



## Análisis Cualitativo de Propóleos Cubanos por Cromatografía en Capa Delgada

Mercedes CAMPO FERNÁNDEZ <sup>1\*</sup>, Osmany CUESTA RUBIO <sup>1\*</sup>,  
Ingrid MÁRQUEZ HERNÁNDEZ <sup>1</sup>, Arístides ROSADO PÉREZ <sup>2</sup> y Rodny Montes de Oca PORTO <sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Universidad de La Habana.  
Ave. 23 No. 21425 el 214 y 222. La Coronela, Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Estación Experimental Apícola (EEA). Ministerio de la Agricultura (MINAGRI),  
Carretera El Cano-Wajay, Km. 0, El Cano, 19190. La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba,

<sup>3</sup> Laboratorio Antidoping de La Habana. Calle 100 y Aldabó. Boyeros. Ciudad de La Habana, Cuba

**RESUMEN.** Se propone una técnica analítica de Cromatografía en Capa Delgada (CCD), utilizando placas de Sílica gel GF<sub>254</sub>, como fase móvil la mezcla hexano:acetato de etilo (7:3) y como reveladores Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y vainillina/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esta técnica resultó válida, permitiendo la identificación y diferenciación de los tres tipos de propóleos cubanos hasta el momento identificados. Se estudiaron 60 muestras que fueron agrupadas en propóleos pardos, rojos y amarillos, según estudios cromatográficos y espectrocópicos previos. Las condiciones cromatográficas utilizadas así como el uso de compuestos aislados, posibilitó la observación de manchas características correspondientes con los marcadores químicos de cada uno de los tipos de propóleos estudiados.

**SUMMARY.** "Qualitative Analysis of Cuban Propolis by Thin Layer Chromatography". Analytical Thin Layer Chromatography (TLC) using Silica gel plates of GF<sub>254</sub>, hexane: ethyl acetate (7:3) as solvent system and, Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and vanillin / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as general developer, was carried out. The developed chromatographic procedure was validated, allowing the identification and differentiation of the three types of Cuban propolis. We analyzed 60 propolis samples from different regions of Cuba, classified in type I, II and III, according to previous chromatographic and spectroscopic studies. Chromatographic conditions used for each group as well as the use of isolated compounds from the propóleos type I and II as patterns, facilitated the observation of characteristic stains corresponding with the chemical markers of each one of the propolis types.

### INTRODUCCIÓN

El propóleos es un material resinoso de coloración variada que las abejas elaboran y usan en la colmena con diferentes fines; 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 <sup>1,2</sup>. Las disímiles propiedades del propóleos han atraído la atención de numerosos científicos, quienes por más de 40 años han publicado sobre la composición química, la actividad biológica, farmacológica y los usos terapéuticos de los propóleos. Uno de los problemas más sensibles que presenta este producto es precisamente la gran variabilidad en su composición química dependiendo del sitio de recolección y la estandarización de sus diferentes formas de presentación <sup>3,4</sup>.

Park *et al.* desarrollaron un método de cromatografía en placa delgada en fase reversa pa-

ra la clasificación de propóleos de Brasil, donde demuestran la utilidad del método en la diferenciación de 12 tipos de propóleos de ese país. En este caso también se emplean técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), que confirman los resultados obtenidos <sup>5</sup>.

En el año 1989 Álvarez *et al.* propusieron un método de CCD para la clasificación preliminar del propóleos cubano <sup>6</sup>. En esta oportunidad se estudiaron 233 muestras de diferentes regiones del país. El método cromatográfico utilizado sugirió la presencia de al menos ocho tipos de propóleos. No obstante los autores le dieron un carácter provisional a esta clasificación, sugiriéndose el desarrollo de estudios que permitieran reconocer la composición química de forma inequívoca.

Más recientemente nuestro grupo de trabajo

**PALABRAS CLAVE:** Cromatografía en capa delgada, Isoflavonoides, Nemorosona, Propóleos cubanos.

**KEY WORDS:** Cuban propolis, Isoflavonoids, Nemorosone, Thin layer chromatography.

\* Autores a quien dirigir la correspondencia. E-mail: iriane@infomed.sld.cu, osmanyrcr@infomed.sld.cu

en coordinación con la Estación Experimental Apícola, acometió un estudio con 65 muestras de propóleos procedentes de diferentes regiones del país. Todas estas muestras han sido analizadas mediante el empleo de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), CLAR, Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR-EM) y CG-EM. Dichos estudios han permitido sugerir la siguiente tipificación para los propóleos cubanos <sup>7</sup>: Propóleos pardos (tipo I): de estos propóleos se pueden obtener extractos pardos rojizos, los cuales se caracterizan químicamente por la presencia de nemorosa <sup>8</sup>, Propóleos rojos (tipo II): estos propóleos son de color rojo y en su composición química prevalecen los isoflavonoides, fundamentalmente vestitol, medicarpina, neovestitol e isosativan <sup>9</sup> y Propóleos amarillos (tipo III): estos han sido menos estudiados en comparación con los anteriores. No obstante se conoce que en sus extractos, de color generalmente amarillo, predomina la existencia de compuestos alifáticos, probablemente triterpenos.

Los métodos analíticos hasta ahora utilizados resultan muy útiles para la identificación y caracterización de productos naturales, sin embargo, el equipamiento necesario para el desarrollo de los mismos es muy costoso. Por tal motivo en este trabajo se diseña y valida una técnica de análisis sencilla y rápida, que permita la identificación de los tres tipos de propóleos cubanos clasificados hasta el momento. La metodología y recursos necesarios para el desarrollo de esta técnica, debe ser factible para su aplicación en los laboratorios o entidades que analizan y procesan el propóleos con fines terapéuticos o comerciales. Por tal motivo, en este trabajo se desarrolla un método sencillo y económico que permita una rápida identificación de los principales grupos de propóleos cubanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras de propóleos*

Todas las muestras fueron recolectadas por la Estación Experimental Apícola entre el mes de Octubre de 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). Se estudiaron un total de 60 muestras de propóleos, las cuales se incluyen en la Tabla 1.

### *Preparación de los extractos*

Se tomaron 5 g de cada una de las muestras y se extrajeron por maceración con metanol (5 X 25 mL) durante 3 h, empleando agitación es-

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

### *Sustancias de referencias utilizadas*

En el estudio se utilizaron un total de siete productos aislados por nuestro laboratorio, mediante el uso de técnicas cromatográficas. Los productos naturales fueron los siguientes: nemorosa, (3S)-7,2'-dihidroxi-4'-metoxi isoflavano (vestitol), (6aS,11aS)-3-hidroxi-9-metoxi pterocarpano (medicarpina), (3S)-2'-hidroxi-4',7-dimetoxi isoflavano (isosativan), 2',4,4'-trihidroxichalcona (isoliquiritigenina), 7-hidroxi-4'-metoxi isoflavona (formononetina), (-)-4',7-dihidroxi flavanona (liquiritigenina).

### *Condiciones cromatográficas*

Se utilizó una cámara cromatográfica de vidrio de 21,5 cm de altura, 23 cm x 6 cm en el área de la base y 28 cm x 13 cm en el área de la cara superior. La cámara se situó en la campana del laboratorio y se trabajó a temperatura ambiente (25-29 °C), con una humedad ambiental relativa entre 70-80 %. 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. La aplicación se realizó con el uso de una microjeringa de 25 µL, efectuándose un secado espontáneo de las aplicaciones.

Se desarrolló una corrida ascendente utilizando como fases móviles la mezcla: hexano-acetato de etilo (7:3) y hexano-acetato de etilo (9:1). La aplicación se realizó a 1 cm del borde inferior y la corrida fue aproximadamente de 8 cm. La distancia entre cada aplicación fue de 0,8-1 cm. Para evaluar el efecto del tiempo de saturación de la cámara en el valor de R<sub>f</sub>, se realizaron tres corridas utilizando como fase móvil hexano-acetato de etilo (7:3): a los 15, 30 y 45 min. Después de la corrida el secado de la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana. El revelado se realizó utilizando la luz ultravioleta (254 nm) y las disoluciones de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y vainillina / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para la preparación de la disolución de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, se pesaron 12 g de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> se colocaron en un beaker (500 mL) con 350 g de hielo y lentamente se adicionaron 40 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La mezcla se agitó con un agitador de vidrio y se colocó en un baño de agua (70 °C)

Muestra	Provincia	Tipo*	Muestra	Provincia	Tipo*
1	Ciudad de La Habana	I	35	Pinar del Río	II
3	Granma	I	36	Pinar del Río	II
4	Granma	I	37	Pinar del Río	II
5	Guantánamo	I	38	Pinar del Río	III
6	Guantánamo	I	39	Pinar del Río	III
7	Granma	I	40	Pinar del Río	III
8	Santiago de Cuba	III	41	Pinar del Río	III
9	Pinar del Río	II	42	Pinar del Río	III
10	Granma	III	43	Pinar del Río	III
11	Las Tunas	III	44	Matanzas	III
12	Holguín	I	45	Matanzas	II
13	Ciudad de La Habana	III	46	Matanzas	III
14	Guantánamo	I	47	Matanzas	III
15	Ciudad de La Habana	I	48	Matanzas	III
16	Las Tunas	I	49	Matanzas	III
17	Guantánamo	I	50	Matanzas	III
18	Ciudad de La Habana	III	51	Matanzas	III
20	Granma	III	52	Holguín	I
21	La Habana	III	53	Holguín	I
24	La Habana	III	54	Holguín	I
25	Villa Clara	III	55	Holguín	I
26	Villa Clara	III	56	Holguín	I
27	Ciudad de La Habana	III	57	Holguín	I
28	Villa Clara	III	58	Holguín	I
29	Villa Clara	II	59	Holguín	I
30	Villa Clara	III	61	Pinar del Río	I
31	Guantánamo	I	63	Ciudad de La Habana	III
32	Santi Spíritus	III	64	Ciudad de La Habana	I
33	Ciego de Ávila	I	65	Ciudad de La Habana	I
34	La Habana	III	70	Pinar de Río	II

**Tabla 1.** Muestras de propóleos cubanos estudiados. \*Componentes mayoritarios. I: Benzofenonas preniladas, II: Isoflavonoides, III: no identificados.

hasta obtener una disolución amarillo naranja. Después de rosear la placa se calentó a una temperatura entre 80 y 90 °C de 3 a 5 min., hasta que se modificó la apariencia de la misma. El revelado con vainillina se efectuó roseando previamente la placa con una disolución metanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50%) y posteriormente con la disolución metanólica de vainillina (1%).

#### **Validación de la técnica de análisis (CCD)**

La validación correspondiente a este método de análisis, según la USP XXVII<sup>10</sup>, categoría IV, solo precisa de la prueba de especificidad o selectividad.

#### **Selectividad**

Para el desarrollo de este parámetro se utilizaron tres muestras de propóleos: M-1 (pardo), M-9 (rojo) y M-30 (amarillo). Además se aplicó la sustancia de referencia nemorosona. De cada una de las disoluciones se aplicaron 2 µL por duplicado.

#### **Límite de detección**

Para este ensayo se utilizó nemorosona, obtenida según el método de aislamiento y purificación informado por Cuesta-Rubio *et al.*<sup>8</sup>. Como disolvente se empleó metanol para análisis. Se prepararon cuatro disoluciones de concentraciones crecientes: 0,1 (D-4); 0,2 (D-3); 0,4 (D-2) y 2 mg/mL (D-1). Para evaluar el límite de detección del estándar utilizado (nemorosona), se realizaron un total de 11 aplicaciones por triplicado (0,05 µg - 6 µg), en volúmenes que oscilaron entre 0,5 µL y 3 µL. La placa se corrió en la fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3), se observó bajo la luz ultravioleta a 254 nm y se reveló además con Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor.

#### **RESULTADOS**

##### **Desarrollo de la técnica**

Para el desarrollo del método cromatográfico se realizó un estudio de saturación de la cámara cromatográfica. Los valores de R<sub>f</sub> en función de los tres tiempos de estudio, se muestran en la Tabla 2.

**Validación****Selectividad**

Las muestras de propóleos empleadas en este estudio (M-1, M-9 y M-30) y la nemorosona como sustancia de referencia, se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas. Como se muestra en la Tabla 3, la diferenciación entre los tres tipos de propóleos se realiza a través de los valores de Rfr correspondientes a las manchas características en cada uno de ellos.

**Límite de detección de nemorosona**

El límite de detección de este compuesto se encuentra alrededor de los 0,2 µg, bajo las condiciones de análisis empleadas.

**Análisis cromatográfico de las muestras de propóleos**

Después de haber resultado válida la técnica cromatográfica desarrollada, se procedió al estudio del comportamiento de cada una de las

muestras colectadas. En esta ocasión cada tipo de propóleos se trabajó bajo las mismas condiciones cromatográficas.

**Muestras de propóleos Tipo I**

De este tipo de propóleos se analizaron 24 muestras, las cuales se puntuaron por duplicado en un volumen de 1 y 2 µL, equivalentes a masas entre 10 y 20 µg respectivamente. En todos los casos se utilizaron similares condiciones cromatográficas y se realizó la corrida en hexano:acetato de etilo (7:3). El revelado se efectuó con  $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$  y calor. La Figura 1 exhibe el comportamiento cromatográfico de 11 muestras y de la sustancia de referencia nemorosona (4 µg).

**Muestras de propóleos rojos Tipo II**

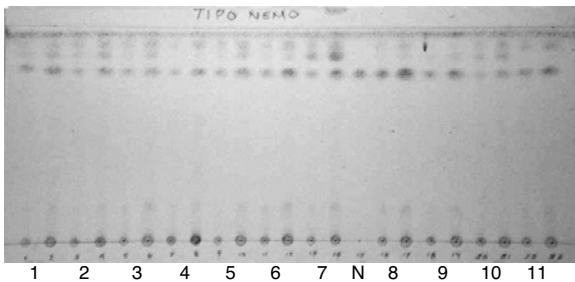
El análisis cromatográfico de este tipo de propóleos se realizó para 7 muestras de diferentes regiones del país, fundamentalmente de la zona occidental. Se aplicaron tres volúmenes de cada muestra que oscilaron entre 0,5 y 3,0 µL, equivalentes a masas entre 8,0 y 34,0 µg. Como

Muestra	Masa (µg)	Rfr (15 min.)	Rfr (30 min.)	Rfr (45 min.)
Nemorosona	4	6,90 ♦	6,70 ♦	6,10 ♦
Tipo I	20,00	1,00	1,00	1,00
Tipo II (4 manchas)	34,20	0,84	0,78	0,75
		0,78	0,72	0,69
		0,46	0,40	0,36
		0,33	0,31	0,28
Tipo III	20,20	1,06	1,09	1,18
Isosativan	*	0,84	0,78	0,75
Medicarpina	*	0,78	0,72	0,69
Vestitol	*	0,46	0,40	0,36
Formononetina	*	0,36	0,33	0,29
Isoliquiritigenina	*	0,26	0,22	0,20
Liquiritigenina	*	0,20	0,18	0,15

**Tabla 2.** Estudio de saturación. Valores de Rfr de las sustancias de referencia y de las manchas correspondiente a los tres tipos de propóleos. ♦ Valor de Rf de la sustancia de referencia nemorosona.\* Se desconoce la masa puntada, debido a la poca cantidad de muestra existente para preparar una disolución de concentración conocida.

Muestra	Masa (µg)	Marcador	Rfr
Nemorosona	4	Sustancia de referencia	6,10 ♦
M-1 (Tipo I)	20,00	Nemorosona	1,00
		Isosativan	0,75
		Medicarpina	0,69
		Vestitol	0,36
M-9 (Tipo II)	34,20	No identificado.	0,28
		Compuestos alifáticos.	1,18

**Tabla 3.** Estudio de selectividad. Valores de Rfr de cada una de las manchas consideradas como marcadores químicos de los tres tipos de propóleos. ♦ Valor de Rf de la sustancia de referencia nemorosona.

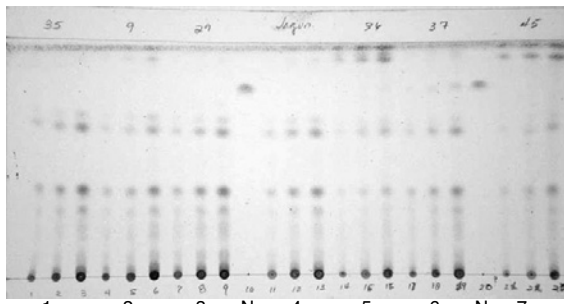


**Figura 1.** Cromatogramas de las muestras de propóleos pardos (Tipo D). N-Nemorosona.

sustancia de referencia se utilizó la nemorosona (4,0 µg). Todas las muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas, utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3). Resulta apreciable la homogeneidad existente entre las 7 muestras de propóleos rojos analizadas. La Figura 2 muestra el comportamiento cromatográfico después de haber efectuado el revelado con  $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$  y calor.

Adicionalmente se efectuó el análisis comparativo de la muestra M-35 con los flavonoides aislados desde esta. En este caso se realizó una placa cromatográfica donde se puntuaron 6 productos naturales aislados de la muestra M-35: isosativan (1), medicarpina (2), vestitol (3), isoliquiritigenina (4), liquiritigenina (5), formononetina (6) y la nemorosona (4 µg). Dada la poca cantidad disponible de los compuestos aislados desde M-35, sus concentraciones no fueron definidas. Para la identificación de estos metabolitos en las muestras de propóleos rojos, se cromatografiaron además 2 µL de las muestras de propóleos M-35 (34,2 µg) y M-37 (34,6 µg) y se utilizó la fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3).

La Figura 3 muestra dos cromatogramas: A, revelado con  $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$  y calor y B, revelado con vainillina (1%)/ $H_2SO_4$  (50%) y calor. Con ambos reveladores se logran visualizar la mayoría de los patrones y las manchas características de las muestras.



**Figura 2.** Cromatograma de las siete muestras de propóleos rojos (Tipo II). N-Nemorosona.

*Muestras de Propóleos Tipo III*

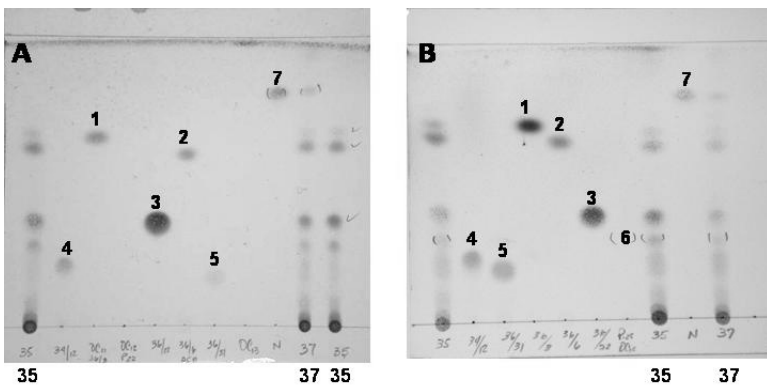
De este tipo de propóleos fueron analizadas un total de 29 muestras. El estudio cromatográfico del tercer grupo de propóleos se realizó utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (9:1). En la Figura 4 se observa el comportamiento cromatográfico de 9 de los extractos correspondientes a este tipo de propóleos. En todos los casos la aplicación se efectuó por duplicado en un volumen de 1 y 2 µL, equivalente a 10 y 20 µg respectivamente.

**DISCUSIÓN**

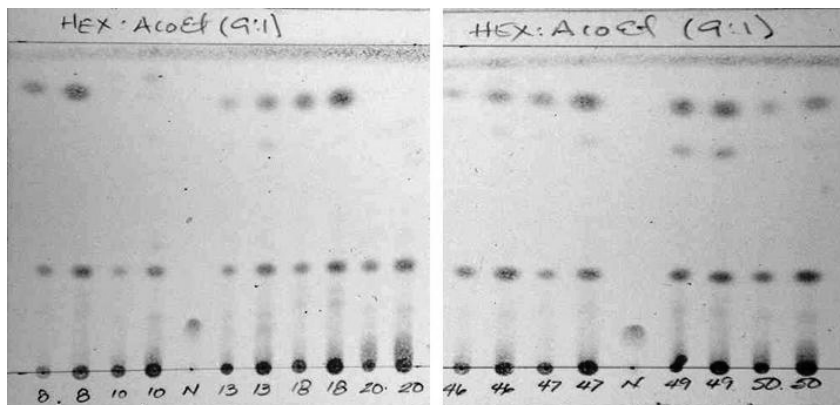
*Desarrollo de la técnica*

Para el desarrollo de este método analítico se probaron diferentes fases móviles, utilizando los disolventes hexano, acetato de etilo, cloroformo, butanol y ácido acético, en diferentes proporciones. Las fases móviles más polares empleadas como: cloroformo, cloroformo-metanol (9:1) y butanol-ácido acético-agua (65:15:25) no dieron buenos resultados, pues muchas de las manchas de los extractos estudiados se acumulan en el frente del disolvente. Este resultado sugirió que la fase móvil a emplear debía ser más apolar que el cloroformo, de ahí que las condiciones más favorables se lograron con el empleo de mezclas de hexano:acetato de etilo.

Al analizar el efecto del tiempo de saturación



**Figura 3.** Cromatograma de M-35 y M-37 junto a las siete sustancias de referencia. **A-**Revelador  $Ce(SO_4)_2$ /calor, **B-** vainillina / $H_2SO_4$  y calor; vestitol (3), medicarpina (2), isosativan (1), isoliquiritigenina (4), liquiritigenina (5) y formononetina (6) y nemorosona (7).



**Figura 4.** Cromatogramas de las muestras de propóleos amarillos (Tipo III).

de la cámara en el valor de R<sub>f</sub>, como se puede observar en la Tabla 2, con el incremento del tiempo de saturación de la cámara, disminuye el R<sub>f</sub> de todas las manchas del sistema cromatográfico. No obstante, aunque se observó variación entre los R<sub>f</sub> correspondientes a cada cromatoplaque, en los tres casos se observaron todas las manchas con una adecuada resolución. Sin embargo, si se deseara un menor tiempo de corrida, se recomienda no colocar la placa hasta después de los 30 min de saturación de la cámara, ya que se observó una dependencia entre el tiempo de corrida y la saturación de la cámara. Aunque el parámetro tiempo de corrida no fue objeto de estudio, los mejores resultados en cuanto a resolución y tiempo de desarrollo del cromatograma se apreciaron por encima de los 30 min de saturación. Por encima de los 45 min el comportamiento cromatográfico se mantuvo constante.

### Validación

#### Selectividad

Para este estudio se realizó el cálculo del R<sub>f</sub> sobre la base de la nemorosona, pues se buscó la diferenciación entre los tres tipos de propóleos. La idea de utilizar la nemorosona como sustancia de referencia se debe a que es el componente mayoritario en aproximadamente un 39,3% de las muestras en estudio, sin descartar su presencia como componente minoritario en otras muestras. Además es un metabolito que se obtiene con buen rendimiento a partir de las resinas florales de la especie *Clusia rosea* y resulta de fácil purificación.

Como se muestra en la Tabla 3, bajo las condiciones de análisis se pueden diferenciar los tres tipos de propóleos que hasta el momento se han identificado en Cuba. El propóleo tipo I (M-1), se caracteriza por la presencia de nemorosona como metabolito mayoritario. Presenta un R<sub>f</sub> intermedio entre los isoflavonoides del

propóleo tipo II y los supuestos triterpenos del tipo III.

La corrida correspondiente a la muestra M-9 (propóleo tipo II), presenta cuatro manchas características que muestran un R<sub>f</sub> inferior a 1, pues cada una de ellas revela por debajo de la nemorosona. Los R<sub>f</sub> de los cuatro marcadores químicos de este tipo de propóleos se presentan en la Tabla 3.

Las aplicaciones correspondientes al propóleo amarillo (M-30), presenta un conjunto de manchas que revelan por encima de la nemorosona, pues dadas las condiciones cromatográficas empleadas los supuestos triterpenos corren muy cercanos al frente del disolvente, con un R<sub>f</sub> por encima de 1. Lógicamente estas manchas por si solas no permiten establecer la diferencia entre los tres tipos de propóleos, pues en los tres casos se observan. Sin embargo, los elementos expuestos para los propóleos pardos y rojos, hacen posible que el propóleo clasificado como amarillo quede excluido de estos grupos.

Los resultados demuestran 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 continua la nemorosona y finalmente las manchas principales de los propóleos amarillos, por lo que la técnica desarrollada resulta selectiva para los tres tipos de propóleos estudiados.

Independientemente 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 por consecuencia podrían visualizarse mezclas de metabolitos. La flora nacional es diversa y con un alto porcentaje de endemismo, por lo que podrían existir otras clasificaciones de propóleos en la medida que se incremente el número de muestras estudiadas. No obstante, la

población analizada es amplia y al menos se cuenta con propóleos de todas las provincias del país, excepto de la Isla de la Juventud.

### **Análisis cromatográfico de las muestras de propóleos**

#### *Muestras de propóleos pardos (tipo I)*

Al realizar la corrida se observó un comportamiento similar entre todas las muestras de propóleos cromatografiadas. La Figura 1 exhibe el comportamiento cromatográfico de 11 de las 24 muestras correspondientes a este tipo de propóleos, coincidiendo el valor de Rf con el de la nemorosona. Las 13 muestras restantes mostraron un comportamiento similar.

#### *Muestras de propóleos rojos (tipo II)*

En la aplicación correspondiente a la muestra M-37 se observa una mancha a igual Rf que la nemorosona. Independientemente de que M-37 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.

#### *Muestras de propóleos tipo III*

El estudio cromatográfico de las 29 muestras correspondientes al tercer grupo de propóleos se realizó utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (9:1). El uso de esta fase móvil se debe a que sus componentes mayoritarios presentan una baja polaridad. Además se trató de disminuir el Rf de las manchas de este grupo y buscar otras posibles manchas que pudieran establecer diferencias de este tipo de propóleos con el resto. Este es el tipo de propóleos menos estudiado, sin embargo el comportamiento cromatográfico (Fig. 4) sugiere dos grupos de metabolitos de polaridad diferente que podrían ser los marcadores químicos de los propóleos amarillos. Como se puede observar la mayoría de las muestras presentan dos manchas características, la primera de ellas aparece a un Rfr de 2,4 y la segunda a un Rfr de 6,8 aproximadamente. Estas manchas revelan con tonos morados, una característica común para triterpenos cuando se emplea la mezcla  $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$  y calor.

### **CONCLUSIONES**

Resulta útil destacar que en este estudio se analizan 60 muestras de todas las regiones del país (occidental, central y oriental) donde están representadas zonas costeras, llanuras y zonas

montañosas. Los diferentes orígenes geográficos pueden condicionar diferente vegetación y por tanto diferente composición química para los propóleos. Sin embargo, la existencia de tres grupos fundamentales de propóleos sugiere que las abejas prefieren determinadas especies vegetales para la elaboración del propóleos.

Se conoce que los propóleos pardos cubanos se originan en la cercanía de poblaciones de la especie *Clusia rosea*<sup>8</sup> y la vegetación que origina los propóleos rojos cubanos parece estar relacionada con una especie de las Leguminosae. Los metabolitos que caracterizan a ambos tipos, presentan una distribución natural restringida por lo que es probable que una o pocas especies vegetales contribuyan a los mismos. Por otra parte, los propóleos amarillos se caracterizan por presentar compuestos alifáticos<sup>7</sup>, probablemente correspondientes al grupo de los triterpenos. Estos metabolitos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, por lo que a este tipo de propóleos podrían tributar varias especies vegetales.

Con el desarrollo de esta técnica y el uso de compuestos aislados desde los propóleos tipo I y II como sustancias de referencia, se define la naturaleza química de las manchas cromatográficas fundamentales que caracterizan a cada tipo de propóleos. Se aprecia una total correspondencia entre los resultados previos obtenidos por técnicas más sensibles o resolutivas y aquellos conseguidos por CCD con las condiciones cromatográficas empleadas. Esta correspondencia es la mayor evidencia de la validez del método por CCD para definir los tipos de propóleos cubanos.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Asis, M. (1989) "Propóleo. El oro púrpura de las abejas". Ed. CIDA. Ciudad de la Habana. 55-89.
2. Bankova, V. (2005) *J. Ethnopharmacol.* **100**: 114-7.
3. Bankova, V., S.L. De Castro & M.C. Marcucci (2000) *Apidologie* **31**: 3-15.
4. Marcucci, M.C. (1995) *Apidologie* **26**: 83-99.
5. Park, K.Y., S.M. Alencar & L.C. Aguiar (2002) *J. Agr. Food Chem.* **50**: 2502-6.
6. Álvarez, J.D., J. Granadillo & C. Tabío (1989) *Cienc. Tec. Agric. Apic.* **5**: 51-60.
7. Cuesta-Rubio, O., M. Campo, I. Márquez, A. Rosado, A.L. Piccinelli & L. Rastrelli (2007) *J. Agr. Food Chem.* **55**: 7502-9.
8. Cuesta-Rubio, O., H. Velez-Castro, B. Frontana-Urbe & J. Cardenas (2001) *Phytochemistry* **57**: 279-83.
9. Piccinelli, A.L., M. Campo, O. Cuesta-Rubio, I. Márquez, F. Simone & L. Rastrelli (2005) *J. Agr. Food. Chem.* **53**: 9010-6.
10. United States Pharmacopoeia (2004) USP XXVII-NF22 Supplement 1, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland.