 agliconas de isoflavonoides naturales que se pueden reunir en nueve grupos, según sus modificaciones estructurales. De estos grupos las isoflavonas y los pterocarpanos suelen ser los más abundantes (Figura 2). Estas estructuras pueden presentar diversas modificaciones sobre los anillos tales como: hidroxilaciones, metoxilaciones, grupos prenilados y formación de puentes metilendióxidos (Dixon, 1999; Williams y Harborne, 1989).

Las isoflavonas son derivados 4-oxo-2,3-insaturados, por lo que poseen el esqueleto 3-fenilcromona. Constituyen el grupo más representativo de los isoflavonoides, siendo la daidzeína, formononetina, genisteína y la biochanina A las más comunes. La adición sobre los anillos de sustituyentes como: hidroxilos, metoxilos, metilendióxidos e incluso grupos isoprenilos, incrementan la variedad estructural dentro de este grupo (Williams y Harborne, 1989; Dixon, 1999). En particular, la formononetina fue identificada a partir de una muestra de propóleos rojo cubano (Cuesta-Rubio, 2001).

Los isoflavanos son la subclase menos frecuente. En ellos el anillo C está compuesto por dos metilenos (C-2 y C-4) y un metino (C-3). Todos los isoflavanos identificados poseen un sustituyente oxigenado en la posición 2', característica relacionada con el origen biogénico a partir de la reducción del pterocarpano. Pudiera presentarse también, aunque de forma menos frecuente, un grupo oxigenado en la posición 5 (Williams y Harborne, 1989). El isosativan, representante de este grupo de metabolitos, fue también identificado desde muestras de propóleos rojos cubanos y más recientemente desde propóleos brasileños (Cuesta-Rubio, 2001; Trusheva y col., 2006).

En algunos casos sobre el esqueleto base puede formarse una ciclización que involucra los C-2 (anillo C) y C-4 (anillo B) a través de un átomo de oxígeno, para generar sistemas tetracíclicos como pterocarpanos, coumaranocromonas y coumestanos (Agrawal y Bansal, 1989).

Los pterocarpanos constituyen el segundo grupo más representativo dentro de los isoflavonoides. Desde el punto de vista estructural están constituidos por un esqueleto tetracíclico derivado del núcleo base de los isoflavonoides, donde se establece un enlace éter entre las posiciones 4 y 2' de la isoflavona. El anillo heterocíclico B está compuesto por un metileno y dos metinos. Para estos metabolitos la nomenclatura resulta diferente a la de los isoflavonoides simples (Figura 2). Resulta frecuente la oxigenación en las posiciones 3,9 y 3, 8, 9 y poco común la oxigenación en la posición 1.

La medicarpina, presente en muchas especies de legumbres, es la de mayor distribución en la naturaleza (Williams y Harborne, 1989). Recientemente, Trusheva y col (2006) determinaron la presencia de este pterocarpano en propóleos rojos de origen brasileño.

Dixon (1999) plantea, además, que los isoflavonoides pueden presentarse de forma oligomérica: isoflavano-isoflavona, isoflavano-flavanona, isoflavano-flavona, isoflavona-flavona, isoflavano-flavono, isoflavona-cinamilalcohol, isoflavona-estilbeno e isoflavano-chalcona.

Las chalconas integran también el grupo de los flavonoides ( $C_6-C_3-C_6$ ), solo que el anillo C no existe y en su lugar se presenta un resto de tres átomos de carbono. Su origen biogénico es similar al de cualquier flavonoide, sólo que en este caso son los primeros intermediarios de la ruta biogénica (Bucharan y col., 2000).

Estos metabolitos con frecuencia se encuentran en las plantas como pigmentos amarillos y se reconocen alrededor de 200 moléculas. Existe una gran variedad estructural de chalconas, las cuales se muestran en la figura 3. Como se puede observar, la numeración utilizada para estos metabolitos difiere del resto de los flavonoides, pues la posición 2 y 3 del anillo C de estos últimos se nombra como  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente, en las chalconas. La mayoría de las

chalconas pueden presentar sustituyentes (OH y OCH<sub>3</sub>) en las posiciones 2', 4, 4', 6' y un número significativo se muestran como derivados prenilados (Bucharan y col., 2000).

Como se puede apreciar en la tabla I, algunos compuestos tipo chalconas han sido aislados desde propóleos de zonas tropicales fundamentalmente (Marccuci, 1995).

### **I.2.2. Ácidos orgánicos, fenilpropanoides y otros compuestos aislados de propóleos.**

Se han aislado otros compuestos de diversas muestras de propóleos tales como: ácidos orgánicos, fenilpropanoides y derivados (Tabla II), terpenos, lignanos, esteroides, azúcares, vitaminas, aminoácidos y otros componentes (Tabla III).

Varios de los ácidos orgánicos se encuentran en especies del género *Populus* (Maciejewicz y col., 2002), *Ambrosia deltoidea*, *Encelia farinosa* (Wollenweber y Buchmann, 1997), *Baccharis dracunculifolia* (Midorikawa y col., 2003) y en las flores de *Citrus spp.* (Dos Santos Pereira y col., 2003).

Compuestos fenólicos como los ácidos p-cumáricos y sus derivados con residuos prenilados ciclados, así como derivados de acetofenonas con sustituyentes prenilados, han sido aislados de propóleos procedentes de América del Sur. Estos propóleos guardan una estrecha relación con especies del género *Baccharis* (Aga y col., 1994; Banskota y col., 1998; Tazawa y col., 1998).

Se han identificado varios metabolitos de la serie de los lignanos (furanofuranoides), a partir de muestras de Islas Canarias, Chile y Brasil. La fuente vegetal de donde provienen aún no ha sido determinada (Bankova y col., 1996 y 1998; Banskota y col., 1998; Valcic y col., 1998).

Compuestos del grupo de los terpenos, fundamentalmente diterpenos y alcoholes triterpénicos, han sido caracterizados de muestras procedentes de Brasil y Egipto (Matsuno y col., 1997; Marcucci y col., 1998).

Monoterpenos y sesquiterpenos se han identificado en fracciones volátiles de varios tipos de propóleos. Si bien no se encuentran en concentraciones elevadas, si se deben considerar dado el aroma característico de los propóleos y la interesante actividad biológica de este grupo de metabolitos (Bankova y col., 1995 y 1998).

Un estudio sobre la composición química de los propóleos rojos del estado de Alagoas, Brasil, demostró la presencia de derivados de fenilpropenos (*trans*-anetol, metil eugenol, *trans*-metil isoeugenol, elemicina y *trans*-isoelemicina) a los cuales se les adjudica el olor característico que presentan los propóleos rojos. También fueron identificados por CG-EM estructuras triterpénicas derivadas de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, lupeol y cicloartenol, benzofenonas preniladas y naftoquinonas (Trusheva y col., 2006).

Elementos inorgánicos como calcio, magnesio, potasio, sodio, zinc, cobre, manganeso, cromo, níquel, plomo, cobalto, cadmio y plata, se han determinado por espectrometría de absorción atómica en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos (Stafilov y col., 1994; Kulevanova y col., 1995).

### **I.2.3. Composición química de propóleos cubanos.**

Cuba presenta formaciones vegetales típicas de zonas tropicales, además de un alto porcentaje de plantas endémicas. Lo anterior sugiere que los propóleos cubanos podrían presentar una composición química peculiar con respecto a propóleos de otros orígenes geográficos.

No son muchos los estudios que evalúan la composición química de propóleos de zonas tropicales, si se tiene en cuenta el número de investigaciones realizadas con propóleos de zonas templadas.

Según estudios realizados en nuestro país se ha determinado la presencia de quinonas desde una muestra de propóleos rojo (Bracho y col., 1996; Rodríguez y col., 1998 y 2000; Romay y col., 1999).

Cuesta (1996) determinó la presencia de  $\beta$ -amirina, ácidos grasos saturados y compuestos prenilados con restos aromáticos, en muestras de propóleos pardos cubanos.

Benzofenonas preniladas como la nemorosona y la mezcla guttiferona E-xanthochymol, se aislaron a partir de propóleos cubanos de diferentes regiones del país (Cuesta y col., 1999; Cuesta-Rubio y col., 2002). Recientemente se caracterizaron otras benzofenonas preniladas, que fueron denominadas como propolona B, C y D (Márquez, 2005) (Tabla IV).

Cuesta-Rubio (2001) determinó la presencia de isoflavonoides en propóleos cubanos, los cuales constituyen los primeros de su tipo aislados desde propóleos de cualquier origen geográfico.

Contrario a lo que expresan algunos autores, parece que la composición química del propóleos no es modificada por la acción de las abejas. Lo anterior puede confirmarse al correlacionar la composición química del propóleos con la fuente vegetal de donde provienen. Cuesta-Rubio y col. (2001) demostraron la presencia de nemorosona como componente mayoritario de propóleos pardos cubanos. Este metabolito ha sido detectado en la resina floral de *Clusia rosea*, especie vegetal que la abeja utiliza como fuente fundamental para la elaboración de este tipo de propóleos. Este resultado es similar a aquellos observados para propóleos ricos en flavonoides. Los flavonoides encontrados en propóleos de zonas templadas son los mismos que se presentan en las especies del género *Populus*.

En el año 1989, Álvarez y col. propusieron un método de cromatografía en capa delgada (CCD) para la clasificación preliminar del propóleo cubano. En esta oportunidad se estudiaron 233 muestras de diferentes regiones del país, sugiriéndose la presencia de al menos ocho tipos de propóleos. Los autores le dieron un carácter provisional a esta clasificación, indicando la necesidad de estudios adicionales que permitieran reconocer la composición química de forma inequívoca.

#### **I.2.4. Principales métodos analíticos utilizados en el estudio del propóleo.**

Dentro de los métodos analíticos utilizados con mayor frecuencia en el estudio químico del propóleo se pueden citar: espectrofotometría (Popova y col., 2004; Yang y col., 2005), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Markham y col., 1996; Bankova y col., 2004; Sawaya y col., 2004; Isla y col., 2005), espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI/EM) (Pietta y col., 2002; Del Boccio y Rotillo, 2004; Sawaya y col., 2004; Volpi y col., 2006), electroforesis capilar (Lu y col., 2004; Volpi, 2004; Cao y col., 2002), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Markham y col., 1996; García-Viguera y col., 1993; Bracho y col., 1996; Stobiecki, 2000; Velikova y col., 2001; Kartal y col., 2002; Sahinler y Kaftanoglu, 2005; Uzel y col., 2005), cromatografía en capa delgada (CCD) (Medic - Saric y col., 2004) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Melliou y Chinou, 2004; Watson y col., 2006).

En la actualidad, algunos de los métodos antes referidos son utilizados para obtener la caracterización del extracto total de un propóleo, como una huella dactilar.

La cromatografía líquida de alta resolución utilizando un detector ultra violeta, ha sido muy utilizada como método de separación y purificación de metabolitos. No obstante, es una herramienta que puede dar información general sobre la composición de los diferentes tipos de propóleos, pues aquellos compuestos que presenten grupos cromóforos conjugados, mostrarán bandas de absorción características a determinada longitud de onda. Conociendo previamente el comportamiento cromatográfico del o los metabolitos mayoritarios, se puede tener una idea general de la composición específica de la muestra en estudio.

Para el análisis directo de compuestos volátiles en propóleos, la CG-EM ha jugado un papel importante, sin embargo, aquellos compuestos que no presenten esta propiedad pueden ser derivatizados, lográndose resultados satisfactorios. La información estructural que brinda esta técnica es superior a la obtenida por CLAR, pues con ayuda de bases de datos se puede determinar cualitativamente la composición química de un extracto total. La mayor ventaja está en confirmar estructuras antes dilucidadas por las técnicas de RMN, haciendo uso de pequeñas cantidades de muestras.

Las técnicas de RMN también han sido empleadas para el análisis de extractos totales. En este caso no se busca la caracterización exhaustiva de un metabolito en particular, sino señales o grupos de señales características de determinados tipos de productos naturales. El método puede indicar la presencia de metabolitos de estructura alifática o aromática, según sus señales características, entre 0-4 ppm ó 6-9 ppm, respectivamente. Además, podrían apreciarse señales propias de protones correspondientes a los metabolitos mayoritarios antes identificados en los extractos objeto de estudio. Esta técnica ha sido empleada por nuestro grupo (Cuesta-Rubio y col., 2007) y por Watson y col (2006).

Todos los métodos antes comentados pueden determinar similitudes o diferencias químicas entre muestras de diferentes orígenes geográficos.

### **I.3. Isoflavonoides.**

#### **I.3.1. Extracción y fraccionamiento de isoflavonoides.**

La literatura sugiere métodos como el reflujo a través del Soxhlet o el uso de disolventes en caliente. La extracción de drogas crudas como las cortezas pulverizadas, requieren de un largo proceso de extracción, empleando dichas técnicas por más de 40 horas. Los disolventes empleados con mayor frecuencia son: benceno, cloroformo, n-hexano, acetato de etilo, etanol y metanol (Williams y Harborne, 1989).

En este sentido, los métodos que emplean calor tienen la ventaja de reducir el tiempo de extracción, sin embargo, pueden favorecer la formación de artefactos.

También se han empleado extracciones sucesivas (maceración) con tres o cuatro disolventes en forma gradual (de menor a mayor polaridad), lo cual puede ser muy efectivo cuando se desconoce la composición química (Williams y Harborne, 1989).

#### **I.3.2. Purificación de isoflavonoides.**

- **Cromatografía en Capa Delgada (CCD).**

La CCD, tanto analítica como preparativa, suele ser comúnmente empleada utilizando cloroformo o acetato de etilo como fase móvil. Se recomiendan también mezclas de cloroformo y metanol, ya que un incremento de la proporción de metanol (4-10 %) posibilita la separación de isoflavonoides con mayor polaridad. Las placas con indicadores fluorescentes facilitan la detección de estos metabolitos (Williams y Harborne, 1989).

- **Cromatografía en Columna (CC).**



Cuando se parten de grandes cantidades de extracto, la CC constituye un método ideal para la separación de isoflavonoides. Las columnas empleadas se cargan generalmente de silica gel, aunque con frecuencia se emplean otros rellenos como: Florisil, Policlar y Sephadex LH-20.

En columnas de silica gel suelen emplearse diferentes mezclas de disolventes de forma gradual, iniciando con cloroformo (menos polar) hasta metanol (más polar) (Williams y Harborne, 1989).

- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).**

La CLAR se emplea para la separación de isoflavonoides utilizando una variedad de columnas y sistemas de disolventes. Esta técnica cromatográfica constituye quizás el mejor procedimiento para el fraccionamiento preliminar así como para el análisis cuantitativo de dichos productos naturales.

En la separación de isoflavonoides por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR), las fases móviles más utilizadas son gradientes de metanol-agua, acetonitrilo-agua (con frecuencia contiene ácido fosfórico), acetonitrilo-3 % ácido acético y acetonitrilo-0,1 M  $K_2HPO_4$  conteniendo ácido fosfórico. Cuando se emplea fase normal (CLAR-FN) se requieren fases móviles relativamente apolares como n-hexano-[diclorometano-etanol-ácido acético (97:3:0,2)] y se usan gradientes para separar isoflavonas y pterocarpanos. Usualmente el detector utilizado es la luz ultravioleta a 254 nm ó 280 nm (Williams y Harborne, 1989).

### **I.3.3. Características espectroscópicas.**

- **Espectrometría de Masas (EM).**

Con frecuencia el estudio de los espectros de masas permite la confirmación de las estructuras de isoflavonoides. La ruptura retro-Diels Alder (RDA) del anillo C origina una fragmentación característica asociada a los anillos A y B, la cual se representa para isoflavanos, isoflavanonas e isoflavonas en la figura 4.

Las isoflavonas muestran picos intensos para el ión molecular, que permiten determinar fácilmente la masa del compuesto analizado. Aquellas con sustituciones 2'-hidroxil o 2'-metoxil exhiben un fragmento adicional, los cuales son únicos para este modelo de sustitución. En aquellas que presentan sustituyentes isopentenilos, la fragmentación pudiera indicar si el sustituyente está libre o formando parte de un anillo de cinco o seis miembros.

Cuando se presenta un grupo 3,3-dimetil alilo en la posición 3' de una isoflavona se producen los fragmentos  $[M-42]^+$  y  $[M-35]^+$  y en el caso de un residuo de isopreno cíclico en C-6 y C-7 se produce un ión  $[M-59]^+$  de elevada intensidad.

En la serie de las isoflavanonas con la sustitución 2'-metoxil, el fragmento del anillo A no se observa o es de baja intensidad, mientras que con la sustitución 2'-hidroxil este fragmento es de elevada intensidad e incluso puede constituir el pico base.

No son muchos los estudios que existen acerca del comportamiento de los pterocarpanos en espectrometría de masas. Según la literatura, la fragmentación clásica de flavonoides, retro-Diels Alder, no tiene lugar en estas estructuras. Esto se debe a la estabilidad que le proporciona a la molécula el O-5, C-6 y el enlace entre el C-6 y el C-6a. Los fragmentos sugeridos para este tipo de compuestos se presentan en la figura 5 (Pelter y col., 1965).

En el año 2000, Tóth y col. realizaron un estudio de la fragmentación por impacto electrónico (IE) de pterocarpanos y sus análogos deuterados, con fusión de anillos *cis*. Se demostró que el pico de mayor abundancia en el espectro era el correspondiente al ión molecular. Le continuaban en abundancia el ión  $[M-H]^+$ , el cual se forma con mayor probabilidad por la pérdida del átomo de H-6 o del H-11a como radical y el  $[M-H-H_2]^+$ .

- **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

La asignación de las señales de protones para flavonoides e isoflavonoides es generalmente similar.

El espectro de las isoflavanonas se distingue por la posición del protón del C-2 (7,6-7,8 ppm) en trimetilsilil derivados disueltos en tetracloruro de carbono. Esta asignación estructural puede ser confirmada por cambio del disolvente, pues estos provocan variaciones en el rango de corrimiento químico entre 8,5-8,7 ppm en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) y entre 7,8-8,1 ppm en cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>). Cuando el espectro de RMN se corre sin derivatización con acetona deuterada, el H-2 se aprecia a 8,17 ppm.

Para el caso de las isoflavanonas las señales características son: 4,47 (H-2a), 4,38 (H-2b) y 4,06 (H-3) ppm.

Los isoflavanos carecen de un grupo ceto en el C-4 y de enlace olefínico en posición 2; por lo que los corrimientos químicos de la zona alifática cambian.

Se han registrado espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{13}C$  (RMN  $^{13}C$ ) representativos de isoflavanos, isoflavanonas, isoflavanonas, pterocarpanos y rotenoides (Agrawal y Bansal, 1989).

Generalmente, en los isoflavanos el sustituyente fenilo en C-3 adquiere orientación ecuatorial. El anillo heterocíclico está compuesto por dos grupos metilenos (C-2, C-4) y por uno metino (C-3).

Se han informado los datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de nueve isoflavanos (Agrawal y Bansal, 1989) y todos ellos carecen de un sustituyente oxigenado en C-5, además de no presentar sustitución de grupo hidroxilo o metoxilo en C-2'. En estos casos la señal del C-2 aparece a 69,6-70,4 ppm, las señales del C-3 y C-4 entre 31,2-32,5 ppm; el C-4 resuena a campos más altos que el C-3. Los carbonos C-3 y C-4 pueden diferenciarse por su comportamiento tipo CH y  $\text{CH}_2$ , respectivamente.

Las señales para el C-2 y C-3 en isoflavanonas se aprecian a 71,7 y 50,9 ppm, respectivamente. Por otra parte, los isoflavanos son diferenciables de las isoflavanonas de acuerdo a la posición de las señales del C-3 (50,9 ppm) y del C-4 (190,6 ppm) (Williams y Harborne, 1989).

Para las isoflavonas, el corrimiento químico de los carbonos del anillo C se observan en los siguientes rangos: 150,6-155,4 (C-2); 122,0-126,1 (C-3) y 174,2-181,2 (C-4) ppm. El corrimiento químico del C-2 prácticamente no se afecta por los sustituyentes del anillo aromático, en cambio los C-3 y C-4 sí dependen de las sustituciones del anillo A y B, particularmente de los oxisustituyentes (Agrawal y Bansal, 1989).

En pterocarpanos el anillo heterocíclico B presenta un metileno (C-6) que resuena en el rango  $\delta$  55,5-67,2 y dos metinos entre  $\delta$  39,3-41,3 (C-6a) y 77,4-79,4 (C-11a). Los carbonos cuaternarios del anillo D suelen resonar a valores entre  $\delta$  117,3-119,4 (C-6b) y  $\delta$  153,6-160,6 (C-10a). En el caso de presentar el C-8 un sustituyente oxigenado, se afecta el corrimiento del C-10a ( $\delta$  153,5-155,6) por el efecto *para* del oxisustituyente, de no presentar dicho sustituyente, entonces el corrimiento del C-10a es de  $\delta$  159,0-160,5 (Agrawal y Bansal, 1989).

#### **I.4. Determinación de la configuración absoluta. Dicroísmo circular (DC).**

Las propiedades quirópticas son propias de sustancias quirales y se aprecian tras una interacción no destructiva con la luz polarizada, lo cual permite diferenciar entre dos enantiómeros de un compuesto quiral (Eliel, 1985).

Cuando un medio ópticamente activo es atravesado por un plano de luz polarizada, en el rango de longitud de onda en el cual el cromóforo de una molécula ópticamente activa absorbe, el plano de polarización es rotado en un ángulo  $\alpha$ . La sustancia activa absorbe de manera diferente hacia la derecha o la izquierda la luz circularmente polarizada. Como resultado la luz es elípticamente polarizada y el medio exhibe dicroísmo circular (DC) (Slade y col., 2005).

La aplicación de las técnicas quirópticas en algunos casos depende de la presencia de un cromóforo en la sustancia de análisis y precisamente el DC se basa en el principio de absorción, por lo que necesita la existencia de un cromóforo en la molécula. Los espectros de DC se miden en disolución. La dependencia de la longitud de onda de la rotación específica y/o elipticidad molecular  $[\Phi]$  es llamada Efecto Cotton (EC).

El signo del EC refleja la estereoquímica alrededor del cromóforo. La configuración absoluta de la molécula se puede deducir si se compara el EC de un compuesto de configuración conocida, con otro compuesto estructuralmente similar. El EC resulta positivo cuando al ir de la mayor longitud de onda hacia la menor, primero se pasa por el pico de la curva y después por el mínimo. Cuando sucede a la inversa estamos en presencia de un EC negativo (Eliel, 1985).

Aunque la configuración absoluta de flavonoides se ha determinado tradicionalmente a través de la rotación óptica, el método del DC ha resultado muy conveniente, por lo que su popularidad se ha incrementado desde mediados de los años sesenta. El DC es ahora una técnica rutinaria en el análisis de metabolitos como: flavanonas, dihidroflavonoles, flavan-3-oles, flavan-4-oles, flavan-3,4-dioles, flavanos, isoflavanos, isoflavanonas, pterocarpanos, 6a-hidroxipterocarpanos, rotenoides y neoflavonoides, entre otros (Slade y col., 2005).

### **DC en pterocarpanos.**

Los pterocarpanos contienen dos centros quirales (posición 6a y 11a) lo cual podría originar cuatro enantiómeros. Sin embargo, en la naturaleza sólo han sido aisladas las formas (6a*R* y 11a*R*)-*cis* y (6a*S* y 11a*S*)-*cis*. Según estudios computacionales, la configuración *cis* es más favorable energéticamente que la fusión *trans* entre los anillos B y C (Schöning y Friedrichsen, 1989; Antus y col., 2001). Aunque pueden existir dos conformaciones suele preferirse la 6a, 11a-di pseudo-axialmente sustituida, quedando el anillo B en la conformación de media silla.

Las bandas de DC de estos compuestos se asignan como <sup>1</sup>La entre 220-240 nm, <sup>1</sup>Lb entre 260-310 nm y <sup>1</sup>Bb alrededor de 200nm. La banda <sup>1</sup>Lb puede dividirse o presentar un hombro de pequeña intensidad hacia el lado de menor longitud de onda, lo cual puede ser atribuido a la banda <sup>1</sup>Lb correspondiente al cromóforo 2,3-dihidrobencofurano (anillos C más D). El anillo cromano (anillos A más B) es el cromóforo dominante en los pterocarpanos lo que trae como consecuencia que la intensidad de la banda <sup>1</sup>Lb sea elevada. La banda <sup>1</sup>La se forma por la contribución de los anillos C y D. La tabla V muestra el EC de los *cis* pterocarpanos.

El DC de los pterocarpanos está determinado por estas bandas y puede ser usado inequívocamente para asignar la configuración absoluta. Diferentes patrones de sustitución sobre el anillo A no afectan el signo de la banda <sup>1</sup>Lb del cromóforo cromano (Eliel, 1985).

### **DC en isoflavanos.**

Para este tipo de metabolito, al igual que en otros flavonoides, la conformación más favorable que adopta el anillo C es la media silla. Dicho efecto tiene lugar por analogía con la molécula de ciclohexano y por minimización de la tensión torcional.

El uso del Efecto Cotton para la determinación de la configuración absoluta del carbono de la posición 3 se presenta en la tabla VI (Slade, 2005).

### **I.5. Actividad biológica de propóleos.**

La acción contra microorganismos es una característica esencial y común para todos los propóleos y ha sido empleada por el hombre para su beneficio durante muchos años (Ghisalberti y col., 1978).

Debido al creciente uso del propóleos en la medicina tradicional, éste se ha convertido en el centro de intensas investigaciones químicas y farmacológicas en los últimos 40 años. Numerosos artículos han demostrado la gran versatilidad de aplicaciones farmacológicas, tales como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, antioxidante, hepatoprotector, antiulceroso e inmunoestimulante. El propóleos también ha penetrado con fuerza en el campo de la cosmética, la industria alimentaria y la conservación de materiales (Banskota y col., 2001; Bankova y col., 2000).

Resulta interesante señalar que si bien en la actualidad se ha incrementado la tendencia a realizar estudios biológicos de propóleos con muestras previamente estandarizadas, aún estos resultan insuficientes. No son pocas las propagandas comerciales e incluso artículos científicos que al citar las propiedades farmacológicas de este producto natural, obvian la estrecha relación que tiene con su composición química. Se debe recordar que este producto no es una sustancia sino una mezcla compleja de metabolitos y que el término propóleos no representa una característica desde el punto de vista químico.

Un amplio rango de actividades biológicas se le atribuyen principalmente a la presencia de flavonoides (Isla y col., 2001) y en particular al cafeato de fenetilo (Banskota y col., 2001; Natarajan y col., 1996; Borrelli y Capasso, 2003).

Se informa en la literatura que el propóleos posee fuerte actividad antioxidante, relacionada fundamentalmente con la presencia de flavonoides (Bonvehi y Coll, 2000; Mateescu, 2000; Hamasaka y col., 2004). La chrisina, la galangina, el kaempferol y la quercetina disminuyen la producción de óxido nítrico (Blonska y col., 2004); el isoninfaeol B tiene actividad detoxificadora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (Kumazawa y col., 2004a) y la tectocrisina disminuye la producción de malonil dialdehído (Lee y col., 2003).

Se conoce, además, que el propóleos presenta actividad antifúngica, antiviral y antimicrobiana, asociada generalmente a la presencia de terpenos y ácidos orgánicos (Castaldo y Capasso, 2002; Melliou y Chinou, 2004), aunque pueden ser propias de algunos flavonoides. En este sentido, se sabe que el cafeato de fenetilo tiene efecto antibacteriano. Keskin y col. (2001) y Borrelli y Capasso (2003) demostraron que algunos compuestos aromáticos,

ésteres de ácidos grasos y sesquiterpenos aislados de extractos de propóleos turco, tienen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus beta hemolíticos*. Algunos extractos de propóleos tienen actividad “*in vitro*” contra el virus del herpes simple (Huleihel e Isanu, 2002).

Banskota y col. (2001a) demostraron que los compuestos fenólicos y los ácidos diterpénicos presentes en propóleos brasileños, actúan contra el *Helicobacter pilory* y son responsables de la actividad hepatoprotectora.

Extractos de propóleos de diferentes orígenes geográficos han mostrado actividades antibacterianas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngicas (*Candida albicans*) y antivirales (*Avian influenza virus*) (Kujumgiev y col., 1999; Trusheva y col., 2006).

Llama la atención que muestras de diferentes orígenes geográficos exhiban similar actividad biológica, lo cual lleva a pensar que diferentes combinaciones de metabolitos pueden lograr la acción antimicrobiana del propóleos.

El propóleos verde de Brasil muestra actividad neuroprotectora “*in vivo*” e “*in vitro*”. Se plantea que este efecto neuroprotector se debe en parte a las propiedades antioxidantes del cafeato de fenetilo (Shimazawa y col., 2005).

Otro efecto interesante del propóleos es la actividad anticancerígena. La propolina C, flavonoide aislado de propóleos de Taiwán, induce efecto citotóxico en las células del melanoma humano (Chen y col., 2004). El ácido cafeico disminuye el crecimiento tumoral en metástasis pulmonar de tumor mamario (Orsolic y col., 2004). El cafeato de fenetilo y la artepillina C tienen un efecto anticancerígeno y quimiopreventivo en el tratamiento de la metástasis del cáncer de colon (Kimoto y Kurimoto, 1999; Kadota y Tezuka, 2004). Se plantea que los flavonoides también actúan como agentes quimiopreventivos (Heo y col., 2001).

Algunos estudios sugieren la actividad antiviral (anti-VIH-1) del propóleos. Sin embargo, aún son escasos los estudios de seguridad y eficacia para tal objetivo (Gekker y col., 2005).

Estudios realizados en ratas con *diabetes mellitus* demostraron que el propóleos procedente del norte de China, relacionado con especies vegetales del género *Populus*, era capaz de controlar los niveles de glucosa en sangre, así como modular el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en la sangre (Fulianga y col., 2005).

Estudios “*in vitro*” de extractos etanólicos de propóleos brasileños demostraron su capacidad de inhibir la adhesión de trofozoitos de *Giardia duodenalis*, lo cual sugiere la posible utilización de este propóleos como un agente anti*giardiasis* (Freitasa y col., 2006).

En el campo de la estomatología, el propóleo ha ganado terreno, el extracto etanólico de un propóleo de Brasil ha sido empleado en el tratamiento de la candidiasis oral (Santos y col., 2005). También se han empleado preparados a base de propóleos en tratamientos de gingivitis, aftas bucales, estomatitis aftosa, cirugía bucal, recubrimiento pulpar, periodontitis, bolsas periodontales, entre otras (Ionita y col., 1990; Kosenko y Kosovich, 1990; Magio y Carvalho, 1990; Martínez y col., 1992; León y Graz, 1993; Veitia y Ruiz, 1994; Quintana, 1996). Además, el ácido cinámico y el ácido caféico poseen actividad contra el *Streptococcus mutans*, microorganismo estrechamente relacionado con las caries dentales en el humano (Ikeno y col., 1995).

Estudios preclínicos realizados en ratas demostraron que extractos de propóleos rojos cubanos podían prevenir alteraciones de los hepatocitos, provocadas por efecto de la galactosamina. Lo anterior sugiere el posible efecto preventivo de este tipo de propóleos en la hepatitis, debido a su actividad como antioxidante (Rodríguez y col., 1998). Otros estudios biológicos han demostrado también el efecto hepatoprotector de extractos de propóleos rojos a nivel hepático (Ramírez y col. 1997; Ramírez y col., 1994).

Se pudo comprobar, además, la actividad antipsoriásica, antiinflamatoria y analgésica del propóleo rojo cubano recolectado en colmenas de Consolación del Sur, provincia Pinar del Río (Ledón y col., 1997).

Suárez, en el 2003, demostró que los propóleos son capaces de inhibir la aparición de colonias del tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Han mostrado, además, tener efecto adyuvante de la poliquimioterapia de citostáticos en la leucemia P 388.

Las primeras referencias de investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas del propóleo cubano datan de 1984, según Morales.

Rojas, en el 2001, demostró la actividad antimicrobiana de la nemorosona, fundamentalmente frente a cepas de bacterias Gram. (+). También se determinó la capacidad antioxidante y antitumoral en cuatro líneas de células, siendo activa frente al carcinoma cérvico humano (Hela), carcinoma humano de laringe (HEp-2), carcinoma prostático (PC-3) y carcinoma del sistema nervioso central (U251) (Cuesta-Rubio y col., 2001). Esta benzofenona prenilada es el marcador químico de un tipo de propóleos cubanos, generalmente de color pardo.

Como se puede constatar, son pocos los estudios realizados con propóleos cubanos que establecen la relación entre la actividad farmacológica y la composición química de la muestra evaluada. Evidentemente, el propóleo rico en nemorosona no debe ser el único tipo de propóleos en nuestro país, tomando en consideración la variedad en la vegetación y la localización de los múltiples apiarios. Al igual que existen en Brasil propóleos de color pardo, verde y rojo, los cuales difieren en su composición química entre sí, cabe esperar que en Cuba los propóleos de

color pardo tengan una composición química diferente a los de color rojo y, en consecuencia, su acción terapéutica también puede diferir.



## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Muestras de propóleos.

Para realizar el estudio de aislamiento, purificación y caracterización química, se empleó una muestra de propóleos de color rojo (M-A) procedente de la zona costera “La Coloma”, provincia de Pinar del Río.

Todas las muestras fueron recolectadas por la Estación Experimental Apícola “El Cano” entre el mes de octubre del año 2002 y diciembre de 2004. Previo a la preparación de los extractos, las muestras fueron almacenadas en frascos de cristal color ámbar y a temperatura de refrigeración (0-5 °C).

El estudio comparativo realizado por la técnica de CG-EM se desarrolló con otras seis muestras de propóleos rojos, procedentes de diferentes zonas del país.

Muestra	Lugar de recolección
M-B	Cabo de San Antonio, Pinar del Río
M-C	Caibarien, Villa Clara
M-D	Lagunilla, Pinar del Río
M-E	Güane, Pinar del Río
M-F	Güane, Pinar del Río
M-G	Jagüey Grande, Matanzas.

### II.2. Preparación del extracto (M-A).

Se tomaron 35,6 g de la muestra M-A y se extrajeron por maceración con metanol (6 X 50 mL) durante una hora, empleando agitación esporádica con el uso de un

agitador de vidrio. Los extractos metanólicos, filtrados por embudo de vidrio normal con algodón desengrasado, se reunieron y concentraron a sequedad en un rotoevaporador Büchi (40 °C) a presión reducida. El extracto seco se conservó en desecadora a vacío.

### II.3. Métodos de análisis cromatográficos.

#### II.3.1. Cromatografía en Columna (CC).

##### II.3.1.1. Sephadex LH-20.

Se pasaron 3 g de la muestra M-A a través de una columna SR-25 (Farmacia, 1 m x 2,5 cm) cargada con 100 g de Sephadex LH-20. Como fase móvil se empleó metanol, el cual fue suministrado por una bomba peristáltica P-1 (Farmacia Biotech). Las fracciones se reunieron según similitud cromatográfica por CCD.

### **II.3.1.2. Columna abierta**

Se utilizó una columna de vidrio (37 cm x 4 cm) que contenía sílica gel G 60 (25 g) como soporte y 5 g de sílica para adsorber la muestra (335 mg). Se adicionaron a la columna el soporte y la muestra, hasta alcanzar una altura de 25 cm.

Los disolventes cloroformo y metanol constituyeron las fases móviles, tanto puros como en mezclas, colectándose fracciones de 10 mL.

### **II.3.1.3. Cromatografía líquida a media presión (CLMP).**

Se empleó una columna Büchi B-685 de vidrio borosilicatado (400 x 35 mm) cargada con 150 g de sílica gel 60 (0,040 - 0,063 mm), empleando una bomba Büchi 688. Como fases móviles se emplearon cloroformo, metanol y las mezclas de n-hexano-cloroformo y cloroformo-metanol. La velocidad de flujo fue de 10 mL/min. La muestra disuelta en acetona fue adsorbida sobre celite.

### **II.3.1.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (I).**

Las separaciones se desarrollaron empleando una columna  $\mu$ -Bondapak C-18 (300 x 7,8 mm) Waters 10  $\mu$ m y como detector uno de índice de refracción (Waters R401).

Como fase móvil se utilizó una mezcla metanol-agua, impulsada por bombas Waters 590 a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min. Las inyecciones se realizaron manualmente y se empleó un “*loop*” de 100  $\mu$ L. El estudio se realizó a temperatura ambiente. Las muestras se disolvieron previamente en metanol y se centrifugaron (centrífuga Hettich Universal) a 4000 rpm x 5 min.

### **II.3.1.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (II).**

Sistema Agilent serie 1100, constituido por una bomba binaria G-1312, un inyector G-1328 A Rheodyne (“*Loop*” de 100  $\mu$ L), un degasificador G-1322 A y un detector de arreglo de diodos G-1315 A equipado con una columna Waters  $\mu$ -Bondapak RP-18 (250 mm x 4 mm).

La fase móvil utilizada fue H<sub>3</sub>CCN (0,1 % de TFA): H<sub>2</sub>O (0,1% TFA). Las inyecciones se realizaron manualmente y se inyectaron 10  $\mu$ L en todos los casos. El estudio se desarrolló a temperatura ambiente.

### **II.3.1.6. Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).**

#### **Preparación de la muestra (Procedimiento I)**

Se tomaron 5 g de propóleos (M-A), se extrajeron en baño ultrasónico (2X) con 100 mL de etanol (EtOH) a 70 % durante 30 min. Los extractos se reunieron, filtraron y evaporaron a sequedad en un rotoevaporador Büchi (50 °C).

Se pesó 1 mg del extracto seco, se mezcló con 50 µL de piridina seca y 100 µL de bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). La muestra se sometió a 100 °C durante 30 min., 1 µL de la mezcla resultante se analizó por CG-EM.

### **Condiciones cromatográficas**

Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N, equipado con un detector selectivo de masas, serie 5973N. La inyección de la muestra se realizó por el modo “*split*” con una relación de 1:50, siendo la temperatura del inyector 280 °C.

La separación se realizó en una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). La temperatura del horno se programó a 60 °C (2 min.), aumentando 3 °C por cada minuto hasta 310 °C (20 min.). Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min.

El espectrómetro de masas fue operado en el modo de impacto electrónico (IE) a 70 eV y con una temperatura de la fuente iónica de 230 °C. La detección se realizó en el modo de barrido total desde 35-700 uma.

### **Preparación de la muestra (Procedimiento II)**

Se tomaron 5 g de las muestras de propóleos (B-G), se extrajeron en baño ultrasónico (2X) con 100 mL de etanol (EtOH) a 70 % durante 30 min. Los extractos se reunieron, filtraron y evaporaron a sequedad en un rotoevaporador Büchi (50 °C).

Se pesó 1 mg del extracto seco, se mezcló con 100 µL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). La mezcla resultante se sometió a 60 °C durante 15 min. y 1 µL de la misma se analizó por CG-EM.

### **Condiciones cromatográficas**

Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N, equipado con un detector selectivo de masas, serie 5973N. La inyección de la muestra se realizó por el modo “*split*” con una relación de 1:10, siendo la temperatura del inyector 280 °C.

La separación fue llevada a cabo en una columna HP-5 (17 m x 0.2 mm x 0,33 µm). Se trabajó con una temperatura inicial de 80 °C, subiendo 5 °C/min. hasta 310 °C donde se dejó durante 20 min. Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,8 mL/min.

El espectrómetro de masas fue operado en las mismas condiciones que el procedimiento I, solo que se barrió un rango de 40 hasta 800 uma.

### **Proceso de identificación y cuantificación.**

Las estructuras de los flavonoides fueron propuestas sobre la base del proceso de fragmentación general así como por las estructuras de flavonoides antes identificadas por RMN desde la muestra M-A.

En algunos casos se utilizaron estándares de referencia (isoliquiritigenina, medicarpina y vestitol) aislados previamente, los cuales fueron cromatografiados para confirmar el tiempo de retención y patrón de fragmentación.

La cuantificación de los compuestos fue llevada a cabo por normalización interna del área bajo la curva de cada pico cromatográfico.

## **II.3.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD).**

### **II.3.2.1. CCD como prueba de identificación.**

#### **Cámara cromatográfica.**

Se utilizó una cámara de vidrio de 21,5 cm de altura, 23 cm x 6 cm el área de la base y 28 cm x 13 cm el área de la cara superior. La cámara se situó en la campana del laboratorio y se trabajó a temperatura ambiente (25-29 °C). Se estima un tiempo de saturación de 30 min., aproximadamente.

#### **Tipo de adsorbente.**

Se emplearon placas de Sílica gel GF<sub>254</sub> (0,20 mm; Macherey-Nagel) sobre soporte de aluminio para los análisis cualitativos. Las placas no fueron activadas y presentaron dimensiones de 10x20 cm o de 10x10 cm.

#### **Aplicación de la muestra.**

Se realizó una aplicación por punteo con el uso de una microjeringuilla de 25 µL, efectuándose un secado espontáneo de las aplicaciones.

#### **Patrones utilizados**

En el estudio se utilizaron un total de siete productos aislados y caracterizados por nuestro laboratorio, los cuales se citan a continuación.

- Nemorosona.
- (3S)-7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano (vestitol).                      Producto **5**
- (6aS,11aS)-3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano (medicarpina).      Producto **8**
- (3S)-2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano (isosativan).              Producto **7**

- |   |            |
|---|------------|
| ▪ 2',4,4'-trihidroxi chalcona (isoliquiritigenina). | Producto 1 |
| ▪ 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona (formononetina).   | Producto 3 |
| ▪ (-)-4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina)    | Producto 2 |

### **Muestras estudiadas.**

- Muestra M-1 (tipo I).
- Muestras de la A-G (tipo II).
- Muestra M-30 (tipo III).

### **Corrida o desarrollo del cromatograma.**

Se desarrolló una corrida ascendente utilizando como fase móvil la mezcla hexano:acetato de etilo (7:3). Se preparó a través de un simple proceso de mezclado. El hexano utilizado fue de la firma Riedel-de Haën y el acetato de etilo de la firma Scharlau. El punteo se realizó a 1 cm del borde inferior y la corrida fue aproximadamente de 8 cm. La distancia entre cada punteo fue de 1 cm.

Después de la corrida, el secado de la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana.

### **Revelado e identificación.**

Se realizaron dos tipos de revelado, físico y mixto. El revelado físico se desarrolló a través de la luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254 nm.

Para el revelado mixto se utilizaron dos métodos:

1.  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  y calor.

La disolución de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  se preparó de la siguiente forma: 12 g de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  se colocaron en un beaker (500 mL) con 350 g de hielo y lentamente se adicionaron 40 g de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, la mezcla se agitó con un agitador de vidrio y se colocó en un baño de agua (70 °C) hasta obtener una disolución amarillo naranja.

Después de asperjar la placa se calentó a una temperatura entre 105 y 110 °C de 3 a 5 min., hasta que se modificó la apariencia de la misma.

2. Vainillina/  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y calor.

Se asperjó previamente la disolución metanólica de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 %) y posteriormente la disolución metanólica de vainillina (1%).

De igual forma, después de asperjar la placa, se calentó a una temperatura entre 105 y 110 °C de 3 a 5 min., hasta aparición de color.

#### **II.3.2.2. CCD para monitoreo de fracciones.**

Se emplearon placas con similares características a las descritas en el epígrafe II.3.2.1. Como fase móvil se utilizó cloroformo-metanol (9:1) y como reveladores se usaron la luz UV (254 nm y 365 nm) y una disolución de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  y calor.

#### **II.3.3. Análisis físico-químico.**

##### **II.3.3.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

Los espectros de RMN se realizaron en un equipo Bruker DRX-300 o Bruker DRX-600. Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$  o  $\text{CD}_3\text{OD} + 0,1\%$  ATA) y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Los datos de corrimiento químico se expresaron en la escala delta ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento se refieren en hertz (Hz).

A todos los productos se le realizaron los espectros: RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, y HMBC. Todas las técnicas de RMN se desarrollaron según los métodos descritos (Braun y col., 1996).

##### **II.3.3.2. Determinación de la rotación óptica ( $\alpha$ ).**

La rotación óptica se midió en un polarímetro Perkin-Elmer, Norwalk, CT modelo 192, equipado con una lámpara de sodio (589 nm) y una celda de 10 cm. Como disolvente se empleó metanol.

##### **II.3.3.3. Dicroísmo Circular (DC).**

Las mediciones de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un dicógrafo J-710 (Jasco, Tokyo, Japón), empleando metanol como disolvente.

#### **II.4. Ensayo uterotrófico en ratas.**

##### **II.4.1. Preparación de las muestras.**

Las muestras para el ensayo farmacológico se prepararon disolviendo el extracto seco de la muestra M-A en dimetil sulfóxido (DMSO).

Se usaron tres dosis de propóleos 50 mg/kg, 250 mg/kg, y 500 mg/kg de peso. Además, se preparó una disolución de etinil estradiol (materia prima suministrada por la Empresa Laboratorio Farmacéutico “Reynaldo Gutiérrez”) la cual se suministró a una dosis de 1,5 mg/kg de peso.

##### **II.4.2. Descripción del ensayo.**

El estudio se desarrollo en ratas inmaduras de la línea Wistar que poseían entre veinte y veintidós días de nacidas, las cuales fueron suministradas por el Centro Nacional de Producción de Animales para Laboratorio (CENPALAB) con un peso entre 60 y 70 g. Todas las ratas poseían su certificado de calidad, encontrándose aptas para realizar el estudio.

Se sometieron a ensayo veinticinco ratas, que se dividieron aleatoriamente en cinco grupos de cinco ratas cada uno, los cuales se muestran en la tabla VII.

**Tabla VII: Grupos de tratamiento del ensayo uterotrófico.**

Grupos	Muestra	Dosis (mg/kg)
I	Propóleos	50
II	Propóleos	250
III	Propóleos	500
IV	Etinil estradiol	1,5
V	DMSO	-

Los animales fueron inyectados por vía subcutánea, aplicándose un volumen de 0,2 mL por administración, una vez al día.

Durante cuatro días se mantuvieron con acceso al agua y a la comida de manera “*ad libitum*” y las condiciones de luz y humedad fueron las descritas para la especie.

Los animales fueron pesados y sacrificados al quinto día, veinte cuatro horas después del último tratamiento. El útero fue rápidamente aislado, se cortó el tejido conectivo y se pesó. La determinación del peso del útero se efectuó en correspondencia con el peso absoluto de cada rata.

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  DS y el procesamiento estadístico se realizó a través del análisis de varianza, según la prueba de “*Student Newman Keuls*”, con una probabilidad menor de 0,05.

## **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **III.1. Obtención del extracto de M-A.**

La extracción de la muestra M-A (35,6 g) por el método de maceración se realizó seis veces durante una hora cada una, con el objetivo de favorecer la máxima disolución de los metabolitos presentes en la droga.

La selección de la maceración como método de extracción se debe a que es un método donde no se aplica calor que pueda afectar la composición química de la droga. Por otro lado, ocurre un proceso de disolución y no una difusión a través de tejidos.

El rendimiento del proceso fue de un 50 % dado que se obtuvieron 17,80 g de sustancias extraíbles. El extracto obtenido se sometió a diferentes métodos de aislamiento y caracterización.

### **III.2. Aislamiento y purificación del extracto de M-A.**

El esquema general de fraccionamiento se puede observar a continuación, en la figura 6.

#### **III.2.1. Cromatografía en Columna sobre Sephadex LH-20.**

Se tomaron 3 g del extracto metanólico concentrado y se fraccionaron utilizando una columna cargada con Sephadex LH-20, la cual logra la separación por el mecanismo de exclusión molecular.

Se colectaron 90 fracciones de 10 mL, que se reunieron según la similitud mostrada por CCD en ocho fracciones, desde la **1/1-1/8**. En la fracción **1/4** se obtuvo un precipitado (0,624 g), el cual se caracterizó por técnicas de RMN y se le denominó producto **3**.

A continuación, se tomó la fracción **1/5**, pues resultó la más interesante dado que poseía el mayor peso (3,279 g). Esta fracción fue analizada por dos técnicas cromatográficas diferentes, columna de Sephadex y CLMP.

El fraccionamiento por la columna de Sephadex se realizó bajo las mismas condiciones y en esta ocasión se colectaron 70 fracciones de 10 mL cada una. Estas fracciones fueron agrupadas en 12 muestras (**2/1-2/12**) de similar comportamiento cromatográfico.

De este proceso de separación resultaron de particular interés las fracciones **2/6**, **2/7** y **2/9**. En relación a la fracción **2/9** (335 mg), su purificación continuó con una cromatografía en columna abierta y la fracción **2/7** (1,223 g) continuó con el fraccionamiento por cromatografía en columna a media presión. La fracción **2/6** (0,372 g) presentó una peculiar coloración roja, su análisis prosiguió por CLAR (II)



### **III.2.2. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta.**

La purificación de la fracción **2/9** (335mg), anteriormente obtenida de la columna de Sephadex, continuó con una cromatografía en columna abierta. La muestra, previamente adsorbida en sílica, se sometió al fraccionamiento con la utilización de diferentes mezclas de disolventes tal como se aprecia en la tabla VIII. Con el empleo de esta técnica se llegó al aislamiento del producto **1**.

De este proceso se obtuvieron 246 fracciones de 10 mL, las cuales se reunieron según CCD en 35 fracciones, desde la **3/1-3/35**. La fracción numerada como **3/12** se consideró óptima para su posterior caracterización por técnicas espectroscópicas y se le denominó producto **1**.

### **III.2.3. Fraccionamiento por cromatografía líquida a media presión (CLMP).**

El proceso de purificación de la fracción **2/7**, antes eluida desde la columna de Sephadex, continuó con el fraccionamiento por cromatografía en columna a media presión. Esta técnica permitió la obtención directa de los productos **2, 5, 7, 8 y 9**.

La muestra (1,223 g) se disolvió en acetona y se adsorbió en celite, para ubicarla en la parte superior de la columna.

Se colectaron un total de 350 fracciones empleando una velocidad de flujo de 10 mL/min., utilizando como disolventes: hexano, cloroformo y metanol, puros y en mezclas de diferentes proporciones, tal como se aprecia en la tabla IX. Las muestras colectadas se reunieron según su similitud cromatográfica en 32 fracciones, desde la **4/1-4/32**.

En esta ocasión, según monitoreo por CCD, se pudieron aislar directamente seis compuestos de las fracciones **4/1, 4/3, 4/5, 4/15, 4/16**, los cuales se identificaron como productos **9** (4,2 mg), **7** (81,8 mg), **8** (194,9 mg), **5** (198,6 mg) y **2** (15,6 mg), respectivamente. La elucidación estructural de cada uno de ellos se desarrolló por técnicas de RMN. Se continuó el análisis de las fracciones **4/6** y **4/8** por CLAR semipreparativa (I).

Por la técnica de CLMP se analizó también la fracción **1/5** obtenida de la columna de Sephadex, de la cual se tomaron 930 mg y se procedió de la misma forma antes comentada. La tabla X muestra los disolventes empleados y sus proporciones.

De este proceso eluyeron 460 alícuotas de 10 mL, las cuales se agruparon en 45 fracciones (**5/1-5/45**) por similitud cromatográfica. Las fracciones **5/13** (5,9 mg) y **5/21** (27,2 mg) se sometieron al proceso de purificación por CLAR (I).

### **III.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (I).**

Como otro paso del proceso de separación y aislamiento se utilizó la CLAR semipreparativa, pues con esta técnica, además de lograr la separación de sustancias en mezcla, se pueden obtener cantidades suficientes de los productos para desarrollar el análisis estructural. Las fracciones fueron analizadas bajo similares condiciones.

Dicha técnica cromatográfica permitió la purificación final de los productos **4, 6, 10, 11, 12 y 13**

#### **Análisis cromatográfico de la fracción 4/6.**

De la fracción **4/6** se tomaron 60 mg y se inyectó la disolución metanólica, obteniéndose un total de seis señales. Estas señales se colectaron en un total de 10 alícuotas, dado el corte realizado en varias de ellas, en aras de garantizar compuestos totalmente puros. De esta corrida cromatográfica se lograron purificar los productos **4** (3,6 mg) **12** (1,2 mg) y **13** (23,2 mg), los cuales se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas de RMN.

#### **Análisis cromatográfico de la fracción 4/8.**

La fracción **4/8**, con un peso de 17 mg, se disolvió en metanol y se inyectó en el equipo de CLAR. En esta ocasión se colectaron 2,9 mg del producto **11**, el cual fue caracterizado por técnicas de RMN.

#### **Análisis cromatográfico de la fracción 5/13.**

Se tomaron los 5,9 mg obtenidos por CLMP y, previa disolución en metanol, se inyectó la muestra en el equipo. El cromatograma exhibió seis señales, correspondiendo una de ellas al producto **10** (2,4 mg), el cual posteriormente fue analizado por técnicas de RMN.

#### **Análisis cromatográfico de la fracción 5/21.**

La corrida cromatográfica de esta fracción (27,2 mg) se realizó en disolución metanólica, bajo las mismas condiciones antes señaladas. De la columna se colectaron un total de diez fracciones, correspondiendo la última de ellas (5,5 mg) con el compuesto denominado producto **6**; este fue caracterizado por técnicas de RMN.

### **III.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (II).**

Este método cromatográfico se utilizó para el análisis de la fracción **2/6**, antes obtenida del segundo fraccionamiento por Sephadex LH-20, epígrafe III.2.1

Independientemente de haberse utilizado la CLAR como método analítico, la técnica se empleó también con interés semipreparativo. Evidentemente, el proceso resultó más engorroso por la necesidad de realizar un mayor número de inyecciones.

Sin embargo, se contaba con un detector ultravioleta visible, el cual daba la posibilidad de trabajar a valores de longitud de onda ( $\lambda$ ) elevados (400 -800 nm); en ese rango se logró mejor diferenciación entre los picos cromatográficos y, por consiguiente, la obtención de eluatos más purificados.

En el cromatograma se pudieron obtener tres picos fundamentales; el correspondiente al tiempo de retención (TR) de 8,85 min. fue posteriormente analizado por técnicas de RMN y se le denominó producto **14**

### **III.3. Análisis estructural**

El estudio químico de la muestra M-A permitió el aislamiento y la caracterización de doce productos: una isoflavona, tres isoflavanos, seis pterocarpanos, además de una chalcona y una flavanona. También se sugirió la presencia de otros dos compuestos, una isoflavona y un isoflavonoide condensado con una chalcona (Figura 7).

La caracterización de cada uno de los metabolito se realizó según las técnicas espectroscópicas de RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC y HMBC.

#### **III.3.1- Producto 1.**

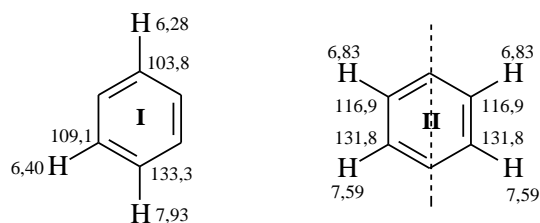
El análisis espectroscópico de este producto permitió deducir la fórmula general  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ , cuyo valor de índice de deficiencia hidrogeniónica (IDH) es diez, correspondiente con la presencia de ocho insaturaciones y dos cierres de anillo.

El espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 8) muestra la presencia de trece señales, de las cuales una se corresponde con el corrimiento químico característico de un grupo carbonilo conjugado ( $\delta$  194,35). Se resalta la apariencia que presentan las señales en  $\delta$  116,9 y 131,8, pues la intensidad de ambas señales es mucho mayor que las restantes.

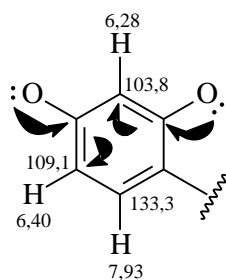
En el espectro RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9) se puede observar que todas las señales se corresponden con protones olefínicos o aromáticos. Según el análisis del espectro COSY (Figura 10), las señales de corrimiento químico a  $\delta$  6,28 (d, 2,0 Hz); 6,40 (dd, 2,0 y 8,6 Hz) y 7,93 (d, 8,6 Hz) pertenecen a un mismo sistema de espines (AMX), en tanto las señales de acoplamiento *orto* que resuenan en  $\delta$  6,83 (d, 8,1 Hz) y 7,59 (d, 8,1 Hz), corresponden a un segundo sistema de espines.

Solapado con esta última señal se encuentra otro protón en  $\delta$  7,57 (d, 15,3 Hz), que por su constante de acoplamiento debe ser un protón olefínico en posición *trans* respecto al de  $\delta$  7,76 (d, 15,3 Hz).

La asignación de los carbonos para ambos anillos se realizó a través de los espectros HSQC (Figura 11) y HMBC (Figura 12); el fragmento estructural correspondiente a cada uno de ellos puede observarse a continuación:



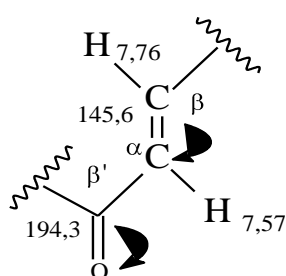
Para el sistema AMX (anillo I) la asignación se realiza, además, por los efectos electrónicos que tienen lugar en este fragmento de la molécula.



Como se aprecia, los protones a  $\delta$  6,28 y 6,40 sufren el efecto *orto/para* director que ejercen los átomos de oxígeno, los cuales se conjugan con el anillo aromático enriqueciendo electrónicamente los carbonos portadores de esos protones. Estos carbonos quedarían apantallados con respecto al resto de las posiciones, provocando que sus protones resuenen hacia campos altos.

Al anillo II se le asignan dos protones y dos carbonos con iguales valores de corrimiento. Esto se debe a que en ese fragmento de la molécula existe un plano de simetría, lo cual provoca que tanto en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 8) como en el de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9), dichas señales se observen con una intensidad que resulta ser el doble de otras señales del espectro con igual multiplicidad. Por otra parte, la diferencia de desplazamientos químicos entre los dos protones sugiere la presencia de un átomo de oxígeno en posición *orto* respecto al protón de menor corrimiento químico, por lo que se infiere la existencia de un sistema de espines tipo AA'XX'.

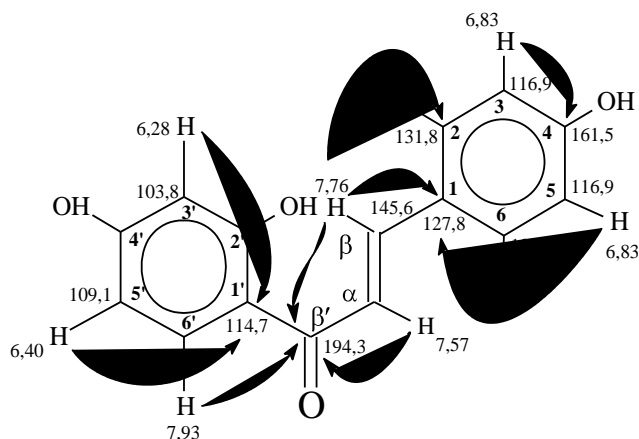
Del análisis anterior se deduce la existencia de una molécula de quince átomos de carbono y no de trece como realmente se observa en el experimento RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 8). Atendiendo al número de átomos de carbono y a la existencia de dos sistemas de espines aromáticos y uno olefínico, se propone la asignación estructural sobre la base de una molécula tipo flavonoide, considerando, además, la amplia distribución de estos metabolitos en la naturaleza. Por otra parte, el hecho de que existan dos protones olefínicos (sistema AB) con una constante de acoplamiento ( $^3J=15,3$  Hz), permite sugerir que el anillo C, característico de los flavonoides, no existe y en su lugar hay un residuo de tres átomos de carbono, por lo que se trataría en particular de una chalcona.



La asignación del fragmento olefínico de la molécula, se realizó a través de los espectros HSQC (Figura 11) y HMBC (Figura 12). El análisis de los efectos electrónicos de esta zona, hace notar que el protón de la posición  $\beta$  queda desapantallado con respecto al de la posición  $\alpha$ , lo que confirma la existencia del fragmento representado.

Además del agrupamiento carbonilo, existen tres átomos de carbono ( $\delta$  161,5; 166,3; 167,4) que por sus valores de corrimiento químico deben estar enlazados directamente a un átomo de oxígeno. La posición de cada uno de ellos se realizó según las interacciones mostradas en el experimento HMBC (Figura 12).

Por todo lo antes expuesto, se sugiere que el compuesto **1** se corresponde con una chalcona. En la siguiente estructura química se señalan las principales interacciones H-C del espectro HMBC:



Aunque las posiciones 4', 2' y  $\alpha$  no pudieron ser asignadas según los experimentos anteriores, el compuesto se corresponde con la isoliquiritigenina (2', 4, 4'-trihidroxi chalcona), y la asignación definitiva se realizó por comparación con el espectro de dicho compuesto informado por Agrawal y Bansal en 1989.

La isoliquiritigenina es un metabolito natural que ha sido aislado de especies tales como: *Sophora tomentosa*, *Dalbergia spp.*, *Onobrychis vicifolia*, *Medicago spp.*, *Machaerium spp.*, *Lespedeza cyrtobotrya*, *Dahlia tenuicaulis*, *Dahlia variabilis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Acacia spp.*, *Platymiscium spp.* y *Cyclolobium*, entre otras. Está ampliamente distribuido en las familias Leguminosae y Compositae y se le ha atribuido fundamentalmente actividad antineoplásica, antiinflamatoria y antifúngica (Tamir y col., 2001; Dictionary of Natural Products, 2003).

La figura 13 y la tabla XI muestran las asignaciones dadas para el producto **1**.

### III.3.2- Producto 2.

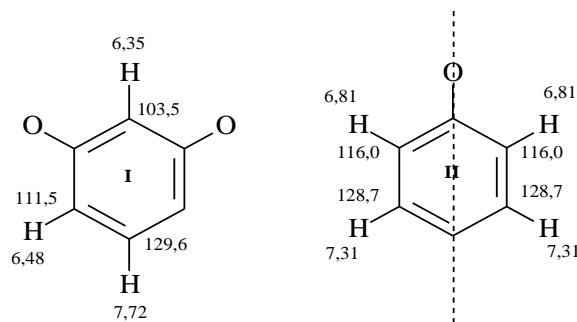
El análisis de los experimentos de RMN permitió asignar al producto **2** la fórmula general  $C_{15}H_{12}O_4$ , la cual se corresponde con un valor de IDH de diez (siete insaturaciones y tres cierres de anillo).

La zona alifática del espectro RMN  $^1H$  (Figura 14) está representada por tres señales que resuenan a  $\delta$  2,68 (dd, 2,9 y 16,9 Hz); 3,03 (dd, 13,0 y 16,9 Hz); 5,36 (dd, 2,9 y 13,0 Hz), las cuales se acoplan entre sí según el experimento COSY (Figura 15).

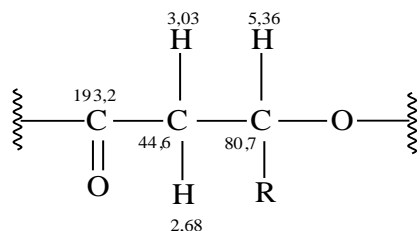
La zona aromática presenta cinco señales, de las cuales las de  $\delta$  6,35 (d, 2,1 Hz), 6,48 (dd, 2,1 y 8,7 Hz) y 7,72 (d, 8,7 Hz) pertenecen a un mismo sistema de espines. Las dos señales restantes que muestran un acoplamiento *orto* y

resuenan a  $\delta$  6,81 (d, 8,5 Hz) y 7,31 (d, 8,5 Hz) se corresponden con otro sistema de espines aromáticos. Lo anterior se confirma mediante el experimento COSY (Figura 15).

Haciendo un análisis de esta zona, se pudo concluir que el compuesto presenta dos sistemas de espines aromáticos, AMX (I) y AA'XX' (II). Similar patrón de sustitución fue antes descrito para la isoliquiritigenina. La asignación según el experimento HSQC (Figura 16) para ambos fragmentos, se presenta a continuación:



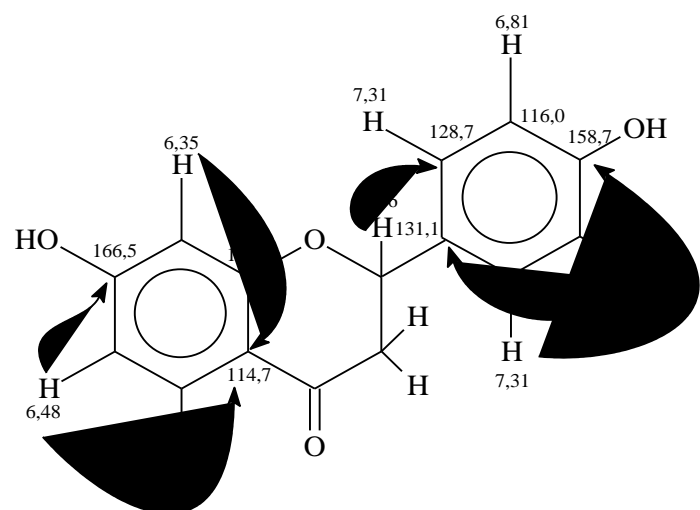
A diferencia del metabolito anterior, este producto presenta una zona alifática, la cual está constituida por tres átomos de carbono. Uno de los carbonos se encuentra formando parte del grupo carbonilo, cuya señal característica ( $\delta$  193,2) se observó en el experimento RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17). Atendiendo al espectro HSQC (Figura 16), se propuso el siguiente fragmento alifático.



Esta zona se compone de un grupo metino (CH), un metileno (CH<sub>2</sub>) y el grupo carbonilo. Teniendo en cuenta el efecto desactivante que ejerce el heteroátomo sobre los carbonos adyacentes, contiguo a este se ubicará el grupo que resuena hacia campos bajos (CH).

Integrando los fragmentos antes sugeridos y teniendo en cuenta el número total de átomos de carbono según el experimento RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17), se deduce que el metabolito es un flavonoide derivado de la 2-fenilcromanona.

La siguiente estructura muestra las principales interacciones H-C del espectro HMBC (Figura 18).

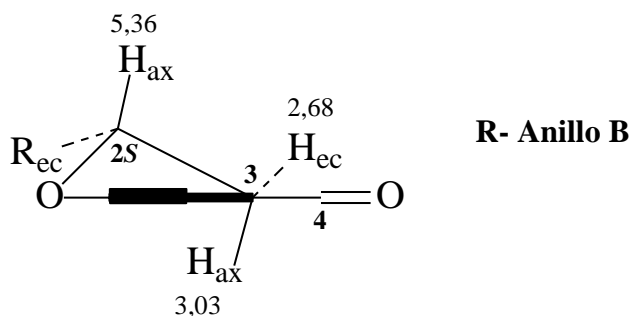


Debe notarse la presencia de tres carbonos cuaternarios que resuenan hacia campos bajos ( $\delta$  158,7; 165,3 y 166,5). Sus valores de corrimiento químico están justificados por el efecto desactivante que ejercen los átomos de oxígeno unidos a ellos. La ubicación de estos

carbonos y los restantes carbonos cuaternarios ( $\delta$  114,7 y 131,1) se fundamenta por las interacciones a larga distancia H-C deducidas del experimento HMBC (Figura 18).

De todo el análisis realizado se llegó a la identificación de la molécula: 4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina). La figura 19 y la tabla XII muestran la propuesta estructural para este metabolito.

Este tipo de metabolito no presenta doble enlace entre los C-2 y C-3, lo cual propicia que sobre el C-2 se genere un centro quiral. Si se hace un análisis de las  $J_{2,3}$ , se deduce que el H-2 ( $J=13,0$  Hz) presenta una interacción diaxial con el H-3 que resuena a 3,03 ppm, quedando la posición ecuatorial para el fenilo y para el H-3 que presenta un corrimiento a 2,68 ppm, tal como se representa a continuación.



Según la literatura (Slade, 2005), valores de constantes de acoplamiento ( $J_{2,3}$ ) grandes entre el H-2 y el H-3 (ax) indican que todas las flavanonas naturales están termodinámicamente favorecidas cuando el grupo fenilo (anillo B) se ubica en posición ecuatorial. Esto implica que todas las flavanonas levorrotatorias poseen la configuración 2S

La determinación de la actividad óptica,  $[\alpha]_D -37,3$  (c 0,16, CH<sub>3</sub>OH) confirmó al compuesto como la (-)-liquiritigenina, cuyos datos ( $[\alpha]_D$  y RMN) coinciden con los informados por Youssef y col. en 1998.

La liquiritigenina ha sido aislada de diversos géneros de la familia Leguminosae, como por ejemplo: *Centrolobium*, *Dalbergia*, *Medicago*, *Umtiza*, *Zollernia*, *Onobrychis*, *Myroxylon*, *Peltogyne*, *Glycyrrhiza*, *Cicer* y *Platymiscium*. Este compuesto se ha valorado como agente antiinflamatorio (Dictionary of Natural Products, 2003).

### III.3.3- Productos 3 y 4.

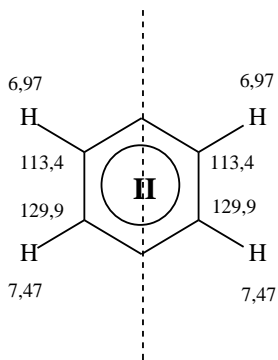
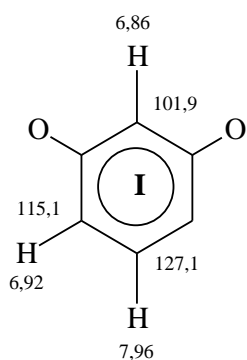
Los compuestos **3** y **4** pertenecen al grupo de los isoflavonoides y en particular son isoflavonas de fórmula general C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> y C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> respectivamente, ambos con un valor de deficiencia hidrogeniónica de once (tres cierres de anillo y ocho insaturaciones).

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 20) del producto **3** se aprecia una escasa zona alifática, donde sólo una señal corresponde al compuesto, pues el resto resultan ser impurezas. Esta señal resuena a  $\delta$  3,76 (s) y muestra las características propias de un grupo metoxilo.

Con valores de corrimiento químico entre 6,8 y 8,3 ppm resuenan un total de seis protones de características olefínicas o aromáticas. En este caso el espectro COSY (Figura 21) sugiere la presencia de dos sistemas de espines, en uno de los cuales se acopla la señal a  $\delta$  6,97 con la de  $\delta$  7,47, ambas como dobletes de 8,7 Hz. En el segundo sistema se acoplan los protones a  $\delta$  7,96 (d, 8,7 Hz) y 6,92 (d, 2,2 Hz). En esta última señal la multiplicidad no resulta clara, sin embargo, por la apariencia e intensidad de la misma, así como por el acoplamiento con un doblete de  $^3J=8,7$  Hz, sugiere que en realidad debe ser un doblete de doblete que se presenta ligeramente solapado con la señal a 6,97 ppm. Evidentemente, la señal que completaría este sistema de espines sería el doblete que resuena a 6,86 ppm con una constante de acoplamiento de 2,1 Hz.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22) presenta un total de catorce señales incluyendo la del agrupamiento metoxilo. Debe notarse que dos de las señales se presentan con una intensidad superior al resto, lo cual permite deducir que uno de los sistemas de espines podría corresponder con un sistema AA'XX', característico de un patrón de sustitución ya comentado anteriormente.

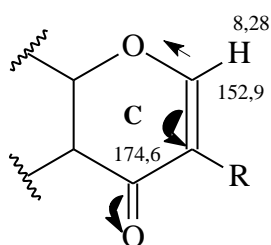
La propuesta estructural de cada uno de los fragmentos aromáticos se realizó con ayuda del experimento HSQC (Figura 23) y se muestra a continuación:



El fragmento **I** muestra un sistema de espines AMX, presente también en los compuestos antes caracterizados.

Realizando un análisis integral, según la apariencia y número de señales presentes en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22), todo parece indicar que el tercer metabolito aislado también se corresponde con un flavonoide. Además, la presencia de una señal característica de grupo carbonilo ( $\delta$  174,6) sugiere que el anillo C del compuesto es del tipo  $\gamma$ -pirona.

La propuesta estructural de este fragmento se presenta a continuación:



A este fragmento estructural se asigna el protón más desblindado ( $\delta$  8,28, s) del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 20), donde resulta evidente la baja densidad electrónica de su entorno, provocada por los efectos electrónicos representados sobre el heterociclo. De lo anterior se puede sugerir la presencia de una isoflavona, pues la posición del protón adyacente al átomo de oxígeno sólo deja al grupo fenilo la posición del sustituyente R.

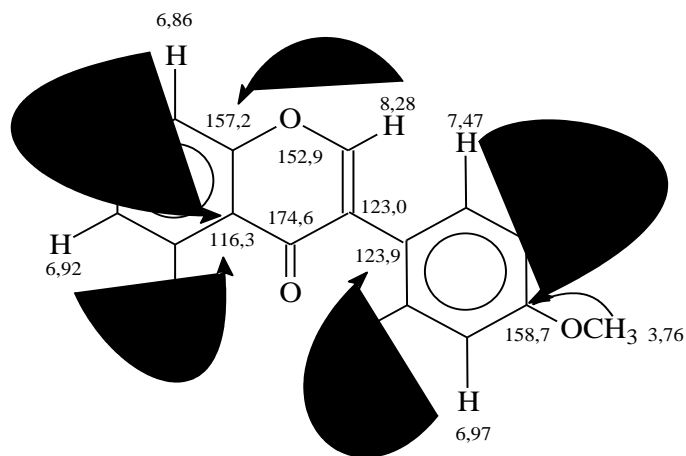
Debe señalarse que el carbono portador del sustituyente R debe presentar un valor de corrimiento muy inferior a los carbonos que resuenan contiguos a él.



Fusionando cada uno de los estructurales comentados y con el HMBC (Figura 24), se llega a la estructural.

Como puede observarse, las correspondientes a los carbonos portadores de oxígenos poseen corrimiento químico: 157,2;

Existen otros tres carbonos cuaternarios que resuenan hacia campos altos (116,3; 123,0 y 123,9 ppm). Cada uno de ellos se ubica atendiendo a las interacciones a larga distancia H-C (Figura 24).



fragmentos  
apoyo del espectro  
siguiente propuesta

posiciones  
cuaternarios  
valores elevados de  
158,7 y 162,3 ppm.

Finalmente, la asignación estructural del producto **3** se presenta en la figura 25 y en la tabla XIII. Su nombre químico es: 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona (formononetina). Este metabolito fue identificado por Cuesta-Rubio (2001) en una muestra de propóleos rojo, procedente también de la zona de Pinar del Río.

El compuesto **4**, que presenta una estrecha relación estructural con la formononetina, sólo muestra cinco señales de protones (Figura 26). Una de ellas se aprecia en 8,11 ppm, lo cual constituye una señal característica para la posición 2 de las flavonas.

Este compuesto sólo difiere de la formononetina en el patrón de sustitución que presenta el anillo A. En este caso dicho anillo muestra un sistema de espines AB, dihidroxi sustituido, con los protones en posición meta. La presencia de un grupo oxigenado en el C-5 debe provocar un ligero desplazamiento de la señal del grupo carbonilo hacia campos bajos, debido a la formación de puentes de hidrógeno. La presencia de este grupo carbonilo no pudo ser confirmada con los experimentos realizados. Este comportamiento, aunque no deseado, es común a carbonos cuaternarios con tiempos de relajación grandes.

Dada la poca cantidad aislada de este producto fue imposible realizar el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , por lo que los datos espectroscópicos se dedujeron de los experimentos RMN 2D y por comparación con la literatura (Agrawal y Bansal, 1989; Chang, 1994).

Se propone entonces que el producto **4** se corresponda con el compuesto de nomenclatura química: 5,7-dihidroxi-4'-metoxi isoflavona (biocanina A). La confirmación de este metabolito precisa la realización del RMN  $^{13}\text{C}$  y/o de la espectrometría de masas (EM).

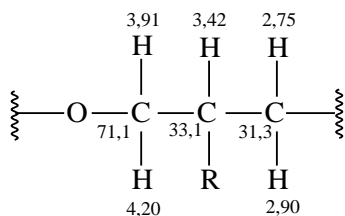
### III.3.4- Productos 5, 6 y 7.

Los productos **5**, **6** y **7** mostraron características muy similares en la zona alifática del experimento de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ . Según el análisis correspondiente, los tres compuestos también pertenecen a la familia de los flavonoides, se corresponden con isoflavanos de fórmula general  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$  para los compuestos **5** y **6** y  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4$  para el producto **7**. Los tres metabolitos presentan un valor de IDH=9, propio de la presencia de seis insaturaciones y tres cierres de anillo. Teniendo en cuenta la similitud estructural que estos productos exhibieron, el análisis estructural detallado solo se desarrollará con el producto **5**. De igual forma, sólo se presentan los espectros de RMN de este último y los datos espectroscópicos de los productos **6** y **7** se resumen en tablas.

Atendiendo a los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 27) y RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28) del producto **5**, se pudo observar la presencia de una zona aromática y otra alifática. Según el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 27), se observan cuatro carbonos alifáticos y doce carbonos aromáticos, para un total de dieciséis átomos de carbono.

En relación a la zona alifática, existen cinco protones, además del agrupamiento metoxilo ( $\delta$  3,69), los cuales se corresponden con dos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) y un metino ( $\text{CH}$ ). El grupo  $\text{CH}_2$  con un  $\delta_{\text{C}}$  71,1 es el más desblindado, por lo que se deduce su unión a un elemento electronegativo (oxígeno).

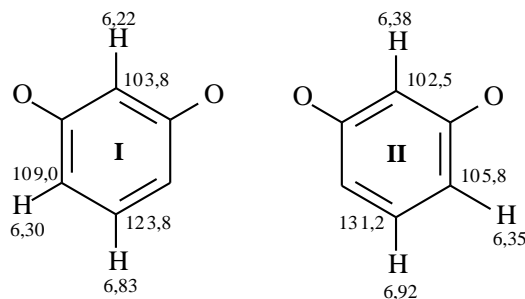
Unido a este carbono según el espectro HSQC (Figura 29) se encuentran los protones a  $\delta$  3,91 (t, 10,0 Hz) y el de  $\delta$  4,20 (m). Este último se acopla con el protón a  $\delta$  3,42 (m), correspondiente al grupo CH y con el protón metilénico a 2,75 (dd, 6,0 y 15,0 Hz). El protón metilénico restante aparece a  $\delta$  2,90 (dd, 6,0 y 15,0 Hz), quien también muestra picos cruzados con el protón a  $\delta$  3,42 (m). Los acoplamientos protónicos y las asignaciones de los protones correspondientes a cada agrupamiento se pudieron deducir de los experimentos HSQC y COSY, figuras 29 y 30, respectivamente. Según el análisis anterior, se dedujo el siguiente fragmento estructural:



Con relación a la zona aromática, según la apariencia de los espectros RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28), HSQC (Figura 29) y COSY (Figura 30), se pueden observar las señales de seis protones: dos dobletes con acoplamiento *orto*, dos con acoplamiento *meta* y otros dos con multiplicidad de doblete de doblete; estas últimas se presentan ligeramente solapadas.

El análisis de los experimentos anteriores permite sugerir la presencia de dos sistemas de espines aromáticos AMX, en los cuales cada anillo presenta tres protones. Los protones a  $\delta$  6,22 (d, 2,4 Hz); 6,30 (dd, 2,4 y 9,0 Hz); 6,83 (d,

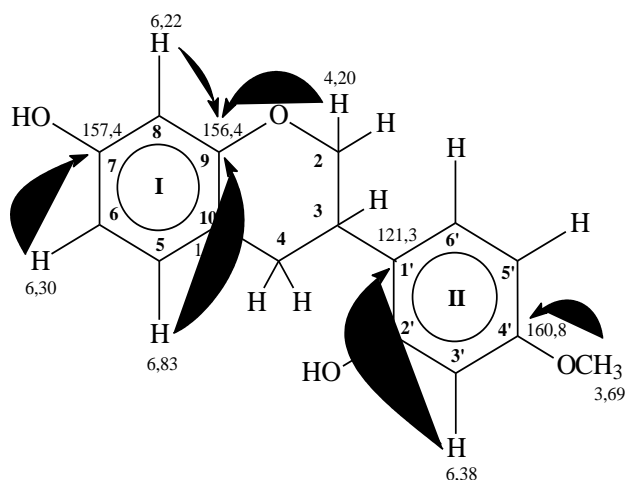
9,0 Hz) corresponden a un sistema de espines y los protones a  $\delta$  6,38 (d, 2,4 Hz); 6,35 (dd 2,4 y 9,0 Hz); 6,92 (d, 9,0 Hz) pertenecen al segundo sistema de espines aromático. Integrando los resultados obtenidos se proponen los siguientes fragmentos estructurales:



Según el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 27) existen cuatro señales a  $\delta$  156,4; 157,2; 157,4 y 160,8 que indican la presencia de cuatro funciones oxigenadas enlazadas a estos carbonos, correspondiendo una de estas al grupo metoxilo ( $\text{OCH}_3$ ).

Teniendo en cuenta: el número de átomos de carbono presentes en la molécula, el valor de deficiencia hidrogeniónica, la presencia de dos anillos aromáticos y de una porción alifática, así como los compuestos antes caracterizados del extracto en estudio, se propone que la estructura del compuesto analizado se corresponda a la de un isoflavonoide.

Atendiendo a las principales interacciones mostradas en el experimento HMBC (Figura 31), la disposición de los anillos **I** y **II** y de los carbonos cuaternarios es la que se presenta.



Si bien se ha podido definir que los carbonos cuaternarios de las posiciones 2' y 4' forman parte del anillo B, con los datos experimentales no es posible ofrecer una asignación definitiva, para lo cual hubiera sido de gran utilidad la técnica NOESY. Sin embargo, experiencias prácticas y datos informados en la literatura (Agrawal y Bansal, 1989), muestran que generalmente en sistemas aromáticos sustituidos por grupos OH y  $\text{OCH}_3$ , el carbono de la posición 4' suele salir a mayor valor de corrimiento químico que el de la posición 2'.

Para este tipo de metabolitos, la presencia de un sustituyente oxigenado en la posición 2' es una característica común para la mayoría de los isoflavanos identificados y guarda relación con el origen biosintético (Williams y col., 1989).

La asignación del producto **5** se presenta en la figura 32 y tabla XIV. La estructura inferida se corresponde con el 7,2'-dihidroxi-4-metoxi isoflavano (vestitol). Los metabolitos estructuralmente relacionados con el vestitol, neovestitol (**6**) e isosativan (**7**), se muestran en la tabla XV.

Todos los isoflavanos aislados presentan una zona alifática muy similar, con valores de  $\delta_H$  entre 3,91-4,06 (H-2ax); 4,20-4,35 (H-2ec); 3,42-3,52 (H-3ax); 2,90-3,02 (H-4ax) y 2,75-2,91 (H-4ec), así como señales de  $\delta_C$  69,9-71,1 (C-2), 31,7-33,1 (C-3) y 30,2-31,4 (C-4).

Resulta un elemento característico la apariencia de la señal correspondiente al H-2ax, la cual se observa como triplete (t), aunque en realidad es un doblete de doblete (dd) con igual constante de acoplamiento ( $^2J$  y  $^3J$ ). Precisamente este valor de  $^3J$  deja implícita la disposición axial-axial con respecto al H-3. De igual forma sucede con los protones correspondientes al C-4 donde ambos exhiben apariencia de doblete de doblete (dd), solo que la  $^3J$  del H de mayor corrimiento químico posee un valor entre 6-14 Hz, indicativo de una disposición diaxial con respecto al C-3.

El neovestitol (2',4'-dihidroxi-7-metoxi isoflavano), producto **6**, presenta igual fórmula molecular que el vestitol, solo difieren en la ubicación de los sustituyentes. Estos metabolitos se consideran isómeros de posición, pues en este compuesto el grupo metoxilo se ubica sobre el C-7 a diferencia del vestitol que lo tiene sobre C-4'.

El isosativan (**7**) difiere del vestitol y del neovestitol en la presencia de un grupo  $OCH_3$  adicional. Aunque se conoce que existe un  $OCH_3$  sobre los carbonos 7 y 4' ( $\delta_H$  3,78 y 3,77), la asignación específica del corrimiento químico de cada uno no pudo ser definida.

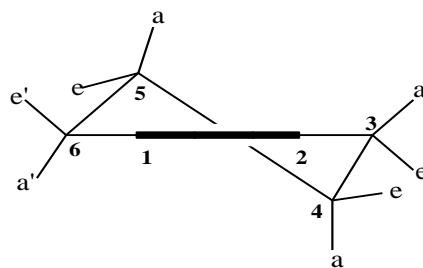
Esta molécula reafirma la sugerencia antes realizada para el vestitol, pues el C-4' suele resonar a campos más bajos que el C-2'. Este producto **7** tiene igual patrón de sustitución en el anillo B que el producto **5** y como se muestra en la (tabla XV), el C-4' se aprecia en 159,0 ppm mientras que el C-2' resuena en 154,2 ppm.

Para estas tres moléculas se puede observar la presencia de un carbono asimétrico en C-3, lo cual sugiere dos posibilidades enantioméricas para cada uno de los productos analizados.

La determinación de la actividad óptica no es suficiente para asignar la configuración absoluta de estas moléculas. Para este propósito se realizó el espectro de dicroísmo circular (DC) (Figura 33).

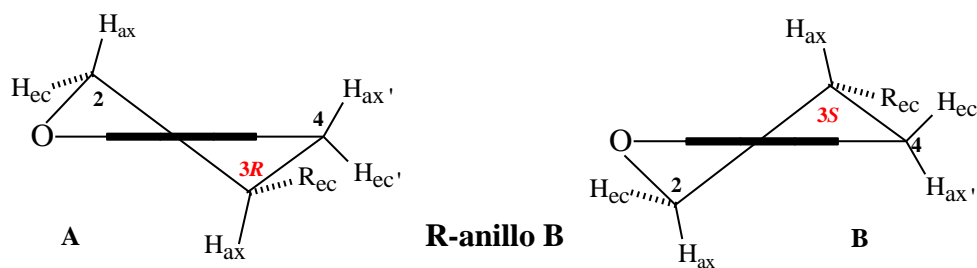
Los tres isoflavanos aislados exhiben un Efecto Cotton negativo en la zona comprendida entre 283-289 nm y positivo en la zona entre 240-246 nm, lo cual indica que la configuración del C-3 es *S*, según se reporta en la literatura (Slade y col, 2005). Los compuestos se corresponden entonces con: (3*S*)-7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano (vestitol) **5**, (3*S*)-2',4'-dihidroxi-7-metoxi isoflavano (neovestitol) **6** y (3*S*)-2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano (isosativan) **7**; los valores de actividad óptica  $[\alpha]_D +5,02$  (c 1,06, CH<sub>3</sub>OH) (**5**),  $[\alpha]_D -24,08$  (c 0,07, CH<sub>3</sub>OH) (**6**) y  $[\alpha]_D +7,5$  (c 0,51, CH<sub>3</sub>OH) (**7**) confirman dicha asignación.

La conformación más favorable del anillo C es en silla, lo cual se asume por analogía con el presencia en el ciclohexeno de un doble enlace, hace carbono Sp<sub>2</sub> y sus carbonos adyacentes se sitúan en 1, C-2, C-3 y C-6), tal como se precia en esta hidrógenos u otros átomos unidos a los C-4 y C-5 posiciones axial y ecuatorial, sin embargo, los a los C-3 y C-6 adoptan las posiciones pseudo-axial (a') o pseudo-ecuatorial (e') (Eliel, 1985).



forma de media ciclohexano. La que los átomos del un mismo plano (C-representación. Los ocupan las sustituyentes unidos

Según estudios realizados por difracción de rayos X, se plantea que los sustituyentes en posición e o e' suelen ser más estables que los de la posición a o a'. Teniendo en consideración lo antes planteado, se representan las dos conformaciones posibles y para cada una de ellas la configuración más estable. La línea engrosada considera al anillo A.



Realizando un análisis integral de la  $^3J_{2,3}$  y  $^3J_{3,4}$  y la configuración absoluta del C-3 (notación *S*) según DC, la conformación de los isoflavanos aislados se corresponde con el conformero B.

Ambos enantiómeros del vestitol (*R* y *S*) han sido identificados en plantas pertenecientes a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, en las cuales suele presentarse como fitoalexina. El vestitol es un metabolito también aislado de la especie *Glycyrrhiza glabra* y se ha demostrado su actividad inhibitoria del crecimiento de la bacteria

*Helicobacter pylori*. Por tal motivo pudiera ser efectivo en el tratamiento de las úlceras pépticas (Fukai y col., 2002).

El neovestitol es un metabolito menos común y ha sido aislado de las hojas de *Dalbergia sericea*, especie también perteneciente a la familia de las Leguminosae (Dictionary of Natural Products, 2003).

El isosativan fue identificado por Cuesta-Rubio (2001) en una muestra de propóleos rojo cubano. Sin embargo, se determina ahora por primera vez su configuración absoluta a través de la técnica de DC. Ha sido aislado de la especie *Dalbergia ecastophyllum* y es una fitoalexina de las especies *Medicago scutellata*, *Medicago rugosa* y *Trifolium spp.* (Dictionary of Natural Products, 2003).

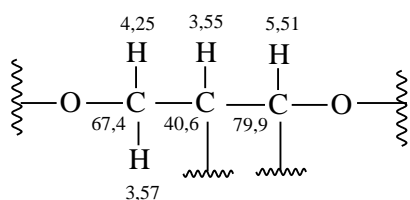
### III.3.5- Productos 8-13.

El proceso de aislamiento permitió obtener también seis metabolitos correspondientes al grupo de los pterocarpanos. De forma similar al análisis realizado para los isoflavanos, sólo se discute en detalle la caracterización estructural de un pterocarpano (producto **8**). El resto de los productos (**9-13**) se analizan de forma comparativa y sus datos de RMN se resumen en una tabla.

El análisis de cada uno de los experimentos de RMN permitió sugerir para el producto **8** la fórmula general  $C_{16}H_{14}O_4$ , correspondiente a un IDH de diez, el cual responde a seis insaturaciones y cuatro cierres de anillos.

Los pterocarpanos muestran una zona alifática caracterizada por dos grupos metinos y un metileno. Según el espectro de RMN  $^1H$  (Figura 34) de este producto, la zona alifática muestra cinco señales, siendo una de ellas ( $\delta$  3,78, s) característica de un grupo metoxilo. Se aprecia una señal con apariencia de multiplete, la cual según análisis posteriores se puede dividir en dos señales parcialmente solapadas con corrimientos químicos a  $\delta$  3,55 y 3,57. Más desblindadas se presentan dos señales a  $\delta$  4,25 (m) y  $\delta$  5,51 (d, 6,2 Hz), que según el espectro COSY (Figura 35) se acoplan con la señal a  $\delta$  3,57 y 3,55, respectivamente.

Para esta zona alifática se realizó la asignación C-H para cada señal, considerando el experimento HSQC (Figura 36) y se pudo concluir que dicho fragmento está formado por dos grupos metinos que resuenan a  $\delta_C$  40,6 y 79,9 y que se encuentran unidos a los protones a  $\delta$  3,55 y 5,51, respectivamente. Un tercer grupo se corresponde con el carbono metilénico ( $CH_2$ ) que resuena a  $\delta$  67,4 y al que se unen los protones a  $\delta$  3,57 y 4,25. El fragmento estructural propuesto es el siguiente.

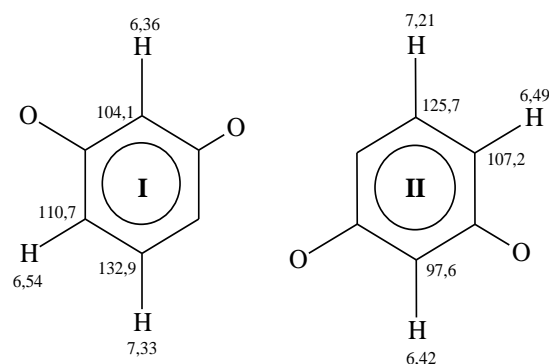


La ubicación de los átomos de carbono de mayor corrimiento químico está en correspondencia con el efecto desblindante que ejercen los átomos de oxígeno adyacentes a ellos.

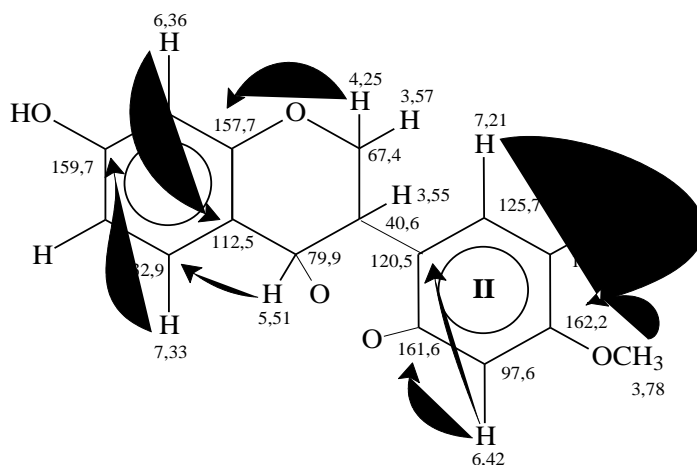
En la zona aromática se observan seis señales entre  $\delta$  6,36 y 7,33 ppm. Del análisis de los espectros COSY (Figura 35) y HMBC (Figura 37) se pudo deducir que las señales a  $\delta$  6,36 (d, 2,4 Hz), 6,54 (dd, 2,4 y 8,4 Hz) y 7,33 (d, 8,4 Hz) pertenecen a un sistema de espines, diferente de las señales a  $\delta$  6,42 (d, 2,2 Hz), 6,49 (dd, 2,2 y 8,1 Hz) y 7,21 (d, 8,1 Hz).

En este caso los sistemas de espines aromáticos tienen igual apariencia, por lo que los fragmentos correspondientes a ellos solo difieren en los valores de corrimiento químico. Con el apoyo del espectro HSQC (Figura 36) se pudo llegar a la siguiente asignación:

Teniendo en cuenta que el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 38) mostró dieciséis señales, incluyendo la del grupo metoxilo, y los antecedentes de la presencia de flavonoides en otras fracciones de esta muestra de propóleos, se sugiere realizar la asignación sobre la base del esqueleto de estos metabolitos.



La siguiente propuesta estructural se fundamenta en el análisis de las interacciones H-C del experimento HMBC (Figura 37) y en los efectos electrónicos que producen los heteroátomos (oxígeno).



Si bien se deduce que sobre los carbonos a  $\delta$  79,9 y  $\delta$  161,6 deben existir átomos de oxígeno, cabe la posibilidad de estar en presencia de un isoflavan 4-ol o de un pterocarpano. En este sentido, la presencia en la naturaleza de los isoflavan 4-ol es bastante limitada y algunos de los reportes que al respecto existen no son de productos de origen natural sino semisintético. Por esta razón, no existen estudios detallados y sistemáticos de sus espectros y estructuras (Wähälä y col., 1997).

Por todo lo anterior, la figura 39 y la tabla XVI sugieren la asignación del producto **8** sobre la base de un pterocarpano, cuyo nombre químico es: 3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano (medicarpina). Este metabolito está presente en muchas especies de Legumimosas y es el pterocarpano de mayor distribución en la naturaleza.

Cuesta-Rubio, en el 2001, logró identificar este metabolito, sin embargo la asignación se efectuó sobre la base de un isoflavan-4 ol. Lógicamente, los efectos que sobre las posiciones 4 y 2' existen, se atribuyen a la presencia de sustituyentes oxigenados, los cuales en ambos casos estarían presentes.

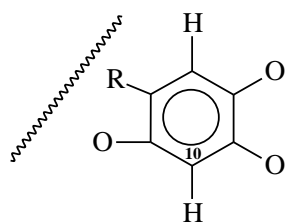
Con similares características estructurales, se presentan otros cinco compuestos (**9-13**), cuyos datos espectroscópicos se muestran en la tabla XVII.

La zona alifática de estos metabolitos presenta  $\delta_H$  entre 4,25-4,32 (H-6 $\alpha$ ), 3,56-3,66 (H-6 $\beta$ ), 3,50-3,62 (H-6a) y 5,43-5,56 (H-11a), así como  $\delta_C$  entre 65,4-67,9 (C-6), 39,5-41,3 (C-6a) y de 77,4-80,2 (C-11a). Las señales correspondientes a los protones de la posición 6 $\beta$  y 6a, en la mayoría de los pterocarpanos, se presentan ligeramente solapadas. Sin embargo, cuando se realiza el experimento de RMN  $^1H$  en cloroformo deuterado ( $CDCl_3$ ), como es el caso del compuesto **12**, se logra buena resolución.

La asignación axial ( $\beta$ ) o ecuatorial ( $\alpha$ ) para los protones de la zona alifática se realiza sobre la base de sus constantes de acoplamiento a dos y tres enlaces.

Generalmente, la señal perteneciente al H-6a se presenta como multiplete y la del H-6 $\beta$  tiene apariencia de triplete (t), aunque en realidad es un doblete de doblete (dd) con igual constante de acoplamiento. En este último caso, la  $^3J_{6\beta,6a}$  presenta un valor que oscila entre 10,1 y 11,0 Hz para todos los pterocarpanos, esto indica que estos protones presentan una interacción diaxial. En relación a la  $^3J_{6a,6a}$ , ésta muestra valores entre 4-5 Hz, indicativo de una interacción ec-ax.

En todos los pterocarpanos aislados se observa el sistema de espines aromáticos AMX, al parecer característico para la mayoría de los productos identificados en la muestra M-A. Los metabolitos del **8-12** presentan este tipo de sistema en el anillo A y los compuestos **8, 9 y 13** en el anillo D.



AB (11, 12)

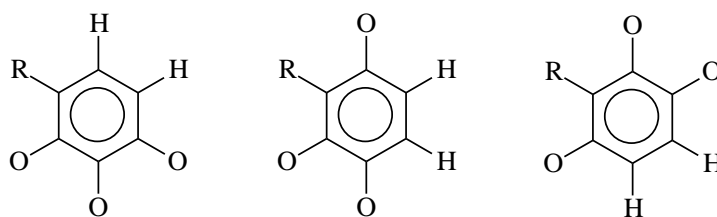
Los productos **11** y **12** muestran en el anillo D un sistema AB donde las señales de cada uno de los protones se observa como singlete (s), ya que se ubican en posición *para* uno respecto al otro, tal como se observa en la estructura. En ambos casos el  $\delta_H$  y



$\delta_C$  del metino en posición 10, están influenciados por el efecto *o/p* director de los átomos de oxígeno que se ubican sobre los C-9 y C-10a.

Existe otro sistema de espines aromáticos AB en los productos **10** y **13** pero, en esta ocasión, las señales protónicas presentan una apariencia de doblete (d) con una  $^3J$  de 9,8 Hz (anillo D, compuesto **10**) y 8,3 Hz (anillo A, compuesto **13**).

Independientemente del análisis de los efectos electrónicos que ejercen los tres oxisustituyentes y por las interacciones H-C de los experimentos HMBC, este sistema puede presentarse de tres formas posibles, como se muestran a continuación.



AB (**10**, **13**)

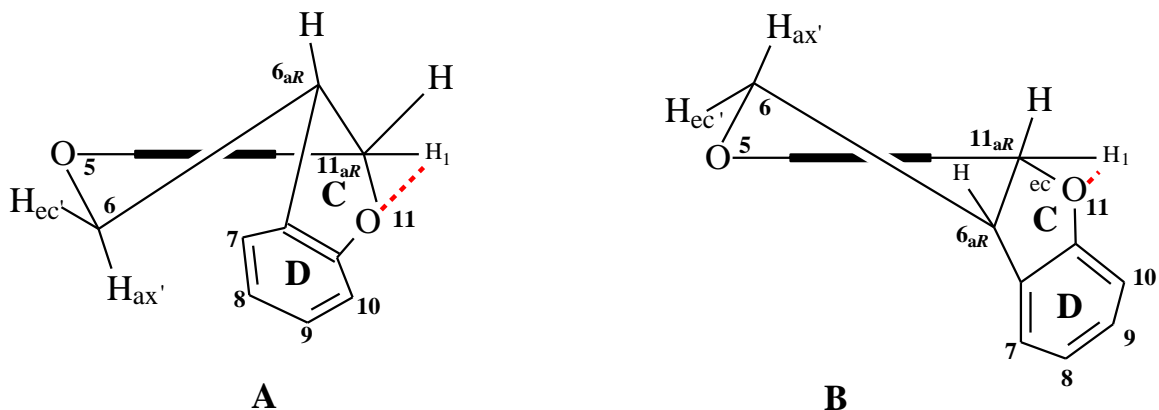
Según datos prácticos de la literatura especializada (Agrawal y Bansal, 1989), cuando sobre el anillo B de cualquier flavonoide se sitúan dos protones en posición *orto* y tres átomos de oxígeno consecutivos; el corrimiento químico del átomo de carbono intermedio es significativamente menor que los dos C adyacentes. En este caso pudiera sugerirse que el doble efecto *orto* logra un mayor efecto blindante que la combinación de un efecto *orto* y uno *para*. En todos los casos se presentan oxisustituyentes (OCH<sub>3</sub> u OH) en posición 9 y 3.

Estos compuestos presentan dos centros quirales en las posiciones 6a y 11a que propician la existencia de cuatro enantiómeros. Sin embargo, en la naturaleza sólo se ha encontrado la fusión *cis*, la cual se ha demostrado que es energéticamente más favorable que la fusión *trans* (Szarvas y col., 2000).

Para determinar la configuración absoluta de cada uno de estos compuestos se realizó el espectro de DC, en el cual se analizó el EC correspondiente a la banda  $^1L_b$  y  $^1L_a$ . Se pudo concluir que los metabolitos **8** y **9** poseen la configuración 6a*S*, 11a*S* (dextrorrotatorios), pues se observa un Efecto Cotton positivo entre 236-238 nm y negativo entre 287-294 nm (Figura 40). Los compuestos del **10-13** muestran un comportamiento inverso por lo que la configuración asignada a ellos es 6a*R*, 11a*R* (levorrotatorios) (Slade y col., 2005).

Según Slade (2005), en este tipo de productos naturales pueden existir dos conformaciones. Sin embargo, se prefiere aquella donde el anillo de pirano (anillo B) se aproxima a una media silla con el anillo D en posición

pseudo-ecuatorial. Este hace que los  $H_{6\beta}$  y  $H_{6\alpha}$  se orienten en posición pseudo axial y pseudo ecuatorial, respectivamente (conformeros A y B).



No obstante, la orientación que muestra el anillo C en el conformero **A** evita además la interacción estérica entre el O-11 y el H-1, de ahí que la conformación **A** resulte la de menor energía y por tanto la más estable.

El análisis antes realizado de las  $^3J_{6,6a}$  y  $^3J_{6a,11a}$ , puede confirmar la conformación más favorable para estas moléculas. Los conformeros A y B muestran la disposición espacial para 6aR, 11aR-pterocarpanos. En el caso de los 6aS, 11aS- pterocarpanos, las posibilidades se asocian con las correspondientes imágenes especulares.

Los compuestos del **9-13** tampoco son metabolitos nuevos, aunque sí menos comunes que la medicarpina. Aunque los datos espectroscópicos fueron reportados con anterioridad (Kurosawa y col., 1978; Bezuidenhout y col., 1987; Tanaka y col., 1998; Stadler y col., 1994), los referidos a los espectros de RMN  $^1H$  y RMN  $^{13}C$  de los compuestos **6**, **7** y **9-12** se asignan en esta ocasión sobre la base de técnicas modernas de resonancia magnética nuclear bidimensional. Además, se informan por primera vez los datos correspondientes al espectro de RMN  $^{13}C$  del vesticarpan (**10**) así como la configuración absoluta del (6aR,11aR)-3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano (**12**). La tabla XVIII muestra los pterocarpanos caracterizados según el análisis realizado mediante las técnicas de RMN, DC y  $[\alpha]_D$ .

La confirmación o determinación de la configuración absoluta tanto de isoflavanos como de pterocarpanos, sobre la base de los espectros de DC, resulta una información novedosa que brinda este trabajo.

### III.3.6- Producto 14.

El último de los metabolitos identificados se corresponde con un compuesto polifenólico, derivado del grupo de los isoflavonoides.

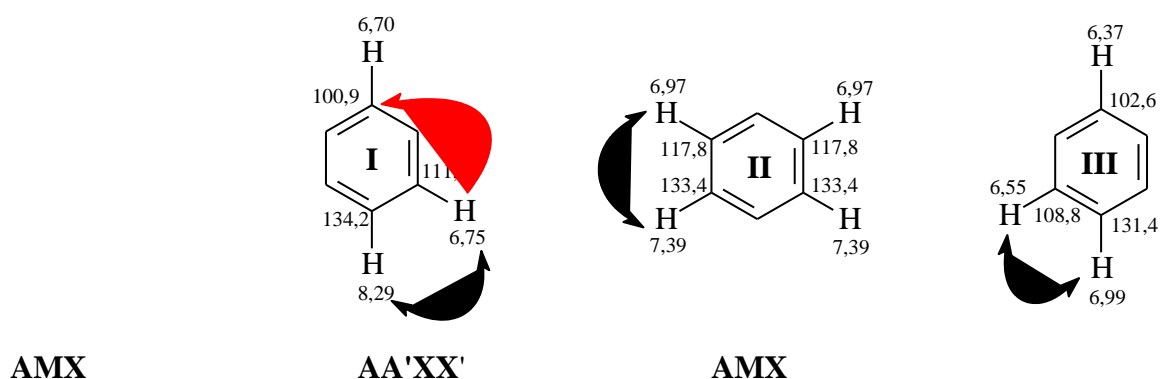
La asignación estructural se realizó sobre la base los experimentos de RMN y por comparación con el compuesto denominado retusapurpurina A, pigmento rojo aislado de la especie *Dalbergia ecastophyllum*, de fórmula molecular  $C_{32}H_{26}O_7$ .

En el espectro de RMN  $^1H$  (Figura 41) realizado al producto se pudieron observar siete señales alifáticas, dos de ellas son singletes correspondientes a agrupamientos metoxilos ( $\delta$  3,81 y 4,07). Las cinco señales restantes se encuentran formando parte de dos grupos metilenos [ $1CH_2$ :  $\delta$  2,91(d), 3,37 (solapada) y  $1CH_2$ :  $\delta$  4,37 (d) y 4,40 (d)] y un grupo metino (CH). Este último caso se pudo deducir del experimento HSQC (Figura 42), pues en el RMN  $^1H$  la señal queda solapada con el singlete a  $\delta$  3,81.

La multiplicidad de la señales de esta zona no resultó de gran utilidad, pues la apariencia de las señales quedó algo distorsionada, lo cual impidió la asignación de las posiciones  $\alpha$  y  $\beta$  de los protones alifáticos. De igual forma el experimento COSY (Figura 43) sólo mostró la interacción entre los H a  $\delta$  2,91 y 3,37. Sin embargo, con la experiencia práctica de los isoflavanos antes caracterizados, la presencia de dos grupos metilenos y un metino sugiere la existencia de un residuo tipo isoflavano.

La zona aromática presentó un total de once señales. Esta información sugirió la existencia de una molécula con espines aromáticos, pero no exactamente un flavonoide de quince átomos de carbono como los antes identificados.

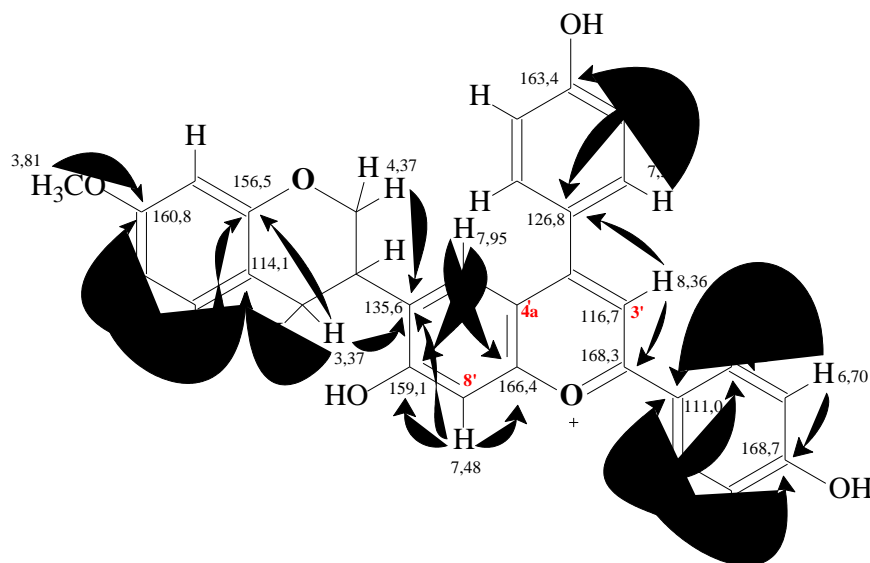
Del experimento COSY (Figura 43) se pudieron deducir al menos tres sistemas de espines aromáticos, dos AMX y uno AA'XX'. Los espectros RMN  $^1H$  (Figura 41), HSQC (Figura 42) y COSY (Figura 43) sugieren los tres sistemas que se presentan a continuación.



Del experimento HMBC (Figura 44) se pudo inferir que el metino a  $\delta_C$  100,9 pertenecía al sistema de espines **I**, pues mostraba picos cruzados con el H a  $\delta$  6,75. Por otra parte el doblete a  $\delta_H$  6,37, aunque no dio interacciones H-H o H-C con alguno de los grupos hidrocarbonados del sistema, se ubica en el sistema de espines aromático **III** por su multiplicidad y su constante de acoplamiento  $^4J = 2,0$  Hz. Estos sistemas de espines parecen ser característicos de los compuestos antes identificados.

El experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 45) exhibió un total de 38 señales, número no representativo de los productos naturales más frecuentemente identificados. Sin embargo, resulta probable que el compuesto esté acompañado de algunas impurezas, lo cual hace un poco más engorrosa la asignación estructural. Por tal razón, se hizo una búsqueda bibliográfica, dirigida hacia metabolitos considerados como pigmentos rojos y fue realizada la asignación sobre la base de la estructura propuesta por Czako y Márton en el 2001 (retusapurpurina A).

Atendiendo a las interacciones H-C que se observan en el experimento HMBC (Figura 44) y sobre la base del núcleo estructural de la retusapurpurina A, se propone para el producto **14** la siguiente estructura molecular.



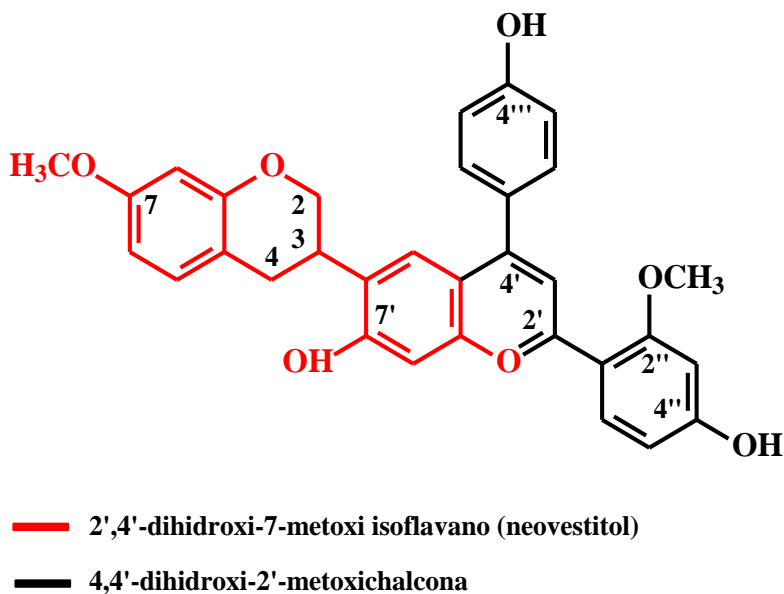
Todo el análisis realizado permitió sugerir que el pigmento rojo aislado podría corresponderse con la retusapurpurina A (Figura 46), cuyos datos espectroscópicos se presentan en la tabla XIX.

En relación a la asignación realizada para el C-4'a, debe tener un valor de corrimiento muy similar al  $\delta_{\text{C}}$  correspondiente al C-3'. Esta suposición se realizó sobre la base de la interacción H-C mostrada entre el H-8' ( $\delta$  7,48) y la señal a  $\delta_{\text{C}}$  en 116,7. Lógicamente, dicho protón no debe mostrar picos cruzados con el C-3', pues se ubican a cinco enlaces. Si, además, se compara el valor de  $\delta_{\text{C}}$  de las posiciones 3' y 4a en el producto que señala la literatura, se podrá apreciar que solo difieren en 0,35 ppm, similitud reafirmada por los efectos electrónicos que existen sobre ambos carbonos.

La retusapurpurina A se puede presentar en diferentes formas tautoméricas; en esta ocasión se identificó la forma protonada, pues el experimento RMN  $^{13}\text{C}$  no mostró ninguna señal que sugiriera la presencia de grupo carbonilo. Como se puede observar en la figura 47, la única estructura donde no existe el agrupamiento carbonilo es la forma protonada. En este caso los experimentos de RMN se realizaron en medio ácido ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 0,1% ATA) para favorecer la forma protonada.

Como se puede apreciar, esta molécula presenta un alto nivel de conjugación entre las múltiples insaturaciones que posee, lo cual genera efectos batocrómicos. Esto justifica el uso de valores de longitud de onda elevados en la CLAR (epígrafe III.2.5) para lograr la identificación y separación del resto de las moléculas presentes en la fracción.

Este compuesto fue el primero informado dentro de los isoflavanos de 30 C, pertenecientes a un grupo relativamente pequeño de productos naturales. Se describen como isoflavonoides condensados con una chalcona. El caso particular que se analiza debe surgir por acoplamiento oxidativo entre el isoflavano neovestitol (2',4'-dihidroxi-7-metoxi isoflavano) y la 4,4'-dihidroxi-2'-metoxi chalcona, como se muestra a continuación (Czakó y Márton, 2001).



Esta molécula sólo presenta un centro quiral en el C-3, por lo cual podría generar dos enantiómeros (*R* y *S*). La definición de su configuración absoluta, precisa de la realización del espectro de DC.

Aunque no pudo ser establecida la configuración axial o ecuatorial de los protones alifáticos sobre la base de la  $^2J$  y  $^3J$ , sí resulta evidente que la mayor estabilidad de esta molécula se debe lograr con la ubicación del H-3 en posición axial, dejando la ubicación ecuatorial para el anillo B del isoflavano condensado a la chalcona. Según experiencias prácticas, generalmente en los isoflavanos aislados el  $\delta_{2ax} < \delta_{2ec}$ , mientras que el  $\delta_{4ax} > \delta_{4ec}$ .

Este pigmento fue el único sugerido por ser el mayoritario en la fracción analizada, sin embargo, existen otros que precisan de posteriores estudios de aislamiento y caracterización.

Los cambios de coloración observados al cambiar el pH de las disoluciones de retusapurpurina A y la absorción a longitudes de onda entre 490 y 560 nm se corresponden con las características informadas para este tipo de metabolito.

#### **III.4. Análisis de la muestra M-A por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).**

Para confirmar los resultados antes obtenidos, se decidió realizar otro estudio de separación e identificación al extracto total de la muestra M-A, utilizando en esta oportunidad la CG-EM.

El desarrollo de la técnica se realizó según se describe en el epígrafe II.3.1.5 (Procedimiento I), en el capítulo de materiales y métodos.

Con el empleo de esta técnica se logró la identificación y cuantificación de la mayoría de los compuestos antes dilucidados, sobre la base de técnicas de RMN y DC.

Para realizar este estudio, el extracto de la muestra en alcohol a 70 % se trató con BSTFA para formar los trimetilsililderivados volátiles. Por tanto, los compuestos con grupos OH, presentarán un  $M^+$  con 72 unidades de masas por encima de su masa molecular, por cada grupo OH.

El cromatograma gaseoso correspondiente al extracto total de la muestra M-A se presenta en la figura 48. Como se puede apreciar, se obtuvieron 67 picos de diferente intensidad. Para la mayoría de ellos se realizó el espectro de masas por impacto electrónico (IE).

Con ayuda de la base de datos (NIST 98) por debajo de 60 minutos se identificaron algunos compuestos minoritarios, los cuales se relacionan en la tabla XX. Estos productos forman parte de la composición química general de propóleos recolectados en cualquier zona geográfica. Son fundamentalmente compuestos polihidroxilados, azúcares y ácidos orgánicos.

Los flavonoides eluyeron entre 60,9 y 71,06 min. (Tabla XXI), donde pudieron ser identificados doce de los compuestos antes caracterizados por RMN.

La identificación de estos flavonoides se llevó a cabo a través del análisis de la fragmentación característica que presentan los flavonoides, según la reacción de retro Diels-Alder (RDA). Las bases de datos en estos casos no

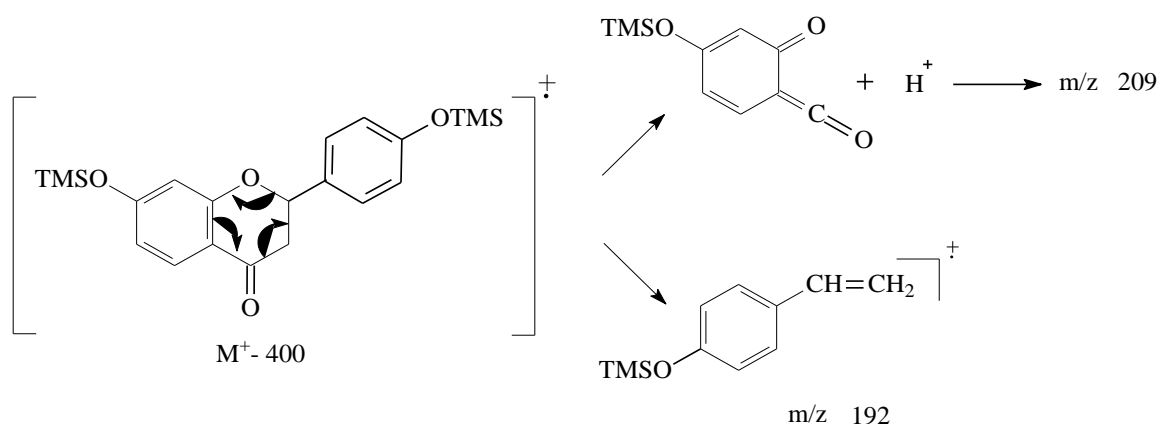
ofrecieron espectros de características similares, a excepción de la homopterocarpina, la cual sí fue sugerida por la espectroteca.

En el anexo se pueden apreciar los espectros de masas correspondientes a todos los compuestos identificados por espectrometría de masas.

El espectro de masas del compuesto **1**, identificado como isoliquiritigenina, mostró un ión molecular de baja intensidad, siendo el fragmento M-15 el pico base del espectro. Este tipo de estructuras de cadena abierta no ofrecen la reacción de retro Diels-Alder, sino que suelen dar iones fragmentos impares, propios de rupturas simples tales como la pérdida de un metilo.

En este caso para confirmar la estructura propuesta se cromatógrafió un estándar del producto aislado previamente, coincidiendo el tiempo de retención y los fragmentos obtenidos, lo cual permitió corroborar que inequívocamente el pico 64 se correspondía con la isoliquiritigenina (**1**).

La (-)-liquiritigenina (**2**) (pico 51) muestra una fragmentación característica de la reacción de retro Diels-Alder, como se aprecia a continuación.



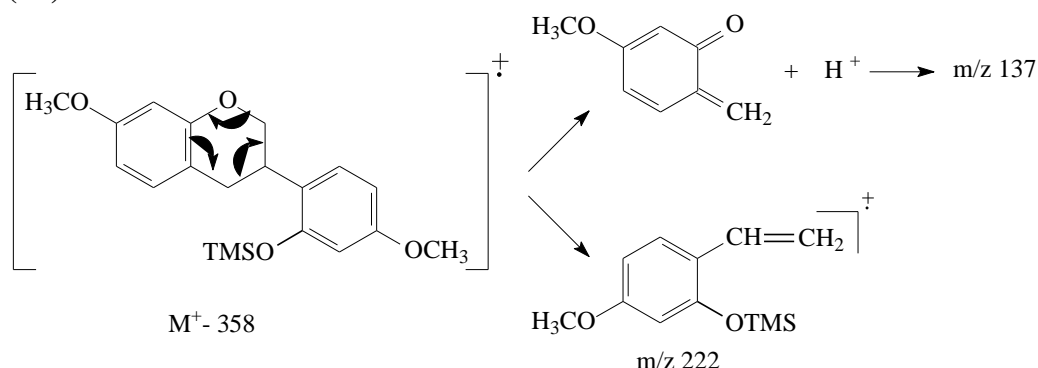
El ión complementario de  $m/z$  208 está presente pero tiene poca intensidad, realmente se observa en forma protonada a  $m/z$  209, lo cual es muy habitual.

El ión de  $m/z$  192 se corresponde con el anillo B. Muy relacionada con esta señal se observan otras dos de  $m/z$  179, pertenecientes al ión tropilio sustituido y  $m/z$  177 que representa la pérdida de un grupo metilo a partir del  $m/z$  192.

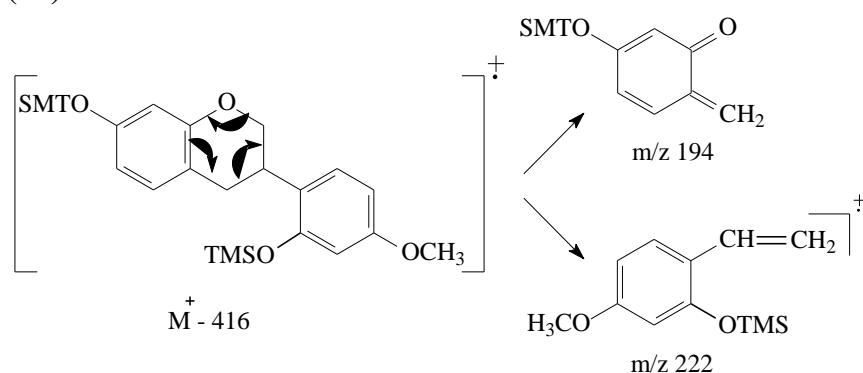
Un comportamiento muy similar se aprecia en los espectros de masas correspondientes a los picos 44, 47 y 48. En este caso, el ión molecular y el fragmento originado tras la reacción de RDA sugieren que el espectro del pico 44 se corresponde con el (3*S*)-isosativan (**7**), el 47 con el (3*S*)- neovestitol (**6**) y el del pico 48 con el (3*S*)-vestitol (**5**). En

los tres casos se observa un hecho común y es la presencia de un trío de señales [ $m/z$  280, 267, 265 (**6**) y  $m/z$  222, 209, 207 (**5 y 7**)], que caracterizan de forma evidente las estructuras mencionadas.

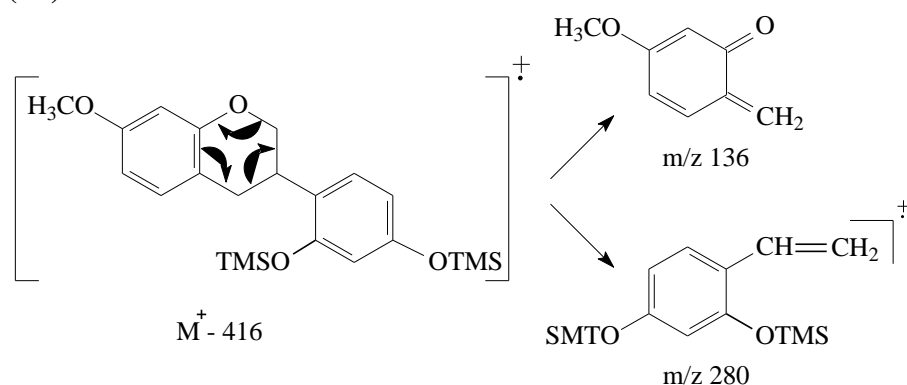
### (3*S*)-isosativan



### (3*S*)-vestitol



### (3*S*)-neovestitol

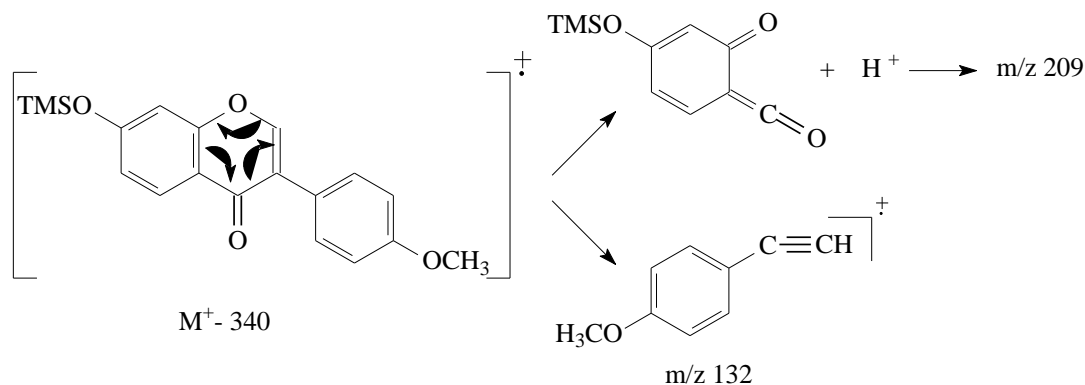


Llama la atención que en todos los casos el fragmento que se aprecia corresponde al anillo B, esto se debe a que dicho anillo presenta una mayor cantidad de sustituyentes, los cuales actúan como grupos estabilizantes.

Los datos espectroscópicos obtenidos para el vestitol, así como el TR, fueron corroborados con los obtenidos para su estándar de referencia, aislado con anterioridad.

La formononetina (**3**) confirma su presencia en el cromatograma a través del pico 57. En este caso el ión molecular resulta ser el de mayor abundancia relativa. Como se observa a continuación, la ruptura tipo RDA propicia la formación de ambos fragmentos iónicos,  $m/z$  208 y  $m/z$  132, asociados a los anillos A y B, respectivamente.





Los espectros propuestos para los pterocarpanos, presentan un comportamiento en correspondencia con lo planteado por Pelter y col. en 1965. La fragmentación clásica de flavonoides, denominada retro Diels Alder, no tiene lugar en pterocarpanos. Esto se debe a la estabilidad que le proporciona a la molécula el O-5, C-6 y el enlace entre el C-6 y el C-6a.

Una característica común de los pterocarpanos ante el impacto electrónico es la formación de iones intensos  $(M-1)^+$  y  $(M-15)^+$ , pues todas estas estructuras presentan grupos metoxilos.

En relación a la (6a*S*,11a*S*)-medicarpina (**8**), constituye el segundo producto de mayor abundancia en el extracto de la muestra M-A (12,99 %).

El pico 45 confirma la estructura de esta molécula, un pterocarpano donde el  $M^+ - 342$ , constituye el pico base del espectro, en tanto los fragmentos que de él se derivan no superan el 30 % de abundancia relativa.

Este comportamiento espectroscópico corrobora la alta estabilidad del ión molecular, no obstante, se efectuó una comparación con un estándar aislado con anterioridad y existe total correspondencia entre el pico 45 y el estándar utilizado.

La (6a*S*,11a*S*)-homopterocarpina (**9**) se identifica del espectro correspondiente al pico 41, siendo los iones de  $m/z$  148 y  $m/z$  161 los iones característicos de su fragmentación. Este es el único compuesto de los citados en la tabla XXI que fue identificado por la base de datos de espectros.

Del grupo de los pterocarpanos se presentan tres estructuras con igual masa molecular (compuestos **10**, **11** y **13**) por lo que debieran obtenerse tres espectros con igual ión molecular ( $M^+ - 430$ ). Con estas características sólo se presentan dos espectros de masas, los correspondientes a los picos 52 y 58.

El pico 52 se sugiere corresponda al compuesto **13**, en el cual aparecen los fragmentos  $m/z$  148 y  $m/z$  161, asociados al anillo D.

El (6a*R*,11a*R*)-vesticarpan (**10**) y (6a*R*,11a*R*)-3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (**11**) son isómeros de posición que sólo difieren en el grupo hidroxilo presente en el anillo D, por lo que no sólo sus masas moleculares son iguales, sino también los fragmentos que de ellos podrían originarse. Ambos compuestos podrían coeluir en el pico 58, observándose los fragmentos de  $m/z$  219 y  $m/z$  249 asociados a la molécula.

El último de los pterocarpanos (producto **12**) eluye en el pico 53, mostrando los fragmentos iónicos de  $m/z$  178 y  $m/z$  191 correspondientes al anillo D.

A excepción de la medicarpina (**8**), el resto de los pterocarpanos se presentan en bajas proporciones.

Con la espectrometría de masas se confirmó que estos productos son pterocarpanos y no flavan 4-ol, ya que en este último caso el ión molecular, se incrementaría en 162 unidades de masas.

No son muchos los artículos científicos que abordan la fragmentación de pterocarpanos, por lo que la información detallada de los principales fragmentos, resulta de gran interés como material de consulta. Algo similar ocurre para los éteres de flavonoides trimetilsil derivados, cuyos patrones de fragmentación se presentan por primera vez.

En el estudio realizado por CG-EM no pudieron confirmarse dos de los metabolitos previamente identificados por RMN, la biocanina A (**4**) y la retusapurpurina A (**14**), seguramente debido a la pequeña concentración en que los mismos se encontraban en el extracto analizado. En este sentido, se sugiere aislar una mayor cantidad de ambos productos y confirmar la presencia del grupo carbonilo en la estructura del compuesto **4**, el cual no se observó en ninguno de los experimentos realizados.

El análisis de los espectros de masas también permitió la identificación de otros flavonoides de carácter minoritario (Tabla XXII y Figura 49). De estas estructuras sólo se pudo definir la fórmula general y los sustituyentes asociados a cada anillo, no así su posición exacta. Se puede asegurar que pertenecen al grupo de los flavonoides, pues en todos los casos se observó una fragmentación tipo RDA característica en estos metabolitos.

Por otra parte, en todas las estructuras propuestas, ambos anillos presentan sustituyentes oxigenados. Según la literatura consultada, se sugiere su ubicación sobre las posiciones 5, 7, 2' y/o 4'.

Para la asignación estructural definitiva de estos compuestos, se precisa el uso de las técnicas de RMN, pues las estructuras sugeridas en estos casos podrían ser 2-fenil o 3-fenil derivados.

### **III.5. Análisis comparativo de siete muestras de propóleos, por CG-EM.**

Después de haber realizado el estudio de caracterización del propóleo M-A, procedente de la Coloma, provincia de Pinar del Río, se procedió al estudio por CG-EM de otras seis muestras de propóleos rojos cubanos.

Aunque el propóleo rojo no presenta una amplia distribución geográfica, al menos se pudo contar con muestras de tres provincias del país: Pinar del Río, Matanzas y Villa Clara.

Para este estudio se siguió la metodología referida en el capítulo de materiales y métodos como procedimiento II. El elemento más distintivo entre el procedimiento I y II está dado en la longitud de la columna, pues en este último es de solo 17 m. No obstante la menor longitud de la columna, la resolución fue adecuada para realizar un buen estudio cualitativo y cuantitativo de las muestras analizadas.

Al realizar el cromatograma gaseoso a cada una de las muestras, se pudo observar que las muestras A, B, C y D muestran un comportamiento cromatográfico muy similar, en tanto los cromatogramas correspondientes a los propóleos E, F y G presentan gran parecido entre sí, pues por encima de los 37 min. se aprecian un conjunto de señales antes no visualizadas. En la figura 50 se presentan los cromatogramas de las muestras C y G, representativos de cada conjunto.

Por debajo de 29 min. en todas las muestras de propóleos se pudo detectar la presencia de polioles, fundamentalmente glicerina (5,73 min.), D-fructuosa (17,63 min.) y D-glucosa (21,03 min.).

La zona comprendida entre 29 y 37 min. exhibe un comportamiento casi idéntico para todas las muestras. Es precisamente en esta región del espectro donde eluyen los flavonoides identificados anteriormente.

En esta ocasión resulta interesante reflexionar sobre el hecho de que, siendo propóleos recolectados en sitios geográficamente diferentes, su composición química es muy similar. Esto lleva a pensar que las abejas que forman este tipo de propóleos, deben recolectar exudados de la misma especie vegetal o especies con una estrecha relación quimiotaxonómica.

La figura 51 ilustra la superposición de tres muestras (A, C y G) correspondientes a tres provincias diferentes. Resulta interesante el comportamiento cromatográfico casi idéntico que se observa en la región donde eluyen los flavonoides. Este resultado sugiere, además, que los propóleos rojos ricos en flavonoides o más específicamente en isoflavonoides, no son exclusivos de la provincia de Pinar del Río, sino que se pueden encontrar también en Matanzas y Villa Clara.

Analizando los espectros de masas correspondientes a la zona rica en isoflavonoides, se pudo observar que los patrones de fragmentación antes comentados para la muestra M-A, son reproducibles en el resto de los propóleos rojos.

La tabla XXIII muestra la composición y cuantificación, referida a los flavonoides presentes en cada una de las muestras en estudio. Resulta apreciable la similitud cualitativa que exhiben todas las muestras. En lo cuantitativo se presentan algunas variaciones, que pueden estar influenciadas por factores como: la flora que rodea al apiario; los factores farmacoergásticos (edad, clima, suelo, etc.) que puedan influir en la composición química de las plantas de donde la abeja realiza la colecta de exudados; la época del año en que se realizó la obtención de la muestra de propóleos; así como la concentración de los extractos, lo cual puede incidir fundamentalmente en la detección de los metabolitos de menor concentración.

Como se puede observar, el vestitol y la medicarpina son los flavonoides mayoritarios en todas las muestras de propóleos, juntos representan entre el 22,33 y el 48,18 % en los extractos totales.

Analizando el cromatograma gaseoso (Figura 51), a un TR de 30,02 min. se observa un pico cromatográfico simétrico, característico de un compuesto puro. Sin embargo, en el mismo coeluyen la medicarpina y el isosativan. Lo anterior se debe al empleo de una columna cromatográfica de menor longitud (17 m), la cual si bien tiene la ventaja de disminuir el tiempo de corrida cromatográfica, también tiene el inconveniente de disminuir los platos teóricos de la columna y consecuentemente afectar la resolución del cromatograma. No obstante, con la columna de 30 m se pudo lograr una adecuada separación, mostrando que la diferencia en los tiempos de retención entre los picos correspondientes a ambos compuestos es pequeña.

Para confirmar la hipótesis de que alrededor de los 30 minutos debían estar eluyendo los compuestos isosativan (7) y medicarpina (8), se realizaron los cromatogramas iónicos de tres de las muestras estudiadas (A, C y G), los cuales mostraron características similares.

En esta técnica de procesamiento se rastrearon los iones moleculares de  $m/z$  358 (7) y 342 (8). Como se puede observar en la figura 52, el área del pico cromatográfico integra ambos iones, lo cual permite confirmar la presencia de ambos productos en las tres muestras de propóleos rojos. Además, se reafirma la idea de que al disminuir la longitud de la columna cromatográfica no se logra la resolución total de estos metabolitos. Aunque no fue posible realizar la cuantificación individual de ambos compuestos, sí se puede apreciar que la abundancia relativa de la medicarpina es superior a la del isosativan.

Una situación muy similar ocurre en el caso de la formononetina (**3**) y el producto **16**, donde a igual tiempo de retención se cuantifican ambos metabolitos. Esta es la razón de los valores algo elevados que se refieren para el producto **16** en la tabla XXIV, en contraste con los referidos para iguales metabolitos en las tablas XXI y XXII.

En relación a la homopterocarpina (**9**), se identificó en todas las muestras pero no pudo cuantificarse, pues se presenta en muy bajas concentraciones.

A un TR de 33,66 min. también se identificó en la mayoría de las muestras estudiadas, según la base de datos espectrales, la presencia del ácido lignocérico.

Por encima de los 37 min. las muestras de propóleos E, F y G exhibieron en común un grupo de señales, las cuales en su mayoría se identificaron según la base de datos espectrales como triterpenos, fundamentalmente derivados pentacíclicos del tipo  $\beta$  amirina y también derivados del núcleo del lupano.

De todo este análisis cromatográfico comparativo se puede concluir que el (3*S*)-vestitol, la (6*aS*,11*aS*)-medicarpina, el (3*S*)-neovestitol y el (3*S*)-isosativan, constituyen los metabolitos mayoritarios en todas las muestras de propóleos. Evidentemente, para poder generalizar estos resultados, se debe realizar el análisis de muestras de propóleos rojos procedentes de otras regiones del país. No obstante, los estudios realizados hasta el momento permiten sugerir que estos compuestos sean los marcadores químicos de los propóleos rojos cubanos.

La determinación de la fuente vegetal de donde provienen los metabolitos presentes en este tipo de propóleos es un aspecto de gran actualidad a escala internacional, pues no sólo reporta valor científico sino que, además, podría permitir la explotación del recurso vegetal con fines terapéuticos. Es importante recordar que una de las limitantes que presenta el propóleos es el bajo rendimiento como producto apícola, por lo que llegar a la especie vegetal de donde proviene posibilitaría la diversificación de productos naturales con similar actividad terapéutica.

Realizando un análisis inverso, al conocer la fuente vegetal de la cual se abastece la abeja para formar un determinado tipo de propóleos, podría el hombre propiciar determinados cambios en la flora que rodea la colmena, con el objetivo de incidir indirectamente en la composición química de un tipo de propóleos en particular.

También el trabajo con la especie vegetal podría contribuir a la determinación estructural de aquellos metabolitos que resultan minoritarios en los bálsamos. De los exudados vegetales podrían obtenerse con mayor facilidad las cantidades necesarias de estos productos, para el análisis posterior por técnicas de RMN.

La mayoría de los productos identificados se clasifican como isoflavonoides, los cuales tienen una limitada distribución en el reino vegetal, siendo fundamentalmente encontrados en la familia de las Leguminosae, con mayor frecuencia en la subfamilia Fabaceae (Papilionaceae) y de forma ocasional en las subfamilias Caesalpinaceae y Mimosaceae. Esto induce a pensar que la fuente vegetal de estos propóleos podría ser una o varias especies de esta familia.

Resulta interesante el hecho de que los cuatro compuestos antes mencionados, pese a representar entre el 24,91 y el 58,95 % del extracto total, no son los responsables de la fuerte pigmentación roja de las muestras analizadas. Pigmentos como la retusapurpurina A podrían ser los metabolitos comprometidos con la fuerte coloración roja, aún presentándose en bajas concentraciones. Esta molécula, junto a otros isoflavonoides de treinta átomos de carbono, han sido identificados en diversas especies del género *Dalbergia* (Czakó y Márton, 2001), lo cual sugiere la contribución de este género a la composición química de los propóleos rojos.

Una comunicación reciente del Dr. Alejandro Estévez de la Universidad de Sao Pablo, Brasil, sobre la idea de que la especie *Dalbergia Ecastophyllum* es la fuente vegetal de los propóleos rojos de Alagoas, Brasil, llevó a reflexionar sobre el posible origen botánico de los propóleos rojos cubanos.

Las especies de *Dalbergia* pertenecen a la familia de las Leguminosae y se reconocen por presentar un leño profundamente pigmentado de variados colores.

Estudios químicos de especies pertenecientes a dicho género informan de la presencia de metabolitos del grupo de los flavonoides tales como isoflavonas preniladas, biochanin A e isoquiritigenina. Según Williams y Harborne (1989), de la especie *Dalbergia oliveri* se aislaron pterocarpanos y de la *D. ecastophyllum* también pterocarpanos, isoflavanos e isoflavonas. Más recientemente, se ha identificado la presencia de oligómeros de neoflavonoides – isoflavonoides e isoflavonoides – cinamilfenoles (Barragá y col, 2004).

Todo lo antes comentado sugiere que la fuente vegetal fundamental de los propóleos rojos es alguna especie del género *Dalbergia*. Esta idea se sostiene al observar la resina del tronco de esta especie, la cual posee una coloración apreciablemente roja, como se muestra en la figura 53.

Recientemente, Trusheva y colaboradores (2006) realizaron un estudio sobre la composición química de los propóleos rojos brasileños del estado de Alagoas, Brasil. En este trabajo se informa de la presencia de isoflavonoides como medicarpina e isosativan. Ambos isoflavonoides son considerados como parte de los marcadores de propóleos rojos cubanos.

En dicho artículo se sugiere que los propóleos rojos de Brasil y Cuba presenten similar origen vegetal. Resulta importante destacar que aún siendo la resina de la *Dalbergia ecastophyllum* la fuente de estos propóleos, dicha especie se desarrolla en lugares geográficamente diferentes. Los factores fundamentalmente extrínsecos pueden provocar diferencias en la composición química de la especie, incluyendo sus exudados. Evidentemente, bajo estas condiciones los propóleos rojos también pudieran diferir químicamente.

### **III.6. Estudio comparativo por CG-EM de los propóleos rojos de Cuba (M-A) y Brasil.**

Para comprobar la hipótesis anterior se pudo analizar una muestra de propóleos rojo brasileño de Alagoas, haciendo uso de la CG-EM (procedimiento II).

Se obtuvo un cromatograma total de características muy similares a los antes obtenidos para cada una de las muestras de propóleos rojos cubanos. La figura 54 muestra una comparación entre la muestra M-A y dicho propóleos rojo brasileño.

Se puede apreciar que en ambos casos en la zona comprendida entre 30 y 35 min. eluyen los metabolitos correspondientes a los isoflavonoides.

Realizando un análisis detallado de los espectros de masas de cada uno de los picos, se pudo llegar a la identificación de once de los metabolitos antes identificados desde la muestra M-A. En la tabla XXV se establece una comparación cualitativa y cuantitativa entre el propóleos rojo cubano y brasileño.

Independientemente que existe un 68,75 por ciento de coincidencia en cuanto a la composición química cualitativa, se puede apreciar que difieren cuantitativamente. En esta muestra de propóleos brasileño, los metabolitos mayoritarios concuerdan con los marcadores químicos de los propóleos rojos cubanos, es decir el vestitol, neovestitol, isosativan y medicarpina representan el 83,09 % del total de compuestos que eluyen en la zona de análisis. Sin embargo, un elemento distintivo resulta ser la relación existente entre la medicarpina e isosativan con el vestitol. En la muestra brasileña la mezcla medicarpina e isosativan es superior al vestitol, contrario a lo que sucede en la muestra M-A.

En las condiciones de trabajo utilizadas, al igual que sucedió con los propóleos rojos cubanos, eluyen conjuntamente el isosativan y la medicarpina. Para confirmar la presencia de ambos, se realizó también el cromatograma iónico, siendo los resultados similares a los antes observados en las muestras A, C y G (Figura 52).

Aunque no fue posible detectar por CG-EM el pigmento rojo retusapurpurina A, se infiere su presencia por el color de la muestra, sin dejar de pensar en la existencia de otras moléculas también consideradas como pigmentos.

Trusheva y colaboradores (2006) sólo informaron de la existencia de los dos isoflavonoides mayoritarios en los propóleos rojos brasileños. Con este estudio por CG-EM se demuestra que además de la medicarpina y el isosativan, están presentes el vestitol, el neovestitol, la liquiritigenina, la formononetina, el vesticarpan, el 3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano, el 3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano, la isoliquiritigenina y el isoflavano nombrado como producto **16**.

Si bien estos datos sugieren que la fuente natural de donde la abeja recolecta los exudados vegetales es la misma, no se descarta la posibilidad de que iguales especies al desarrollarse en condiciones climáticas diferentes, presenten variaciones cualitativas y cuantitativas en su composición química.

### **III.7. Análisis por CCD.**

Reflexionando sobre la CG-EM, se puede plantear que es una técnica de gran valor, ya que posibilita la rápida identificación de los propóleos a partir de sus extractos totales, sobre todo cuando dichas materias primas han sido caracterizadas previamente por técnicas de RMN. Sin embargo, esta tecnología no es de fácil adquisición por los laboratorios o entidades que analizan y procesan el propóleos con fines terapéuticos, pues el equipamiento es sumamente costoso. Con esta premisa surge la idea de desarrollar un método analítico por CCD, cuya sencillez y recursos necesarios para el desarrollo de la misma, hace factible su aplicación en los laboratorios o entidades que analizan y procesan el propóleos con fines terapéuticos y comerciales.

#### **III.7.1. Caracterización por CCD de los tres tipos de propóleos cubanos hasta ahora definidos.**

Estudios cromatográficos y espectroscópicos actuales realizados con 65 muestras de propóleos cubanos procedentes de diferentes regiones del país, han permitido agrupar los propóleos en tres grupos (Cuesta-Rubio y col., 2007).

- Tipo I: Propóleos pardos que se caracterizan químicamente por la presencia de nemorosona.
- Tipo II: Propóleos rojos, que como se ha demostrado es este trabajo en su composición química prevalece la presencia de isoflavonoides.
- Tipo III: Estos han sido menos estudiados en comparación con los anteriores. No obstante, se conoce que en sus extractos, generalmente amarillos, predomina la presencia de compuestos alifáticos como los alcoholes triterpénicos y sus acetatos.



Para el estudio de identificación se utilizó la nemorosona como estándar de referencia y se tomaron tres muestras de propóleos M-1 (tipo I); M-B (tipo II) y M-30 (tipo III), las cuales se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas. Dichas condiciones fueron debidamente validadas, considerándose la misma como una prueba de identificación selectiva y con un límite de detección para la nemorosona de 0,2 µg (Abbouch, 2007).

De cada una de las muestras analizadas se puntearon 2 µL y la aplicación se realizó por duplicado. En la tabla XXVI se puede apreciar la masa aplicada de cada muestra para este análisis cromatográfico.

La idea de utilizar la nemorosona como patrón se debe a que es el componente mayoritario en aproximadamente un 40 % de las muestras en estudio. Además, es un metabolito que se obtiene con buen rendimiento a partir de la resina floral de la especie *Clusia rosea* y resulta de fácil purificación.

Como se puede apreciar en los cromatogramas (Figura 55), bajo las condiciones de análisis se pueden diferenciar los tres tipos de propóleos que hasta el momento se han identificado en Cuba. En la figura 55 se señalan las manchas características para cada uno de ellos.

El propóleos tipo I se caracteriza por la presencia de nemorosona como metabolito mayoritario. Resulta evidente que las manchas que caracterizan el punteo 4 y 5 coinciden en distancia de corrida con el patrón nemorosona, lo cual confirma la presencia de este metabolito en este tipo de propóleos.

En relación al punteo 1 y 2, se corresponde con los propóleos rojos (tipo II). De estos propóleos ya se conoce que presentan isoflavonoides como composición química mayoritaria. La corrida de esta muestra, en ambos punteos, presenta cuatro manchas características que salen a un Rfr inferior a 1, pues cada una de ellas revela por debajo del patrón nemorosona. Los Rfr de los cuatro marcadores químicos de este tipo de propóleos son: 0,81; 0,74; 0,43; 0,32.

El último tipo de propóleos correspondiente al grupo III se caracteriza por la presencia de metabolitos de baja polaridad. Los compuestos mayoritarios de sus extractos metanólicos pertenecen al grupo de los triterpenos (Abbouch, 2007).

Los punteos 7 y 8 corresponden a los propóleos tipo III, como se puede apreciar, las manchas fundamentales de este tipo de propóleos revelan por encima de la nemorosona, pues dadas las condiciones cromatográficas empleadas los triterpenos corren muy cercanos al frente del disolvente con un Rfr por encima de 1 (Rfr=1,11). Lógicamente, estas manchas por si solas no permiten establecer la diferencia entre los tres tipos de propóleos, pues se observan en los tres casos. Sin embargo, los elementos expuestos para los tipos I y II hacen posible que el propóleos clasificado como tipo III quede excluido de estos grupos.

La presencia de estructuras triterpénicas en todos los propóleos es algo característico, no sólo de propóleos cubanos, sino también de otras regiones geográficas, pues estos metabolitos presentan una amplia distribución en la naturaleza.

Aunque en la muestra tipo III punteada se observa una mancha a menor distancia de corrida, ni su color después de revelada, ni su R<sub>f</sub>, coincide con las dos manchas de propóleos rojo con similar distancia de corrida. Esta mancha no representa una característica peculiar de este grupo de propóleos, pues no se observa en todas las muestras de propóleos consideradas del tipo III (Abbouch, 2007).

Concluyendo, se puede apreciar en la figura 55 que, bajo las mismas condiciones de análisis, los tres tipos de propóleos pueden ser diferenciados. De manera general en hexano:acetato de etilo (7:3), primero revelan los isoflavonoides, le continúa la nemorosona y finalmente los compuesto triterpénicos.

Se debe reflexionar sobre el hecho de que independientemente de que estas muestras de propóleos han sido agrupadas por la similitud en sus componentes mayoritarios, podría presentarse una muestra cuyo origen vegetal sea mixto y consecuentemente podrían visualizarse mezclas de metabolitos.

### **III.7.2. Análisis cromatográfico de las muestras de propóleos rojos (tipo II).**

El análisis cromatográfico por CCD se le realizó a las muestras de la A-G. La tabla XXVII presenta las características de los veintitrés punteos realizados. Se aplicaron tres volúmenes de cada muestra que oscilaron entre 0,5 y 3 µL. Como patrón o estándar de referencia se utilizó la nemorosona. Todas las muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas antes descritas en el epígrafe II.3.2.1, en el capítulo de materiales y métodos.

En la figura 56 se presenta el comportamiento cromatográfico después de haber efectuado el revelado con Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y calor. Resulta apreciable la homogeneidad existente entre las siete muestras de propóleos rojos analizadas, lo cual era predecible dado los resultados espectroscópicos y cromatográficos antes obtenidos.

Como puede observarse, se aplicaron tres cantidades crecientes de cada muestra de propóleos. Aunque en todos los casos pudieron apreciarse las cuatro manchas características de este tipo de propóleos (tipo II), la tercera aplicación fue la que mejores resultados mostró, correspondiéndose con masas de extracto entre 20 y 33 µg.

En relación a la muestra M-F, los estudios de CG-EM sugirieron algunos fragmentos característicos de la existencia de nemorosona (ej. m/z 105). Si se observa detenidamente el cromatograma, podrá notarse la presencia de una mancha en M-F a igual R<sub>f</sub> que el patrón nemorosona. Este resultado confirma la presencia de nemorosona en esta muestra de propóleos rojo.

Independientemente de que la muestra M-F presente características cromatográficas propias de un propóleos rojo, en estos productos no se descarta la existencia de un origen vegetal mixto. Si se tiene en cuenta que la especie *Clusia rosea* presenta una amplia distribución geográfica, resulta lógica la existencia de estas especies dentro del ecosistema que rodea el apiario de donde procede este propóleos en particular.

### **III.7.3. Análisis de la muestra M-A contra patrones aislados.**

En el estudio se utilizaron seis productos naturales (patrones) aislados a partir de la muestra M-A, los cuales dada la poca cantidad disponible de cada uno de ellos, fue imposible trabajarlos a una concentración definida. También se utilizó nemorosona, la cual fue obtenida a partir de la resina floral de *Clusia rosea*. Se punteó una masa correspondiente a 4 µg contenida en 2 µL.

En la placa se puntearon estos seis compuestos y el patrón nemorosona. Para la identificación de estos metabolitos en las muestras de propóleos rojos, se cromatografiaron además 2 µL de las muestras de propóleos M-A (34,20 µg) y M-F (34,60 µg).

Con ambos reveladores se obtuvieron buenos resultados, pues se logran visualizar todos los patrones y las manchas características de las muestras. Sin embargo, con la vainillina se genera una gama de colores muy significativa, que permite una mejor asociación de los metabolitos del extracto con los patrones punteados (Figura 57).

Como se puede observar, en ambos cromatogramas pudieron ser identificados tres de los productos considerados como indicadores cromatográficos en capa delgada de los propóleos rojos: el isosativan (**7**), la medicarpina (**8**) y el vestitol (**5**).

Resulta evidente la presencia de los patrones **1** y **2** en las muestras, sobre todo por la significativa coloración amarilla, pero dada la analogía estructural de ambos metabolitos, no fue posible observar una adecuada resolución entre las manchas. La isoliquiritigenina (**1**) es una chalcona dihidroxilada y la liquiritigenina (**2**) es el análogo estructural, donde la cadena abierta se ha ciclado para formar el anillo C correspondiente a una flavanona.

Respecto a la formononetina (**3**), al realizar la segunda corrida (B) se observó la cromatoplaaca a la luz ultravioleta a 254 nm, siendo esta la forma en que revela dicho compuesto. La formononetina corre muy cercana al compuesto de menor Rfr, lo que resulta característico para los propóleos rojos, pero con un valor de Rfr ligeramente superior. La determinación del Rf absoluto para identificar una sustancia en cuestión posee algunos inconvenientes, debido a la incapacidad que existe de reproducir las condiciones analíticas iniciales. Pudiera citarse, por ejemplo, las variaciones entre las placas cromatográficas de lotes diferentes (para un mismo fabricante); el estado de saturación de la cámara; la técnica de aplicación de la muestra; la distancia de corrida; etc. Por tales razones se prefirió la determinación del Rf relativo (Rfr), donde se minimizan o anulan estos factores de variabilidad.

El análisis químico del propóleos es una herramienta que resulta muy conveniente para lograr preparaciones farmacéuticas con calidad. Además, al definir químicamente un propóleos, se está definiendo su actividad biológica específica, lo cual favorece la adecuada orientación de los profesionales que lo prescriben, así como de las personas que lo consumen.

Respecto a la actividad biológica, como cualquier otro tipo de propóleos, éste resulta de gran utilidad como antimicrobiano. Sin embargo, si se tiene en cuenta la composición mayoritaria (isoflavonoides) de los propóleos rojos cubanos e incluso de los propóleos rojos de origen brasileño, sin duda este producto natural sugiere una actividad terapéutica muy peculiar, actividad estrogénica. Compuestos como la formononetina y biochanina A han demostrado poseer esta acción farmacológica (Cornwell y col., 2004).

### **III.8. Determinación de la actividad fitoestrogénica del propóleos rojo (M-A).**

Analizando la composición química mayoritaria de los propóleos rojos cubanos (isoflavonoides) y los posibles efectos biológicos que podrían presentar, evidentemente la acción fitoestrogénica es la más relevante que para ellos se sugiere.

Los fitoestrógenos se consideran compuestos vegetales, no esteroideos, con acción estrogénica y han sido utilizados como terapia alternativa para la menopausia. También se indican para reducir la osteoporosis y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, así como disminuir fundamentalmente el riesgo de cáncer de mama y próstata (Cornwell y col., 2004).

Si bien pueden producir efectos beneficiosos para la salud humana, también podrían inducir trastornos endocrinos, pues se ha comprobado que en animales pueden provocar infertilidad, lesiones del hígado y alteraciones de la función hepática, similares a las encontradas en mujeres que toman anticonceptivos orales en altas dosis (Allué, 2001).

Existen diversos ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*” que pueden medir esta actividad biológica (Song y col., 2002). En este caso se seleccionó el ensayo uterotrófico en ratas inmaduras con veintidós días de nacidas, tratadas por vía subcutánea. La tabla XXVIII y figura 58 muestran los resultados del estudio uterotrófico realizado.

Al analizar el peso uterino de los cinco grupos de tratamientos se puede notar que los que tuvieron el menor peso uterino fueron aquellos a los que se les aplicó el propóleo rojo y los de mayor peso uterino fueron los tratados con el etinil estradiol. Este último resultado es lógico ya que se conoce que el etinil estradiol tiene efectos sobre los receptores del útero provocando aumento de su peso.

Por otra parte, el control negativo empleado (DMSO) difiere del grupo IV y de los grupos tratados con el propóleo, lo cual indica que el producto que se estudia tiene efecto sobre los receptores del útero, disminuyendo su peso.

La relación peso del útero con respecto al peso del animal (peso relativo), tuvo un comportamiento similar al peso del órgano aislado, en los cinco grupos de tratamientos.

Este resultado demuestra que independientemente de las dosis administradas, algunos de los metabolitos presentes en el propóleo rojo podrían actuar como antagonistas estrogénicos a nivel de los receptores presentes en el útero o incluso podrían de alguna manera afectar la acción hormonal de tipo estrogénica. De hecho, se conoce que los fitoestrógenos actúan como moduladores selectivos de la respuesta estrogénica (Cornwell y col., 2004).

Evidentemente, este resultado podría incentivar estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos posteriores, que permitan determinar la forma en que actúan los metabolitos presentes en los propóleos rojos.

Aunque no son pocos los trabajos publicados sobre la actividad fitoestrogénica de diversos productos naturales, sí resultan escasos los relacionados con propóleos para dichos fines. Según un estudio realizado por Song y col. (2002), en el cual se determinó la posible actividad estrogénica de propóleos coreanos, se llegó a la conclusión que poseía una actividad estrogénica débil. En dicho artículo no se hace alusión a la composición química del propóleo utilizado, aspecto que resulta de gran importancia si se tiene en cuenta que no todos los productos naturales pueden interactuar con los receptores estrogénicos. No obstante, aunque en algunos estudios sobre propóleos coreanos estandarizan sobre la base de compuestos polifenólicos y flavonoides (Ahn, y col., 2004; Choi y col., 2006), la literatura generalmente adjudica la actividad estrogénica a determinados metabolitos como: isoflavonoides, lignanos, estilbenos y algunos flavonoides peculiares como la 8-prenil naringenina.

Recientemente, se ha informado también sobre la capacidad que pueden tener los fitoestrógenos de actuar como antivirales. Se considera que estos metabolitos tienen la capacidad de inhibir la tirosina-quinasa y la DNA-topoisomerasa, mecanismos por los cuales pueden ser efectivos contra enfermedades virales tales como el dengue, el herpes simple o la influenza (Martin y col., 2007).

Evidentemente, aunque se cuenta con un producto natural de gran valor biológico, se precisan otros estudios que avalen la efectividad terapéutica del propóleo rojo cubano, así como su relación beneficio-riesgo.

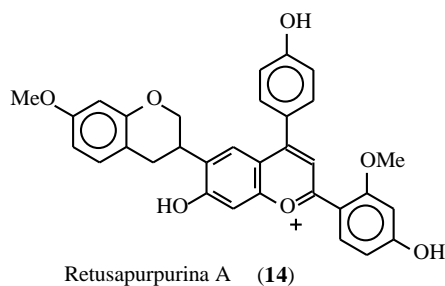
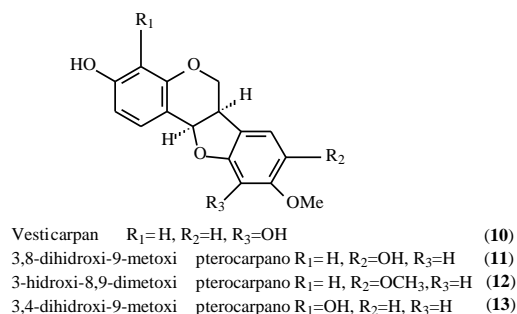
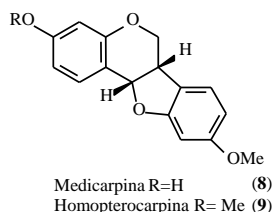
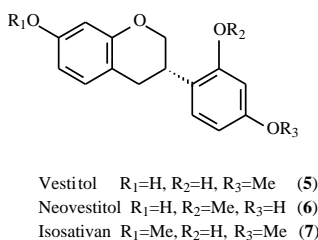
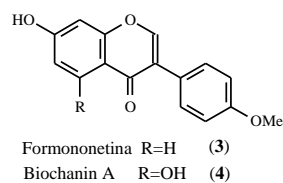
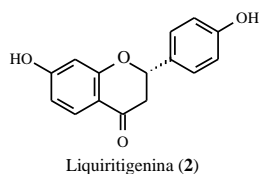
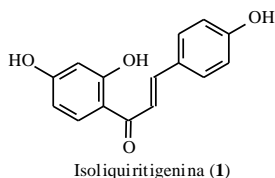
Con esta investigación queda demostrada la necesidad de estudiar la composición química de cualquier producto natural, aunque su uso tradicional date de muchos siglos atrás. La flora mundial es muy diversa y mucho de ella queda por investigar.

## DISCUSIÓN GENERAL

Para desarrollar este trabajo se contó con siete muestras de propóleos rojos de origen nacional y una muestra de propóleos rojo de procedencia brasileña.

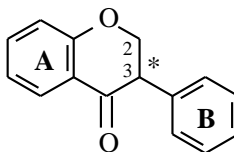
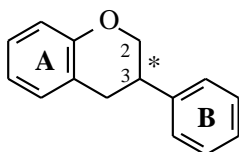
Se comenzó con el aislamiento y caracterización de una muestra de propóleos rojo procedente de la Coloma, provincia de Pinar del Río, a la cual se le denominó M-A. Se realizó un proceso de extracción por maceración, del cual se obtuvo un 50 % de rendimiento.

El empleo de técnicas cromatográficas tales como: cromatografía en columna (Sephadex LH-20, CC abierta, CLMP, CLAR y CG-EM) y CCD, permitieron el fraccionamiento del extracto total y el aislamiento de doce productos naturales. Además, se sugirió la existencia de otros dos productos, para los cuales se precisan los espectros de masas que confirmen las estructuras deducidas por RMN. Los catorce metabolitos identificados por técnicas espectroscópicas modernas se muestran a continuación.



La confirmación o determinación de la configuración absoluta, tanto de isoflavanos como de pterocarpanos, se realizó sobre la base de los espectros de DC, lo cual resulta una información novedosa que brinda este trabajo.

La técnica de CG-EM no sólo confirmó la presencia de la mayoría de estos productos naturales, sino que, además, permitió la identificación de otros flavonoides minoritarios, los cuales se muestran a continuación.



Productos	Anillo A	Anillo B
<b>16</b>	-OH	-OH, -OMe(2)

Productos	Anillo A	Anillo B
<b>15</b>	-OH	-OH, -OMe
<b>17</b>	-OH (2)	-OH, -OMe
<b>18</b>	-OH (2)	-OH
<b>19</b>	-OH	-OH, -OMe(2)

De estas estructuras solo se pudo definir la fórmula general y los sustituyentes asociados a cada anillo, no así su posición exacta. Se puede asegurar que pertenecen al grupo de los flavonoides, pues en todos los casos se observó una fragmentación tipo RDA, característica en estos metabolitos.

No son muchos los artículos científicos que abordan la fragmentación de pterocarpanos, por lo que la información detallada de los principales fragmentos resulta de gran interés como material de consulta. Algo similar ocurre para los éteres de flavonoides trimetilsil derivados, cuyos patrones de fragmentación se presentan por primera vez.

Los catorce compuestos aislados y caracterizados, incluso los cinco productos sugeridos por CG-EM, no resultan nuevos productos naturales. A excepción de los metabolitos **3**, **7** y **8**, el resto de los productos naturales se identifican por primera vez desde propóleos de cualquier origen geográfico.

Se desarrolló un estudio de caracterización de los extractos totales de siete muestras de propóleos cubanos por CG-EM y se pudo observar que las muestras A, B, C y D muestran un comportamiento cromatográfico muy similar, en tanto los cromatogramas correspondientes a los propóleos E, F y G presentan gran parecido entre sí, pues por encima de los 37 min. se aprecian un conjunto de señales que se corresponden fundamentalmente con la presencia de estructuras triterpénicas.

De todo este análisis cromatográfico comparativo, se pudo concluir que el (3*S*)-vestitol, la (6*aS*,11*aS*)-medicarpina, el (3*S*)-neovestitol y el (3*S*)-isositivan, constituyen los metabolitos mayoritarios en todas las muestras de propóleos, por lo que estos compuestos pueden ser considerados como los marcadores químicos de los propóleos rojos cubanos.



Resulta interesante el hecho de que, siendo propóleos recolectados en sitios geográficamente diferentes, su composición química es muy similar. Esto lleva a pensar que las abejas que forman este tipo de propóleos deben recolectar exudados de especies vegetales idénticas o, de lo contrario, con una estrecha relación quimiotaxonómica.

Respecto a la determinación de la fuente vegetal de donde provienen los metabolitos presentes en este tipo de propóleos, la mayoría de los productos identificados se clasifican como isoflavonoides, los cuales tienen una limitada distribución en el reino vegetal, siendo fundamentalmente encontrados en la familia de las Leguminosae. Esto induce a pensar que la fuente vegetal de estos propóleos podría ser una o varias especies de esta familia.

Resulta interesante el hecho de que los cuatro compuestos antes mencionados, pese a constituir los productos mayoritarios, no son los responsables de la fuerte pigmentación roja de las muestras analizadas. La retusapurpurina A (**14**) es uno de los metabolitos responsables de la coloración roja y el mismo ha sido aislado de la especie *Dalbergia ecastophyllum*, perteneciente a la familia Leguminosae, por lo que pudiera ser ésta la especie vegetal fundamental que contribuye a la composición química de los propóleos rojos.

Se realizó, además, un estudio comparativo entre la muestra M-A y una muestra de propóleos rojo brasileño. En este estudio se demostró la presencia de medicarpina, isosativan, vestitol, neovestitol, liquiritigenina, formononetina, vesticarpan, 3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano, 3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano, isoliquiritigenina y el isoflavano nombrado como producto **16**.

En esta muestra de propóleos brasileño, los metabolitos mayoritarios concuerdan con los marcadores químicos de los propóleos rojos cubanos, es decir, vestitol, neovestitol, isosativan y medicarpina. Sin embargo, un elemento distintivo resulta ser la relación existente entre la medicarpina e isosativan con el vestitol. En la muestra brasileña la mezcla medicarpina e isosativan es superior al vestitol, contrario a lo que sucede en la muestra M-A.

Después de todo el estudio de caracterización realizado, se desarrolló un método analítico por CCD, cuya sencillez y recursos necesarios para el desarrollo del mismo hace factible su aplicación en los laboratorios o entidades que analizan y procesan el propóleos con fines terapéuticos.

Se empleó como fase estacionaria placas de silica gel GF<sub>254</sub> (0,20 mm) sobre soporte de aluminio para los análisis cualitativos. Se desarrolló una corrida ascendente utilizando como fase móvil la mezcla hexano:acetato de etilo en proporciones 7:3 y dos reveladores: Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor y vainillina/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor. Como estándar de referencia se utilizó nemorosona. Se estimó un tiempo de saturación de la cámara de 30 min.

Con estas condiciones, se logró diferenciar las muestras de propóleos rojos de otras dos muestras correspondientes a propóleos ricos en nemorosona (tipo I) y propóleos ricos en triterpenos (tipo III). También se observó que todas

las muestras rojas cromatografiadas presentaban cuatro manchas características que revelan a un R<sub>f</sub> entre 0,78 y 0,28, aproximadamente.

El estudio con seis patrones aislados a partir de M-A (vestitol, medicarpina, isosativan, isoliquiritigenina, formononetina y liquiritigenina) demostró que tres de las manchas características de estos propóleos se correspondían con tres de los metabolitos mayoritarios: vestitol, medicarpina e isosativan.

Por último, se realizó un estudio biológico preliminar para demostrar la actividad estrogénica de los propóleos rojos, a través del ensayo uterotrófico en ratas inmaduras tratadas por vía subcutánea. Se obtuvo como resultado que algunos de los metabolitos presentes en el propóleo rojo podrían actuar como antagonistas estrogénicos a nivel de los receptores presentes en el útero o podrían de alguna manera afectar la acción hormonal de tipo estrogénica.

Este efecto biológico se le atribuye fundamentalmente a los isoflavonoides, los cuales poseen la peculiaridad de actuar como fitoestrógenos que modulan selectivamente los receptores estrogénicos.

## CONCLUSIONES

1. El estudio químico de la muestra M-A permitió el aislamiento y la caracterización de doce compuestos:
  - Una chalcona, la 2',4,4'-trihidroxi chalcona (isoliquiritigenina).
  - Una flavanona, la (-)-4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina).
  - Una isoflavona, 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona (formononetina).
  - Tres isoflavanos de configuración 3*S*, el 7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano (vestitol), 2',4'-dihidroxi-7-metoxi isoflavano (neovestitol) y 2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano (isosativan).
  - Seis pterocarpanos, (6*aS*, 11*aS*)-3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano; (medicarpina); (6*aS*, 11*aS*)-3,9-dimetoxi pterocarpano (homopterocarpina); (6*aR*, 11*aR*)-3,10-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (vesticarpán), (6*aR*, 11*aR*)-3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano, (6*aR*, 11*aR*)-3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano y (6*aR*, 11*aR*)-3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano).
2. Se sugirió, además, la presencia de 5,7-dihidroxi-4'-metoxi isoflavona (biocanina A) y de retusapurpurina A, para las cuales se precisan otros experimentos que confirmen la masa molecular deducida por técnicas de RMN.
3. Todos los metabolitos identificados no constituyen nuevos productos naturales, pero a excepción de la medicarpina, isosativan y formononetina, sí son aislados por primera vez desde propóleos rojos de cualquier origen geográfico.
4. La GC-EM confirmó la presencia de flavonoides en los propóleos rojos cubanos, así como la homogeneidad en cuanto a su composición química, independientemente de la zona geográfica de recolección. El (3*S*)-vestitol, la (6*aS*, 11*aS*)-medicarpina, el (3*S*)-neovestitol y el (3*S*)-isosativan, pudieran considerarse los marcadores químicos de los propóleos rojos cubanos, pues constituyeron los metabolitos mayoritarios en todas las muestras de propóleos estudiadas.
5. Se desarrolló un método de CCD utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel GF<sub>254</sub> (0,20 mm) y como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3) que permite el estudio cualitativo de los propóleos rojos cubanos.
6. Se demostró el efecto estrogénico del propóleo rojo cubano, según el ensayo uterotrófico preliminar realizado en ratas inmaduras, tratadas por vía subcutánea.

## RECOMENDACIONES

- Realizar el espectro de masas de los productos **4** y **14** para confirmar su masa molecular.
- Continuar los procesos de purificación y caracterización espectroscópica de los compuestos presentes en las fracciones cromatográficas no estudiadas.
- Continuar evaluando la actividad fitoestrogénica de los propóleos rojos y las potencialidades biológicas de las estructuras aisladas.
- Proponer la aplicación de la técnica de CCD como método analítico para la identificación de los principales metabolitos presentes en las muestras de propóleos rojos cubanos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbouch O. Cromatografía en capa delgada para el análisis cualitativo de propóleos cubanos. Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. IFAL. Universidad de La Habana, 2007.
- Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Nakajima, Sh. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, 58, 945- 946.
- Agrawal, P. K.; Bansal, M. C. Carbon-13 NMR of flavonoids. *Elsevier Science Publishers B. V.*, 1989, 185-188, 367-369.
- Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Bang K.-S; and Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 7286-7292.
- Allué, J. Fitoestrógenos: biología vegetal y biología animal. *Ginecología Clínica y Quirúrgica*, 2001, 2(3), 163-165.
- Alvarez, J. D.; Granadillo, J.; Tabío, C. La cromatografía en capa delgada como método para la clasificación del propóleo cubano. *Cinc. Tec. Agri. Aple.*, 1989, 5, 51.
- Antus, S.; Kurtan, T.; Juhasz, L.; Kiss, L.; Hollosi, M.; Majer, Z. S. Chiroptical properties of 2,3-dihydrobenzo[b]furan and chromane chromophores in naturally occurring O-heterocycles. *Chirality*, 2001, 13, 493-506.
- Asis, M. *Propóleo. El oro púrpura de las abejas*. Ed. CIDA. Ciudad de la Habana, 1989, 55-89.
- Awale, S.; Prakash, S.; Tezuka, Y.; Ueda, J.; Matsushige, K. and Kadota, S. Neoflavonoids and Related Constituents from Nepalese Propolis and Their Nitric Oxide Production Inhibitory Activity *J. Nat. Prod.*, 2005, 68, 858-864.
- Bankova, P.M.; Butovska, D.; Petrov, V.; Nikolova, B.; Sabitini, A.G.; Marcazzan, G.I.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal.*, 2004, 15, 235–240.
- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 100, 114–117.
- Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM*, 2005a, 2 (1), 29-32.
- Bankova, V.; Christov, R.; Delgado Tejera, A. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, 1998, 49, 1411-1415.
- Bankova, V.; Christov, R.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M.C.; Popov, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z. Naturforsch*, 1995, 50 C, 167-172.
- Bankova, V.; Christov, R.; Stoev, G.; Popov, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1992, 607 (1), 150-153.
- Bankova, V.; De Castro, S. L.; Marcuccic, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 2000, 31, 3–15.

- Bankova, V.; Kuleva, L. Phenolic compounds of propolis from different regions of Bulgaria. *Zhivotnovud. Nauki*, 1989, 26 (2), 94-98.
- Bankova, V.; Marcucci, M.C.; Simova, S.; Nicolova, N.; Kujumgiev, A.; Popov, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch*, 1996, 51 C, 277-280.
- Bankova, V.; Nikolova, N.; Marcucci, M. A new lignan from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch*, 1996a, 51 C (9/10), 735-737.
- Bankova, V.; Popov, S.; Marekov, N. A study on flavonoids of propolis. *J. Nat. Prod.*, 1983, 46 (4), 471-474.
- Bankova, V.; Popov, S.; Marekov, N. Flavonoids from propolis. *Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod.*, 1981, 3 (1), 104-110.
- Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A-G. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforschung*, 2002, 57 C (5/6), 530-533.
- Banskota, A. H.; Nagaoka, T.; Sumioka, L. Y.; Tezuka, Y.; Awale, S.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 80 (1), 67-73.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana I.K.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from brazilians propolis. *Phytomedicine*, 2001a, 8, 16-23.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, 2001, 15 (7), 561-571.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, Sh. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.*, 1998, 61, 896-900.
- Barragá, B. E.; Peralta, J.; González, R.; Karchesy, J. Neocandenatone, an isoflavan-cinnamylphenol quinone methide pigment from *Dalbergia congestiflora*. *Phytochemistry*, 2004, 65, 925–928.
- Basnet, P.; Matsushige, K.; Hase, K.; Kadota, S. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acid from propolis. *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, 19, 1479-1484.
- Bezuidenhoudt, B. C. B.; Brandt, E. V.; Ferreira, D. Flavonoid analogs from *Pterocarpus* species. *Phytochemistry*, 1987, 26, 531-535.
- Blonska, M.; Bronikowska, J.; Pietsz, G.; Czuba, Z. P.; Scheller, S.; Krol, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 91 (1), 25-30.
- Bonvehi, J. S.; Coll, F. V. Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z. Naturforschung*, 2000, 55 (9/10), 778-784.
- Borcic, I.; Radonic, A.; Grzunov, K. Comparison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croacia. *Flavour Fragrance J.*, 1996, 11 (5), 311-313.
- Borrelli, F.; Capasso, F. CAPE, a constituent of propolis: A mini review. *Mitsubachi Kagaku*, 2003, 24 (2), 67-70.

- Boudourova-Krasteva, G.; Bankova, V.; Sforcin, J.M.; Nikolova, N.; Popov, S. Phenolic from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch*, 1997, 52c, 676-679.
- Bracho, J. C. Volatile constituents of propolis. A reality concerning its enriched chemical composition. *Boletín de la sociedad Química del Perú*, 2000, 66 (4), 198-209.
- Bracho, J. C.; Rosado, A.; Pino, J. Comparison of isolation methods for propolis volatiles. *J. Essent. Oil.*, 1996, Res. 8, 665.
- Braun, S.; Kalinowski, H-O.; Berger, S. 100 and more basic NMR experiments. A practical course. Ed. VCH, Weinheim, 1996.
- Bucharan, B.; Gruissem, W.; Jones R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Cap 24. Natural Products (Secondary Metabolites). Ed. American Society of Plant Physiologist, 2000, 1302-1308.
- Cao, Y. N.; Wang, Y.; Yuan, Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. *Chromatography*, 2002, 59 (1/2), 135-140.
- Cardile, V.; Panico, A.; Gentile, B.; Borrelli, F.; Russo, A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*, 2003, 73 (8), 1027-1035.
- Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002, 73 (1), S1-S6.
- Cengarle, L.; Carta, A.; Tilloca, G.; Marceddu, M. F. Antioxidant activity of Sardinian propolis. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 1998, 75 (12), 551-557.
- Chang, Y. C.; Nair, M. G.; Santell, R. C.; Helferich, W. G. Microwave-mediated synthesis of anticarcinogenic isoflavones from soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 1869-1871.
- Chen, C-N.; Wu, C-L.; Lin, J-K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome C release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67 (1), 53-66.
- Chi, H.; Hsieh, A. K.; Ng., C. L.; Lee, H. K.; Li, S. F. Y. Determination of components in propolis by capillary electrophoresis and photodiode array detection. *J. Chromatogr. A.*, 1994, 680 (2), 593-597.
- Chi, J.; Xue, B.; Chen, H. The chemical constituents from Liaoxi propolis. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 1996, 31 (5), 264-266.
- Choia, Y.M.; Nohb, D.O.; Choc, S.Y.; Suhd, H.J.; Kimd, K.M.; Kime, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT* 39, 2006, 756–761.
- Christov, R.; Bankova, V.; Hegazi, A.; Abd El Hady, F.; Popov, S. Chemical composition of Egyptian propolis. *Z. Naturforsch*, 1998, 53c, 197-200.
- Christov, R.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A.; Delgado Tejera, A. Antibacterial furofuran lignans from Canary Island propolis. *Fitoterapia*, 1999, 70, 89-92.
- Cizmarik, J.; Matel, I. Examination of the chemical composition of propolis. Isolation and identification of the 3, 4- dihydroxycinnamic acids (caffeic acid) from propolis. *Experientia*, 1970, 26 (7), 713.
- Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 2004, 65, 995-1016.

- Cuesta, O. R.; Cuéllar, C. A.; Rojas, N.; Vélez, C. H.; Rastrelli, L.; Aquino, R. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J. Nat. Prod.*, 1999, 62 (7), 1013-1015.
- Cuesta, O.R. “Estudios sobre propóleos”. Tesis en opción al título de Master en Química Farmacéutica. IFAL. Universidad de La Habana. 1996.
- Cuesta-Rubio, O. “Estudio químico de propóleos cubanos”. Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Farmacéuticas. Ciudad de La Habana, 2001.
- Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Campo, M.; Márquez, I.; Rosado, A., and Rastrelli, L. Chemical and Geographical Classification of Cuban Propolis Using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Together with HPLC-DAD data, *J. Agric. Food. Chem.* 2007, (aceptada)
- Cuesta-Rubio, O.; Frontena-Urbe, B. A.; Ramirez-Apan, T.; Cárdenas, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosona. *Z. Naturforschung*, 2002, 57 C (3/4), 372-378.
- Cui, G.; Duan, H.; Ji, L. Antioxidant furofuran lignans identified from Chinese propolis. *Shipin Kexue*, 2002, 23 (12), 117-120.
- Czako, M, Márton, L. A heartwood pigment in Dalbergia cell cultures. *Phytochemistry*, 2001, 57, 1013–1022.
- De Castro, S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *ARBS: Annual Review of Biomedical Sciences*, 2001, 3, 49-83.
- Del Boccio, P.; Rotilio, D. Quantitative analysis of caffeic acid phenetil ester in crude propolis by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Separation Sciences*, 2004, 27 (7-8), 619-623.
- Dictionary of Natural Products. Data© Chapman Hall/CRC 1982-2003. HDS Software Copyright©, Hampden Data Services Ltd. 2003.
- Dixon, A.R. *Isoflavonoids: Biochemistry Molecular, Biology and Biological Functions. In Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier Pergamon, 1999, Vol.1, 774-777.
- Dos Santos Pereira, A.; Pereira, A. F. M.; Trugo, L. C.; Radler e Aquino Neto, F. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. *Z. Naturforschung*, 2003, 58 C (7/8), 590-593.
- Dos Santos Pereira, A.; Pinto, A. C.; Cardoso, J. N.; De Aquino Neto, F. R.; Feiman de Souza Ramos, M.; Dellamora-Ortiz, G. M.; Pereira dos Santos, E. Application of high-temperature high-resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1998, 21 (7), 396-400.
- Dos Santos Pereira, A.; Rodríguez, F.; Radler, F. PROPOLIS: 100 AÑOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS. *Quim. Nova*, 2002, 25, 2, 321-326.
- Duarte, S.; Koo, H.; Bowen, W. H.; Hayacibara, M. F.; Cury, J. A.; Ikegaky, M.; Rosalen, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 26 (4), 527-531.



- Eda, M; Hayashi, Y.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Akutu, K. Anti-emetic principles of water extract of Brazilian propolis. *Pharmaceutical Biology* (Philadelphia, PA, United States). *Acs. Scin. Finder*®, 2005, 43 (2), 184-188.
- El-Badrawy, E. E. Y.; El-Fadaly, H. Antifungal and antioxidative activities of some phenolic acids extracted from bees honey propolis. *Mansoura Science Bulletin, A: Chemistry*, 2001, 28 (1, Suppl. 2), 285-306.
- Eliel, E. *Stereochemistry of carbon compounds*. Primera edición cubana, Poligráfico “Juan Marinello”, 1985, 398-433.
- Ellnain-Wojtaszek, M.; Hladon, B.; Bylka, W.; Skrzypczak, L.; Szafarek, P.; Chodera, A.; Kowalewski, Z. Isolation and study of cytostatic activity of components of propolis DEEP ether fraction. *Herba Pol.*, 1982, 28 (1-2), 51-59.
- Fernández, A. A. H.; Sinzato, S.; Kato, H. H. N. Biochemical evaluation of an ethanolic extract of propolis in rats. *Revista de Ciencias Farmacéuticas* (Sao Paulo), 2002, 23 (1), 97-109.
- Freitas, S.F.; Shinohara, L.; Sforcin, J.M.; Guimarães, S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, 2006, 13, 170–175.
- Fu, Su-Hsiong; Yan, Ming-Hua; Wen, Hwei-Mei; Chern, Jeing-Chuan. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electroforesis. *Yaown shipin fenxi*, 2005, 13 (1), 43-50.
- Fukai, T.; Marumo, Ai.; Kaitou, K.; Kanda, T. Terada, S.; Nomura, T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences*, 2002, 71, 1449–1463.
- Fulianga, H.U.; Hepburn, H.R.; Xuana, H.; Chenc, M.; Dayad, S.; Radloff, S.E. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus *Pharmacological Research*, 2005, 51, 147–152.
- Furukawa, S.; Tagaki, N.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nafady, A.M.; Nohara, T.; Sugimoto, H.; Doi, S.; Yamada, H. Two novel long-chain alkanolic acid esters of lupeol from Alecrim-propolis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 50 (3), 439-440.
- Gabrys, J.; Konecki, J.; Krol, W.; Scheller, S. Shani. Free aminoacids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. *J. Pharmacol. Res. Commun.*, 1986, 18 (6), 513-518.
- García-Viguera, C.; Ferretes, F. and Barberan, T. Study of Canadian Propolis by GC-MS and HPLC. *Z. Naturforsch*, 1993, 48 C, 731-735.
- García-Viguera, C.; Greenaway, W. ; Whatley, F.R. Composition of propolis from two different Spanish regions. *Z. Naturforsch*, 1992, 47C, 634.
- Gekker, G.; Hua, S.; Spivak, M.; Lokensgard, J. R.; Peterson, P. K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 102, 158–163.
- Ghisalberti, E. L.; Jefferies, P. R., Lanteri, R. Potential drugs from propolis. *Mass Spectrom. Drug. Metab.* (Proc. Int. symp.), 1977, 111-130.

- Ghisalberti, E. L.; Jefferies, P. R.; Lanteri, R.; Matisons, J. Constituents of propolis. *Experientia*, 1978, 34 (2), 157-158.
- Ghisalberti, E.L. Propolis: a review. *Bee world*, 1979, 60, 59.
- Greenaway, W.; May, J.; Scaysbrook, T.; Whatley, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z. Naturforsch.*, 1991, 46 C, 111.
- Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F.R. The analysis of bud exudates of *Populus euramericana*, and of propolis by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1987, 232, 249.
- Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work. *Bee world*, 1990, 71, 107.
- Hamasaka, T.; Kumazawa, S.; Fujimoto, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food Science and Technology Research*, 2004, 10 (1), 86-92.
- Hegazi, A. G.; Abd El Hady, F. K.; Allah, F. A. M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsch.*, 2000, 55 C (1/2), 70-75.
- Hegazi, A. G.; El Hady, F. K. A. Egyptian propolis. Part I. Antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z. Naturforsch.*, 2001, 56 C (1/2), 82-88.
- Heinen, W.; Linskens, H. F. Occurrence of fatty acids in propolis. *Port. Acta Biol., Ser. A.* 1971-1972, 12 (1-2), 65-76.
- Heo, M. Y.; Sohn, S. J.; Au, W. W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *College of Pharmacy*, 2001, 488 (2), 135-150.
- Huleihel, M.; Isanu, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Israel Medical Association Journal*, 2002, 4 (11), 923-927.
- Ikeno, K.; Ikeno, T.; Miyazawa, C. Effectos of Propolis in dental caries in rats. *Caries Res.*, 1995, 25 (5), 347-351.
- Ionita, R.; Sacalus, A.; Jivanescu, M.; Constantinescu, I. Experimentation of apiarian preparations for the direct and indirect capping of the dental pulp. *Stomatologia*, 1990, 37 (1), 19-30.
- Isla, M. I.; Nieva Moreno, M. I.; Sampeiro, A. R.; Vattuone, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 2001, 76, 165-70.
- Isla, M.I.; Paredes-Guzman, J.F.; Nieva-Moreno, M.I.; Koo, H.; Park, Y.K. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Agric Food Chem.*, 2005, 53, 1166–1172.
- Issao, Y. The detection of bioactive components of the tablets of bee-propolis: ethanolfraction (th 2<sup>nd</sup> report). *Acs ScinFinder*®, 2005, 45, 49-51.
- Itoh, K.; Amamiya, I.; Ikeda, S.; Konishi, M. Anti-Helicobacter pylori substances in propolis. *Mitsubachi Kagaku*, 1994, 15 (4), 171-173.
- Jeong, C.; Bae, Y.; Lee, H.; Shim, K. Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *Han'guk Sikp'um Yongyang Kwahak Hoechi*, 2003, 32 (4), 501-505.

- Jeong, C.; Jung, J.; Jung, K. The effect of propolis on endotoxin-induced thrombosis. *Journal of Applied Pharmacology*, 2000, 8 (3), 223-227.
- Jeong, III-Yun. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. *Han'guk Sikp'um Yongyong Kwahak Hoechi. Acs ScinFinder*®, 2005, 34 (2), 162-166.
- Johnson, K. S.; Eischen, F. A.; Giannasi, D. E. Chemical composition of North American bee propolis and biological activity towards larvae of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Chem. Ecol.*, 1994, 20 (7), 1783-1791.
- Kaczmarek, F.; Debowski, W.J.  $\alpha$ - and  $\beta$ - amylase in propolis. *Acta Pol. Pharm.*, 1983, 40 (1), 121.
- Kadota, Sh.; Tezuka, Y. Study on antimetastatic activity of a propolis constituent, CAPE, and its analogues. *Toyama Med. Pharm. Univ.*, 2004, 25 (3), 107- 112.
- Kartal, M.; Kaya, S. and Kurucu, S. GC-MS Analysis of propolis Samples from Two Different Regions of Turkey. *Z. Naturforsch.*, 2002, 57c, 905-909.
- Kartal, M.; Yildiz, S.; Kaya, S.; Kurucu, S.; Topcu, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 86 (1), 69-73.
- Kazuma, Y.; Nobuo, N.; Tomoko, T. The xantine oxidase inhibitory activity and hypouricemia effect of the propolis in rats. *Acs ScinFinder*®, 2005, 125 (3), 315-321.
- Kedzia, B.; Holderna-Kedzia, E. Chemical composition of propolis in up-to-date studies. *Herba Pol.*, 1991, 37 (2), 95-110.
- Keskin, N.; Hazir, S.; Baser, K. H. C.; Kurkcuoglu, M. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z. Naturforschung*, 2001, 56 C (11/12), 1112-1115.
- Khodjakulov; Burhon. Amino acid content of propolis, wanked out in Uzbekistan. *American Chemical Society*, Abstracts of Papers, United States, March 13-17, 2005.
- Kholodova, Y. D.; Kardakov, V. P.; Vendt, V. P.; Volovenko, V. O.; Skachkova, T. F. Squalene, lanosterol and cholesterol in the composition of propolis and its probable sources. *Dopov. Akad. Nauk Ukr. RSR. Ser. B: Geol, Khim. Biol. Nauki*, 1981, 5, 88-90.
- Kimoto, T.; Kurimoto, M. Antioxidant and antitumor effects of oral administration of propolis and artemisinin. *Mitsubichi Kagaku*, 1999, 20 (2), 67-74.
- Kolankaya, D.; Selmanoglu, G.; Sorkun, K.; Salih, B. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 2002, 78 (2), 213-217.
- Kosalec, I.; Bakmaz, M.; Pepeljnjak, S. Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharmaceutical*, 2003, 53 (4), 275-285.
- Kosenko, V.; Kosovich, T. The treatment of periodontitis with prolonged action propolis preparation. *Stomatologia*, 1990, 69 (2), 27-29.
- Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethopharm.*, 1999, 64, 235–240.

- Kulevanova, S.; Stafilov, T. Determination of some macro and microelements in propolis and its ethanol and water extracts by atomic adsorption spectrometry. *Acta Pharm.*, 1995, 45 (1-2), 15-22, CA. 123, 1995, # 52669c.
- Kumazawa, S.; Goto, H.; Hamasaka, T.; Fukumoto, T.; Nakayama, T. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68 (1), 260-262.
- Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis from various geographic origins. *Food Chemistry*, 2003, 84 (3), 329-339.
- Kumazawa, S.; Hayashi, K.; Kajija, K.; Ishii, T.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (17), 4777-4782.
- Kumazawa, S.; Shimoi, K.; Hayashi, K.; Ishii, T.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Identification of metabolites in plasma and urine of Uruguayan propolis-treated rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2004a, 52(10), 3083-3088.
- Kurkin, V. A.; Braslavsky, V. B.; Zapesochneya, G. G. Determination of flavonoids in propolis. *Farmatsiya*, 1992, 41 (1), 35-39.
- Kurkin, V. A.; Braslavsky, V. B.; Zapesochneya, G. G. Study of the extracts of propolis and *Populus balsamifera* buds by high-performance liquid chromatography. *Zh. Fiz. Khim.*, 1994, 68 (10), 1816-1818.
- Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Redman, B.; Sutherland, I. O.; Gottlieb, O. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium Vestitum*. *Phytochemistry*, 1978, 17, 1413-1415.
- Ledón, N.; Casacó, A.; González, R.; Merino, N.; González, A. y Tolón, Z. Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propóleo rojo colectado en Cuba. *Zhongguo Yaoli Xuebao*, 1997, 18(3), 274-276.
- Lee, S.; Kim, K. S.; Park, Y.; Shin, K. H.; Kim, B-K. In vivo anti-oxidant activities of tectochrysin. *Archives of Pharmacol. Research*, 2003, 26 (1), 43-46.
- León, G.; Graz, G. Efectos del propóleo en el tratamiento de aftas bucales. *Rev. Cubana Med. Milit.*, 1993, 22 (1), 42-45.
- Lu, Y.; Wu, C.; Yuan, Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. *Fitoterapia*, 2004, 75 (3-4), 267-276.
- Maciejewicz, W.; Daniewski, M.; Dzido, T. H.; Bal, K. GC-MS and HPLC analysis of phenolic acids extracted from propolis and from *Populus nigra* bud exudates. *Chemia Analityczna*, 2002, 47 (1), 21-30.
- Maciejewicz, W.; Daniewski, M.; Mielwiczuk, Z.; Supryniewicz, Z. Gas chromatography-mass spectrometry study of propolis. Analysis of  $\beta$ -steroids. *Acta Pol. Pharm.*, 1982, 39 (4), 277-279.
- Magio, F.; de Carvalho, A. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, 1990, 32 (1), 4-13.
- Mamontova, N.S.; Tikhonov, A. I.; Soboleva, V. A. Chemical composition of phenol-polysaccharide from propolis. *Khim. Prir. Soedin*, 1988, 6, 877-878.
- Marcucci, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 1995, 26, 83-99.

- Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Custodio, A. R.; Ferreira, M. M. C.; Bankova, V. S.; Garcia-Viguera, C.; Bretz, W. A. Evaluation of fenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z. Naturforsch.*, 2000, 55 C (1/2), 76-81.
- Marcucci, M. C.; Rodríguez, J.; Ferreres, F.; Bankova, V.; Groto, R.; Popov, S. Chemical composition of Brazilian propolis from Sao Paulo. *Z. Naturforsch.*, 1998, 53 C (1/2), 117-119.
- Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; Lu, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 1996, 42 (1), 205-211.
- Márquez, I.; Campo, M.; Cuesta, O.; Piccinelli, A.L.; Rastrelli, L. Polyprenilated benzofenone derivatives from Cuban propolis. *J. of Nat. Prod.*, 2005, 68 (6), 931-934.
- Martin, J.H.J.; Crotty, S.; Warren, P.; Nelson, P.N. Does an apple a day keep the doctor away because a phytoestrogen a day keeps the virus at bay? A review of the anti-viral properties of phytoestrogens. *Phytochemistry*. 2007, 68, 266–274.
- Martínez, G.; Alfonso, G.; Ortega, D.; Gou, G. Efectos curativos de una solución hidroalcohólica del propóleo cubano al 1.5 en la terapéutica periodontal. *Rev. Cubana Estomatol.*, 1992, 29 (1), 14-19.
- Martos, I.; Cossentini, M.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45 (8), 2824-2829.
- Mateescu, C. Propolis as therapeutic agent. *Roumanian Biotechnology Letters*, 2000, 5 (5), 329-360.
- Matsuno, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Z. Naturforsch.*, 1995, 50c, 93-97.
- Matsuno, T.; Jung, S.-K.; Matsumoto, Y.; Saito, M.; Morilawa, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenil-4-hidrooxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res.*, 1997, 17, 3565-3568.
- Matsuno, T.; Matsumoto, Y.; Saito, M.; Morikawa, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Z. Naturforsch.*, 1997a, 52c, 702-704.
- Medic-Saric, M.; Japsprica, L.; Mornar, A.; Smolicic-Bubalo, A.; Golja, P. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in propolis by two-dimensional thin layer chromatography. *J Planar Chromatogr Mod TLC*, 2004, 17: 459–463.
- Melliou, E.; Chinou, I. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 2004, 70 (6), 515-519.
- Meresta, L.; Meresta, T. Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis, occurring in flora in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 1985, 28-29 (1-4), 61-63.
- Metzner, J.; Bekemeier, H.; Paintz, M.; Schneidewind, E. Antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. *Pharmazie*, 1979, 34 (2), 97-102.
- Micallef, M. J.; Kimoto, T.; Kurimoto, M. Honeybee propolis and artepillin C in cancer and its chemoprevention. *Recent Research Developments in Cancer*, 2000, 305-317.

- Midorikawa, K.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. G.; Kadota, S. Buds of *Baccharis dracunculifolia*: potent source of biologically active caffeoylquinic acids and labdane-type diterpenes of Brazilian propolis. *Wakan Iyakugaku Zasshi*, 2003, 20 (5), 187-194.
- Morales, C. Acción antimicrobiana de los extractos alcohólicos de propóleos. Tesis en opción al título de licenciado. Universidad de la Habana. 1984.
- Moreira, T. Chemical composition of propolis: vitamins and amino acids. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 1986, 1 (1), 12-19.
- Nafady, A. M.; El-Shanawany, M. A.; Mohamed, M. H.; Hassanean, H. A-H.; Nohara, T.; Yoshimitsu, H.; Ono, M.; Sugimoto, H.; Doi, S.; Sasaki, K.; Kuroda, H. Cyclodextrin-enclosed substances of Brazilian propolis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 51 (8), 984-985.
- Nagy, E.; Papay, V.; Litkei, G.; Dinya, Z. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populus gemma* by the CG/MS method. *Stud. Org. Chem.*, 1986, 23, 223-233.
- Nagy, M.; Suchy, V.; Ubik, K.; Tekelova, D.; Grancai, D. Study of components of propolis of czechoslovakian sources. *Cesk. Farm.*, 1987, 36 (9), 410-411.
- Nagy, M.; Suchy, V.; Uhrin, D.; Ubik, K.; Budesinsky, M.; Grancai, D. Constituents of propolis of Czechoslovak origin. *V. Chem. Pap.*, 1988, 42 (5), 691-696.
- Nagy, M.; Suchy, V.; Uhrin, D.; Ubik, K.; Grancai, D. Components of propolis of czechoslovak origin. *Cesk. Farm.*, 1989, 38 (4), 171-172.
- Natarajan, K.; Singh, S.; Burkner, T. R. Jr.; Grunberger, D.; Aggarwal, B. B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 9090-9095.
- Negri, G.; Salatino, M. L. F.; Salatino, A. "Green propolis": unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. *Journal of Apicultural Research*, 2003, 42 (3), 39-41.
- Nikolovska-Coleska, Z.; Dorevski, K.; Klisarova, L.; Suturkova-Milosevic, L. Identification of phenolic constituents isolated from Macedonian propolis. *Glas. Hem.Tehnol. Maked*, 1995, 14 (1), 13-17.
- Noelker, C.; Bacher, M.; Gocke, P.; Wei, X.; Klockgether, T.; Du, Y.; Dodel, R. The flavonoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hidroxydopamine- induced neurotoxicity. *Neuroscience letters*, 2005, 383 (1-2), 39-43.
- Ogeturk, M.; Kus, I.; Colakoglu, N.; Zorarsiz, I.; Ilhan, N.; Sansilmaz, M. Caffeic acid phenetil ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 97 (2), 273-280.
- Okutan, H.; Ozulic, N.; Romuzon-Yilmaz, H.; Uz, E.; Effects of caffeic acid phenetil ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetes rat heart. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38 (2), 191-196.
- Orsolic, N.; Knezevic, A. H.; Sver, L.; Terzic, S.; Basic, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 94 (2-3), 307-315.
- Orsolic, N.; Kosalic, I.; Basic, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against tumour. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005, 28 (4), 694-700.

- Ozyurt, H.; Irmak, M. K.; Akyol, O.; Sogut, S. Caffeic acid phenetil ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochemistry and Function*, 2001, 19 (4), 259-263.
- Papay, V.; Soltesz, M.; Csizmadia, B.; Toth, L. Chemical and pharmacological study of propolis samples of various locations. *Acta Pharm. Hung.*, 1987, 57 (3-4), 143-151.
- Park, Y. K.; Ikegaki, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biotechnol. Biochem.*, 1998, 62 (11), 2230-2232.
- Pelter, A.; Stainton, P.; Barber, M. J. Mass spectra of oxygen heterocycles. II. Mass spectra of some flavonoids. *Heterocycl. Chem.* 1965, 2, 262-271.
- Pepeljnjak, S.; Jalsenjak, I.; Maysinger, D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, 1985, 40 (2), 122-123.
- Petri, G.; Lemberkovics, E.; Foldvari, M. Examination of differences between propolis (beegle) produced from different floral environments. *Dev. Food. Sci. (Flavors Fragrances)*, 1988, 18, 439-446.
- Pietta, P. G.; Gardana, C.; Pietta, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 2002, 73 (1), S7-S20.
- Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal.*, 2004, 15, 235-240.
- Popravko, S. A. Isolation and identification of the main components of propolis. *Apicult. Abstr.*, 1970, 21 (3), 127.
- Popravko, S. A.; Gurevich, A. I.; Kolosov, M. N. Flavonoid components of propolis. *Khim. Prir. Soedin*, 1969, 5 (6), 476-482.
- Pryzyk, E.; Dantas, A. P.; Salamao, K.; Pereira, A. S.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Aquino Neto, F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 88 (2-3), 189-193.
- Quintana, A. M. V.; Coronel, B. M. B.; Sánchez, J. J. S.; Buelga, C. S. Phenolic composition of monofloral honeys of different origins. *Alimentaria*, 1999, 306, 93-99.
- Quintana, D. Efectos del propóleo en los tratamientos quirúrgicos y las úlceras bucales. *Rev. Cubana Estomatol.*, 1996, 33(1), 26-29.
- Ramirez, D.; Gonzalez, A.; Rodriguez, S.; Gonzalez, R.; Merino, N.; Ancheta, O.; Pascual, C.; Rojas, E.; Ramos, M. E. Hepatoprotective effect of the Cuban red propolis on the toxicity induced in mice by the administration of acetaminophen. *Rev. Cubana Farm.*, 1994, 28(1), 45-54.
- Ramirez, D.; Gonzalez, R.; Rodriguez, S.; Ancheta, O.; Bracho, J. C.; Rosado, A.; Rojas, E.; Ramos, M. E. Protective effects of Propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice. *Phytomedicine*, 1997, 4(4), 309-314.
- Robbers, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Cap. 8 Phenylpropanoids. William & Wilkins, 1996, 138-139.

- Rodríguez, S.; Ancheta, O.; Ramírez, D.; González, A.; Merino, N.; González R. Efecto protector del propóleo rojo cubano, ante el daño agudo inducido en hepatocitos de roedores. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 1998, 29 (2), 69-72.
- Rodríguez, S.; Braet, F.; Sey Noeve, C.; Baekeland, M.; Bli Jweetr, D.; De Zonger, R.; Fajardo, M.; Wise, E. Evaluation of Cuban red propolis extract on liver sinusoidal endothelial cell cultures. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 2000, 31 (2), 99-102.
- Rojas, N.; Pilotos, S. Aislamiento de pseudomona aeruginosa en pacientes quemados y su sensibilidad frente al propóleo. *Revista biológica*, 1990, 14 (1), 57-63.
- Rojas, N.; Cuesta-Rubio, O.; Avilés, A.; Lugo, D.; Avellaneda, S. Actividad antimicrobiana de nemorosa aislada de *Clusia rosea*. *Revista cubana de farmacia. Suplemento especial* (35), 2001, 198-200.
- Romay, Ch.; Ramírez, D.; Bracho, J.C. Evaluation of the antioxidant properties of a 1,4 –naphthoquinona fraction isolated from Cuban red propolis. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 1999, 32 (2), 97-98.
- Ruseva, N.; Mateeva, N. Gas-chromatographic analysis of some propolis components. *God. Vissh. Khim-Teknol. Inst., Sofiya*, 1990, 30 (3), 191-195.
- Sahinler, N.; Kaftanoglu, O. Natural product propolis: chemical composition. *Nat Prod Res.*, 2005, 19, 183–188.
- Santos, V. R.; Pimenta, F. J. G. S.; Aguiar, M. C. F.; do Carmo M. A. V.; Naves M. D.; Mesquita, R. A. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytoterapy Research*, 2005, Vol.19, 652-654.
- Sawaya, A. C. H. F.; Tomazela, D. M.; Cunha, I. B. S.; Bankova, V. S.; Marcucci, M. C.; Custodio, A. R.; Eberlin, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, 2004, 129 (8), 739-744.
- Schneidewind, E. M.; Kala, H.; Linzer, B.; Metzner, J. On the knowledge of the constituents of propolis. *Pharmazie*, 1975, 30 (12), 803.
- Schöning, A., Friedrichsen, W. The stereochemistry of pterocarpanoids. A theoretical study. *Z. Naturforsch.*, 1989, 44, 975–982.
- Serra, J. B.; Ventura, C. F. Phenolic composition of propolis from China and from South America. *Z. Naturforsch*, 1994a, 49 C (11/12), 710-718.
- Serra, J. B.; Ventura, C. F.; Escola, J. R. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, 71 (5), 529-532.
- Sforcin, J.M.; Orsi, R.O.; Bankova, V. Effect of propolis, some isolated compounds and it's source plant on antibody production. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 98 (3), 301-305.
- Shalinder, N.; Kaftanoglu, O. Natural Product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*, 2005, 19 (2), 183-188.
- Shich, D.-B.; Shi, X.-Y.; Wu, Y.-N.; Wu, S.-N. Properties of BkCa channels in oral keratinocytes. *Journal of dental research*, 2005, 84 (5), 468-473.



- Shimazawa, M.; Chikamatsu, S.; Morimoto, N.; Mishima, S.; Nagai, H.; Hideaki, H. Neuroprotection by Braziliaz Green Propolis against In vitro and In vivo Ischemic Neuronal Damage. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2005, 2 (2), 201-207.
- Shimizu, K.; Ashida, H.; Matsuura, Y.; Kanazawa, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 424 (2), 181-188.
- Siess, M-H.; Le bon, A-M.; Canivenc-Lavier, M-C.; Amiot, M-J.; Sebatier, S.; Aubert, S.Y.; Suschetet, M. Flavonoids of honey and propolis: characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo [α] pyrene-DNA binding in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44 (8), 2297-2301.
- Slade, D., Ferreira, D., Marais, J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry*, 2005, 66, 2177–2215.
- Sokolov, I. V.; Torgov, I. V. Conjugates of trans-coniferyl alcohol in propolis and its sources. *Khim. Prir. Soedin*, 1989, 3, 319-324.
- Sokolov, I. V.; Torgov, I. V. Flavonoid aglycons in propolis and its sources. *Khim. Prir. Soedin*, 1990a, 4, 550-551.
- Sokolov, I. V.; Torgov, I. V. Phenylpropanoid aldehydes in propolis and its sources. *Khim. Prir. Soedin*, 1990b, 2, 261-262.
- Song, Y. S.; Park, E-H.; Hur, G. M.; Ryu, Y. S.; Lee, J. Y.; Kim, Y. M.; Jin, C. Caffeic acid fenetil ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Letters*, 2002a, 175 (1), 53-61.
- Song, Y. S.; Park, E-H.; Jung, K. J.; Jin, C. Inhibition of angiogenesis by propolis. *Archives of Pharmacol Research*, 2002b, 25 (4), 500-504.
- Song, Y.; Jin, C.; Ja, K.; Park, E-H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 82, 89-95.
- Stadler, M.; Dayne, E.; Anke, H. Nematicidal activities of two phytoalexins from *TaVerniera abyssinica*. *Planta Med.* 1994, 60, 550-552.
- Stafilov, T.; Kulevanova, S. Determination of some trace elements in propolis by atomic adsorption spectrometry. *Anal. Lab.*, 1994, 3 (4), 207-214.
- Stobiecki, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 2000, 54, 237-256.
- Suárez, D. “Estudio de la actividad antitumoral de propóleos cubanos”. Tesis en opción al grado científico de master en ciencias. Universidad de la Habana. 2003.
- Suchy, V.; Tekelova, D.; Grancai, D.; Nagy, M.; Dolejs, L.; Tamko, J. Study of the substances contained in propolis of Czechoslovak origin. III. *Cesk. Farm.*, 1985, 34 (10), 405-407.
- Suchy, V.; Tekelova, D.; Petrovic, P.; Hrochova, V.; Dojels, L. Study of constituents of propolis of Czechoslovakian origin. I. Flavanones and aromatic acids. *Farm. Obz.*, 1981, 50 (11), 543-548.

- Szarvas, S. Z., Szokan, G.Y., Hollo, M., Kiss, L., Antus, S. Determination of the absolute configuration of synthetic pterocarpanes by chiral HPLC using on-line CD detection. *Enantiome*, 2000, 5, 535–543.
- Tahara, S.; Ibrahim, R. K. *Phytochemistry*, 1995, 38, 1073. Tomado de Dixon, A.R. *Isoflavonoids: Biochemistry Molecular, Biology and Biological Functions. In Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier Pergamon, 1999, Vol.1, 774-777.
- Takai, M.; Yamaguchi, H.; Saitoh, T.; Shibata, S. *Chem. Pharm. Bull.*, 1972, 20, 2488. Tomado de Dixon, A.R. *Isoflavonoids: Biochemistry Molecular, Biology and Biological Functions. In Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier Pergamon, 1999, Vol.1, 774-777.
- Tanaka, T.; Ohyama, M.; Iinuma, M.; Shirataki, Y.; Komatsu, M.; Burandt, C. Isoflavonoids from *Sophora secundiflora*, *S.arizonica* and *S. gypsophila*. *Phytochemistry*, 1998, 48, 1187-1193.
- Tatefuji, T.; Izumi, N.; Otha, T.; Arai, Sh.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, 19, 966-970.
- Tazawa, S. Analysis of the constituents, chemical evaluation and tyrosinase inhibition of propolis. *Fragrance Journal*, 2002, 30 (3), 25-32.
- Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. II. *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, 47 (10), 1388-1392.
- Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T.; Miyase, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. *Chem. Pharm. Bull.*, 1998, 46 (9), 1477-1479.
- Tekelova, D.; Suchy, V.; Hrochova, V.; Bartuskova, J.; Dojels, L. Study of constituents of propolis of Czechoslovak provenience. II. Derivatives of flavonol, vainillin and isovainillin. *Farm. Obz.*, 1981, 50 (12), 611-615.
- Than, M. M.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Kadota, S. Inhibitors of nitric oxide (NO) production in murine macrophage – like J774.1 cells – from Brazilian propolis. *Wakan Iyakugaku Zasshi*, 2003, 20 (1), 22-29.
- Tikhonov, A. I.; Dranik, L. I.; Litvinenko, V. I. Components of a water-soluble polyphenol preparation of propolis. *Khim. Prir. Soedin*, 1977, 3, 416-417.
- Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F.; Ortiz, A. Flavonoids from *Apis mellifera* beeswax. *Z. Naturforsch.*, 1993, 48 C (1-2), 68-72.
- Tomás-Barberán, F. A.; García-Viguera, C.; Vit-Oliver, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, 1993a, 34 (1), 191-196.
- Tóth, E., Dinya, Z.; Antus, S. Mass spectrometric studies of the pterocarpano skeleton. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14, 2367–2372.
- Trusheva, B.; Popota, M.; Bankova, V.; Simova, S; Marcucci, M.C; Laguna, P.; Da Rocha, F. and Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Advance Access Publication*, eCAM 2006, 3 (2) 249-254.

- Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Sabatini, A. G. A new type of European propolis, containing bioactive labdanes. *Rivista Italiana EPPOS*, 2003, 36, 3-7.
- Usia, T.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J. of Nat. Prod.*, 2002, 65 (5), 673-676.
- Uzel, A.; Sarkun, K.; OEncang, O.; Cogulu, D.; Gencay, O.; Salih, B.; Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*, 2005, 160 (2), 189-195.
- Valcic, S.; Montenegro, G.; Timmermann, B. Lignans from Chilean propolis. *J. of Nat. Prod.*, 1998, 61, 771-775.
- Veitía, G; Ruiz, G. Efectividad del propóleo en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Medicentro*, 1994, 10 (1), 49-58.
- Velikova, M.; Bankova, V. Sorkun, K.; Popov, S. And Kujumgiev, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and Bulgarian origin. *Mellifera 1-1*, 2001, 57-59.
- Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meloponinae. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, 2000, 55 (9/10), 790-793.
- Vennat, B.; Arvovet-Grand, A.; Gross, D.; Pourrat, A. Qualitative and quantitative analyses of flavonoids and identification of phenolics acids from a propolis extract. *J. Pharm. Belg.*, 1995, 50 (5), 438-444.
- Villanueva, V. R. ; Barbier, M. ; Gonnet, M. ; Lavie, P. Propolis flavonoids. Isolation of new bacteriostatic substance, pinocembrin (5,7-dihydroxyflavanone). *Ann. Inst. Pasteur*, 1970, 118 (1), 84 -87.
- Volpi, N. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 2004, 25 (12), 1872-1878.
- Volpi, N.; Bergonzini, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 42, 354–361.
- Wähälä, K.; Koskimies J.K.; Mesilaakso, M.; Salakka A.; Leino, T.; Adlercreutz, H. The Síntesis, Structure, and Anticancer Activity of cis- and trans- 4', 7-dihydroxyisoflavans-4-ols. *J.Org. Chem.*, 1997, 62, 7690-7693.
- Wang, B.; Zhang, H. Chemical constituents of Beijing propolis. *Zhongyao Tongbao*, 1988, 13 (10), 613-614.
- Watson, d. G.; Peyfoon, E.; Zheng, L.; Lu, D.; Seidel, V.; Johnston, D.; Parkinson, J. A. and Fearnley, J. Application of Principal Components Analysis to 1H-NMR Data Obtained from Propolis Samples of Different Geographical Origin. *Phytochem. Anal.* 2006,17: 323–331.
- Weng, Meng-Shih; Ho, Yuan-Soon; Lin, Jen-Kun. Chrisin induces G1phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21 waf 1/Cip1 expresion: Involvement of p38 mitogen- activated protein kinase. *Biochemical pharmacology*, 2005, 69 (12), 1815-1825.
- Williams, A. C.; Harborne, J. B. Methods in plant chemistry. *Plants phenolics. Isoflavonoids*, 1989, 12 (1), 439-443.

- Wohrl, S.; Hemmer, W.; Focke, M.; Gotz, M.; Jarich, R. The significance of fragrance mix, balsam of Peru, colophony, and propolis as screening tools in the detection of fragrance allergy. *British Journal of Dermatology*, 2001, 145 (2), 268-273.
- Wollenweber, E.; Asakawa, Y.; Schillo, D.; Lehman, V.; Weigel, H. A novel caffeic acid derivative and other constituents of *Populus* bud excretion and propolis (bee-glue). *Z. Naturforsch.*, 1987, 42 C (9/10), 1030-1034.
- Wollenweber, E.; Buchmann, S. L. Feral honey bees in the Sonoran Desert. Propolis sources other than poplars. *Z. Naturforsch.*, 1997, 57 C (7/8), 530-535.
- Yang, X.; Chu HH, Qi. Y.; Di, J.W.; Tu, YF. Determination of total effective value of flavonoids in propolis by quenched electroluminescence analysis. *Spectrosc Spectral Anal.*, 2005, 25, 192–194.
- Yasuhiro, M. Skin preparation containing propolis or it is components for treatment of pigmentation or rash. *Jpn. Kokai Tokkio Koho. Acs. Scin. Finder®*. CODEN: JKXXAF JP 2005126412 A2 20050519 Patent written in Japanese. 2005.
- Youssef, D.; Ramadan, M. A.; Califa, A.A. Acetphenones, a chalcone, a chromone and flavonoids from *Pancreatium maritimum*. *Phytochemistry*, 1998, 49, 2579-2583.
- Zhou, L.; Guo, J.; Yu, J. Flavonoids from Beijing propolis. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 1999, 24 (3), 162-164.

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS.**

**ATA:** Acido trifluoroacético.

**BSTFA:** bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida.

**CC:** Cromatografía en Columna.

**CCD:** Cromatografía en Capa Delgada.

**CD<sub>3</sub>OD:** Metanol deuterado.

**CDCl<sub>3</sub>:** Cloroformo deuterado.

**CENPALAB:** Centro Nacional de Producción de Animales para Laboratorio.

**CG/EM:** Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas.

**CLAR:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

**CLAR-FN:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Normal.

**CLAR-FR:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa.

**CLMP:** Cromatografía Líquida a Media Presión.

**COSY:** Correlated Spectroscopy.

**DC:** Dicroísmo Circular.

**DMSO:** Dimetil sulfóxido.

**EC:** Efecto Cotton.

**EM:** Espectrometría de Masas.

**ESI/MS:** Espectrometría de masas de ionización por electrospray.

**HMBC:** Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

**HSQC:** Heteronuclear Single Quantum Correlation.

**IDH:** Índice de deficiencia hidrogeniónica.

**J:** Constante de acoplamiento.

**MSTFA:** N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida.

**RDA:** Retro Diels-Alder.

**R<sub>Fr</sub>:** R<sub>f</sub> relativo.

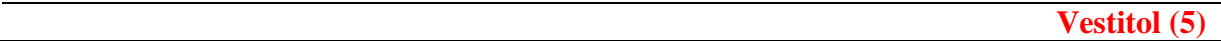
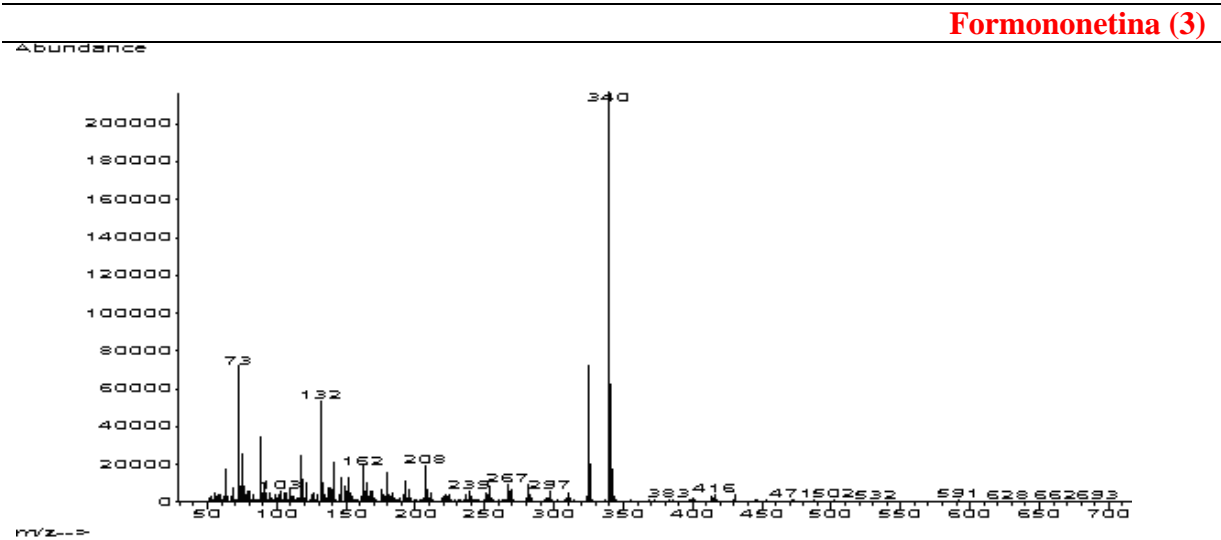
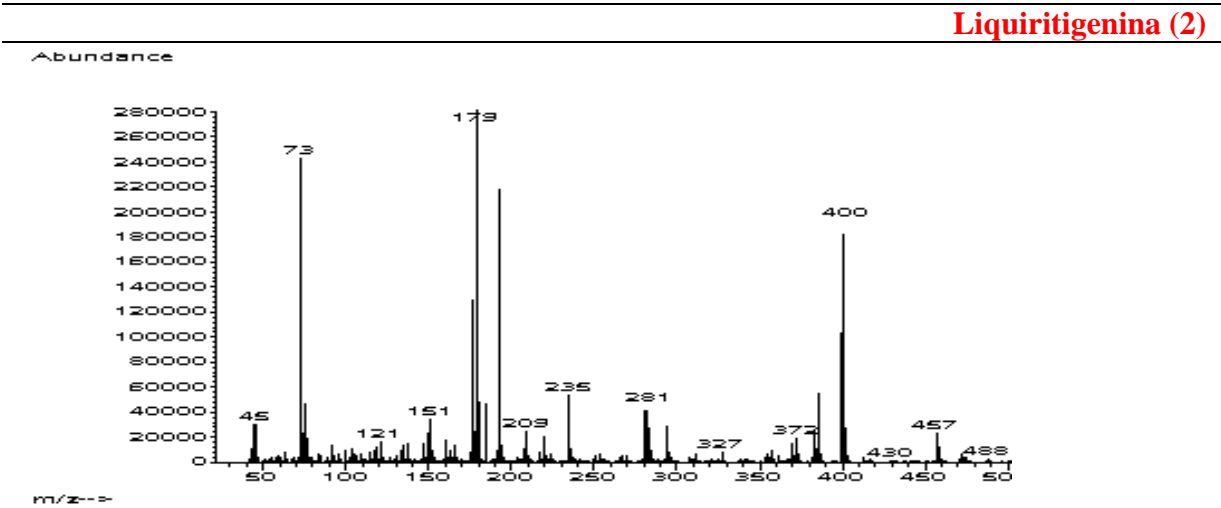
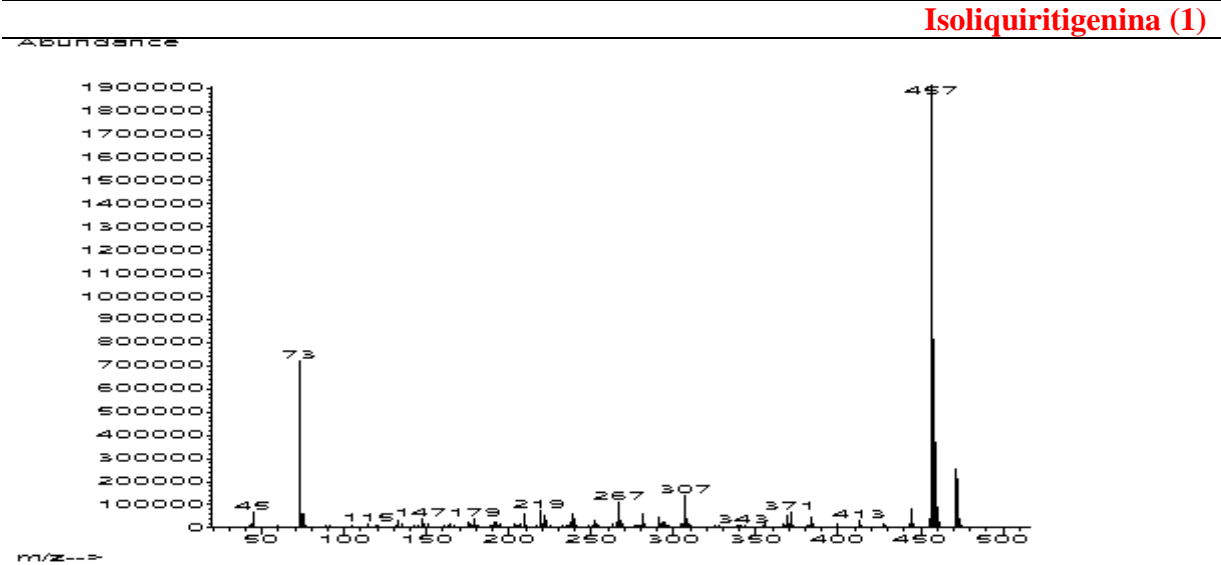
**RMN  $^{13}\text{C}$ :** Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.

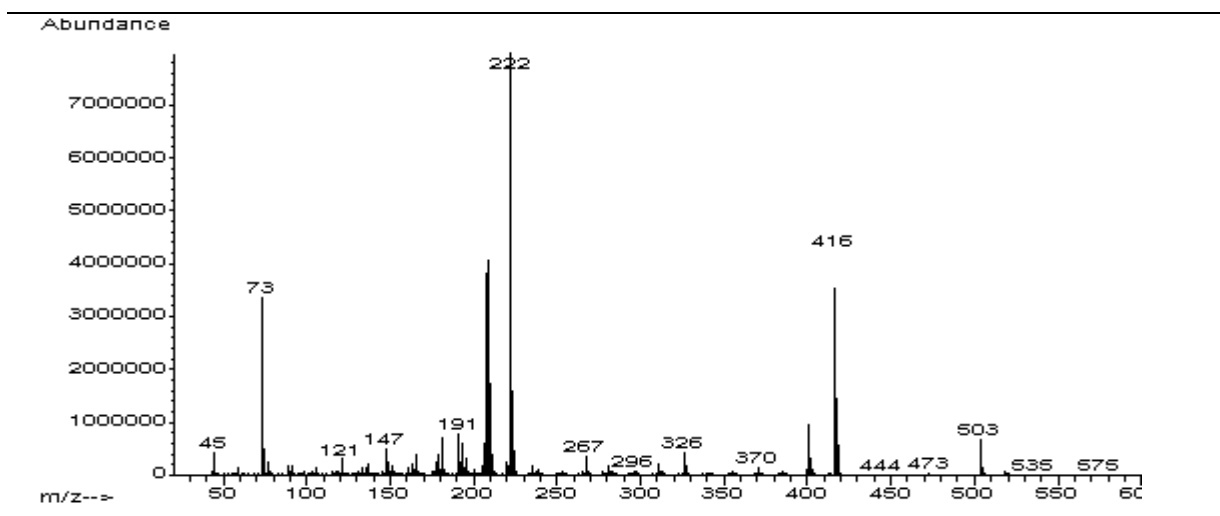
**RMN  $^1\text{H}$ :** Resonancia Magnética Nuclear de Protones.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

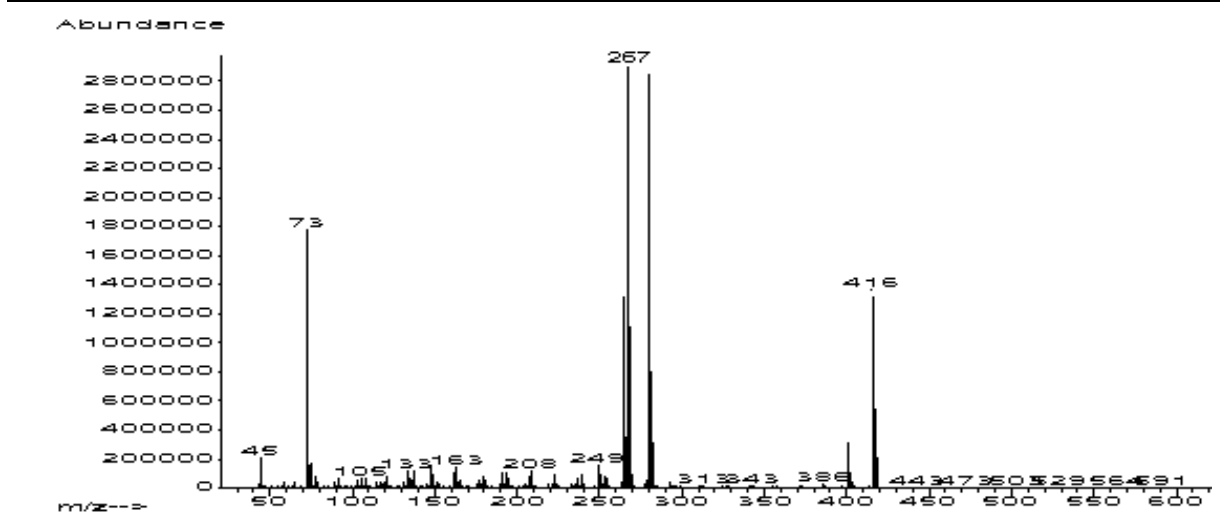
**TMS:** Tetrametilsilano.

Espectros de masas de los productos caracterizados.

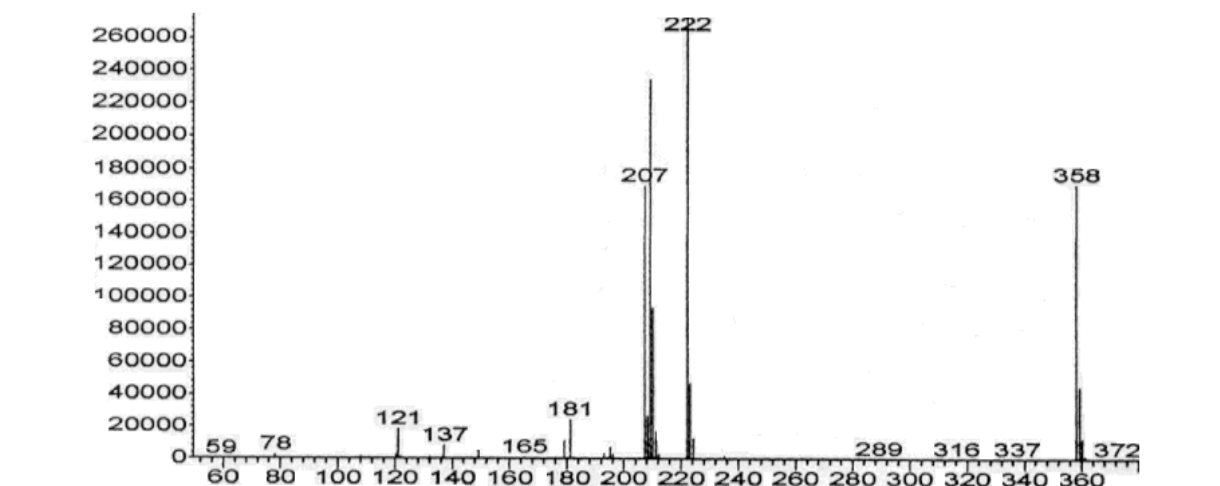




Neovestitol (6)

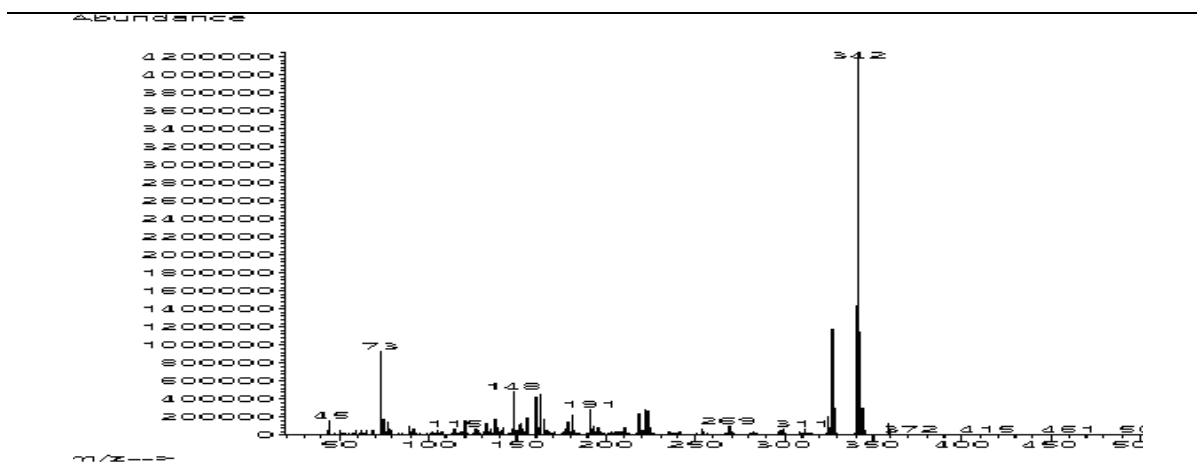


Isosativan (7)

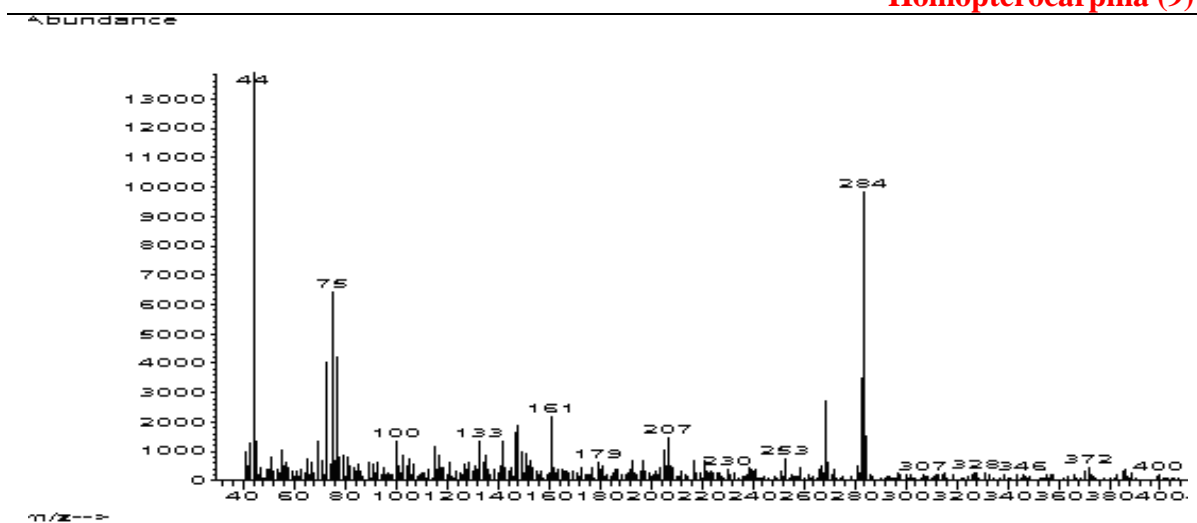


Medicarpina (8)

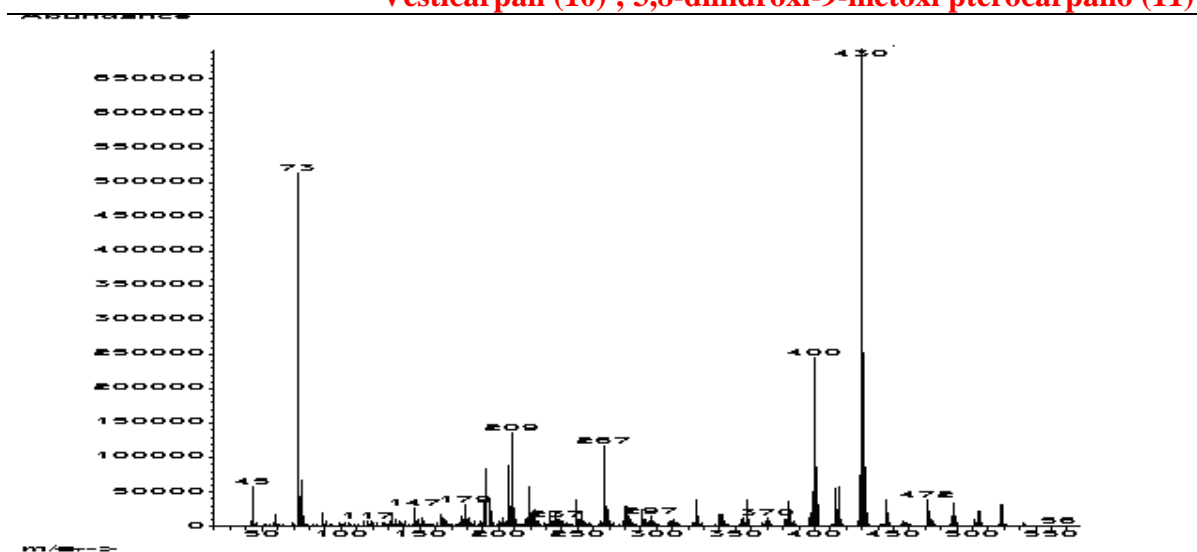




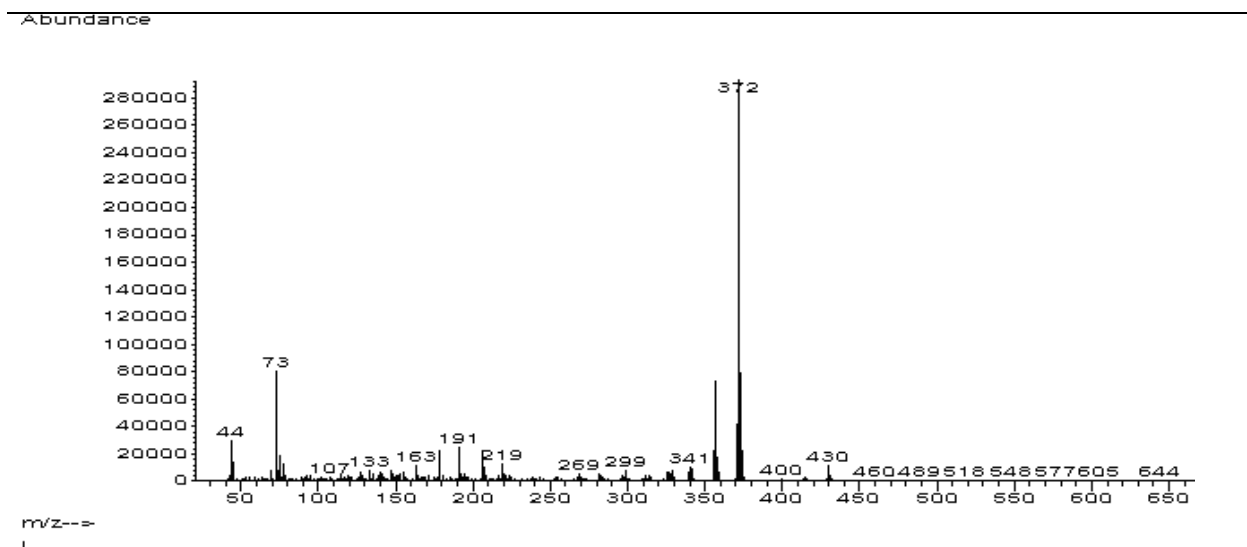
### Homopterocarpina (9)



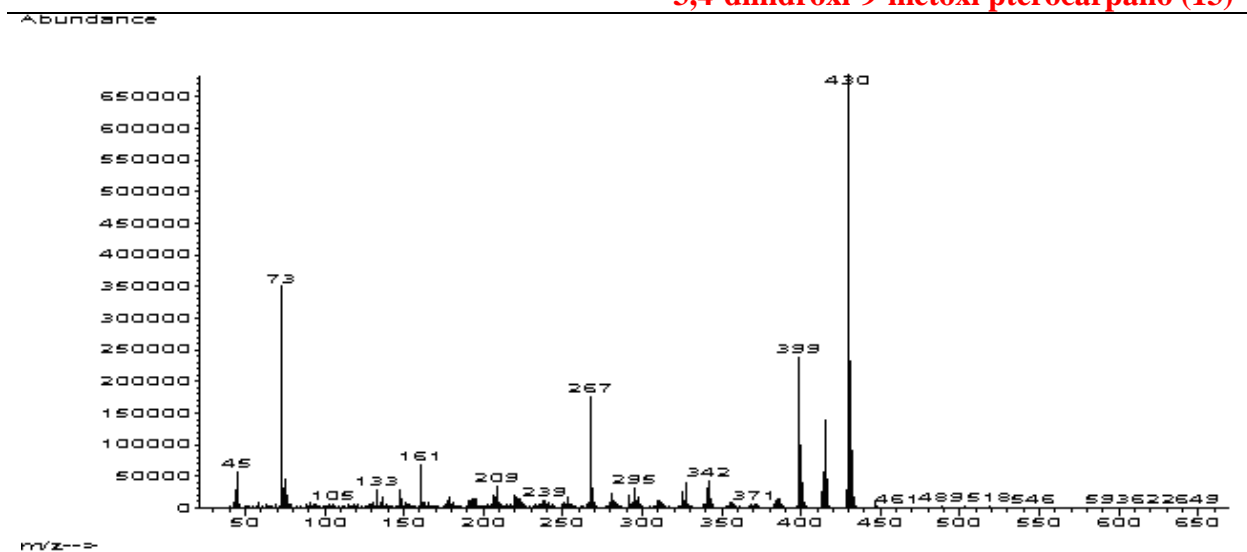
### Vesticarpan (10) ; 3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (11)



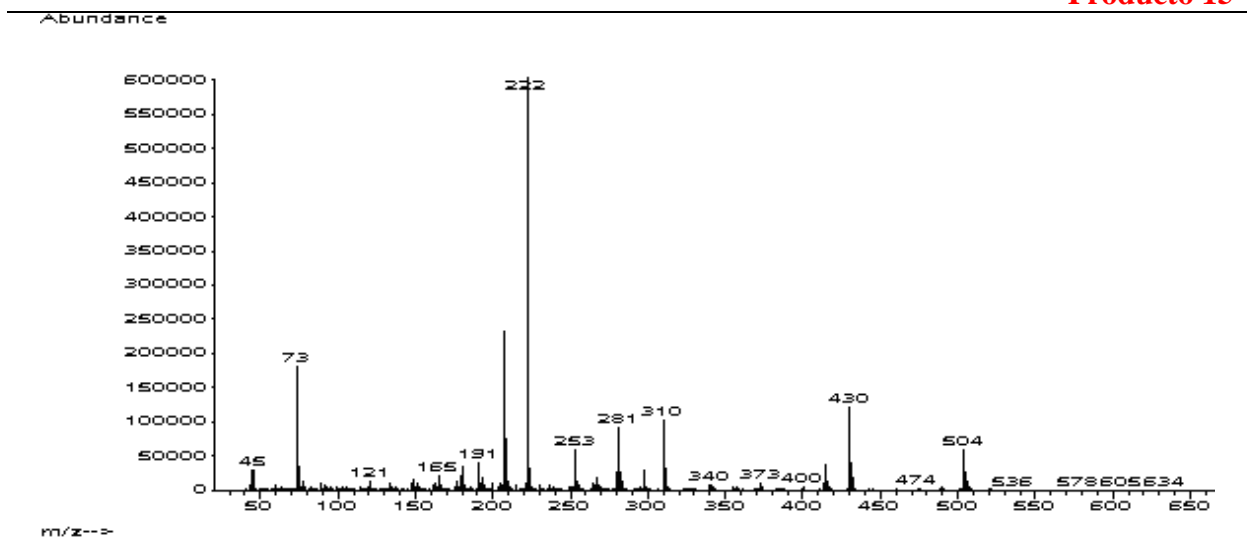
### 3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano (12)



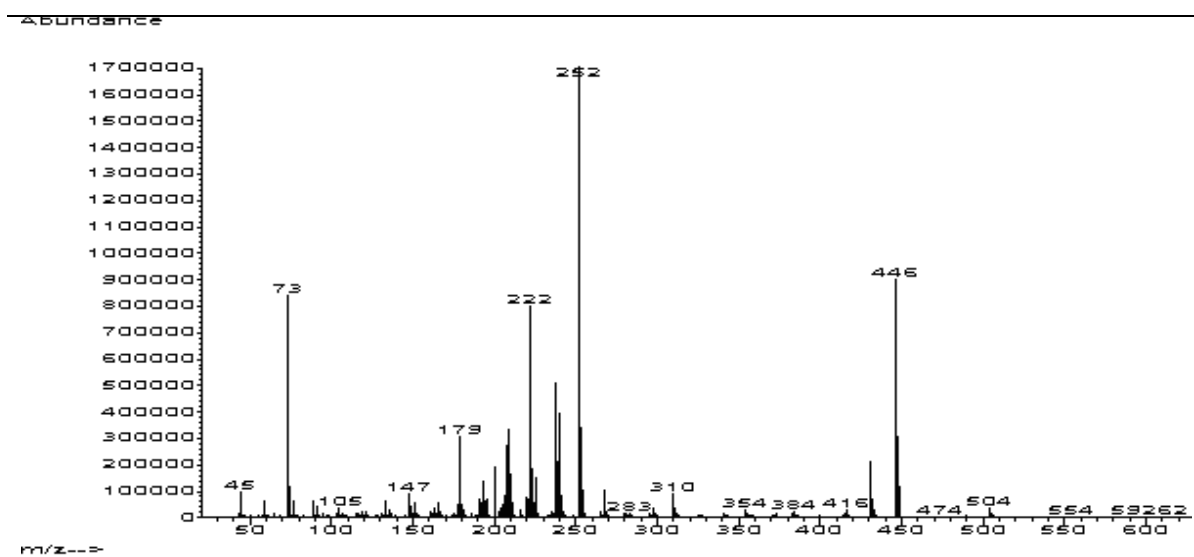
**3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (13)**



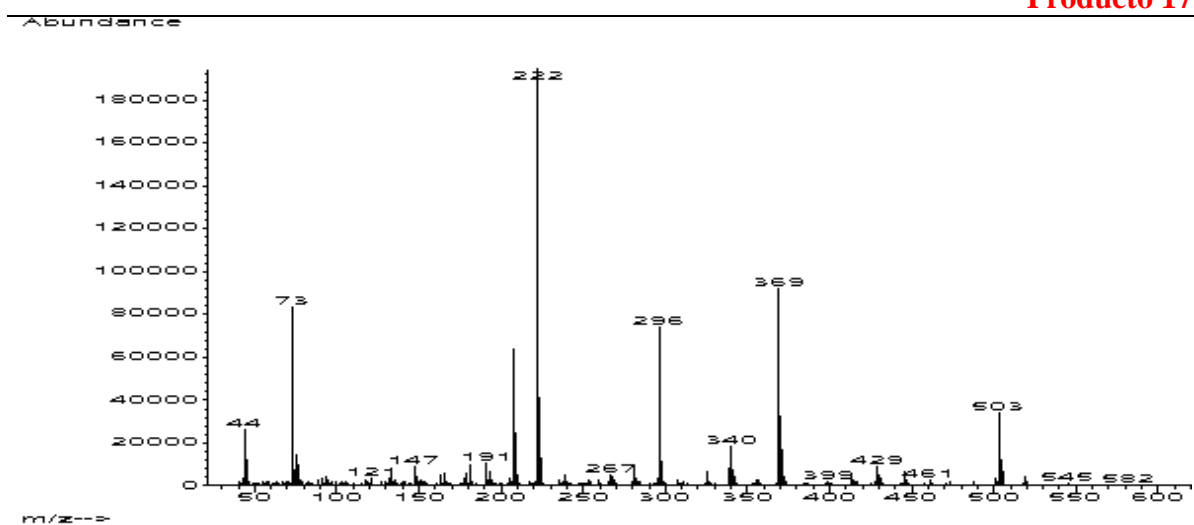
**Producto 15**



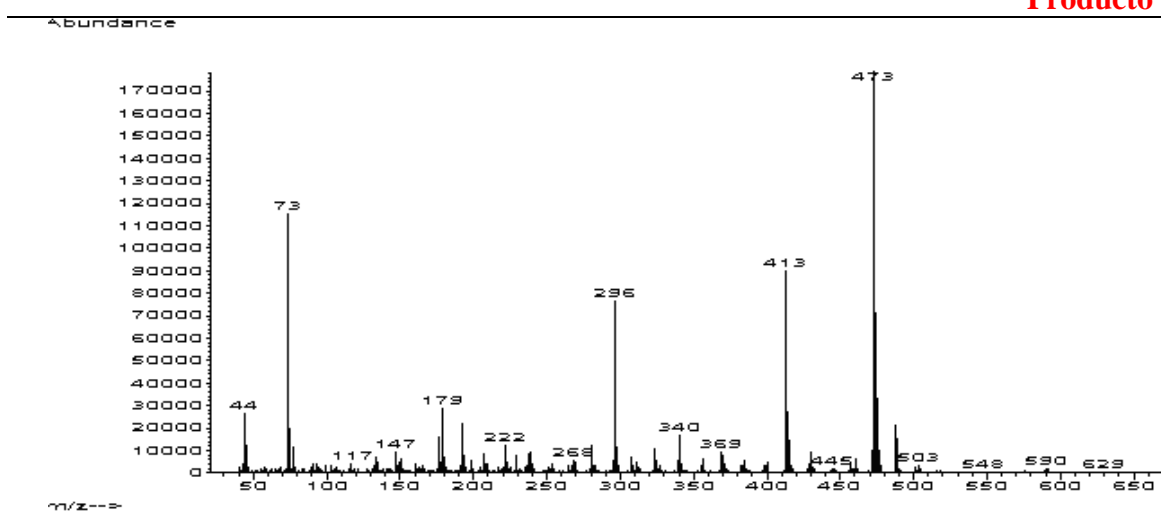
**Producto 16**



Producto 17

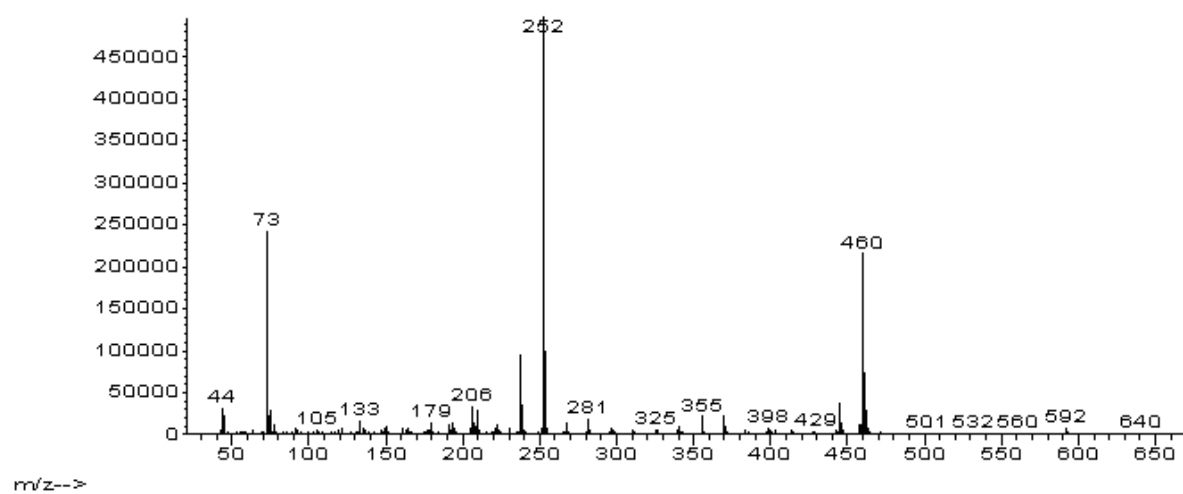


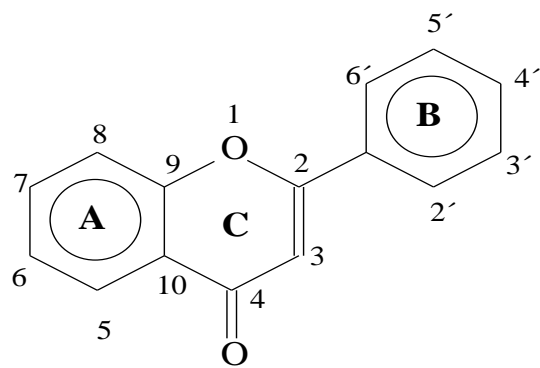
Producto 18



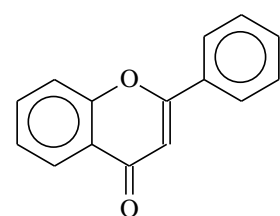
Producto 19

Abundance

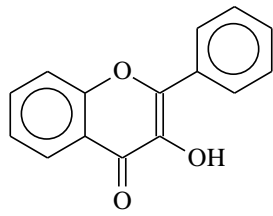




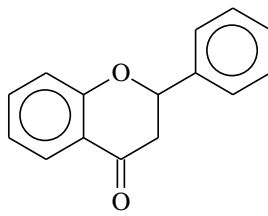
2-fenilcromona



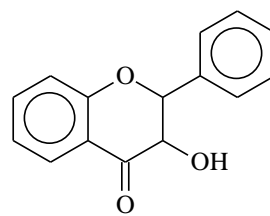
Flavona



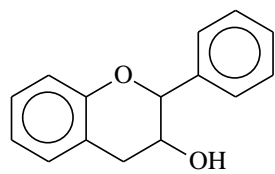
Flavonol



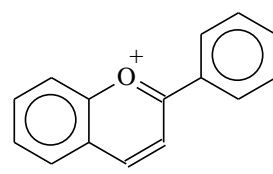
Flavanona



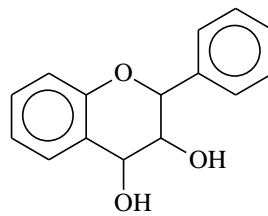
Flavanonol



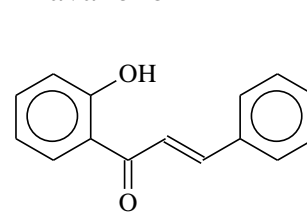
Catequina



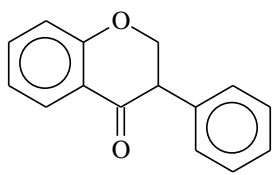
Antocianidina



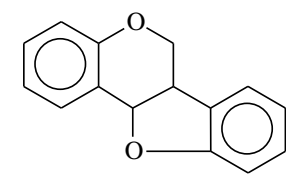
Leucoantocianidina



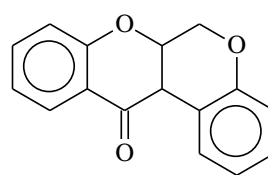
Chalcona



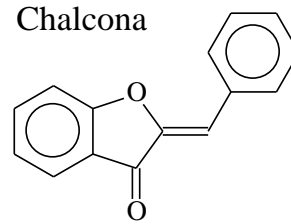
Isoflavanona



Pterocarpano

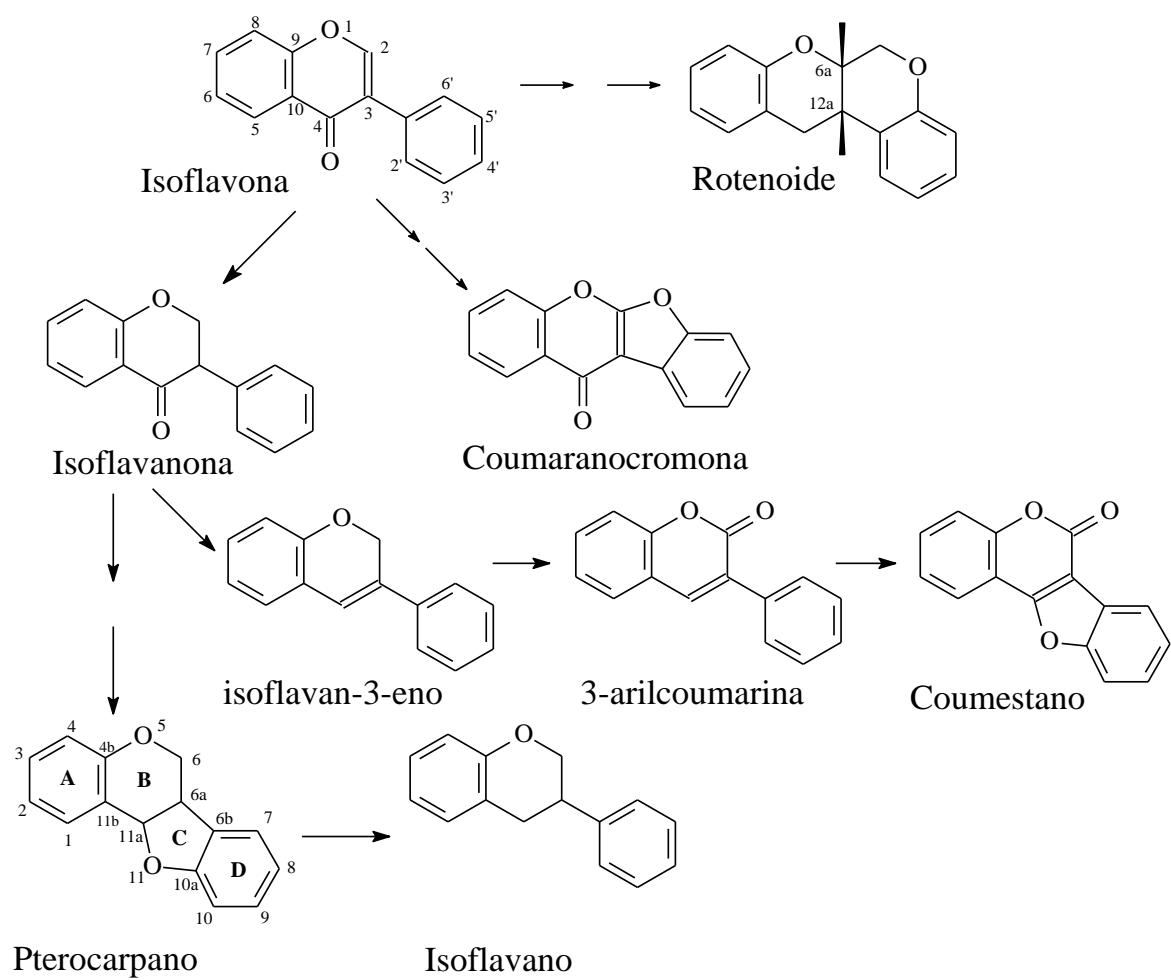


Rotenoide



Aurona

Figura 1: Estructura básica de flavonoides. Variantes estructurales.



**Figura 2: Grupos fundamentales de isoflavonoides.**

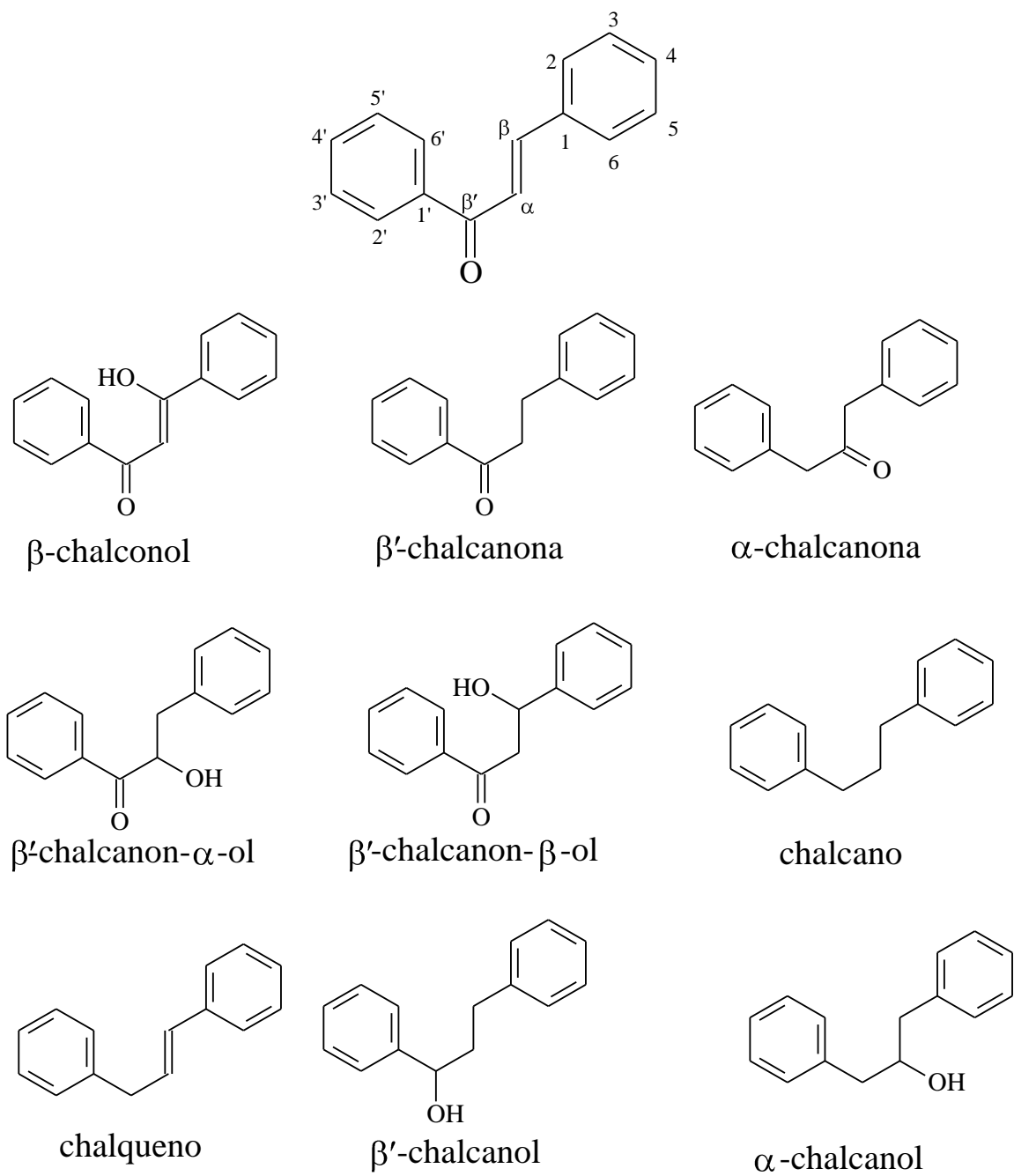


Figura 3: Grupos fundamentales de chalconas.

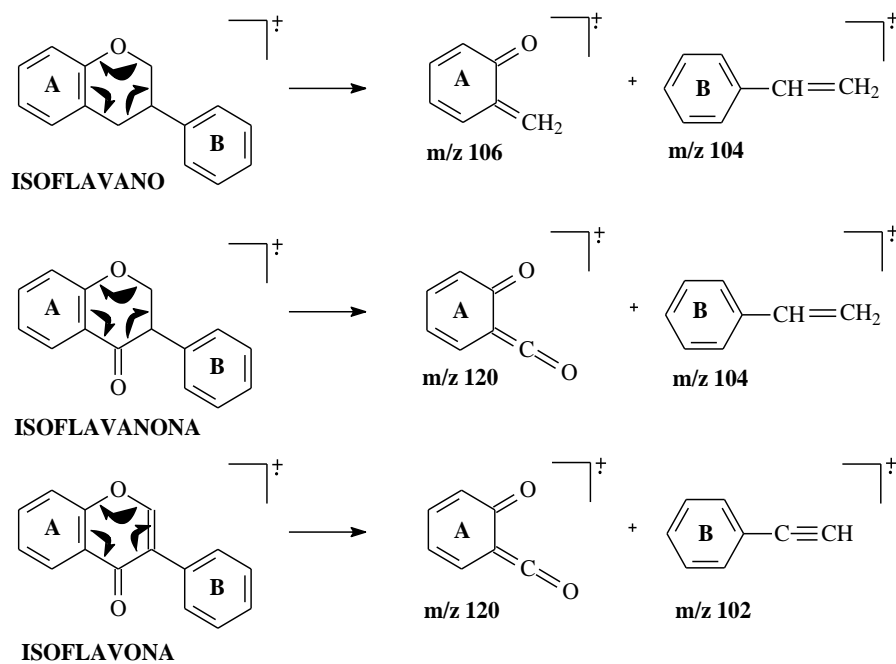


Figura 4. Fragmentación RDA para isoflavanos, isoflavanonas e isoflavonas.

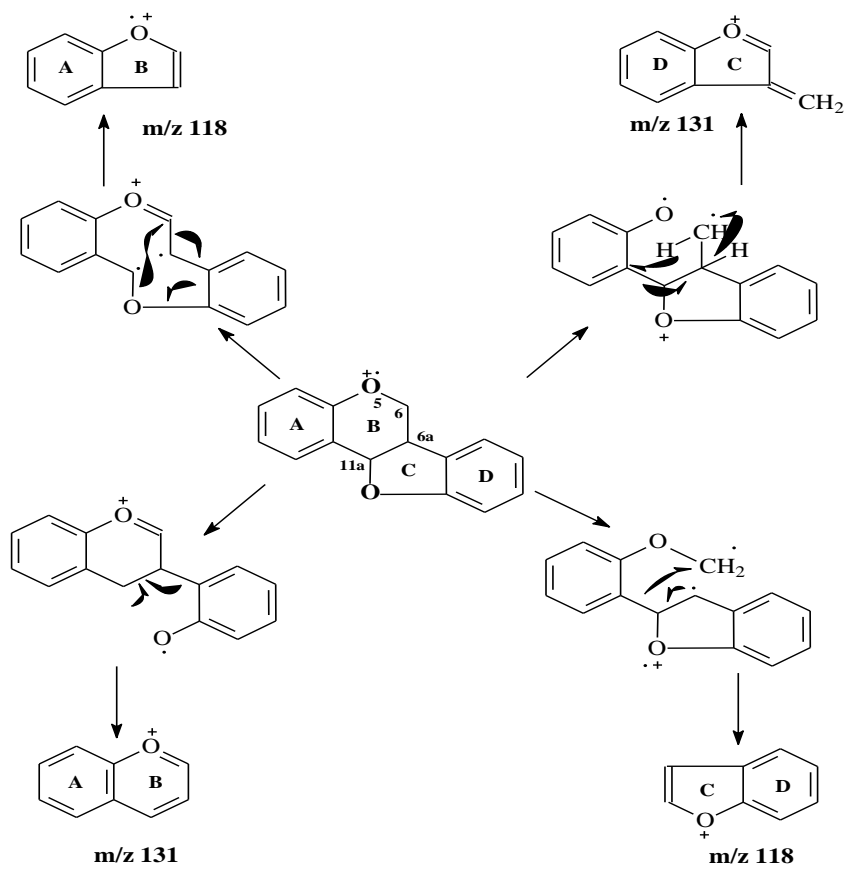


Figura 5. Fragmentos sugeridos para pterocarpanos.



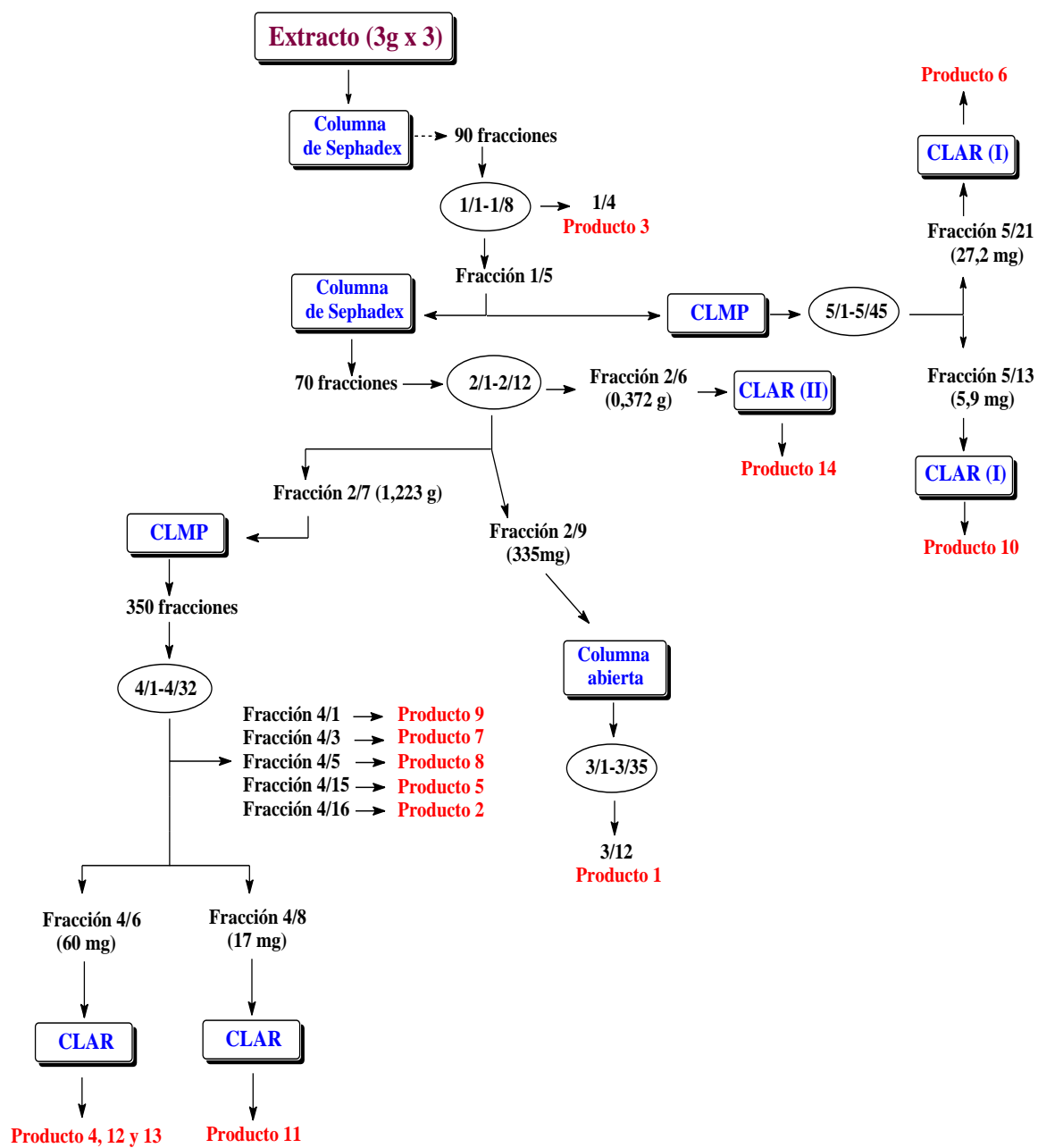
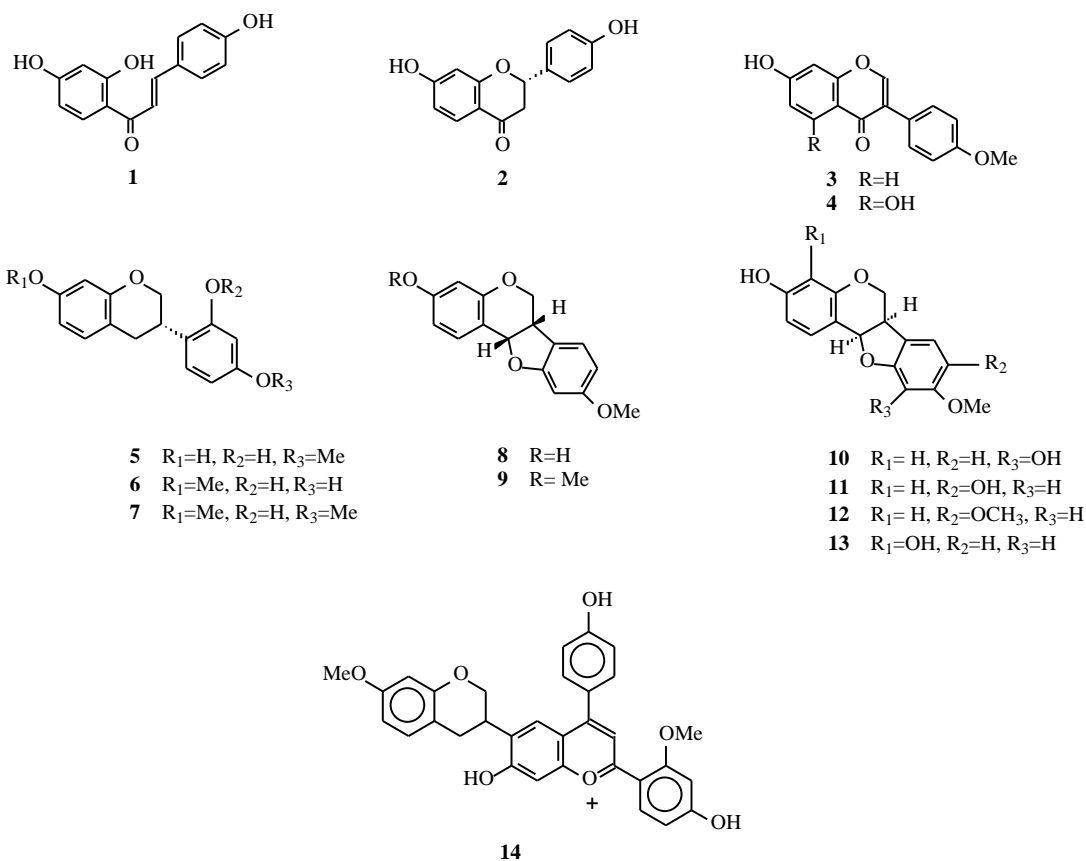


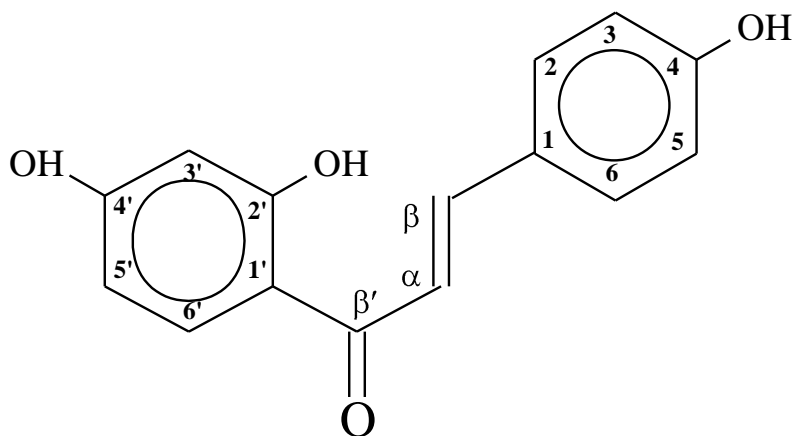
Figura 6: Esquema general de aislamiento y purificación de los productos (1-14).



N° del producto	Nombre común	Nomenclatura química
1	isoliquiritigenina	2',4,4'-trihidroxi chalcona
2	liquiritigenina	(-)-4',7-dihidroxi flavanona
3	formononetina	7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona
4	biocanina A	5,7-dihidroxi-4'-metoxi isoflavona
5	vestitol	(3S)-7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano
6	neovestitol	(3S)- 2',4'-dihidroxi-7-metoxi isoflavano
7	isosativan	(3S)-2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano
8	medicarpina	(6aS,11aS)-3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano
9	homopterocarpina	(6aS,11aS)-3,9-dimetoxi pterocarpano
10	vesticarpan	(6aR,11aR)- 3,10-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano
11		(6aR,11aR)- 3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano

<b>12</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )- 3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano
<b>13</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )- 3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano
<b>14</b>	retusapurpurina A

**Figura 7: Compuestos identificados por técnicas de RMN desde la muestra de propóleos rojos M-A.**



**Figura 13: Propuesta estructural de la isoliquiritigenina.**

**Tabla XI: Datos espectroscópicos de la isoliquiritigenina (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).**

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	Grupo	HMBC
<b>1</b>	127,8		C	
<b>2, 6</b>	131,8	7,59 (d, 8,1)	CH	C-1, C-4, C- $\beta$
<b>3, 5</b>	116,9	6,83 (d, 8,1)	CH	C-1, C-4
<b>4</b>	161,5		C	
<b>1'</b>	114,7		C	
<b>2'</b>	166,3		C	
<b>3'</b>	103,8	6,28 (d, 2,0)	CH	C-1', C-2', C-4', C-5'
<b>4'</b>	167,4		C	
<b>5'</b>	109,1	6,40 (dd, 2,0 y 8,6)	CH	C-1'
<b>6'</b>	133,3	7,93 (d, 8,6)	CH	C-2', C-4', C- $\beta'$
<b><math>\beta'</math></b>	194,3		C=O	
<b><math>\alpha</math></b>	118,3	7,57 (d, 15,3)	CH	C-1, C- $\beta$ , C- $\beta'$
<b><math>\beta</math></b>	145,6	7,76 (d,15,3)	CH	C-1, C-2, C- $\alpha$ , C- $\beta'$

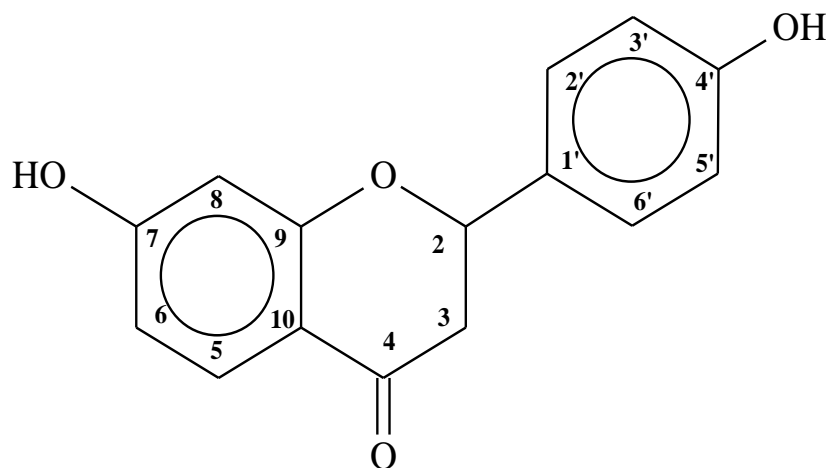
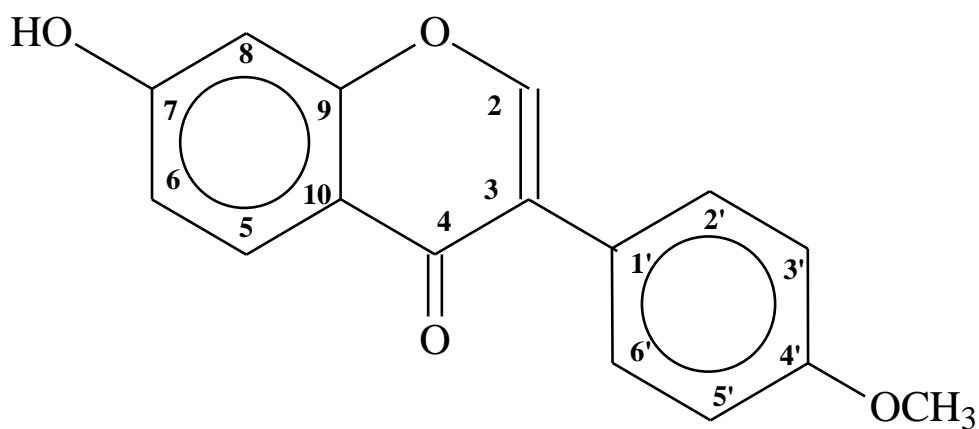


Figura 19: Propuesta estructural para la liquiritigenina.

Tabla XII: Datos espectroscópicos para la liquiritigenina (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).

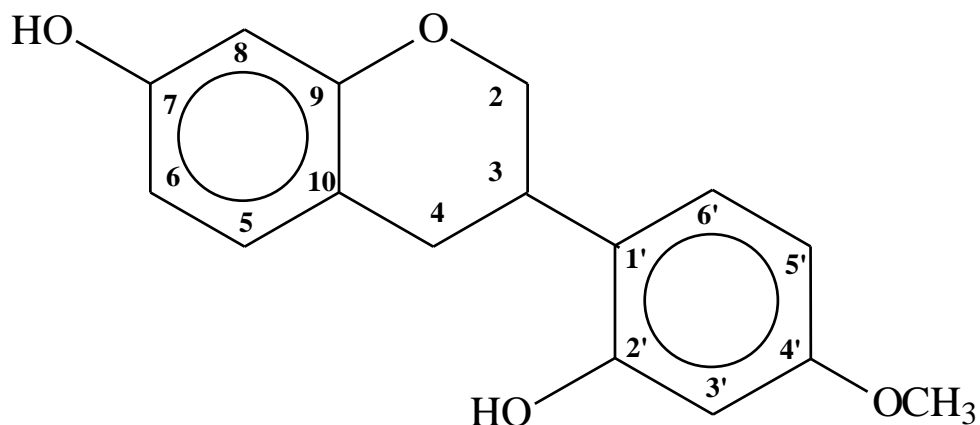
Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	Grupo	HMBC
2ax	80,7	5,36 (dd, 2,9 y 13,0)	CH	C-4; C-1'; C-2'
3ax	44,6	3,03 (dd, 13,0 y 16,9)	CH	C-2; C-4; C-1'
3ec		2,68 (dd, 2,9 y 16,9)		C-4; C-1'
4	193,2		C=O	
5	129,6	7,72 (d, 8,7)	CH	C-4; C-7
6	111,5	6,48 (dd, 2,1 y 8,7)	CH	C-7; C-8; C-10
7	166,5		C	
8	103,5	6,35 (d, 2,1)	CH	C-4; C-6; C-7; C-10
9	165,3		C	
10	114,7		C	
1'	131,1		C	
2', 6'	128,7	7,31 (d, 8,5)	CH	C-2; C-4'
3', 5'	116,0	6,81 (d, 8,5)	CH	C-1'; C-4'
4'	158,7		C	



**Figura 25:** Propuesta estructural para la formononetina.

**Tabla XIII:** Datos espectroscópicos de la formononetina (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	Grupo	HMBC
<b>2</b>	152,9	8,28 (s)	CH	C-3; C-4; C-9; C-1'; C-2'
<b>3</b>	123,0		C	
<b>4</b>	174,6		C=O	
<b>5</b>	127,1	7,96 (d, 8,7)	CH	C-4; C-7; C -9
<b>6</b>	115,1	6,92 (dd, 2,2 y 8,7)	CH	C-7; C-8; C-9; C-10
<b>7</b>	162,3		C	
<b>8</b>	101,9	6,86 (d, 2,2)	CH	C-4; C-6; C-7; C-9; C-10
<b>9</b>	157,2		C	
<b>10</b>	116,3		C	
<b>1'</b>	123,9		C	
<b>2', 6'</b>	129,9	7,47 (d, 8,7)	CH	C-3; C-3'; C-4'
<b>3', 5'</b>	113,4	6,97 (d, 8,7)	CH	C-1'; C-4'
<b>4'</b>	158,7		C	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	54,9	3,76 (s)	OCH <sub>3</sub>	C-4'



**Figura 32: Propuesta estructural para el vestitol.**

**Tabla XIV: Datos espectroscópicos del vestitol (CD<sub>3</sub>OD, 300).**

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	Grupo	HMBC
2ax	71,1	3,91 (t, 10,0)	CH <sub>2</sub>	C-4
2ec		4,20 (m)		C-4, C-9
3ax	33,1	3,42 (m)	CH	
4ax	31,3	2,90 (dd, 10,8 y 15,5)	CH <sub>2</sub>	C- 3, C-4, C-9, C-10, C-1'
4ec		2,75 (dd, 5,2 y 15,5)		C-3, C-10
5	128,8	6,83 (d, 9,0)	CH	C-9
6	109,0	6,30 (dd, 2,4 y 9,0)	CH	C-7
7	157,4		C	
8	103,8	6,22 (d, 2,4)	CH	C-9, C-10
9	156,4		C	
10	115,0		C	
1'	121,3		C	
2'	157,2		C	
3'	102,5	6,38 (d, 2,4)	CH	C-1', C-2', C-4', C-5'
4'	160,8		C	
5'	105,8	6,35 (dd, 2,4 y 9,0)	CH	C-4'
6'	131,2	6,92 (d, 9,0)	CH	
OCH <sub>3</sub>	55,6	3,69 (s)	OCH <sub>3</sub>	C-4'

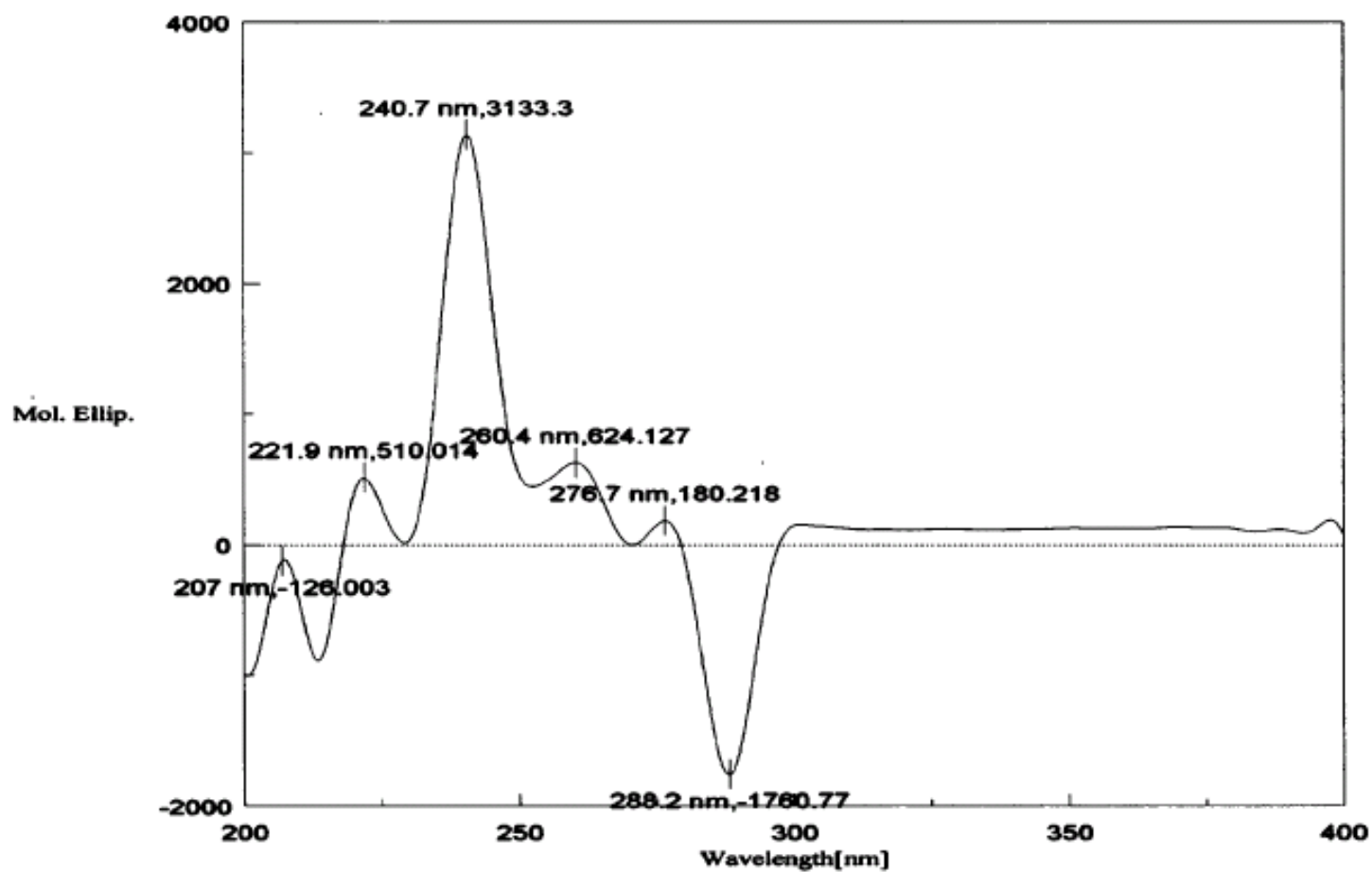


Figura 33: Espectro de dicroísmo circular del compuesto (3S)-isosativan.



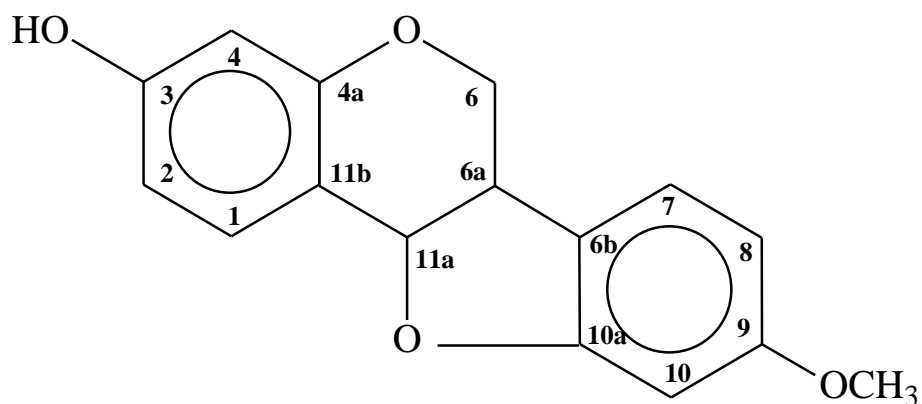


Figura 39: Propuesta estructural de la medicarpina.

Tabla XVI: Datos espectroscópicos de la medicarpina (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	Grupo	HMBC
1	132,9	7,33 (d, 8,4)	CH	C-3, C-4a
2	110,7	6,54 (dd, 2,4 y 8,4)	CH	C-11b
3	159,7		C	
4	104,1	6,36 (d, 2,4)	CH	C-2, C-3, C-4a, C11b
4a	157,7		C	
6ec	67,4	4,25 (m)	CH <sub>2</sub>	C-4a, C-6a, C-11a
6ax		3,57 (m)		C-6a, C-10a, C-11a
6a	40,6	3,55 (m)	CH	C-6, C-6b
6b	120,5		C	
7	125,7	7,21 (d, 8,1)	CH	C-9, C10a
8	107,2	6,49 (dd, 2,2 y 8,1)	CH	C-10, C-6b
9	162,2		C	
10	97,6	6,42 (d, 2,2)	CH	C-8, C-9, C-6b, C10a
10a	161,6		C	
11a	79,9	5,51(d, 6,2)	CH	C-1, C-6, C-6a, C-11b,
11b	112,5		C	
OCH3	56,0	3,78 (s)	OCH3	C-9

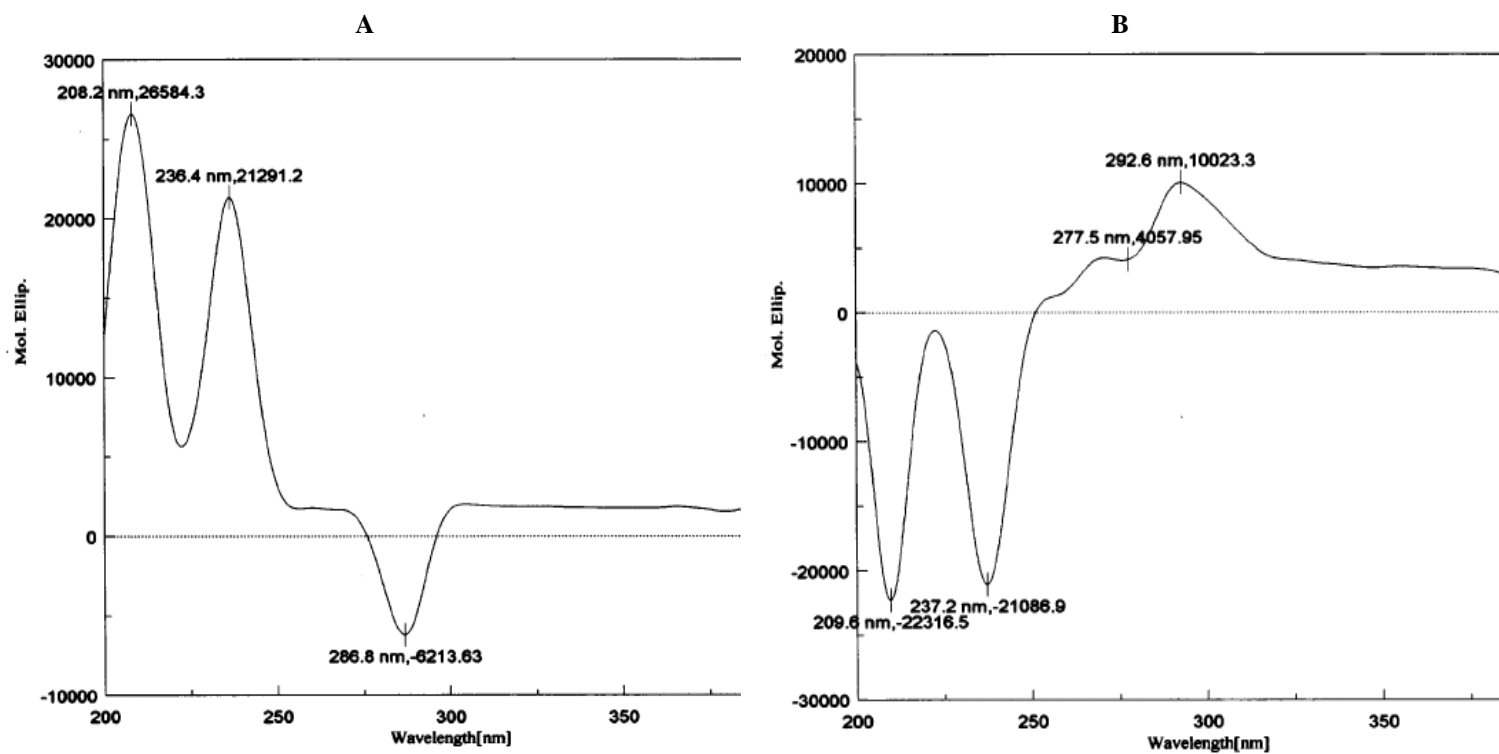
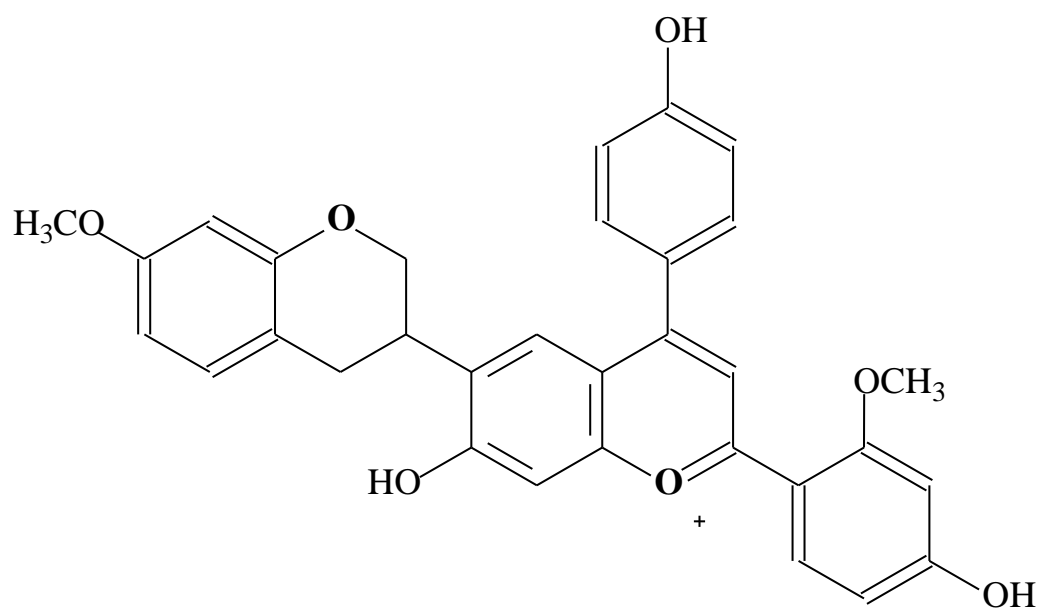


Figura 40: Espectros de dicroísmo circular de (6a*S*, 11a*S*)-homoptercarpina (A) y (6a*R*, 11a*R*)-3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano (B).



**Figura 46: Propuesta estructural de la retusapurpurina A.**

**Tabla XIX: Datos espectroscópicos de la retusapurina A.**

Posición	(Czakó y Márton, 2001)		Producto 14	
	Retusapurina A (DMSO-d <sub>6</sub> , 500)		Retusapurina A (CD <sub>3</sub> OD+ATA, 600 MHz)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)
<b>2</b>	68,4	4,25 (dd, 10,9 y 5,4)	69,2	4,37 (m)
		4,30 (dd, 10,9 y 2,8)		4,40 (m)
<b>3</b>	31,5	3,61 (m)	32,5	≈ 3,81
<b>4</b>	28,9	3,11 (dd, 16,2 y 5,7)	29,6	3,37
		2,87 (dd, 16,2 y 5,5)		2,91
<b>4a</b>	113,6		114,1	
<b>5</b>	130,9	6,98 (d, 8,5)	131,4	6,99 (d, 8,4)
<b>6</b>	107,9	6,48 (dd, 8,5 y 2,4)	108,8	6,55 (dd, 8,4 y 2,0)
<b>7</b>	159,3		160,8	
<b>8</b>	101,8	6,32 (d, 2,0)	102,6	6,37 (d, 2,0)
<b>8a</b>	155,2		156,5	
<b>2'</b>	166,8		168,3	
<b>3'</b>	115,6	8,20 (s)	116,7	8,36 (s)
<b>4'</b>	162,8		164,9 <sup>♦</sup>	
<b>4'a</b>	115,3		≈ 116,7	
<b>5'</b>	127,9	7,81 (s)	129,4	7,95 (s)
<b>6'</b>	133,9*		135,6	
<b>7'</b>	157,7		159,1*	
<b>8'</b>	103,1	7,73 (s)	103,2	7,48 (s)
<b>8'a</b>	165,5		166,4*	
<b>1''</b>	109,7		111,0	
<b>2''</b>	163,7		165,1 <sup>♦</sup>	
<b>3''</b>	100,6	6,74 (d, 2,0)	100,9	6,70 (d, 1,7)

<b>4"</b>	167,5		168,7	
<b>5"</b>	111,3	6,80 (dd, 9,0 y 2,0)	111,7	6,75 (dd, 9,0 y 1,7)
<b>6"</b>	133,8*	8,23 (d, 9,0)	134,2	8,29 (d, 9,0)
<b>1'''</b>	125,4		126,8	
<b>2'''6'''</b>	133,0	7,43 (d, 8,5)	133,4	7,39 (d, 8,4)
<b>3'''5'''</b>	117,3	7,00 (d, 8,5)	117,8	6,97 (d, 8,4)
<b>4'''</b>	162,4		163,4	
<b>OCH<sub>3</sub> (C-7)</b>	55,7	3,69 (S)	55,7	3,81 (s)
<b>OCH<sub>3</sub> (C-2'')</b>	57,2	3,97 (S)	56,9	4,07 (s)
	<b>* Intercambiables</b>		<b>*, ♦ Intercambiables</b>	

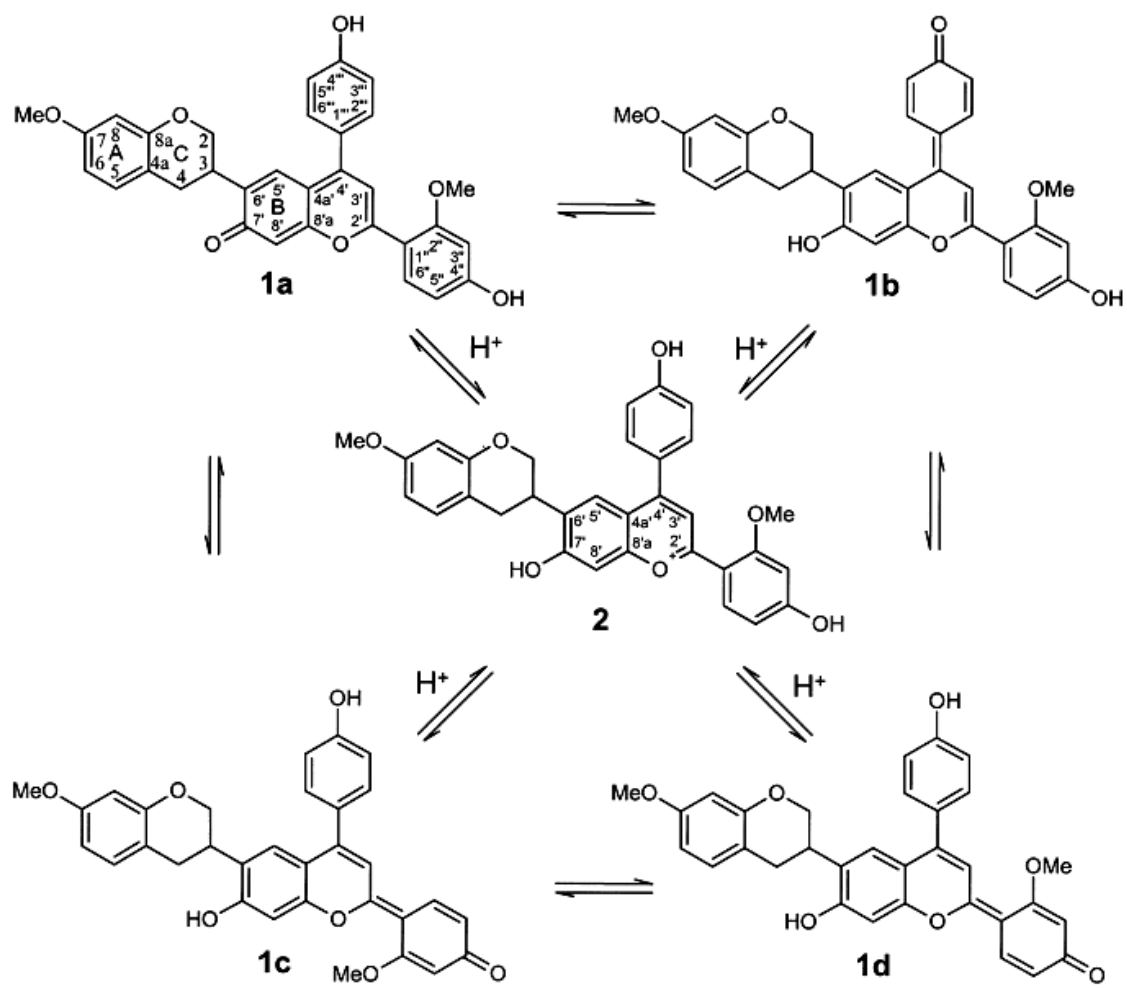


Figura 47: Cuatro formas tautoméricas de la returapurpurina A (1c-1d) y su forma protonada (2).

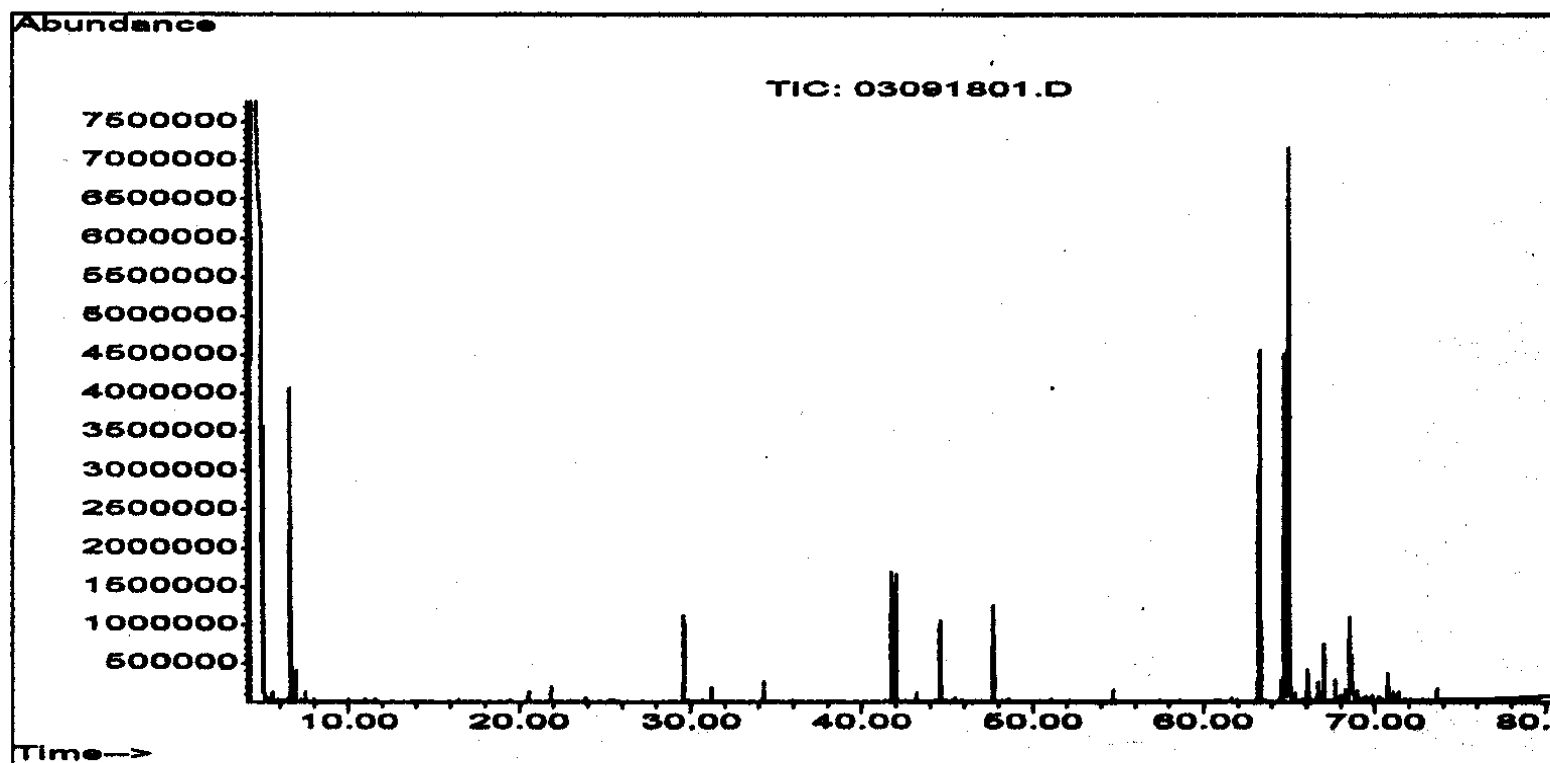
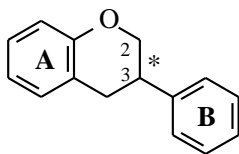


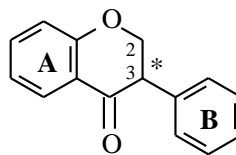
Figura 48: Cromatograma gaseoso de la muestra M-A.

Tabla XXII: Otros flavonoides inferidos del análisis del espectro de masas.

No.	TR	Por ciento (%)	Fragmentos iónicos (% abundancia relativa)
15	67,99	0,12	430 (17), 222 (100), 207 (32)
16	68,53	2,56	446 (39), 252 (100)
17	69,83	0,23	518 (5), 296 (40), 222 (100)
18	70,23	1,13	488 (17), 296 (100), 192 (28), 179 (38), 177 (19).
19	71,06	0,27	460 (27), 252 (100), 209 (4)



Productos	Anillo A	Anillo B
<b>16</b>	-OH	-OH, -OMe(2)



Productos	Anillo A	Anillo B
<b>15</b>	-OH	-OH, -OMe
<b>17</b>	-OH (2)	-OH, -OMe
<b>18</b>	-OH (2)	-OH
<b>19</b>	-OH	-OH, -OMe(2)

\* Podrían presentarse como 2-fenil o 3-fenil derivados.

Figura 49: Estructura de otros flavonoides sugeridos por CG-MS.



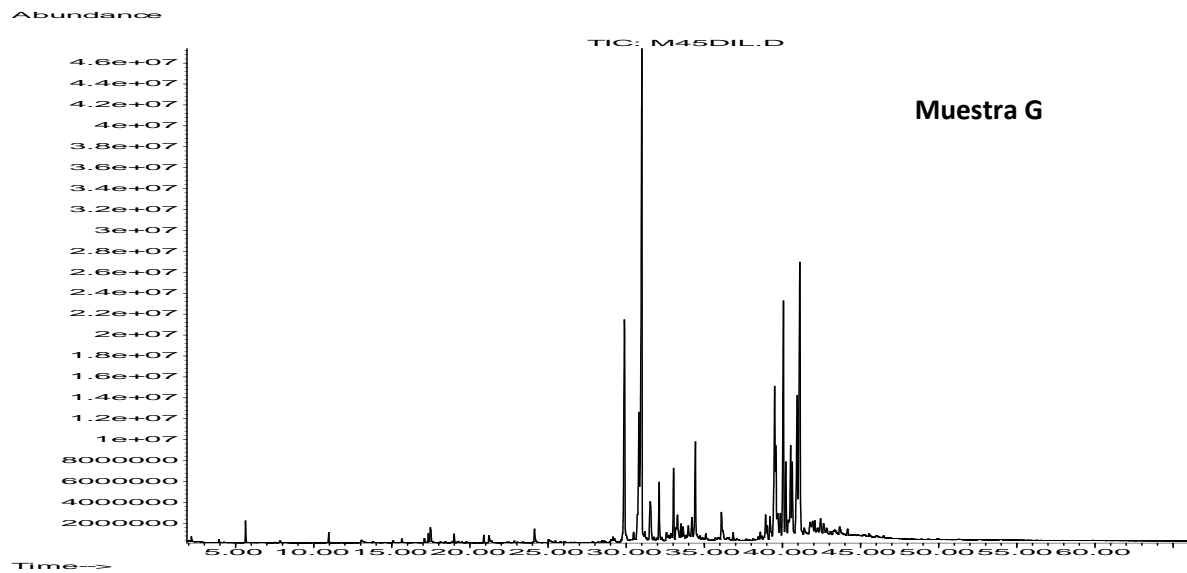
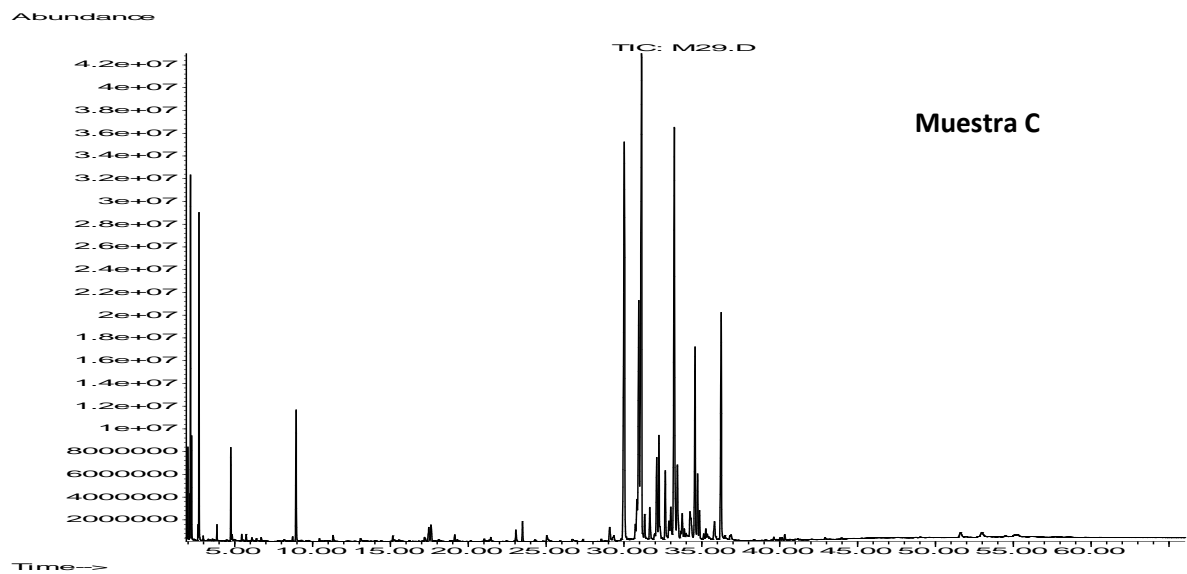


Figura 50: Cromatogramas gaseosos correspondientes a la muestra C y a la muestra G.

Abundance

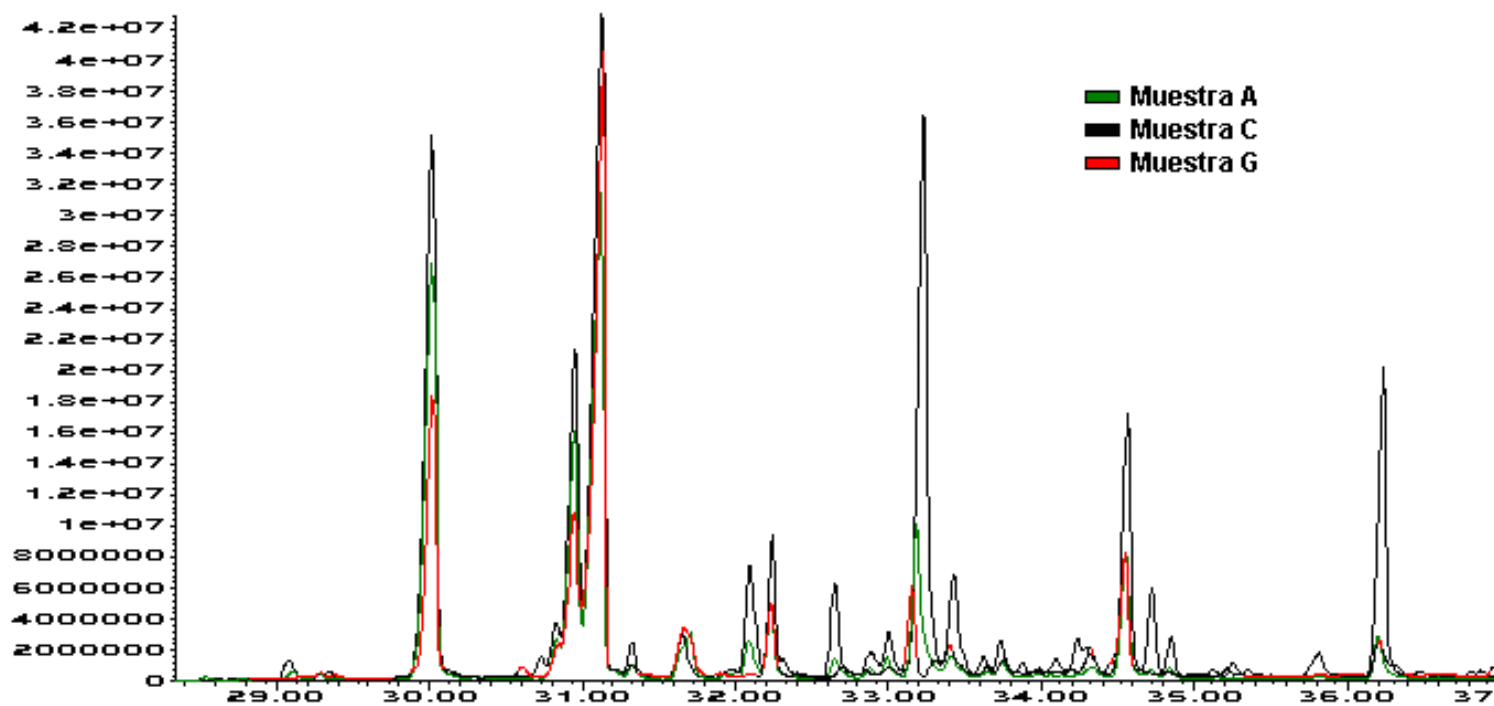


Figura 51: Superposición de la región del CG, de tres muestras de propóleos (A, C y G), donde eluyen los flavonoides.

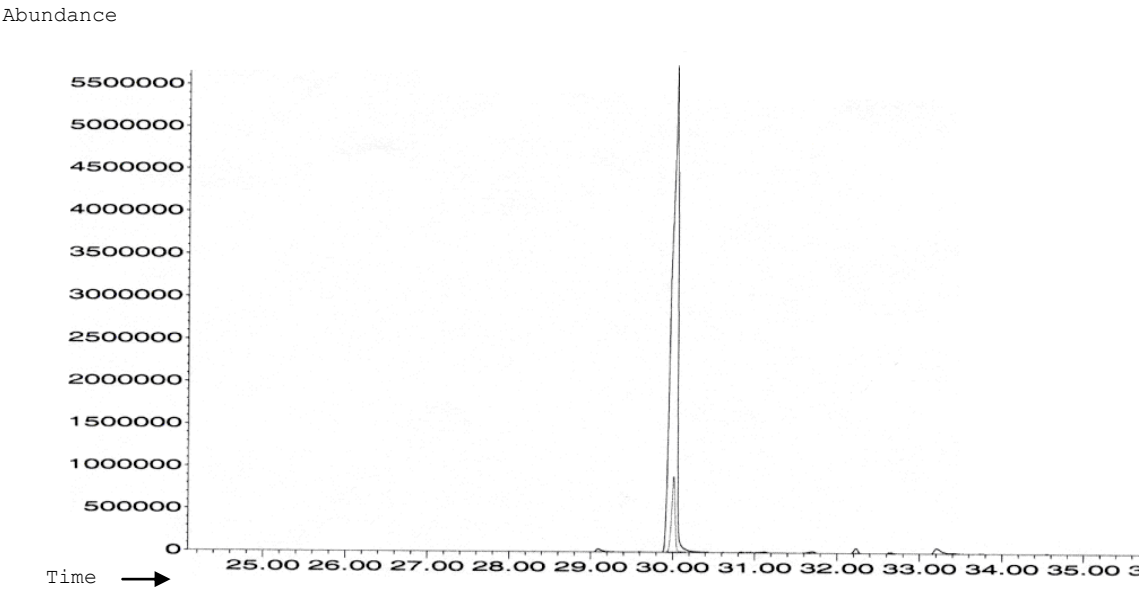


Figura 52: Cromatograma iónico de la muestra M-A.

Tabla XXIV: Por ciento (%) relativo de flavonoides minoritarios según CG-EM.

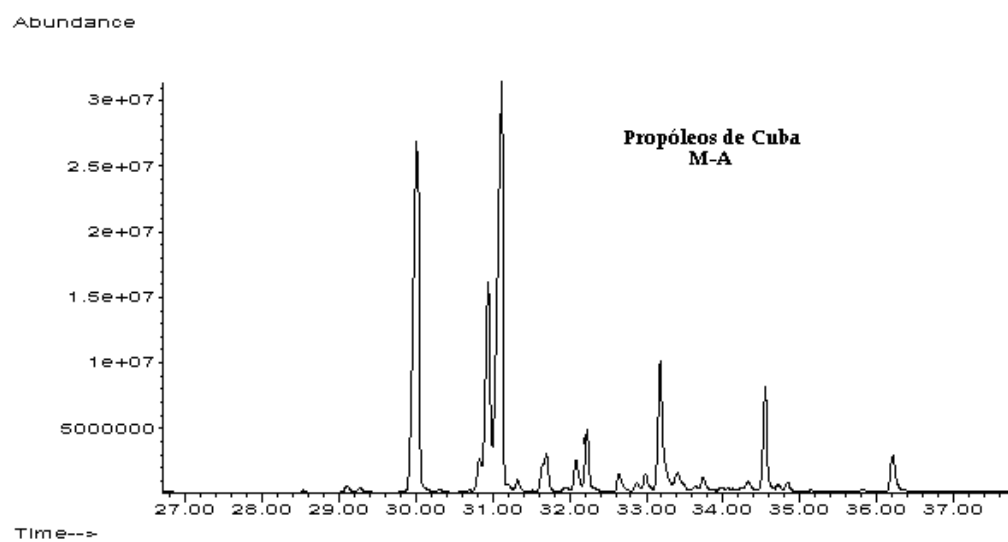
No.	TR (min.)	Por ciento (%) de cada componente						
		A	B	C	D	E	F	G
15	32,99	0,80	1,21	1,17	1,82	0,08	0,39	+
16	33,18	6,53	10,45	14,07	7,86	2,04	6,28	+
17	34,24	-	0,26	+	0,50	-	-	+
18	34,48	-	+	0,61	0,62	-	-	-
19	34,72	0,23	0,73	1,78	1,03	+	0,21	+

(-) no detectado; (+) detectado pero no cuantificado.



Figura 53: Tronco, resina y partes aéreas de la especie *Dalbergia ecastophyllum*, Leguminosae.

**A**



**B**

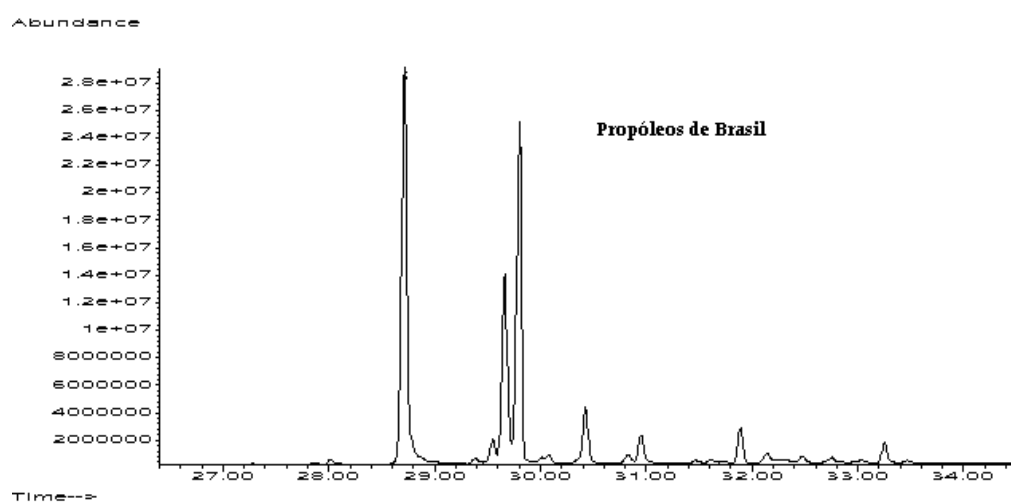


Figura 54: Cromatogramas de la zona donde eluyen los isoflavonoides. Propóleos de Cuba (A), propóleos de Brasil (B).

Tabla XXVI: Descripción del punteo realizado para las tres muestras de propóleos cubanos.

Tipo de propóleos	Nº del punteo	Muestra	Masa aplicada (µg)
I	4 y 5	M-1	20,00
II	1 y 2	M-B	34,20
III	7 y 8	M-30	20,20
Patrón	3 y 6	Nemorosona	4,00

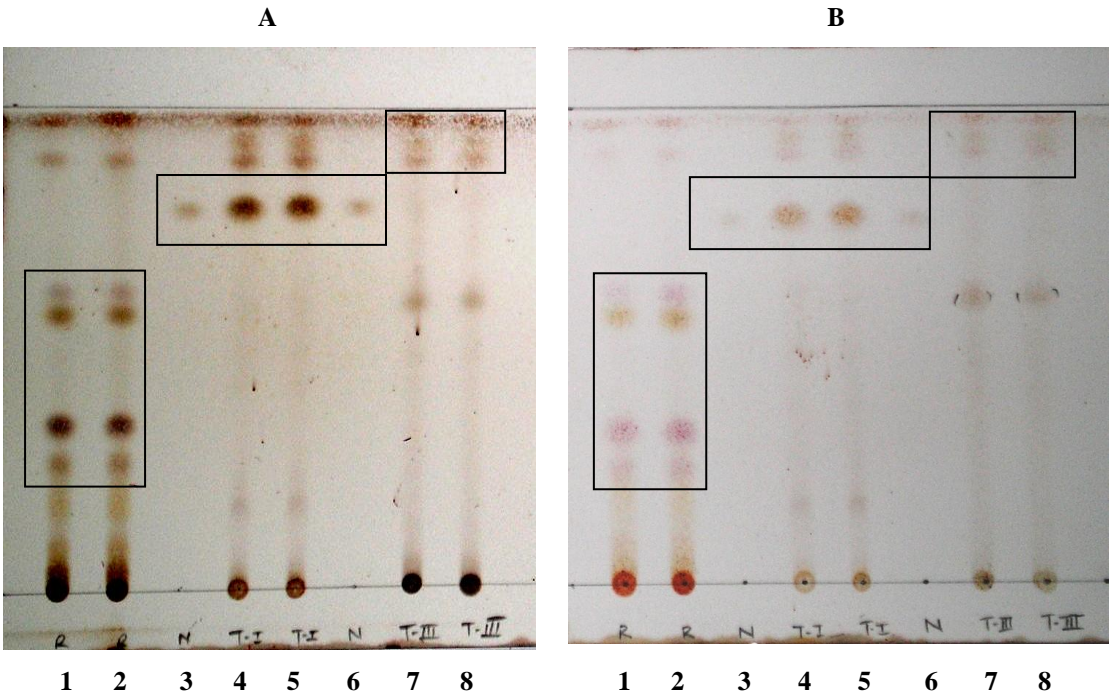
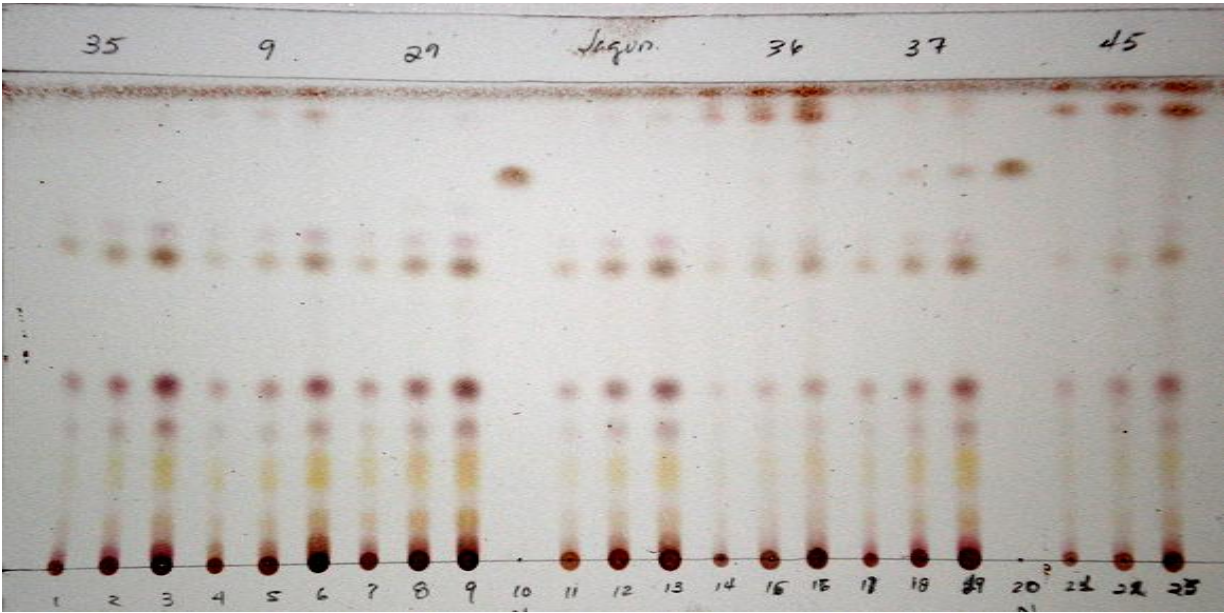


Figura 55: Cromatogramas correspondientes a los tres tipos de propóleos y el patrón nemorosona. A: revelado con  $Ce(SO_4)_2$ ; B: revelado con vainillina.

Tabla XXVII: Descripción del punteo realizado para las muestras de propóleos rojos.

Nº del punteo	Muestra	Volumen/masa (µg)			
		0,5 µL	1 µL	2 µL	3 µL
1-3	M-A	8,50	17,10	34,20	-
4-6	M-B	8,50	17,10	34,20	-
7-9	M-C	-	11,10	22,20	33,3
10	Nemorosona	-	-	4,00	-
11-13	M- D	-	6,70	13,40	20,10
14-16	M-E	8,65	17,30	34,60	-
17-19	M-F	8,65	17,30	34,60	-
20	Nemorosona	-	-	4,00	-
21-23	M-G	8,60	17,20	34,40	-



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

Figura 56: Cromatograma de las siete muestras de propóleos rojos.



**Los patrones punteados fueron los siguientes:**

Nº Producto	Patrones	Rfr
1	2',4,4'-trihidroxichalcona (isoliquiritigenina).	0,25
2	(-)-4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina).	0,20
3	7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona (formononetina).	0,34
5	(3S)-7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano (vestitol).	0,43
7	(3S)-2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano (isosativan).	0,81
8	(6aS,11aS)-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (medicarpina).	0,74
N	Nemorosona.	Referencia

**Figura 57: Cromatogramas de M-A y M-F junto a los siete patrones. A-Revelador  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{calor}$ , B- vainillina  $/\text{H}_2\text{SO}_4$  y calor.**



Tabla XXVIII: Actividad del propóleos rojo en el ensayo uterotrófico de ratas inmaduras.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Peso corporal (g)	Peso del útero húmedo (mg)	Peso del útero húmedo (mg)/peso promedio corporal(g)
Propóleos	50	66.00 ± 6.52	16.70 ± 5.61 a	0.25 ± 0.08 a
Propóleos	250	70.46 ± 4.53	20.96 ± 4.67 a	0.30 ± 0.08 a
Propóleos	500	70.72 ± 4.84	18.08 ± 3.30 a	0.26 ± 0.04 a
Etinil estradiol	1,5	64.44 ± 3.65	71.58 ± 12.90 b	1.12 ± 0.24 b
DMSO	-	74.24 ± 3.10	56.42 ± 9.04 c	0.76 ± 0.12 c

a,b,c: significación estadística (p<0.05). Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (DS) de los cinco úteros.

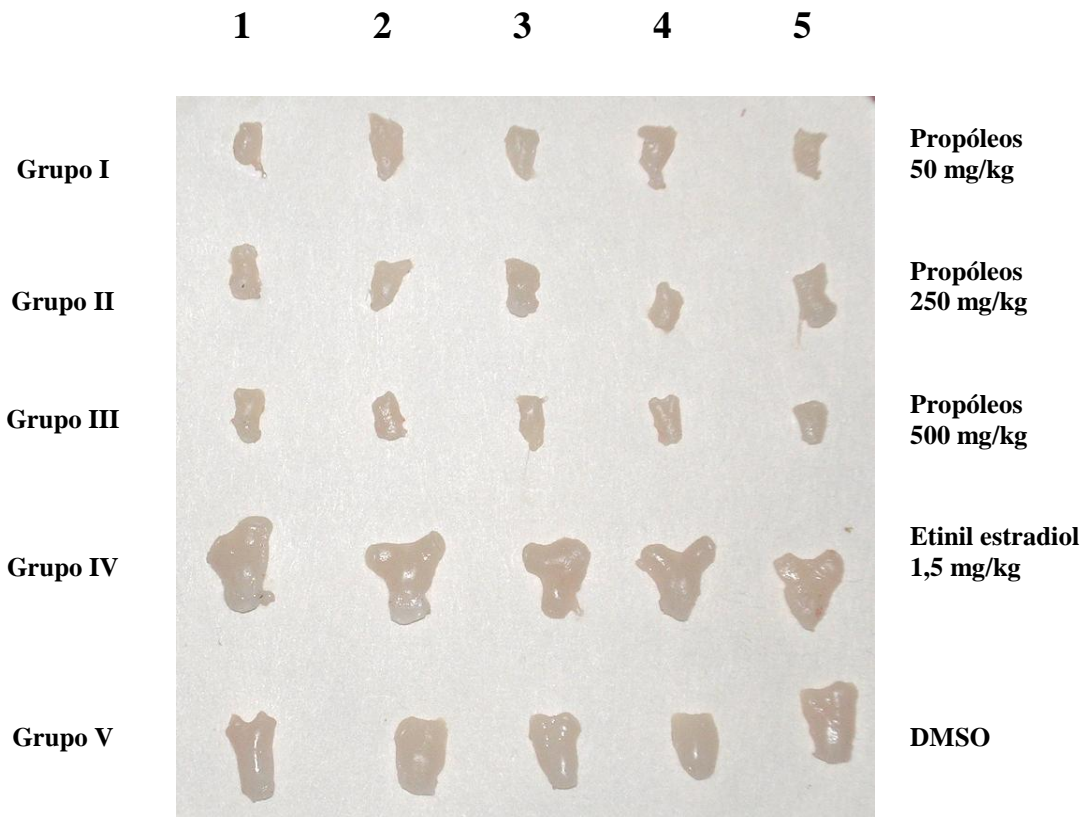


Figura 58: Úteros aislados de los animales correspondientes a los cinco grupos de tratamientos.

**Tabla I: Flavonoides aislados de propóleos.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
chrisina (5,7-dihidroxiflavona).	Schneidewind y col., 1975; Bankova y col., 1981; Ellnain-Wojtaszek y col., 1982; Suchy y col., 1985; Nagy y col., 1986; Papay y col., 1987; Wang y Zhang, 1988; Ruseva y Mateeva, 1990; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Tomás-Barberán y col., 1993; Itoh y col., 1994; Nikolovska-Coleska y col., 1995; Chi y col., 1996; Siess y col., 1996; Cengarle y col., 1998; Zhou y col., 1999; Jeong y col., 2000; Bankova y col., 2002; Blonska y col., 2004; Kumazawa y col., 2004; Sawaya y col., 2004; Shimizu y col., 2004; Volpi, 2004; Fu y col., 2005; Kazuma y col., 2005; Orsolic y col., 2005; Uzel y col., 2005; Weng y col., 2005.
galangina (3,5,7-trihidroxiflavona).	Villanueva y col., 1970; Schneidewind y col., 1975; Bankova y col., 1981; Tekelova y col., 1981; Pepeljnjak y col., 1985; Nagy y col., 1986; Papay y col., 1987; Wang y Zhang, 1988; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Bankova y col., 1992; Tomás-Barberán y col., 1993; Itoh y col., 1994; Johnson y col., 1994; Nikolovska-Coleska y col., 1995; Vennat y col., 1995; Chi y col., 1996; Siess y col., 1996; Cengarle y col., 1998; Zhou y col., 1999; Hegazi y col., 2000; Heo y col., 2001; Bankova y col., 2002; Kosalec y col., 2003; Blonska y col., 2004; Kumazawa y col., 2004; Volpi, 2004; Fu y col., 2005; Kazuma y col., 2005; Uzel y col., 2005.
naringina.	Fu y col., 2005.
4',5-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona kumatakenina	Nagy y col., 1989

**Tabla I: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
3,7,3'-trimetoxi-quercetina.	Martos y col., 1997; Fu y col., 2005; Jeong III-Yun, 2005; Orsolic y col., 2005; Sforcin y col., 2005; Uzel y col., 2005; Yasuhiro, 2005.
quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona).	Schneidewind y col., 1975; Bankova y col., 1981; Ellnain-Wojtaszek y col., 1982; Suchy y col., 1985; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Tomás-Barberán y col., 1993a; Nikolovska-Coleska y col., 1995; Chi y col., 1996; Zhou y col., 1999; Cao y col., 2002; Jeong y col., 2003; Blonska y col., 2004; Orsolic y col., 2004; Volpi, 2004; Fu y col., 2005; Jeong III-Yun, 2005; Orsolic y col., 2005; Sforcin y col., 2005; Uzel y col., 2005; Yasuhiro, 2005.
dihidrokaempferido.	Tazawa y col., 1998.
7-O-prenil-estropinina.	Melliou y Chinou, 2004.
kaempferol (3,4',5,7 -tetrahidroxiflavona).	Popravko y col., 1969; Suchy y col., 1981; Sokolov y Torgov, 1990; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Serra y Ventura, 1994; Serra y Ventura, 1994a; Chi y col., 1996; Park e Ikegaki, 1998; Jeong y col., 2003; Kosalec y col., 2003; Kumazawa y col., 2003; Kumazawa y col., 2004; Shimizu y col., 2004; Volpi, 2004; Fu y col., 2005.
naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona).	Nagy y col., 1986; Kosalec y col., 2003; Shimizu y col., 2004; Volpi, 2004; Fu y col., 2005; Orsolic y col., 2005; Uzel y col., 2005.
genkwanina.	Chi y col., 1996.
ermanina.	Sokolov y Torgov, 1990.
5-metoxi chrisina.	Nagy y col., 1989.
5,6,7-trihidroxi-3,4'-dimetoxi flavona.	Boudourova-Krasteva y col., 1997.

**Tabla I: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona).	Schneidewind y col., 1975; Bankova y col., 1981; Ellnain-Wojtaszek y col., 1982; Suchy y col., 1985;

	Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Tomás-Barberán y col., 1993, Nikolovska-Coleska y col., 1995; Chi y col., 1996; Zhou y col., 1999; Cao y col., 2002; Jeong y col., 2003; Kosalec y col., 2003; Volpi, 2004; Fu y col., 2005.
aromadendrina [dihidrokaempferol] (3,4',5,7-tetrahidroxiflavanona).	Tazawa y col., 1999; Nafady y col., 2003.
4-metoxi aromadendrina.	Banskota y col., 1998; Boudourova-Krasteva y col., 1997.
3,5,7 -trihidroxi-4'-metoxiflavanol.	Kosalec y col., 2003.
myricetina (3,3',4',5,5',7 hexahidroxiflavona).	- Meresta y col., 1985; Jeong y col., 2003; Volpi, 2004; Fu y col., 2005.
3,4',5',7-tetrametoxi myricetina.	Martos y col., 1997; Fu y col., 2005.
6-cinamilcrisina.	Usia y col., 2002.
rutina (3-O-rhamnoglucosil-3',4,5,7- tetrahidroxiflavona).	Nagy y col., 1988; Bankova y col., 1995.; Cao y col., 2002; Volpi, 2004; Fu y col., 2005.
3,5-dihidroxi-7-metoxiflavanona.	Bankova y col., 1983 y 1995.
hesperetina 3',5,7 -trihidroxi-4'- metoxiflavanona.	Nagy y col., 1986; Lu y col., 2004; Fu y col., 2005.
fisetina 3,3',4',7-tetrahidroxiflavona.	Cengarle y col., 1998.
5,7,4' -trihidroxi-6,8-dimetoxi flavona.	Bankova y col., 2000.

**Tabla I: Continuación.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
pinocembrina (5,7-dihidroxiflavanona).	Villanueva y col., 1970; Schneidewind y col., 1975; Metzner y col., 1979; Bankova y col., 1981; Suchy y col., 1981; Nagy y col., 1986; Papay y col., 1987; Ruseva y Mateeva, 1990; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Bankova y col., 1992; Kurkin y col., 1992; Tomás-Barberán y col., 1993a; Itoh y col., 1994; Serra y Ventura, 1994; Serra y col., 1994a;

	Markham y col., 1996; Siess y col., 1996; Park e Ikegaki, 1998; Quintana y col., 1999; Zhou y col., 1999; Hegazi y col., 2000; Bankova y col., 2002; Kumazawa y col., 2004a; Sawaya y col., 2004; Volpi, 2004; Uzel y col., 2005.
luteolina.	Cao y col., 2002; Volpi, 2004.
5- metoxi galangina.	Nagy y col., 1988.
5- metoxi pinobanksina.	Nagy y col., 1988; Bankova y col., 1995.
acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona).	Popravko y col., 1969; Suchy y col., 1981; Sokolov y Torgov, 1990a; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Serra y Ventura, 1994; Serra y col., 1994a; Chi y col., 1996; Park e Ikegaki, 1998.; Volpi, 2004.
epicatequina.	Jeong y col., 2003.
catequina.	Volpi, 2004.
5-metoxi pinobanskina.	Kumazawa y col., 2004.
genisteína.	Fu y col., 2005.
daidzeína.	Fu y col., 2005.
pinostropina.	Uzel y col., 2005.
5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona	Tomás-Barberán y col., 1993.
morina 2',3,4',5,7 -pentahidroxiflavona.	Cengarle y col., 1998; Fu y col., 2005.

**Tabla I: Continuación.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
pinobanskina (3,5,7 -trihidroxiflavanona).	Schneidewind y col., 1975; Bankova y Kuleva, 1989; Tomás-Barberán y col., 1993; Markham y col., 1996; Siess y col., 1996; Quintana y col., 1999; Marcucci y col., 2000; Bankova y col., 2002; Kumazawa y col., 2004.
isosakuranetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona).	Ghisalberti y col., 1977; Serra y Ventura, 1994; Park e Ikegaki, 1998; Shimizu y col., 2004.
3-O-acetato pinobanskina.	Bankova y col., 2002.
(-) pinostrobina (5-hidroxi-7-metoxiflavanona).	Popravko y col., 1969; Popravko, 1970; Schneidewind y col., 1975; Ghisalberti y col., 1977 y 1978; Suchy y col., 1981; Ellnain-Wojtaszek y col., 1982; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Kurkin y

	col., 1992; Zhou y col., 1999.
tectochrisina (5-hidroxi-7 metoxiflavona).	Schneidewind y col., 1975; Bankova y col., 1981; Ellnain-Wojtaszek y col., 1982; Suchy y col., 1985; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Tomás-Barberán y col., 1993; Nikolovska-Coleska y col., 1995; Chi y col., 1996; Zhou y col., 1999.
eupatorina.	Tomás-Barberán y col., 1993.
hispidulina.	Tomás-Barberán y col., 1993.
kaempferido (3, 5, 7-trihidroxi-4'-metoxiflavona).	Propavko y col., 1969; Propavko, 1970; Suchy y col., 1985; Sokolov y Torgov, 1990; Bankova y col., 1996; Cengarle y col., 1998; Park e Ikegaki, 1998.
4',7-dimetoxiflavona.	Popravko y col., 1969.
3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona.	Popravko y col., 1969.
5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona.	Popravko y col., 1969.
5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxiflavona.	Asis, 1989.
3,4',5',7 –tetrametoximyrictina.	Martos y col., 1997.

**Tabla I: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
rhamnocitrina (3, 4', 5-trihidroxi-7-metoxiflavona).	Popravko y col., 1969; Popravko, 1970; Schneidewind y col., 1975; Nagy y col., 1986.
3, 5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona.	Popravko y col., 1969; Popravko, 1970.
(-) 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona.	Popravko y col., 1969; Ghisalberti y col., 1977.
isalpinina (3, 5-dihidroxi-7-metoxiflavona).	Schneidewind y col., 1975; Tekelova y col., 1981; Nagy y col., 1986; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Chi y col., 1996; Zhou y col., 1999; Uzel y col., 2005.
5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona.	Schneidewind y col., 1975.
3, 3'-dimetoxiquercetina.	Schneidewind y col., 1975; Johnson y col., 1994.
5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona.	Ellnain-Wojtaszek y col., 1982.
pectolinarigenina (5, 7- dihidroxi-4', 6-dimetoxiflavanona).	Schneidewind y col., 1975; Nagy y col., 1986.

sakuranetina (4', 5-dihidroxi-7- metoxiflavanona).	Schneidewind y col., 1975; Ghisalberti y col., 1977 y 1978; Nagy y col., 1986; Park e Ikegaki, 1998.
3-acetilpinobanksina.	Schneidewind y col., 1975; Nagy y col., 1986; Bankova y Kuleva, 1989; Tomás-Barberán y col., 1993a; Markham y col., 1996.
3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanona.	Bankova y col., 1983 y 1995.
3- metoxikaempferol.	Johnson y col., 1994.
6-metoxikaempferol.	Tazawa y col., 1999.
isorhamnetina 3,4',5,7 -tetrahidroxi-3'- metoxiflavona.	Nagy y col., 1986; Serra y Ventura, 1994; Park e Ikegaki, 1998.

**Tabla I: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
ramnacina 3,4',5-trihidroxi-3',7-dimetoxiflavona.	Chi y col., 1996.
betuletol 3,5,7 -trihidroxi-4',6-dimetoxiflavona.	Asis, 1989; Banskota y col., 1998.
rhamnetina 3,3',4',5-tetrahidroxi-7-metoxiflavona.	Nagy y col., 1986; Chi y col., 1996.
alpinetina chalcona.	Ghisalberti y col., 1978; García-Viguera y col., 1992.
naringenina chalcona.	Ghisalberti y col., 1978
pinobanksina chalcona	Ghisalberti y col., 1978; Greenaway y col., 1987; García-Viguera y col., 1992.
pinobanksina-3-acetato chalcona	Ghisalberti y col., 1978; Greenaway y col., 1987
pinocembrina chalcona	Ghisalberti y col., 1978; Greenaway y col., 1987; García-Viguera y col., 1992.
pinostrobina chalcona	Ghisalberti y col., 1978; Greenaway y col., 1987; García-Viguera y col., 1992.
sakuranetina chalcona	Ghisalberti y col., 1978
2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	García-Viguera y col., 1992.
2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona	García-Viguera y col., 1992.
2',4'-dihidroxi-6-metoxidihidrochalcona	García-Viguera y col., 1993.
2', 4', 6'-trihidroxidihidrochalcona	Ghisalberti y col., 1978; García-Viguera y col., 1992.
2', 4', 6'-trihidroxichalcona	García-Viguera y col., 1992.
2',6', $\alpha$ -trihidroxi-4'-metoxichalcona	García-Viguera y col., 1992.
2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona	García-Viguera y col., 1992.
2', 4',6', $\alpha$ -tetrahidroxichalcona	García-Viguera y col., 1992.



**Tabla II: Ácidos orgánicos, fenilpropanoides y derivados aislados de propóleos.**

<b>ÁCIDOS AROMÁTICOS Y DERIVADOS.</b>	
ácido 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzóico.	Tazawa y col., 1999.
ácido ftálico.	Heinen y Linskens, 1971-1972; Maciejewicz y col., 2002.
ácido-2-amino-3-metoxibenzoico.	Mamontova y col., 1988.
ácido gálico.	Velikova y col., 2000; Jeong y col., 2003.
ácido benzóico.	Bankova y col., 1989; Chi y col., 1994; Maciejewicz y col., 2002.
<b>ÁCIDOS P-COUMARICOS PRENILADOS.</b>	
3-prenilcinamato de alilo.	Negri y col., 2003a.
artepillina C (ácido-3,5-diprenil-4-hidroxicinámico).	Aga y col., 1994; Boudourova-Krasteva y col., 1997; Matsuno y col., 1997a, Marcucci y col., 2000; Micallef y col., 2000; Tazawa, 2002; Nafady y col., 2003; Sawaya y col., 2004; Shimizu y col., 2004; Kazuma y col., 2005; Yasuhiro, 2005.
ácido 3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5-prenil-4-hidroxicinámico.	Nafady y col., 2003.
ácido -3-prenil-4-hidroxi-cinámico.	Marcucci y col., 2000; Sawaya y col., 2004.
ácido -6-propenoico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano.	Marcucci y col., 2000.
ácido 3-prenil-4-dihidro-cinamoiloxicinámico.	Aga y col., 1994; Banskota y col., 1998.

**Tabla II: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
ácido-3,4-dimetoxicinámico ((E)-ácido3-(3,4-dimetoxifenil)- propenóico).	Suchy y col., 1981; Papay y col., 1987; Bankova y col., 1989.
ácido 3-prenil-4-(2-metoxipropionil)- cinámico.	Tazawa y col., 1998.
ácido-(E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-hidroxi-1- metiletil)-prenil-benzofurano-5-yl]-2- propenóico.	Tazawa y col., 1998.
<b>ÁCIDOS GRASOS.</b>	
ácido linoléico.	Markham y col., 1996.
ácido oléico.	Markham y col., 1996.
ácido esteárico. C-18.	Markham y col., 1996.
ácido mirístico. C-14.	Heinen y Linskens, 1971-1972; Markham y col., 1996.
ácido pentadecanoico. C-15.	Heinen y Linskens, 1971-1972.
ácido palmítico. C-16.	Heinen y Linskens, 1971-1972; Markham y col. 1996.
ácido undecanoico. C-11.	Heinen y Linskens, 1971-1972.
<b>ACIDOS ALIFÁTICOS</b>	
ácido 4-hidroxi-butírico.	Maciejewicz y col., 2002.
ácido 3-hidroxi-butírico.	Maciejewicz y col., 2002.
ácido nicotínico.	Lu y col., 2004.
ácido láctico.	Hegazi y El Hady, 2001.

**Tabla II: Continuación.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
<b>OTROS ACIDOS</b>	
ácido 5-fenil- <i>trans,trans</i> -2,4-pentadienóico.	Markham y col., 1996.
ácido 5-fenil- <i>trans</i> -3-pentenóico.	Markham y col., 1996.
ácido fenil láctico.	Maciejewicz y col., 2002.
ácido (2E, 4E)-5-fenil-2,4-pentadienóico.	Nagy y col., 1988.
2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano.	Marcucci y col., 2000; Sawaya y col., 2004.
9-E-2-dimetil-6-carboxietinil-8- prenil- 2H-1-benzopirano.	Boudourova-Krasteva y col., 1997; Matsuno y col., 1997; Banskota y col., 1998.
<b>FENILPROPANOIDES Y DERIVADOS.</b>	
ácido dihidrocinámico.	Eda y col., 2005.
isoeugenol.	Wohrl y col., 2001.
anetol.	Bracho, 2000.
eugenol.	Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Wohrl y col., 2001.
fenetol.	Maciejewicz y col., 2002.
metileugenol.	Bracho, 2000.
aldehído coniferílico	Than y col., 2003.
coumaraldehído.	Sokolov y Torgov, 1990a.
trans-coniferilaldehído.	Sokolov y Torgov, 1989.
3-metoxi-4-hidroxicinamalaldehído.	Sawaya y col., 2004.
isovainillina y vainillina.	Popravko, 1970; Tekelova y col., 1981; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Serra y Ventura, 1994.
alcohol cinámico.	Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991.
p-hidroxi-dihidro-cinamato de metilo.	Than y col., 2003.

**Tabla II: Continuación.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
2-metil-2-butenilcaferulato.	Kumazawa y col., 2002.

cafeato de bencilo	Banskota y col., 2002; Usia y col., 2002.
cafeato de cinamilo	Banskota y col., 2002.
ácido p-cumárico (E)-ácido-3-(4-hidroxifenil)-propenoico).	Tikhonov y col., 1977; Bankova y col., 1989; Marcucci y col., 1998; Hegazi y col., 2000; Marcucci y col., 2000; Maciejewicz y col., 2002; Tazawa, 2002; Sawaya y col., 2004; Kazuma y col., 2005; Yasuhiro, 2005.
ácido (E)- 3-(2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-il)-2-propenóico.	Eda y col., 2005.
ácido (Z)- 3-(2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-il)-2-propenóico.	Eda y col., 2005.
cafeato de fenetilo.	Hegazi y col., 2000; Micallef y col., 2000; Chen y col., 2001; Ozyurt y col., 2001; Banskota y col., 2002; Song y col., 2002a-b; Usia y col., 2002; Borrelli y Capasso, 2003; Cardile y col., 2003; Kumazawa y col., 2003; Del Boccio y Rotilio, 2004; Hamasaka y col., 2004; Orsolic y col., 2004; Kazuma y col., 2005; Noelker y col., 2005; Ogeturk y col., 2005; Okutan y col., 2005; Shich y col., 2005; Yasuhiro, 2005.
3,3-dimetilalil-cafeato.	Kartal y col., 2003.
isopent-3-enil cafeato.	Kartal y col., 2003.
ferulato de bencilo.	Hegazi y col., 2000.
ácido isoferúlico (ácido-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-propenóico).	Bankova y Kuleva., 1989; Chi y col., 1994.

**Tabla II: Continuación.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
ácido neoclorogénico.	Mamontova y col., 1988.
ácido dihidrocafeico (ácido-3-fenil-propanóico).	Nikolovska-Coleska y col., 1995.
cafeato de dodecilo.	Christov y col., 1998.

cafeato de tetradecilo	Christov y col., 1998.
cafeato de hexadecilo.	Christov y col., 1998.
cafeato de tetradecenilo.	Christov y col., 1998.
3-fenilpropanol.	Bankova y col., 1995.
ácido 3,4 di-o-cafeoilquínico.	Tatefuji y col., 1996; Tazawa y col., 1998; Midorikawa y col., 2003.
ácido 3,5 di-o-cafeoilquínico.	Tatefuji y col., 1996; Tazawa y col., 1998; Midorikawa y col., 2003.
ácido clorogénico (ácido 3- cafeoilquínico).	Mamontova y col., 1988; Tatefuji y col., 1996; Tazawa y col., 1998; Jeong y col., 2003; Midorikawa y col., 2003.
ácido 4- cafeoilquínico.	Tatefuji y col., 1996; Tazawa y col., 1998.
ácido 5- cafeoilquínico.	Tatefuji y col., 1996; Tazawa y col., 1998.
ácido ferúlico ((E)-ácido-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propenoico).	Cizmarik y Matel, 1970; Tikhonov y col., 1977; Nagy y col., 1986; Mamontova y col., 1988; Bankova y col., 1989; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Bankova y col., 1992; Chi y col., 1994; Nikolovska-Coleska y col., 1995; Marcucci y col., 2000; Cao y col., 2002; Maciejewicz y col., 2002.
ácido metil éster 4,5-dicafeoilquínico.	Basnet y col., 1996.

**Tabla II: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
ácido 4,5-dicafeoilquínico.	Tatefuji y col., 1996; Tazawa y col., 1998.
metil éster del ácido 3,4-dicafeoilquínico.	Basnet y col., 1996.
ácido 4-feruilquínico.	Dos Santos Pereira y col., 2003.
ácido 5-feruilquínico.	Dos Santos Pereira y col., 2003.
ácido cinámico ((E)-ácido-3-fenilpropenoico).	Mamontova y col., 1988; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Markham y col., 1996; Maciejewicz y col., 2002; Cardile y col., 2003; Lu y col., 2004; Volpi, 2004; Yasuhiro, 2005.

<p>ácido cafeico</p> <p>((E)-ácido-3-(3,4-dihidroxifenil)-propenoico).</p>	<p>Cizmarik y Matel, 1970; Tikhonov y col., 1977; Nagy y col., 1986; Mamontova y col., 1988; Bankova y col., 1989; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Bankova y col., 1992; Chi y col., 1994; Nikolovska-Coleska y col., 1995; Marcucci y col., 2000; El-Badrawy y El-Fadaly, 2001; Cao y col., 2002; Maciejewicz y col., 2002; Cardile y col., 2003; Kartal y col., 2003; Kosalec y col., 2003; Hamasaka y col., 2004; Orsolic y col., 2004; Volpi, 2004; Orsolic y col., 2005; Sforcin y col., 2005; Shalinder y Kaftanoglu, 2005.</p>
<p>ácido cinámico</p> <p>((E)-ácido-3-fenilpropenoico).</p>	<p>Mamontova y col., 1988; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991; Markham y col., 1996; Maciejewicz y col., 2002; Cardile y col., 2003; Lu y col., 2004; Volpi, 2004; Yasuhiro, 2005.</p>

**Tabla III: Otros compuestos aislados de propóleos.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
<b>TERPENOS.</b>	
MONOTERPENOS. (Componentes volátiles)	
$\alpha$ -pinano.	Borcic y col., 1996.
$\beta$ -pinano.	Borcic y col., 1996.
$\gamma$ -terpinano.	Borcic y col., 1996.
geraniol.	Bankova y col., 1998.
propionato de linalilo.	Bankova y col., 1998.
SESQUITERPENOS. (Componentes volátiles)	
ledol.	Bankova y col., 1995.
spatulenol.	Bankova y col., 1998.
isospatulenol.	Bankova y col., 1998.
palustrol.	Bankova y col., 1998.
ledeno.	Bankova y col., 1998.
germacreno D.	Bankova y col., 1998.
DITERPÉNOS. (Componentes no volátiles)	
ácido <i>ent</i> -17-hidroxi-3,13-Z-clerodadien-15-oico.	Matsuno, 1995.
Ácido 15-oxo-3,13-Z-kolavadien-17-oico.	Matsuno y col., 1997a.
Ácido 15-oxo-3,13-E-kolavadien-17-oico.	Matsuno y col., 1997a.
ácido comunico.	Bankova y col., 1995.
ácido imbricatoloico.	Bankova y col., 1995.
ácido isocuprésico.	Bankova y col., 1995; Banskota y col., 1998.

ácido acetilisocuprésico.	Bankova y col., 1995; Banskota y col., 1998.
Ácido-8(17),13-E-labdadien-15,19-dioico.	Banskota y col., 1998.
lab-8(17),13-E-dieno-15-ol.	Trusheva y col., 2003.

**Tabla III: Continuación.**

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
ácido 8(17),13E-labdadien-15,19-dioico 15-metilester.	Banskota y col., 1998.
ácido 19-oxo-8(17),13E-labdadien-15-oico.	Banskota y col., 1998.
ácido 13-hidroxi-8(17),14-labdadien-19-oico.	Banskota y col., 1998.
clerodano.	Yasuhiro, 2005.
<b>TRITERPENOS.</b>	
Cicloartenol.	Christov y col., 1998; Marcucci y col., 1998.
$\alpha$ y $\beta$ -amirina.	Furukawa y col., 2002.
cicloartenol.	Furukawa y col., 2002.
escualeno.	Kholodova y col., 1981.
lupeol	Eda y col., 2005.
<b>ESTILBENOS.</b>	
resveratrol.	Volpi, 2004.
pterostilbeno.	Ghisalberti y col., 1978.
<b>ESTEROIDES.</b>	
lanosterol.	Kholodova y col., 1981.
colesterol.	Kholodova y col., 1981.
chalinasterol.	Maciejewicz y col., 1982.



fucosterol.	Maciejewicz y col., 1982.
$\beta$ -dihidrofucosterol.	Maciejewicz y col., 1982.
estigmasterol.	Maciejewicz y col., 1982.
<b>AZÚCARES Y POLIOLES.</b>	
glicerol.	Issao, 2005.
sorbosa.	Issao, 2005.
glucitol.	Issao, 2005.

**Tabla III: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
D-glucosa, D-ribofuranosa, talosa, D-fructosa, D-glucocitol, sacarosa.	Heinen y Linskens, 1971-1972; Issao, 2005.
xilosa.	Bankova y col., 1998.
galactosa.	Bankova y col., 1998.
manosa.	Bankova y col., 1998; Issao, 2005.
ácido glucurónico.	Bankova y col., 1998.
lactosa.	Bankova y col., 1998.
maltosa.	Bankova y col., 1998.
melibiosa.	Bankova y col., 1998.
eritritol.	Bankova y col., 1998.
xilitol.	Bankova y col., 1998.
inositol.	Bankova y col., 1998; Issao, 2005.
<b>VITAMINAS.</b>	

tocoferoles.	Moreira, 1986.
vitaminas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> .	Moreira, 1986.
<b>COUMARINAS.</b>	
esculetina y escopoletina.	Tikhonov y col., 1977; Mamontova y col., 1988; Kedzia y Holderna-Kedzia, 1991.
2-[1-metil]-vinil-5-acetilcumarina.	Banskota y col., 1998.
2-[1-hidroximetil]-vinil-6-acetil-5-hidroxycumarina.	Banskota y col., 1998.
2-[1-acetoximetil]-vinil-6-acetil-5-hidroxycumarina.	Banskota y col., 1998.
<b>LIGNANOS.</b>	
sesamina.	Christov y col., 1999; Cui y col., 2002.
yangambina.	Christov y col., 1999; Cui y col., 2002.
aschantina.	Christov y col., 1999.
sesartenina.	Christov y col., 1999.

**Tabla III: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)1,2-bis{4-[(E)-3-acetoxipropen-1-yl]-2-metoxifenoxi}-propan-3-ol acetato.	Valcic y col., 1998.
1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2{4-[(E)-3-acetoxipropen-1-yl]-2-metoxifenoxi}-propan-1,3-diol 3-acetato (eritro y treo).	Valcic y col., 1998.
3-acetoximetil-5-[(E)-2-formileten-1-il]-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano.	Bankova y col., 1996a; Banskota y col., 1998; Valcic y col., 1998.

<b>AMINOÁCIDOS.</b>	
isoleucina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
leucina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
cisteína.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
valina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
glutamina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
tirosina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
prolina.	Gabrys y col., 1986; Khodjakulov y Burhon, 2005.
metionina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
triptófano.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
asparagina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
fenilalanina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
oxiprolina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
serina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
treonina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
glicina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.

**Tabla III: Continuación.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>
alanina.	Khodjakulov y Burhon, 2005.
argilina.	Gabrys y col., 1986.
<b>OTROS.</b>	

imidazol.	Maciejewicz y col., 2002.
benzaldehído.	Serra y Ventura, 1994.
6-tridecil-tetrahidro-2H-piran-2-ona.	Negri y col., 2003.
1-bencilidano                      2,2,3,3-tetrametil- ciclopropano.	Negri y col., 2003.
2-terbutil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona.	Negri y col., 2003.
2,6-bis-pentaniloxi-4-pentanilfenetanol.	Hegazi y col., 2001.
1-(4-hidroxifenetil)butano-1,3-diona.	Than y col., 2003.
dihidro- $\alpha$ -lapachol.	Bracho, 2000.
n-eicosano.	Bracho, 2000.
xanthorrhoeol.	Ghisalberti y col., 1977 y 1978.
alcohol bencílico.	Borcic y col., 1996.
alcohol -3,5-dimetoxibencílico.	Ghisalberti y col., 1977.
$\alpha$ y $\beta$ amilasa.	Kaczmarek y Debowski, 1983.
$\beta$ -eudesmol.	Petri y col., 1988.
daphnetin.	Nagy y col., 1989.
galato de epigallocatequina.	Jeong y col., 2003.
galato de epicatequina.	Jeong y col., 2003.
3-nonadecilfenol.	Negri y col., 2003.
3-octadecilfenol.	Negri y col., 2003.
Aromadendrano-4S,10 <sup>a</sup> -diol	Eda y col., 2005.

Tabla IV: Composición química de los propóleos cubanos.

COMPUESTOS	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
<b>BENZOFENONAS POLIISOPRENILADAS.</b>	
propolonas A-D garcinielliptone. hyperibone B.	Cuesta y col., 1999; Márquez y col., 2005.
xanthochymol guttiiferone E. nemorosona.	Cuesta-Rubio, 2001; Cuesta-Rubio y col., 2002.
<b>ISOFLAVONOIDES</b>	
2'-hidroxi-4', 7-dimetoxi isoflavano. 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona. 2', 4, 7-trihidroxi-4'-metoxi isoflavano*	Cuesta-Rubio, 2001.

\* Este compuesto fue corregido en el estudio actual. Realmente es el 3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano (medicarpina).

Tabla V. Efecto Cotton (EC) de los *cis* pterocarpanos.

Cromóforo cromano	Cromóforo 2,3-dihidrobenczo [b] furan	EC <sup>1</sup> La (220-250 nm)	[α] <sub>D</sub>	Configuración absoluta
EC <sup>1</sup> Lb (260-310 nm)	EC <sup>1</sup> Lb (260-310 nm)			
Positivo	Negativo	Negativo	-	6a <i>R</i> y 11a <i>R</i>
Negativo	Positivo	Positivo	+	6a <i>S</i> y 11a <i>S</i>

Tabla VI. Efecto Cotton (EC) para isoflavanos.

EC de <sup>1</sup> Lb (260-320 nm)	EC de <sup>1</sup> La (220-250 nm)	Configuración absoluta.
Positivo	Negativo	3 <i>R</i>
Negativo	Positivo	3 <i>S</i>

**Tabla VIII: Mezcla de disolventes empleados en la CC abierta.**

<b>Fracciones</b>	<b>Disolvente</b>	<b>%</b>
1-103	CHCL <sub>3</sub>	100
104-136	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(98:2)
137-141	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(95:5)
142-154	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(90:10)
155-190	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(80:20)
191-205	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(70:30)
206-214	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(60:40)
215-222	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(50:50)
223-230	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(40:60)
231-244	CHCL <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(20:80)
245	CH <sub>3</sub> OH	100
246	CH <sub>3</sub> OH (HOAc 1%)	-

**Tabla IX: Mezcla de disolventes empleados en la CLMP, para el análisis de la fracción 2/7.**

<b>Fracciones</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Proporción</b>
1-73	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub>	(2:8)
74-101	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub>	(1:9)
102-177	CHCl <sub>3</sub>	100
178-235	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(98:2)
236-285	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(95:5)
286-317	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(90:10)
318-341	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(80:20)
342-349	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(60:40)
350	CH <sub>3</sub> OH	100

**Tabla X: Mezcla de disolventes empleados en la CLMP, para el análisis de la fracción 1/5.**

<b>Fracciones</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Proporción</b>
1-100	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub>	(20:80)
101-130	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> - CHCl <sub>3</sub>	(10:90)
131-218	CHCl <sub>3</sub>	100
219	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(98:2)
220-302	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(95:5)
203-369	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(90:10)
370-400	CHCl <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	(80:20)
401-460	CH <sub>3</sub> OH	100



**Tabla XV: Datos espectroscópicos de los productos 6 y 7.**

Posición	Neovestitol (6) (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz)		Isosativan (7) (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)
<b>2ax</b>	71,3	3,98 (t, 10,0 )	69,9	4,06 (t, 10,0 )
<b>2ec</b>		4,26 (m)		4,35 (m)
<b>3ax</b>	33,1	3,49 (m)	31,7	3,52 (m)
<b>4ax</b>	31,4	3,00 (dd, 10,5 y 15,1)	30,2	3,02 (dd, 10,3 y 15,7)
<b>4ec</b>		2,82 (dd, 5,5 y 15,1)		2,91 (dd, 5,4 y 15,7)
<b>5</b>	131,2	6,98 (d, 8,8)	130,1	$\approx$ 7,01 (t, 8,6 y 8,6)
<b>6</b>	107,8	6,45 (dd, 2,2 y 8,8)	107,2	$\approx$ 6,49 (m)
<b>7</b>	160,4		159,3	
<b>8</b>	102,3	6,37 (d, 2,2)	101,4	6,44 (d, 2,5)
<b>9</b>	156,5		155,0	
<b>10</b>	116,1		114,4	
<b>1'</b>	120,0		119,9	
<b>2'</b>	158,0		154,2	5,11 (s)
<b>3'</b>	103,6	6,34 (d, 2,4)	102,1	6,36 (d, 2,4)
<b>4'</b>	157,3		159,0	
<b>5'</b>	107,6	6,28 (dd, 2,4 y 9,0)	105,9	$\approx$ 6,49 (m)
<b>6'</b>	128,8	6,90 (d, 9,0)	128,1	$\approx$ 7,01 (t, 8,6 y 8,6)
<b>OCH<sub>3</sub> (C-4')</b>			55,3*	3,78
<b>OCH<sub>3</sub> (C-7)</b>	55,6	3,76	55,3*	3,77

\* Posiciones intercambiables.

**Tabla XVII: Datos espectroscópicos de los productos del 9-13.**

Posición	Homoptercarpina (9)		Vesticarpan (10)		3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (11)		3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano (12)		3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (13)	
	(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz)		(CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz)		(CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz)		(CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz)		(CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( $J_{\text{H-H}}$ en Hz)
<b>1</b>	133,0	7,44 (d, 8,5)	133,1	7,37 (d, 9,8)	131,0	7,30 (d, 8,4)	132,1	7,38 (d, 8,0)	122,1	6,86 (d, 8,3)
<b>2</b>	109,8	6,69 (dd, 2,5 y 8,5)	110,4	6,51 (m)	108,6	6,50 (m)	109,5	6,55 (d, 8,0)	110,4	6,56 (d, 8,3)
<b>3</b>	162,4*		160,0		157,9		159,7		147,1	
<b>4</b>	102,4	6,51 (d, 2,5)	103,8	6,33 (s)	102,1	6,33 (d, 2,3)	103,6	6,42 (s)	134,3	
<b>4a</b>	159,0		157,6		155,9		156,8		145,8	
<b>6ec</b>	67,6	4,30 (m)	67,3	4,25 (dd, 4,0 y 10,9)	65,4	4,23 (dd, 4,1 y 10,2)	66,5	4,26 (dd 5,0 y 11,0)	67,9	4,32 (dd, 4,1 y 10,1)
<b>6ax</b>		3,63 (m)		3,57 (t, 10,9)		3,56 (t, 10,2)		3,66 (t, 11,0)		3,58 (t, 10,1)
<b>6a</b>	40,8	3,62 (m)	41,3	3,54 (m)	39,5	3,50 (m)	40,4	3,53 (m)	40,9	3,52 (m)
<b>6b</b>	120,7		122,3		117,4		116,8		120,7	
<b>7</b>	125,9	7,24 (d, 8,1)	115,3	6,76 (d, 9,8)	111,0	6,80 (s)	108,7	6,82 (s)	125,9	7,17 (d, 8,1)
<b>8</b>	107,2	6,52 (dd, 2,9 y 8,1)	105,6	6,53 (d, 9,8)	139,0		143,8		107,2	6,45 (d, 8,1)
<b>9</b>	162,6*		150,0		147,0		150,0		162,5*	
<b>10</b>	97,6	6,44 (d, 2,9)	132,0		94,2	6,50 (s)	95,6	6,51	97,5	6,39 (s)
<b>10a</b>	162,0		147,8		152,0		153,7		162,0*	
<b>11a</b>	79,8	5,56 (d, 6,3)	80,1	5,50 (d, 6,5)	77,4	5,43 (d, 6,5)	78,1	5,47 (6,9)	80,2	5,50 (d, 6,5)
<b>11b</b>	113,9		113,0		110,4		112,8		113,7	
<b>OCH3</b>	55,7 (C9)	3,77 (s)	56,6 (C9)	3,84 (s)	54,5 (C9)	3,83 (s)	56,9 (C8)	3,85	55,9 (C9)	3,74 (s)

<b>OCH<sub>3</sub></b>	55,9 (C3)	3,79 (s)					56,0 (C9)	3,83		
------------------------	--------------	----------	--	--	--	--	--------------	------	--	--

\*: Posiciones intercambiables para una misma columna.

Tabla XVIII: Pterocarpanos aislados de la muestra M-A. Elipticidad molecular ( $[\Phi]$ ) y rotación óptica ( $[\alpha]_D$ ).

No	Compuestos	$[\Phi]$	$[\alpha]_D$ (CH <sub>3</sub> OH)
<b>8</b>	(6a <i>S</i> ,11a <i>S</i> )-3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano (medicarpina)	$[\Phi]_{236}$ 48,6 $[\Phi]_{287}$ -18,8	173,0 (c 1,25)
<b>9</b>	(6a <i>S</i> ,11a <i>S</i> )-3,9-dimetoxi pterocarpano (homopterocarpina)	$[\Phi]_{236}$ 21291,2 $[\Phi]_{287}$ -6213,63	54,5 (c 0,18)
<b>10</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )- 3,10-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (vesticarpan)	$[\Phi]_{236}$ -571,9 $[\Phi]_{282}$ 806,1	-29,6 (c 0,03)
<b>11</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )-3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano	$[\Phi]_{236}$ -12472,4 $[\Phi]_{294}$ 3954,9	-266 (c 0,10)
<b>12</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )-3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano	$[\Phi]_{237}$ -21086,9 $[\Phi]_{292}$ 10023,3	-67,9 (c 1,25)
<b>13</b>	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i> )-3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano	$[\Phi]_{235}$ -10437,8 $[\Phi]_{285}$ 4934,1	-105,7 (c 1,25)

**Tabla XX: Metabolitos identificados por CG-EM (Picos del 1-33).**

No Pico	TR (min.)	Por ciento (%)	Compuestos
1	10,96	0,05	Ácido propanoico, 2-[(trimetilsilil)oxy],-trimetilsililester
2	11,54	0,10	Ácido glicólico
5	20,38	0,05	Ácido fosfórico
6	20,55	0,31	Glicerol
7	21,86	0,44	Ácido butadienónico
8	22,98	0,04	Ácido propanónico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxy],-trimetilsililester
9	23,87	0,15	Benzaldehído, 4-[(trimetilsilil)oxy]
10	25,25	0,09	Metileugenol
11	25,43	0,08	Hidroquinona
12	29,01	0,05	Isohomogenol
13	29,60	2,50	Ácido málico
15	30,70	0,05	Eritritol
21	41,36	0,05	Gulosa
22	41,78	4,33	D-fructosa
23	42,03	4,28	Sorbopiranososa
25	43,19	0,34	$\beta$ -D-Galactofuranosa
26	44,59	2,68	Manosa
29	47,70	3,08	Glucosa
30	48,18	0,05	Ácido-D-glucónico
31	48,31	0,03	Ácido hexadecanónico
33	49,13	0,03	Ácido $\alpha$ -D-Glucopiranurónico

**Tabla XXI: Metabolitos identificados por CG-EM (Picos del 41-64).**

<b>N° Pico</b>	<b>TR (min.)</b>	<b>Por ciento (%)</b>	<b>Compuesto (No)</b>	<b>m/z (intensidad relativa)</b>
41	60,92	0,06	homopterocarpina ( <b>9</b> )	284 (100), 283 (39), 269 (35), 148 (22), 161 (24)
44	63,23	7,32	isosativan ( <b>7</b> )	358 (61), 222 (100), 209 (83), 207 (60)
45	63,33	12,99	medicarpina ( <b>8</b> )	342 (100), 341 (38), 327 (31), 219 (5), 161 (9), 148 (11)
47	64,74	15,94	neovestitol ( <b>6</b> )	416 (43), 280 (100), 267 (98), 265 (45).
48	65,02	29,19	vestitol ( <b>5</b> )	416 (44), 222 (100), 209 (50), 207 (47)
51	66,68	0,72	liquiritigenina ( <b>2</b> )	400 (69), 399 (46), 192 (85), 179 (100), 177 (50)
52	67,02	2,02	3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano ( <b>13</b> )	430 (100), 415 (22), 161(15), 148 (5)
53	67,68	0,71	3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano ( <b>12</b> )	373 (24), 372 (100), 357 (20)
57	68,67	1,16	formononetina ( <b>3</b> )	340 (100), 325 (31), 208 (8), 132 (17).
58	68,94	0,37	vesticarpan ( <b>10</b> ) ; 3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano ( <b>11</b> )	430 (100), 219 (12), 249 (8)
64	70,74	1,28	isoliquiritigenina ( <b>1</b> )	472 (13), 458 (42), 457 (100), 307 (10)

**Tabla XXIII: Principales flavonoides identificados desde siete muestras de propóleos rojos cubanos.**

No	TR	Compuestos	Muestras de propóleos (% de cada componente)						
			A	B	C	D	E	F	G
9	28,64	Homopterocarpina	+	+	+	+	+	+	+
8	30,02	Medicarpina	23,55	20,68	16,30	21,16	12,22	17,55	9,30
7		Isosativan							
6	30,95	Neovestitol	10,83	10,30	8,13	9,28	2,58	3,86	5,77
5	31,12	Vestitol	24,57	24,29	19,16	27,02	10,11	15,16	22,21
2	32,08	Liquiritigenina	1,60	3,25	2,85	1,67	0,97	2,26	2,59
13	32,23	3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	2,69	2,16	2,61	1,95	1,50	2,64	+
12	32,65	3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano	1,00	1,03	1,90	1,07	0,48	0,93	1,96
3	33,18	Formononetina	+	+	+	+	+	+	+
11	33,40	3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	0,37	1,52	2,47	-	+	1,88	+
10		Vesticarpan							
1	34,55	Isoliquiritigenina	4,49	5,82	5,49	5,86	1,55	4,51	2,98

**(-) no detectado; (+) detectado pero no cuantificado.**

**Tabla XXV: Comparación cualitativa y cuantitativa entre el propóleos rojo cubano y el brasileño.**

<b>Compuesto (N°)</b>	<b>Cuba Por ciento relativo (%)</b>	<b>Brasil Por ciento relativo (%)</b>
isoliquiritigenina (1)	4,49	1,93
liquiritigenina (2)	1,60	0,72
formononetina (3)	+	+
vestitol (5)	24,57	28,41
neovestitol (6)	10,83	17,63
isosativan (7)	23,55	37,05
medicarpina (8)		
homopterocarpina (9)	+	-
vesticarpan (10)	0,37*	0,88*
3,8-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (11)		
3-hidroxi-8,9-dimetoxi pterocarpano (12)	1,00	-
3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (13)	2,69	2,15
Producto 15	0,80	-
Producto 16	6,53	2,88
Producto 19	0,23	-

\* La cuantificación incluye a la formononetina.