

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA



Efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos". Ayacucho - 2013.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:
Bach. LOAYZA CUBA, BRITT

AYACUCHO – PERÚ
2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. BRITT LOAYZA CUBA

R.D. N° 117-2014 F.C.B.D.

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día doce de setiembre del dos mil catorce, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se reunieron los miembros del jurado de evaluación de acuerdo a la R.D. N° 117-2014 FCB.D, presidido por el Mg. José Manuel Diez Macavilca (presidente - miembro), Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista, Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo y Blgo. Elbert Hermoza Valdivia (como miembro y secretario docente) con la finalidad de recibir en acto público la sustentación de tesis presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica Srta Britt Loayza Cuba y cuyo Título de la tesis es **Efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos". Ayacucho - 2013.** Con la que pretende obter el Título Profesional de Químico Farmacéutica.

Una vez verificada la documentación sustentatoria del presente acto el presidente del jurado evaluador autoriza se de inicio a la sustentación a la tesis en el tiempo reglamentario que no exceda de los cuarentaicinco minutos, hecho esto la srta sustentante da inicio a su exposición.

Concluida con la sustentación, el señor presidente solicita a los miembros del jurado evaluador que realicen sus preguntas y aclaraciones que vean por conveniente, dando respuesta la srta sustentante.

Posteriormente y concluida con esta parte de la sustentación, el señor presidente solicita a la sustentante y público asistente puedan desocupar el ambiente con la finalidad de realizar la respectiva deliberación y calificación respectiva con el siguiente resultado.

| Jurado evaluador | Exposición | Respuesta | Promedio |
|---------------------------------------|-------------------|------------------------|-----------------|
| Mg. José Manuel Diez Macavilca | 18 | 18 | 18 |
| Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista | 17 | 17 | 17 |
| Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo | 19 | 19 | 19 |
| Blgo. Elbert Hermoza Valdivia | 18 | 18 | 18 |
| | | Promedio total: | 18 |

De la calificación efectuada se obtuvo nota promedio de (18) DIECIOCHO.

A continuación se invita a la sustentante y público asistente hacer ingreso al auditorio con la finalidad de que el señor presidente de conocer el resultado de la evaluación y se tome el Juramento Farmacéutico.

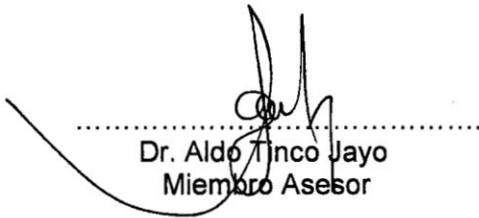
El acto de sustentación culmina siendo 5.50 de la tarde firmando al pie de la presente los miembros del jurado en conformidad del acto.



.....
Mg. José Manuel Díez Macavilca
Miembro



.....
Mg. Saturnino Martín Tenorio B.
Miembro



.....
Dr. Aldo Tinco Jayo
Miembro Asesor



.....
Blgo. Ebert Hermoza Valdivia
Miembro secretario docente

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres, Américo y Victoria, mis
hermanos Yenny y Darcy.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y a los docentes que en ella laboran, por su invaluable apoyo académico y moral quienes son forjadores de nuevos profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, que permitieron formarme profesionalmente día a día.

A mi asesor Dr. QF. Johnny Aldo TINCO JAYO, por su invaluable asesoramiento y constante apoyo durante la realización del presente trabajo de investigación.

Al docente de la E.F.P. de Farmacia y Bioquímica, Mg. QF. Enrique AGUILAR FELICES, por su apoyo permanente en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial a todas las personas por su apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTO | iii |
| ÍNDICE GENERAL | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| ÍNDICE DE ANEXOS | vii |
| RESUMEN | ix |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 2.1. Antecedentes | 4 |
| 2.2. Propóleo | 7 |
| 2.2.1. Definición | 7 |
| 2.2.2. Características físicas del propóleo | 7 |
| 2.2.3. Composición química | 8 |
| 2.2.4. Función del propóleo en la colmena | 8 |
| 2.2.5. Propiedades medicinales | 9 |
| 2.2.6. Propiedades farmacológicas de algunos metabolitos del propóleo | 10 |
| 2.3. Aparato respiratorio | 12 |
| 2.4. Asma | 14 |
| 2.5. Histamina | 15 |
| 2.6. Medicamentos utilizados en el tratamiento del asma | 16 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Ubicación | 20 |
| 3.2. Materiales | 20 |
| 3.3. Diseño metodológico | 21 |
| 3.4. Diseño experimental | 25 |
| 3.5. Análisis estadístico | 26 |
| IV. RESULTADOS | 27 |
| V. DISCUSIÓN | 34 |
| VI. CONCLUSIONES | 40 |
| VII. RECOMENDACIONES | 41 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| ANEXOS | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Características organolépticas del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. | 28 |
| Tabla 2. Características físico - químicas del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. | 29 |
| Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. | 30 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Esqueleto común de los flavonoides. | 12 |
| Figura 2. Tensión (g) de la contracción de los anillos traqueales según tratamientos. | 31 |
| Figura 3. Número de contracciones de los anillos traqueales en respuesta a los tratamientos. | 32 |
| Figura 4. Altura de las contracciones de los anillos traqueales en respuesta a los tratamientos. | 33 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Página |
|---|--------|
| Anexo 1. Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" del distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. | 46 |
| Anexo 2. Recolección del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. | 47 |
| Anexo 3. Propóleo, maceración, filtrado, tintura madre, concentración y extracto blando de la muestra. | 48 |
| Anexo 4. Tubos de prueba con el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico. | 49 |
| Anexo 5. Composición del medio nutricio Tyrode. | 50 |
| Anexo 6. Quimógrafo automatizado Panlab Harvard. | 51 |
| Anexo 7. Flujograma del efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" en anillos traqueales aislados de <i>Cavia porcellus</i> "cobayos. | 52 |
| Anexo 8. Anillos traqueales de cobayo en el baño de órganos. | 53 |
| Anexo 9. Análisis de varianza de la tensión generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos. | 54 |
| Anexo 10. Prueba de Tukey de la tensión generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos. | 55 |
| Anexo 11. Análisis de varianza del número de contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos. | 56 |
| Anexo 12. Prueba de Tukey del número de contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos. | 57 |
| Anexo 13. Análisis de varianza de la altura de las contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos. | 58 |
| Anexo 14. Prueba de Tukey de la altura de las contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por | |

| | |
|--|----|
| efecto de los tratamientos. | 59 |
| Anexo 15. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina y salbutamol. | 60 |
| Anexo 16 Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina extracto hidroalcohólico de propóleo al 5%. | 61 |
| Anexo 17. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina extracto hidroalcohólico de propóleo al 10%. | 62 |
| Anexo 18. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina extracto hidroalcohólico de propóleo al 15%. | 63 |
| Anexo 19. Matriz de consistencia. | 64 |

RESUMEN

El propóleo es usado en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias como tos, bronquitis y asma. El presente trabajo se realizó con el propósito de determinar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos", desarrollado en los laboratorios de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de julio a diciembre del 2013. La muestra fue recolectada en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. Al propóleo en bruto se le realizó la determinación de sus características organolépticas y físico – químicas mientras que al extracto hidroalcohólico, se le realizó el tamizaje fitoquímico. El efecto broncodilatador se determinó mediante el método de Jagdish *et al.*, modificado en anillos traqueales, haciendo uso de un quimógrafo automatizado, Panlab Harvard; las contracciones fueron inducidas por histamina 5×10^{-4} M, registrándose el aumento de tensión, número y altura de contracciones. Se usó como control salbutamol y se evaluó el extracto hidroalcohólico de propóleo a las concentraciones de 5%, 10% y 15%. El extracto hidroalcohólico de propóleo al 5% redujo la tensión a 10,818 g semejante a la del salbutamol (10,852 g), siendo menor al 10% y 15% a 10,206 g y 9,371 g respectivamente. El número y la altura de las contracciones fueron de 21,40 y 9,52 mm con salbutamol; 19,20 y 9,24 mm al 5%; 15,40 y 8,42 mm al 10% y finalmente 9,80 y 7,30 mm al 15% respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos ($p < 0,05\%$). Se concluye que el extracto hidroalcohólico de propóleo tiene efecto broncodilatador, mostrando mayor efecto al 15%.

Palabras clave: Propóleo, extracto hidroalcohólico, efecto broncodilatador.

I. INTRODUCCIÓN

El propóleo es ampliamente utilizado en la medicina tradicional ha sido empleado extensamente desde tiempos antiguos reconocida por sus propiedades terapéuticas que se le han atribuido. En la medicina tradicional peruana el propóleo es utilizado en el tratamiento de afecciones respiratorias entre ellos el asma, se han venido resolviendo con el empleo alternativo de resinas y/o bálsamos; además de plantas medicinales, práctica que se ha transmitido de generación en generación, además de que continúan siendo un valioso arsenal de sustancias para la industria farmacéutica.

Según la OMS,¹ más de 235 millones de personas en el mundo padecen de asma; en la actualidad en todo el planeta, una de cada 250 muertes son causadas por el asma además más del 80 por ciento de las muertes por asma ocurren en países de ingresos bajos y medio - bajos.

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica colectado por las abejas obreras de la especie *Apis mellífera* "abeja", a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas. Los materiales colectados, son triturados, humedecidos con saliva y secreciones enzimáticas, mezclados con la cera producida por las glándulas ceras y finalmente transportadas por las abejas hacia la colmena, donde cumplen diversas funciones².

El propóleo es utilizado por la gran variedad de compuestos que presenta entre ellos compuestos fenólicos o polifenoles y flavonoides que han sido reconocidos por su amplio espectro de actividades biológicas, tales como anticancerígenos, analgésicos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antibacterianos, y antioxidantes³.

El propóleo de *Apis mellifera* "abeja", es empleado por su propiedad broncodilatadora en el asma y por esta razón se desarrolló el presente trabajo de investigación que estuvo orientado a conocer los principales metabolitos secundarios responsables de dicha actividad mediante un tamizaje fitoquímico y corroborar el efecto broncodilatador utilizando el modelo de anillos traqueales aislados de cobayo *in vitro* haciendo uso de un quimógrafo automatizado; este equipo tiene un transductor y amplificador con conexión a un computador que permitió registrar la actividad muscular del órgano aislado de manera más precisa.

Por estas consideraciones, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron los siguientes.

Objetivo general:

Evaluar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos".

Objetivos específicos:

- Determinar las características organolépticas y físico - químicas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".
- Identificar la presencia de metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" por medio del tamizaje fitoquímico.

- Determinar la concentración más eficaz del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" con mayor efecto broncodilatador.
- Comparar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" con el estándar salbutamol en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos".

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Existen estudios químicos y farmacológicos de dicho bálsamo estudiados a nivel local, nacional e internacional, pero no se encuentra literatura científica o reportes sobre el efecto broncodilatador del propóleo. Sin embargo se ha encontrado estudios de algunas plantas acerca de la actividad broncodilatadora y antiasmática que utilizaron el mismo método con ciertos cambios llevados a cabo en varios países.

Se ha realizado un trabajo sobre la formulación y evaluación de la actividad antitusígena del jarabe elaborado a base de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja". Determinando que el jarabe elaborado a las concentraciones de 2,0%, es estadísticamente similar al jarabe de codeína y estadísticamente diferente a los jarabes de las concentraciones de 1,0% y de 0,5% respectivamente⁴.

El estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. Resultando que los promedios del halo de inhibición de las soluciones experimentales. El menor promedio del halo de inhibición corresponde al alcohol 96° (6,8 mm), seguido de la clorhexidina 0,12% (11,87 mm) y del extracto etanólico de propóleo peruano 30% (16,73 mm), con

un intervalo de confianza del 95%. Resultando estadísticamente significativo entre ellos⁵.

Estudios realizados en la Universidad Nacional de Colombia, en la evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá. Donde se tuvo como objetivo principal evaluar la actividad genotóxica del propóleo de diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá; llegaron a la conclusión de que ambos tipos de propóleo causan muerte celular en linfocitos de sangre periférica a concentraciones elevadas y a distintas horas de exposición, con la prueba de micronúcleos fue posible determinar que las concentraciones elevadas el propóleo tiene efectos citostático en los linfocitos de sangre periférica humana además de que presentan actividad genotóxica a dosis - dependiente⁶.

Se realizó el trabajo de flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad. Donde se lograron aislar flavonoides como crisina, galangina, pinocembrina y apigenina aislados de propóleo presentaron marcada acción antibacteriana, en forma individual y en mezcla. Se pudo corroborar *in vitro*, que el efecto antibacteriano es mayor frente a las cepas Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, y resultó activo frente una cepa Gram (-), *Escherichia coli* e inactivo frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*⁷.

En la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga se ha realizado un trabajo sobre efecto broncodilatador del extracto fluido de *Menta aff. arvensis L.* "hierba buena" en tráquea aislada de *Cavia porcellus* "cobayo". Utilizándose como inductor de respuestas contráctiles a la acetilcolina y de líquido nutricio a la solución de Krebs. Se logró demostrar que el extracto fluido de *Menta aff. arvensis L.* presenta efecto broncodilatador⁸.

En el estudio sobre la actividad antiasmática del extracto metanólico de *Physalis angulata* Linn (PAL). Fueron evaluados tres experimentos *in vitro* en modelos de músculo liso (íleon, cadena traqueal de cobayo y tira de fondo del ojo de rata). Demostrándose así que el extracto etanólico de PAL deja expuesta su actividad antagonista sobre los receptores histaminérgicos y receptores serotoninérgicos. Sobre la base del estudio de investigación, se puede concluir que en parte PAL puede ser un agente antiasmático potente para la próxima generación⁹.

Jagdish *et al.*,¹⁰ llevaron a cabo el trabajo de investigación actividad antiasmática de *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Am leaves. El objetivo de dicho trabajo fue investigar la posible actividad antiasmática del extracto hidroalcohólico de hojas de *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Am leaves. El extracto se evaluó para su actividad antiasmática en íleon y en cadena traqueal de cobayo. Llevándose todo el trabajo *in vitro*, los resultados del estudio concluyen que *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Am leaves presenta gran potencial de actividad antiasmática en experimentos con animales *in vitro*. La actividad biológica hace responsable a la presencia de flavonoides y saponinas identificadas en el extracto.

En el estudio sobre la acción broncodilatadora y antiinflamatoria del 1,8 - cineol en modelo experimental de asma en cobayos. Los resultados demostraron que el 1,8 - cineol $6,5 \times 10^{-6}$ a $6,5 \times 10^{-3}$ M que se administró acumulativamente presentó una acción relajante sobre el músculo liso bronquial de cobayo e invierte significativamente la respuesta contráctil ($p < 0,01$) producida por histamina a una concentración de 10 μ M demostrándose así que el 1,8 - cineol presenta una acción broncodilatadora mientras que los parámetros inflamatorios se estudiaron mediante análisis histológico, el recuento de células inflamatorias (reducción significativa en el recuento total de células inflamatorias, especialmente eosinófilos y neutrófilos , y en los niveles de IL - 1 , TNF)¹¹.

2.2. Propóleo

2.2.1. Definición

El término de propóleo o propolis proviene del griego *pro*: "delante de" y *polis*: "ciudad", lo que significa "delante de la ciudad", es decir, de la colmena¹².

El propóleo es un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, de consistencia viscosa es recogido de ciertas partes de los vegetales, por las abejas *Apis mellifera*, que las transportan al interior de la colmena, modificándolas en parte con sus secreciones (ceras y secreciones salivares)¹³.

La participación de la abeja hace que su composición experimente modificaciones respecto las resinas vegetales, pudiendo considerarse producto de origen mixto, vegetal y animal¹².

La abeja, al secretar beta - glucosidasa durante la recolección y procesamiento del propóleo, hidroliza los heterósidos de flavonoides a gliconas, mejorando la acción farmacológica del producto y así produce cambios físico - químicos del mismo¹².

2.2.2. Características físicas del propóleo

Su color varía entre el amarillo y el marrón oscuro, en función de las resinas de origen, aunque se han citado casos de propóleos transparentes¹⁴.

Entre los 20 y los 45°C su consistencia es suave, flexible y adhesiva, pero al enfriarse se endurece y se hace quebradiza alrededor de los 15°C, cuando esto ocurre a temperaturas de congelación, no recupera sus anteriores características¹⁴.

A más de 45°C cada vez son más pegajosos y se vuelven líquidos alrededor de los 60°C, aunque hay casos que no son líquidos hasta 100°C. El propóleo es prácticamente insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos como benceno, acetona, éter y alcohol, razón por la cual la mayoría de las aplicaciones en el uso diario se realizan a través de extractos etanólicos⁶.

Es de color verde pardo, castaño casi negro (dependiendo de su origen botánico), sabor frecuentemente amargo, olor agradable y suave¹⁴.

2.2.3. Composición química

La composición química del propóleo es altamente variable, ya que ésta depende del sitio de recolección y por lo tanto de los diferentes ecosistemas donde las abejas recolectan los exudados y las secreciones de las plantas. La composición varía con las diferentes regiones geográficas y climáticas y sobretodo con las fuentes vegetales. Además, se ha determinado que los componentes del propóleo se originan de tres fuentes: los exudados de las plantas que colectan las abejas, las sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y los materiales que se introducen durante la elaboración del propóleo¹⁵.

Sin embargo, se dice que en general el propóleo está compuesto por:

| | |
|----------------------------------|----------|
| Resinas y bálsamos | 50 - 55% |
| Ceras | 25 - 35% |
| Aceites volátiles | 10% |
| Polen | 5% |
| Sustancias orgánicas y minerales | 5% |

Se han identificado más de 160 compuestos, de los cuales un 50 por ciento son compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye acción farmacológica. Los principales fenoles son: flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavononas); ácidos aromáticos y sus esteres (ácido caféico, cinámico y otros), ácidos orgánicos (ácido benzoico); aldehídos aromáticos (vainillina e isovainillina); cumarinas y triglicéridos fenólicos¹⁶.

2.2.4. Función del propóleo en la colmena

Las abejas aplican el propóleo 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 propóleo 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 ésta¹⁷.

El propóleo evita las vibraciones cuando las colmenas están ubicadas en sitios expuestos a las corrientes de aire además de reducir al mínimo las piqueras de entrada a las colmenas evitando que puedan penetrar depredadores, tapiza las piqueras para evitar que las obreras introduzcan en sus patas entes contaminantes, amortigua los sonidos intensos a los cuales las abejas son muy sensibles, mantiene estable la temperatura de la colmena (alrededor de 30°C) y el nivel de humedad relativo dentro de la colmena: impidiendo la entrada de agua, evitando la evaporación excesiva, ya que las larvas necesitan para su desarrollo determinado grado de humedad¹⁸.

La presencia del propóleo por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales y antiparasitarias garantiza la asepsia del medio ambiente al interior de la colmena¹⁸.

2.2.5. Propiedades medicinales

A través de la historia de la humanidad, se han reconocido las propiedades terapéuticas del propóleo¹⁹.

Los soldados romanos lo utilizaban como agente cicatrizante para curar las heridas sufridas en combate, los médicos de Roma y Grecia clásicas lo recomendaban como desinfectante oral y las tribus incas lo empleaban como un agente antipirético. Estas aplicaciones y otras, se conservan en la actualidad en

un gran número de países alrededor del mundo. En Europa, Japón y Estados Unidos, se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades como otitis crónica media y externa, faringitis, rinitis crónica, amigdalitis entre otras, y su eficacia ha sido reconocida por diversos estudios farmacológicos¹⁹.

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antioxidantes, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular²⁰.

Posee actividad antitusígena protegen y desinflan las vías respiratorias indicado en el caso de afecciones respiratorias de las vías altas como faringitis, laringitis, sinusitis bronquitis y tos²¹.

Algunos autores plantean la utilización del propóleo en la odontología como agente antibacteriano para el control de la placa o en el tratamiento de diversas infecciones que se puedan presentar en la cavidad oral, ya que se ha comprobado su capacidad bactericida y bacteriostática frente a bacterias orales²².

Hernández *et al.*,²¹ indican entre sus experiencias con apicultores, narran el poder estimulante de la inmunología que tiene el propóleo en humanos fundamentalmente, tal es el caso de niños y jóvenes desnutridos que reciben dosis frecuentes y sostenidas de este producto apícola, en el desayuno con jugos de productos naturales, en dosis de 3 a 5 gramos diarios y por un lapso de 20 a 30 días seguidos, lográndose resistencia a gripes y resfríos por ejemplo.

2.2.6. Propiedades farmacológicas de algunos metabolitos del propóleo

Fenoles

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza en el reino vegetal, todos ellos presentan un anillo bencénico que puede estar unido a grupos hidroxilos libres o combinados en forma de éster, éter, heterósidos, etc.

Las acciones más importantes de los ácidos fenólicos son la actividad antimicrobiana, preferentemente frente a bacterias Gram (+), utilizándose como antiséptico, desinfectante, antiinflamatoria, analgésica y antipirético²³.

En la industria, se emplea en la fabricación de plásticos y de diversos colorantes, también se emplea como anestésico local en aerosoles para la garganta irritada y como antiséptico en la cirugía²⁴.

Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en todas las partes de las plantas cumplen una función protectora de ella y sus frutos, además de ser responsables de la coloración de numerosas flores y ciertas frutas²⁵.

Por ejemplo, los flavonoides se encargan de proteger a los vegetales de la incidencia de rayos ultravioletas y visibles, protege a la planta de los insectos, hongos, virus y bacterias. También ejercen un efecto antioxidante, controlan la acción de hormonas vegetales, son atractivos de insectos polinizadores²⁵.

Se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta del ácido Shikímico y la ruta de los Policétidos). Los flavonoides son Compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C6-C3-C6, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los Policétidos y el B y la unidad C3 proceden de la ruta del ácido Shikímico. Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y, por tanto, son polifenólicas. Poseen un carbonilo en posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C3 y en el anillo B²⁶.

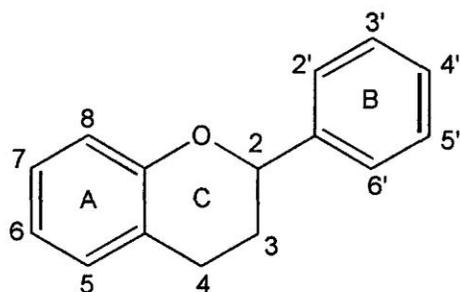


Figura 1. Esqueleto común de los flavonoides²⁶.

Desde el punto de vista de sus propiedades biológicas, numerosos estudios *in vitro* ponen de manifiesto que estos compuestos tienen efectos antioxidantes, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que los flavonoides potencialmente presentan numerosas actividades farmacológicas, destacando las acciones protectora vascular, antiaterogénica, antianginosa, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antialérgica, antiulcerosa y hepatoprotectora, entre otras²⁷.

2.3. Aparato respiratorio

Según su función el aparato respiratorio consta de dos partes: 1) La zona de conducción consiste en una serie de cavidades y tubos intercomunicados fuera y dentro de los pulmones -la nariz, la laringe (órgano de la voz), la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los bronquiolos terminales- que filtran, calientan y humectan el aire y lo conducen a los pulmones. 2) La zona respiratoria está constituida por tejidos dentro de los pulmones donde tiene lugar el intercambio gaseoso: los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alveolos, los sitios principales de intercambio de gases entre el aire y la sangre²⁸.

El aparato respiratorio también cumple en menor grado funciones endocrinas (producción y secreción de hormonas) y participa en la regulación de las respuestas inmunitarias a los antígenos inhalados²⁹.

2.3.1. Músculo liso de las vías aéreas

El músculo liso de las vías aéreas se extiende desde la tráquea hasta los bronquios terminales; se está contrayendo y relajando continuamente y el nivel del tono muscular determina el calibre de la vía aérea y, por consiguiente, la resistencia al flujo aéreo. Este tono muscular es el producto de influencias neuronales, hormonales e inflamatorias y de insultos químicos o farmacológicos. El broncoespasmo, la hiperreactividad y la hipertrofia e hiperplasia del músculo liso bronquial son hallazgos característicos del asma bronquial³⁰.

2.3.2. Control neuronal de las vías aéreas

El tono del músculo liso bronquial se encuentra regulado por el sistema nervioso autónomo, que contribuye a controlar el diámetro de las vías aéreas y por ende la resistencia de la vía aérea³¹.

La estimulación simpática en las vías aéreas causa broncodilatación. La circulación de sustancias adrenérgicas (epinefrina, isoproterenol o drogas simpaticomiméticas) causan una marcada broncodilatación porque tanto el epitelio bronquial como el músculo liso y las células cebadas contienen un gran número de receptores adrenérgicos β_2 que producen relajación del músculo liso en respuesta a estas sustancias³¹.

Son numerosas las evidencias que muestran que la excesiva actividad colinérgica es un factor importante en el asma. La acetilcolina liberada en los receptores mucarínicos causa broncoespasmo³⁰.

La tercera red neural en el pulmón se denomina sistema nervioso no adrenérgico no colinérgico (NANC). El NANC inhibitor contiene péptido intestinal vasoactivo (VIP) y óxido nítrico (NO) y probablemente es el único mecanismo neural broncodilatador en las vías aéreas. El VIP y el NO contrarrestan la broncoconstricción y funcionan como un mecanismo de control de los nervios colinérgicos³⁰.

2.4. Asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que se manifiesta como una obstrucción bronquial reversible en respuesta a diversos estímulos³².

La inflamación crónica está relacionada con hiperreactividad de la vía respiratoria que lleva a episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos³².

2.4.1. Patogénesis del asma

El asma es una enfermedad mediada por anticuerpos reagínicos (IgE), unidos a mastocitos en la mucosa de las vías respiratorias. En la reexposición al antígeno ocurre la interacción antígeno - anticuerpo lo que activa tanto la liberación de mediadores almacenados en los gránulos celulares³³.

Los agentes responsables de una acción temprana incluyen histamina, triptasa, u otras proteasas neutras; además leucotrienos C₄ y D₄ y prostaglandinas.

El asma es una enfermedad inflamatoria del árbol bronquial, caracterizada por hiperreactividad bronquial mediada por un infiltrado de eosinófilos y de otras células inflamatorias³³.

Inicialmente se produce un cuadro de broncospasmo como respuesta a la liberación de diferentes sustancias broncoactivas desde los mastocitos alveolares³³.

También se produce la liberación de factores quimiotácticos, que atraen a las células inflamatorias, responsables de mantener el broncospasmo y de producir otras manifestaciones como vasodilatación, edema de mucosa, daño epitelial con exposición de terminaciones nerviosas, hipersecreción de moco y, con el tiempo, hipertrofia e hiperreactividad de la musculatura lisa bronquial. Las células inflamatorias liberan a su vez factores quimiotácticos, que perpetúan la infiltración inflamatoria³³.

2.5. Histamina

La histamina (2-[4-imidazol] etilamina) es sintetizada y almacenada por mastocitos y basófilos. Los mastocitos constituyen la principal reserva de esta amina en los mamíferos. También es sintetizada en células nerviosas, monocitos, células T, etcétera³⁴.

Es sintetizada intracelularmente a partir del aminoácido L - histidina, mediante la L - histidina descarboxilasa, enzima que tiene mayor afinidad por la L - histidina que la enzima L - dopa descarboxilasa aunque ésta también puede sintetizar histamina³⁵.

Ha sido reconocida por mucho tiempo como un mediador de la respuesta alérgica. Se sintetizó en 1907 y su nombre deriva de la palabra griega *histos*, por estar presente en muchos tejidos. Henry Dale fue el primero en demostrar sus propiedades broncoconstrictoras y vasodilatación en animales y 13 años más tarde encontró que los síntomas producidos por la inyección de antígeno en animales, podían ser reproducidos por la inyección de histamina. La respuesta broncoespástica producida por la histamina inhalada ha sido usada como prueba para detectar el grado de hiperreactividad bronquial en el diagnóstico del asma. Los efectos de la histamina son múltiples y son mediados por su acción sobre cuatro tipos de receptores. Los H₁ que median la broncoconstricción y el aumento de la permeabilidad capilar, especialmente en las vías respiratorias altas, con producción de edema bronquial; también estimulan los receptores irritativos colinérgicos³⁰.

Los receptores H₂ no se han podido demostrar en el músculo bronquial, pero existen algunas evidencias de que en el epitelio bronquial estimulan la producción de la prostaglandina E, que protege contra la broncoconstricción al relajar el músculo liso bronquial. Producen también estimulación de la secreción mucosa del bronquio, la secreción gástrica y la quimiotaxis de basófilos.

Igualmente, realizan algunas acciones moduladores de la respuesta inmune en la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas y los granulocitos³⁰.

Los receptores H₃ son abundantes en el sistema nervioso central y periférico, modulan la neurotransmisión colinérgica e inhiben la liberación de neuropéptidos por los nervios sensoriales. También regulan la liberación de histamina y constituyen un mecanismo de retroalimentación que limita la secreción de histamina por el mastocito. Los receptores H₄ son más prominentes en las células hematopoyéticas medulares y periféricas, especialmente en eosinófilos, probablemente en mastocitos y basófilos³⁰.

2.6. Medicamentos utilizados en el tratamiento del asma

Desde el punto de vista clínico, los fármacos utilizados en el asma pueden ser clasificados en controladores y aliviadores (rescatadores)³².

2.6.1. Controladores

Son medicamentos que se toman a diario y en un tratamiento a largo plazo para mantener el asma bajo control clínico, por lo regular a través de sus efectos antiinflamatorios³².

A. Glucocorticoides

Su principal acción antiinflamatoria consiste en inhibir la liberación del ácido araquidónico en las membranas celulares y por eso disminuye la producción de leucotrienos y prostaglandinas, aunque hoy, la acción considerada como más importante es la inhibición de la producción de citocinas, las cuáles se cree que tengan una función central en la iniciación de la cascada inflamatoria producida por inhalación de antígenos e infección viral. La introducción de formas liposolubles, como beclometasona, triamcinolona, flunisolida, fluticasona y budesonida, hacen posible la llegada de los corticosteroides a las vías respiratorias³³.

B. Modificadores de leucotrienos

Estos fármacos ejercen una discreta actividad broncodilatadora (insuficiente para su uso en el tratamiento del broncoespasmo agudo), pero sobretodo tiene actividad antiinflamatoria. Ambos el montelukast y el zafirlukast, exhiben una rápida absorción oral³⁴.

C. Agonista β_2 de acción prolongada

Los más utilizados son salmeterol y formoterol, producen relajación del músculo liso bronquial por activación de la adenilato - ciclasa que incrementa la producción de monofosfato de adenosina cíclico, inhiben la liberación de los mediadores de la célula cebada, disminuyen la permeabilidad vascular y aumentan la aclaración mucociliar³².

D. Cromonas

Inhiben la respuesta inflamatoria tardía y la consiguiente hiperreactividad bronquial, lo que implica una acción adicional sobre otras células inflamatorias asimismo, inhiben la liberación de histamina, leucotrieno C_4 y prostaglandina D_2 , factores quimiotácticos, etc. Su acción antiasmática es eminentemente preventiva, protegiendo a los pacientes susceptibles frente a diversos estímulos provocadores de asma los fármacos representativos son cromoglicato disódico y nedocromilo³⁵.

E. Metilxantinas.

Son fármacos que producen relajación directa del músculo liso bronquial. Inhiben la fosfodiesterasa, una enzima que degrada al AMPc³⁶.

2.6.2. Medicamentos aliviadores (rescatadores)

Son fármacos empleados por necesidad, ya que actúan con rapidez al revertir la broncoconstricción y aliviar los síntomas³².

A. Agonistas β_2 inhalados de acción corta

Son los medicamentos de elección para aliviar el broncoespasmo en las exacerbaciones agudas del asma y para el pretratamiento de broncoconstricción inducida por el ejercicio. Deben ser usados por razón necesaria a dosis baja y con mínima frecuencia. El prototipo es el salbutamol³².

a. Salbutamol

Es un agonista β_2 selectivo de acción corta,³⁷ ampliamente utilizado para aliviar síntomas de asma agudo severo y para la prevención de asma nocturna y producidos por el ejercicio. Se utiliza para prevenir y tratar todo tipo de broncoespasmos³⁵.

Es conocido también como albuterol causa la relajación de la musculatura bronquial y uterina, los vasos periféricos se dilatan, aumentan la frecuencia cardiaca, aumenta el movimiento ciliar mejorando la eliminación de moco,³⁸. Los preparados del salbutamol se encuentran en aerosol (0,1 mg/dosis), jarabe (2mg/5ml), tabletas (4 mg) y ampolla (0,5 mg)³⁹.

Mecanismo de acción del salbutamol

Estimula los receptores β_2 adrenérgico que se localizan en el músculo liso bronquial,³² actúan facilitando la unión de una molécula de guanosina tri - fosfato (GTP) a la proteína G con la consiguiente activación de la misma incrementando, a su vez, la actividad de una adenilciclase. Esta enzima cataliza la reacción que da lugar a la síntesis de adenosina mono - fosfato cíclico (AMPC) a partir de una molécula de adenosina tri - fosfato (ATP). La acumulación intracelular de este segundo mensajero genera la activación de proteín kinasas que facilitan la fosforilación de diversas enzimas que median las respuestas características del estímulo del receptor a β_2 adrenérgico,⁴⁰. Además impide la liberación de mediadores por parte de los mastocitos y otras células proinflamatorias de la mucosa bronquial⁴¹.

Se ha referido efectos secundarios frecuentes como palpitaciones, nerviosismo, taquicardia y, con menor frecuencia, arritmias cardiacas, insomnio, cefalea, temblor fino, calambres musculares e hipopotasemia³⁴.

B. Anticolinérgicos

Son broncodilatadores eficaces, inhiben de manera competitiva el efecto de la acetilcolina en los receptores muscarínicos y pueden bloquear de modo eficaz la contracción del músculo liso de las vías respiratorias y el aumento en la secreción de moco que se presenta en respuesta a la actividad vagal. Este grupo está conformado por bromuro de ipratropio, tiotropio y la atropina⁴².

C. Simpaticomiméticos

Relajan el músculo liso de las vías respiratorias. Inhiben la liberación de algunas sustancias broncoconstrictoras a partir de células cebadas. Aumentan el transporte mucociliar. Modifican la composición de las secreciones mucosas. Estimulan la adenilciclasa y catalizan la formación de AMPc en los tejidos de las vías respiratorias. Los Simpaticomiméticos más utilizados en el tratamiento del asma incluyen adrenalina, efedrina e isoproterenol³³.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes de Farmacología y Farmacognosia, de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de julio a diciembre del 2013.

3.2. Materiales

3.2.1. Población

Propóleo de *Apis mellifera* "abeja" que se produce en el distrito de Chalhuanca una altura de 2 897 m.s.n.m., provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

3.2.2. Muestra

Se utilizó dos kg de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" (en bruto) recolectado de 30 colmenas en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes, el sistema de muestreo fue por conveniencia.

3.2.3. Animales de experimentación

Se extrajo la tráquea de 15 cobayos *Cavia porcellus* de la misma edad, sexo (macho) entre 600 +/- 50 g, procedentes del Instituto Nacional de Investigación Agraria - Ayacucho, los mismos que fueron acondicionados con alimentación balanceada y agua a libertad en el bioterio del Laboratorio de Farmacología del

área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.3. Diseño metodológico: básico – experimental.

3.3.1. Procedimiento metodológico para la recolección de datos

3.3.1.1. Recolección, selección y secado de la muestra

El propóleo se recolectó de la colmena en las horas de la mañana en un clima templado, durante el mes de julio del 2013; empleando el método de recolección raspado directo con espátula de todos los lugares de la colmena en los cuales las abejas hayan depositado el propóleo tratando que el producto permanezca en forma de escamas o trozos (Anexo 2).

La muestra recolectada se depositó en una bolsa plástica oscura y luego procedió a la limpieza minuciosa con ayuda de una pinza para retirar los trozos de madera, astillas de la colmena, abejas muertas, etc.

Una vez seleccionada la muestra se dejó secar en la sombra en una habitación ventilada alejado de la luz en un recipiente de vidrio, aproximadamente por 15 días para luego ser conservado en frascos de vidrio color ámbar a temperatura ambiente.

3.3.1.2. Preparación de la tintura madre de propóleo

Para la preparación de la tintura madre previamente se redujo a polvo toda la muestra. Para facilitar la molienda se hizo un tratamiento con frío, congelando (5 a 10°C) como mínimo 2-3 horas, con la cual se logró una consistencia sólida, para luego ser molido.

Posteriormente se sometió a una maceración del propóleo en proporción 1:1 peso/volumen, con alcohol etílico de 96° durante 30 días y agitando cada día una media hora aproximadamente.

Se procedió a filtrar en frío previa refrigeración a 8°C aproximadamente para la remoción de ceras consiguiéndose así la tintura madre de propóleo.

3.3.1.3. Preparación del extracto blando de propóleo

Se concentró la tintura madre de propóleo en baño maría a 37°C aproximadamente. Una vez obtenido el extracto blando, se envasó en un frasco de vidrio herméticamente cerrado (Anexo 3) la cual se embolsó con cinta negra aislante para que no entrara la luz y se conservó en la refrigeradora hasta su empleo.

3.3.1.4. Evaluación de las características organolépticas

La evaluación de las características organolépticas (Tabla 1) se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, cuyo análisis se efectuó a través de una evaluación sensorial⁴³.

3.3.1.5. Determinación de las características físico - químicas

Se realizó siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar⁴³.

a. Determinación de humedad

Se pesó 5 g de la muestra en una luna de reloj, previamente tarada y secada; luego se desecó a 105°C, durante 3 horas, luego se enfrió a temperatura ambiente en un desecador y se pesó, colocándolo nuevamente en la estufa durante 1 hora y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

b. Determinación de cenizas

Se pesó 3 g del extracto hidroalcohólico de propóleo concentrado en un crisol de porcelana previamente incinerado y tarado, luego el crisol y la muestra se calentó suavemente en una cocinilla hasta carbón, luego se incineró a 500°C, en mufla por 3 horas se enfrió en el desecador, se pesó y se calculó mediante la siguiente fórmula:

M = Masa del crisol vacío (g).

M_1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g).

M_2 = masa del crisol con la muestra (g).

100 = Factor matemático para los cálculos.

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

c. Determinación de sólidos totales

Se colocó 5.0 ml de la muestra en una cápsula previamente tarada, luego se evaporó en una estufa a 105°C hasta peso constante (aprox. 3 horas), se retiró la cápsula de la estufa y se colocó en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente, luego se pesó.

Se realizó el cálculo mediante la siguiente fórmula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Dónde:

Pr = Masa de la cápsula más el residuo (g).

P = Masa de la cápsula vacía (g).

V = Volumen de la porción de ensayo.

100 = Factor matemático para el cálculo.

3.3.1.6. Tamizaje fitoquímico

Las reacciones de identificación de los diferentes metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico se realizó siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar⁴³.

3.3.1.7. Fármaco de referencia

Cien tabletas salbutamol de 4 mg, fabricado por Laboratorios Medrock S.A.C., N° de lote 107312.

3.3.1.8. Preparación de la solución patrón

Se preparó la solución patrón utilizando como vehículo agua destilada, en la cual se pesó 20 mg de salbutamol por cada 10 ml de agua destilada.

3.3.1.9. Determinación de la actividad broncodilatadora

Fundamento: La metodología que se empleó para la determinación de la actividad broncodilatadora se basa en el método utilizado por Jagdish *et al.*,¹⁰ modificado. Consiste en la inducción de broncoconstricción de los anillos traqueales aislado de cobayos conservados en el medio nutricio de Tyrode (Anexo 7 y 8) con histamina y evaluación del efecto broncodilatador con la sustancia problema, utilizando como patrón de referencia salbutamol.

Materiales

- Histamina, se preparó en agua destilada a una concentración de 5×10^{-4} M.
- Cien tabletas de salbutamol 4 mg (Laboratorios Medrock Corporation S.A.C.). Las cuales se ha preparado en una proporción de veinte miligramos por cada 10 ml de agua destilada y luego se filtró obteniéndose así la solución patrón de salbutamol.
- Extracto hidroalcohólico de propóleo *Apis mellifera* "abeja" a diferentes concentraciones: 5%, 10% y 15%, que se prepararon con medio nutricio de Tyrode.

Procedimiento

Se suspendió la alimentación de los animales con 24 horas de anticipación siendo mantenidas con agua a voluntad. Para iniciar el trabajo se encendió y calibró el quimógrafo automatizado Panlab Harvad (Anexo 6), luego se sacrificó a los cobayos por traumatismo encéfalo craneano, se abrió la cavidad torácica y se extrajo la tráquea que fue sumergida de inmediato en la solución nutritiva Tyrode a 37°C, se lavó cuidadosamente y luego se cortó transversalmente entre los cartílagos para dejar libres los anillos traqueales. Amarrar estos anillos con

seda quirúrgica por su parte cartilaginosa y muscular incluido de tal manera que formen una cadena con sus partes musculares alternamente opuestas. Transferir al baño de órganos aislados los cuales fueron fijados con seda quirúrgica, por un extremo a un transductor y por el otro a la cámara para órgano aislado, con 25 ml de solución Tyrode, burbujeo constante y a 37°C (Anexo 7). Se encendió el software (LarChart) y a los 4 minutos aproximadamente se adicionó 1 ml de histamina 5×10^{-4} M y se dejó en observación por 4 minutos aproximadamente (Grupo I) (Anexo 15). Para el caso de los Grupos II, III IV y V, se hizo un registro control durante 4 minutos aproximadamente y después se agregó 1 ml de histamina al baño que permaneció en contacto con los anillos traqueales durante 4 min aproximadamente, luego se adicionó 1 ml de salbutamol, extracto al 5%, 10% y 15% respectivamente para cada grupo y se dejó en observación durante 20 minutos más. Todos los cambios y movimientos fueron captados por un transductor y registrados en la computadora (Anexo 16, 17 y 18).

Para cada uno de los grupos se utilizaron tejidos recién obtenidos y se acondicionaron aproximadamente por 10 min. Se realizaron cinco repeticiones por grupo, la dosis óptima de histamina y de salbutamol se determinaron en experiencias previas.

3.4. Diseño experimental

Las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" fueron sometidas a la evaluación del efecto broncodilatador. Los animales de experimentación se dividieron utilizando un diseño completamente aleatorizado en cinco grupos de cinco repeticiones cada una; procediéndose de la siguiente manera:

- Grupo I: Tratado con 1 ml solución de Histamina 5×10^{-4} M , blanco.
- Grupo II: Tratado con 1 ml solución de salbutamol 20mg/10ml, control.

- Grupo III: Administrando 1 ml del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* a una concentración al 5%.
- Grupo IV: Administrando 1 ml del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* a una concentración al 10%.
- Grupo V: Administrando 1 ml del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* a una concentración al 15%.

3.5. Análisis de datos

Se determinó el promedio de las diferencias de tensión generada con histamina, salbutamol y extracto hidroalcohólico de "*Apis mellifera* "abeja" (5%, 10% y 15%). También se calculó el promedio y los valores de dispersión del número de las contracciones y las alturas alcanzadas (mm) por éstas para cada uno de los tratamientos. Los resultados se presentaron comparativamente en cuadros y gráficos estadísticos y fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) que permitió determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias intergrupos se analizaron por la prueba de Tukey, para el estudio se utilizó un nivel de confianza $p < 0,05$; el software estadístico SPSS versión 20,0.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Características organolépticas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

| Características | Descripción |
|------------------------|---|
| Aspecto externo | Enteras y granos briqueteados. |
| Estructura | Heterogénea, presencia de impurezas. |
| Color | Pardo oscuro casi negro. |
| Olor | Característico, resinoso y aromático. |
| Sabor | Amargo picante. |
| Consistencia | A temperatura superior a 20°C, es viscoso, blando y pegajoso, a temperatura menor de 15°C es duro quebradizo. |

Tabla 2. Características físico - químicas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

| Características | Resultados |
|------------------------|-------------------|
| Humedad | 4,264% |
| Cenizas totales | 1,290% |
| Sólidos totales | 17,188% |

Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

| Metabolitos secundarios | Ensayo | Resultados | Observación |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Triterpenos y/o esteroides | Lieberman-Burchard | +++ | Rosado a rojo |
| Catequinas | Catequinas | +++ | Verde carmelita |
| Resinas | Resinas | +++ | Precipitado |
| Azúcares reductores | Benedict | ++ | Precipitado rojo |
| Fenoles y/o Taninos | Cloruro férrico | +++ | Verde azulado |
| Flavonoides | Shinoda | +++ | Rojo |
| Flavonoides | Antocianidinas | +++ | Rojo a marrón |

Leyenda :

(+++) : Abundante

(++) : Moderado

(-) : Leve

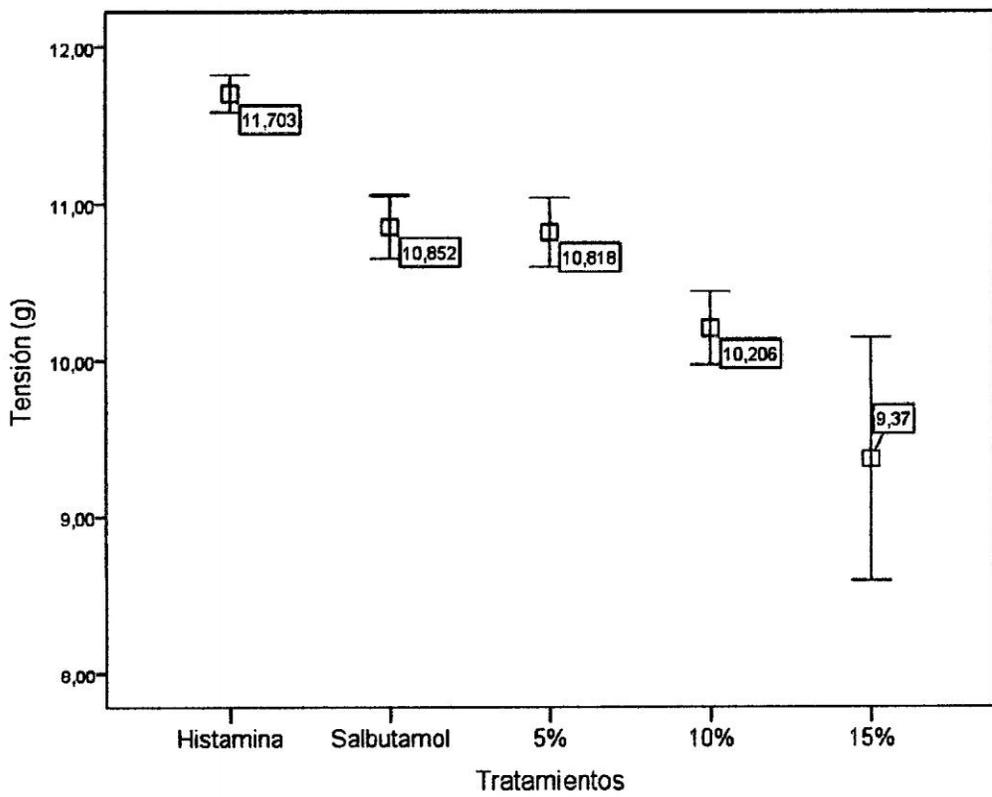


Figura 2. Tensión (g) de la contracción de los anillos traqueales según tratamientos.

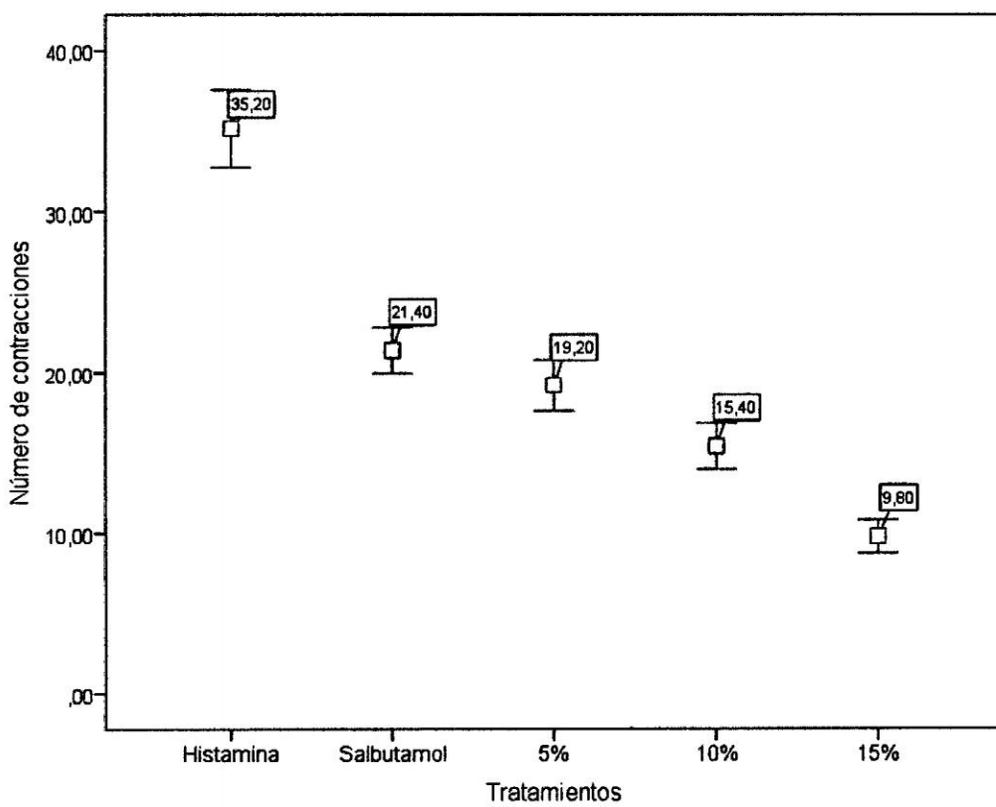


Figura 3. Número de contracciones de los anillos traqueales en respuesta a los tratamientos.

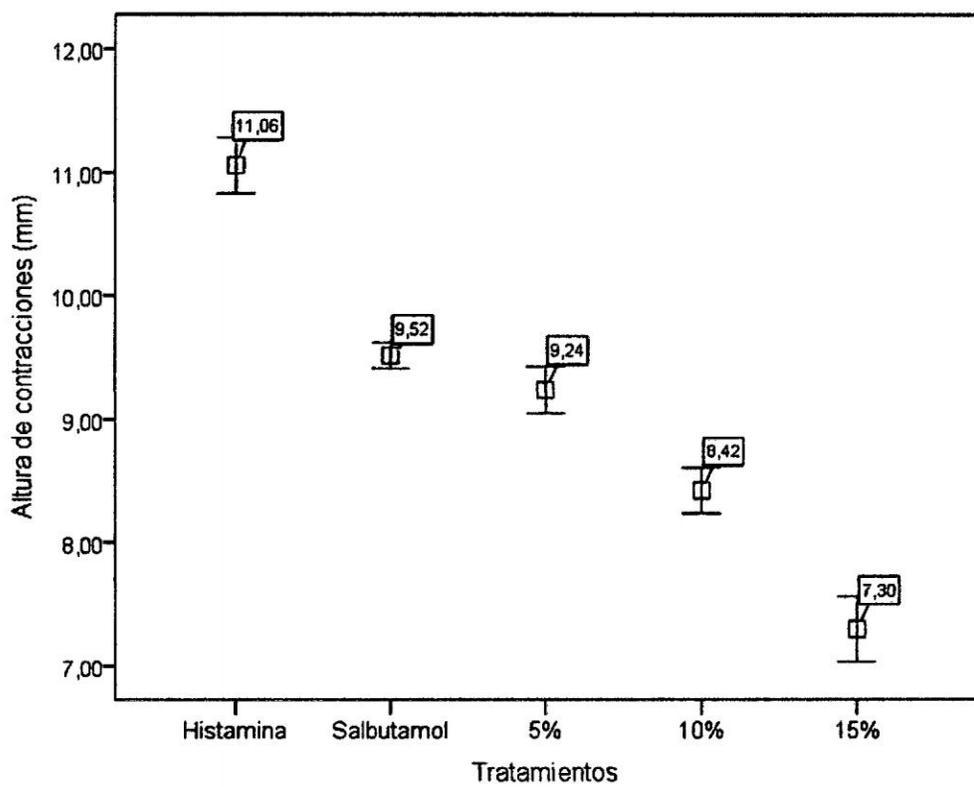


Figura 4. Altura de las contracciones de los anillos traqueales en respuesta a los tratamientos.

V. DISCUSIÓN

Para determinar el efecto broncodilatador de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" objeto del presente estudio se procedió a realizar la preparación de tintura madre el cual se sometió a maceración con alcohol etílico de 96° a partir de ello se obtuvo el extracto blando de propóleo con el cual se realizó el estudio (Anexo 1 y 7).

La extracción con etanol de 96° se hizo teniendo en cuenta que es el disolvente más usado y adecuado para realizar la extracción de metabolitos presentes en el propóleo; además de que se extrae la mayor diversidad de compuestos químicos presentes en las drogas¹⁴.

Las características organolépticas del propóleo en bruto según estudio de diversos autores varían según el clima, el área geográfica, la latitud; asimismo estos factores determinan las propiedades del propóleo⁷.

En la Tabla 1 el propóleo presenta un aspecto externo entero con granos briqueteados de estructura heterogénea con presencia de impurezas, de color pardo oscuro casi negro, olor característico resinoso y aromático, sabor amargo picante. La consistencia a temperatura superior a 20°C es viscoso, blando y pegajoso, a temperatura menor a 15°C es duro quebradizo.

En nuestro país podemos encontrar diferentes tipos de propóleo de acuerdo a la ubicación geográfica de su producción, donde la altura de la zona de recolección

y la escasa o nula contaminación de la región son características que le confieren un valor agregado al propóleo peruano⁵.

Con respecto a las características físico - químicas del propóleo presentes en la Tabla 2 se observa la presencia de humedad de 4,264%, cenizas totales 1,290% y sólidos totales 17,188%; estos valores indican que la muestra analizada cumple con la normativa vigente del Ministerio de Agricultura de Brasil,⁴⁴ que indica que la humedad no debe ser superior al 8%, cenizas totales 5% y sólidos totales 40%. Además afirma Martínez,¹⁹ que entre menos humedad contenga la muestra presentará mayor concentración de compuestos bioactivos.

En el tamizaje fitoquímico (Anexo 4), los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de propóleo se determinaron utilizando pruebas específicas de coloración y precipitación,⁴³ donde se encontró abundante presencia de triterpenos y/o esteroides, catequinas, resinas, fenoles, y/o taninos y flavonoides; Chong,⁴ señala la presencia de resinas, flavonoides, compuestos fenólicos antocianinas y cumarinas, pero en el presente estudio no se evidenció la presencia de cumarinas como afirma Chong.

Medina,⁷ evidenció mediante ensayos cromatográficos (CCF) y UV - visible la presencia de flavonoides como crisina, galangina, pinosembrina y apigenina aislados de propóleo.

La presencia de flavonoides en el propóleo permite sospechar que debe existir una actividad biológica en las células debido a las propiedades conocidas por estos compuestos⁶.

Así mismo según Ferré en el 2004,²⁰ algunos de los componentes fenólicos del propóleo, como el ácido caféico y el éster del ácido fenil - etil caféico, la quercetina y la naringenina, ejercen efectos antiinflamatorios y actúan sobre la producción de eicosanoides, tanto *in vitro*, suprimiendo la generación de

prostaglandinas y de leucotrienos en macrófagos peritoneales, como *in vivo*, en la inflamación peritoneal aguda inducida por la zimosina²⁰.

El propóleo por vía oral suprime de forma significativa la vía de la lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico y, el éster del ácido fenil - etil caféico es, de entre los componentes conocidos del propóleo, el modulador más potente de la cascada del ácido araquidónico. Ambos productos disminuyen la actividad de la ciclooxigenasa en macrófagos, medida en función de la producción de prostaglandina E₂, y protegen, al tejido cartilaginoso y a los condrocitos humanos, de los daños producidos por la interleuquina-1 β ²⁰.

Este es el caso de la miricetina y la quercetina que, a concentraciones relativamente altas, son capaces de bloquear *in vitro* los mecanismos de acción de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, mientras que a concentraciones bajas inhiben sólo la acción de la lipoxigenasa. Estas propiedades antiinflamatorias también se han demostrado *in vivo* para numerosos flavonoides en distintos modelos de inflamación aguda y/o crónica. Entre ellos cabe mencionar: la nepetina, apigenina, rutina, crisina, quercetina, quercitrina y luteolina⁴⁵.

Por lo expuesto se puede inferir que el propóleo no tiene un mecanismo específico de ser un broncodilatador, pero la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos son los que le confieren propiedades terapéuticas.

El ensayo farmacológico se realizó teniendo en cuenta que los anillos traqueales aislados de cobayo mantienen su función de contracción y relajación cuando se encuentran inmersos en soluciones adecuadas Jagdish *et al.*,¹⁰ por tal motivo los anillos traqueales se mantuvieron todo el tiempo inmerso en la solución de Tyrode a 37°C con una adecuada oxigenación constante en todo momento desde su aislamiento.

Los resultados se observaron en la computadora gracias al software (LabChart) la que muestra la contracción y relajación del órgano aislado la cual modifica la

tensión mecánica que ejerce, la que es convertida en señal eléctrica mediante un transductor de tensión; esta señal es ampliada y registrada para cuantificar los cambios de tensión ejercida por el órgano aislado.

En la Figura 2, se observó que el extracto hidroalcohólico de propóleo a la concentración de 5% redujo a 10,818 g la tensión generada por la histamina presentando un efecto similar a la del salbutamol (10,852 g), a diferencia de las que presentaron las concentraciones de 10% y 15% que redujeron aún más la tensión a 10,206 g y 9,371 g respectivamente. Estableciéndose así una relación dosis - respuesta puesto que a mayor dosis se obtuvo una mayor disminución de la tensión generada. La prueba de Tukey (Anexo 10) corrobora lo mencionado, donde el extracto de propóleo al 5% y el salbutamol poseen el mismo efecto farmacológico con respecto al grado de tensión.

Mientras en la Figura 3 se observa el número de contracciones generados por los tratamientos en la que se ve, que el salbutamol disminuye el número de contracciones generada por la histamina en un número de 21,40 seguida por el extracto de propóleo al 5% en 19,20 y de las concentraciones de 10% y 15% con 15,40; 9,80 respectivamente. La prueba de Tukey (Anexo 12) demuestra que el extracto de propóleo al 5% y el salbutamol tienen semejante efecto farmacológico con respecto al número de contracciones.

En la Figura 4, se observa que las alturas alcanzadas por las contracciones son más pequeñas en los tratamientos con salbutamol (9,52 mm) y las concentraciones al 5%, 10% y 15% que muestran alturas de 9,24; 8,42 y 7,30 mm respectivamente, a comparación del tratamiento con histamina que alcanzó una altura de 11,06 mm. Con respecto a la prueba de Tukey (Anexo 14) muestra que el salbutamol y el extracto de propóleo al 5% tienen respuestas estadísticamente semejantes.

Con respecto al análisis de varianza del grado de tensión, el número y altura de contracciones (Anexo 9,11 y 13) muestran que existen diferencias significativas en los diferentes tratamientos, mostrando que las tres concentraciones trabajadas tienen efecto broncodilatador.

Bautista,⁸ determinó el efecto broncodilatador del extracto fluido de *Menta aff. arvensis L.* "hierba buena" en tráquea aislada de cobayo y reportó que el extracto fluido al 10% y 15% presentan valores de disminución estadísticamente similares. El extracto fluido al 20% y el salbutamol 2mg/5ml presentan una disminución de la respuesta contráctil estadísticamente similares ($p > 0,05$).

En el presente trabajo el extracto de propóleo al 5% es estadísticamente similar al salbutamol (20mg/10ml), además que el extracto de propóleo al 15% disminuye aún más el número de contracciones (Figura 3), pero también se observa un inconveniente que conforme va pasando el tiempo va disminuyendo el número y la altura de contracciones; esto podría deberse a que no presenta mucha afinidad a los receptores histaminérgicos o presenta otro tipo de receptores.

La histamina es uno de los principales mediadores de la inflamación en la fase inmediata del asma, causando la incapacidad de respuesta de las vías respiratorias produciendo hiperinflamación de las vías bronquiales. Chhaya et al.,⁹ determinó que en los modelos del músculo liso en PAL posee eficacia inhibitoria por 100% (1 μ g), 133% (2 μ g) y 126% (4 μ g) en el íleon de cobayo frente a 1 μ g de histamina; mientras en cadena traqueal el 86% (1 μ g), 100% (2 μ g) y 106% (4 μ g) frente a 1 μ g de histamina y en tira de fondo del ojo de rata 50% (1 μ g), 75% (2 μ g) y 100% (4 μ g) frente a un μ g de 5HT.

Esto nos permite corroborar que el conejillo de indias es altamente sensible a la histamina debido a la presencia de receptores histaminérgicos en el íleon y en el músculo liso traqueal.

También se puede mencionar que Jagdish *et al.*,¹⁰ demostró la actividad antiasmática de *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Arn leaves. Demostrándose así que 10 µg/ml de histamina produce contracción del íleon aislado y el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Leptadenia reticulata* a una concentración 0,8 mg/ml inhibió significativamente ($p < 0,01$) el efecto contráctil de la histamina. Así como también la histamina a la misma dosis administrada en cadena traqueal con el mismo extracto a una dosis de 1,2 mg/ml inhibió significativamente ($p < 0,01$) el efecto contráctil de la histamina. La actividad biológica se hace responsable a la presencia de flavonoides y saponinas identificadas en el extracto.

En el estudio *in vitro* se han encontrado que el 1,8 - cineol tiene efectos farmacológicamente importantes: relaja los músculos lisos de la tráquea de cobayos manteniéndolas un bajo tono basal, tiene propiedades antiinflamatorias significativas a través de su capacidad para reducir los niveles de los marcadores de procesos inflamatorios en las vías respiratorias. Cuando se realizó la respuesta contráctil con la histamina se realizó en tráquea aislada de cobayos el 1,8 - cineol era capaz de relajar la contracción lo que indica que su efecto relajante muscular también puede estar presente en la fase inicial broncoconstrictora¹¹.

Finalmente a condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" ha evidenciado tener efecto broncodilatador a la concentración de 5% el cual presenta un efecto similar al del salbutamol; pero debe tenerse cuidado ya que a medida que pasa el tiempo va disminuyendo aún más el número de y altura de contracciones.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" tiene efecto broncodilatador, por disminuir la tensión, número y altura de las contracciones generadas tras la administración de histamina.
2. Se determinó las características organolépticas y físico - químicas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".
3. Se logró identificar la presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de propóleo como: triterpenos y/o esteroides, catequinas, resinas, fenoles, y/o taninos, flavonoides y azúcares reductores.
4. El extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" al 15% presenta mayor efecto broncodilatador.
5. El extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" al 5% tiene efecto similar al salbutamol con respecto al grado de tensión, número y altura de contracciones.

VII. RECOMENDACIONES

1. Aislar y elucidar las estructuras de los flavonoides presentes en propóleo de *Apis mellifera* "abeja".
2. Realizar el análisis microbiológico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".
3. Estandarizar el propóleo apurimeño, de acuerdo a las normas internacionales.
4. Complementar el estudio toxicológico de la actividad broncodilatadora del extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".
5. Evaluar el posible mecanismo de acción.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud [OMS] datos sobre el asma [revista en internet]. 2011 [acceso, 20 de Octubre del 2013]; Disponible en <http://www.who.int/features/factfiles/asthma/es/index.html>.
2. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* [revista en internet]. 2002 [acceso, 22 de setiembre del 2013]; 73 Suppl. 1, S1-S6. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12>.
3. Gómez C, Gómez R, Arráez R, Segura C, Fernández G, Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [revista en internet]. 2006 [acceso, 22 de Setiembre del 2013]; 4 (3):728-736. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506002536>.
4. Chong A. Formulación y evaluación de la actividad antitusígena del jarabe elaborado a base de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja". [Tesis pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2008.
5. Reyes C. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. [Tesis pregrado]. Lima: UNMSM; 2010.
6. Ángel C. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá. [Tesis de maestría]. Colombia: UN; 2012.
7. Medina A. Flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad [Tesis pregrado]. Chile: Universidad Austral de Chile; 2012.
8. Bautista L. Evaluación del efecto broncodilatador del extracto fluido de *Mentha aff. arvensis* L. "hierba buena" en tráquea aislada de *Cavia porcellus* "cobayo" [Tesis pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2012.
9. Chhaya K, Shobharam S, Lokesh D, Actividad antiastmática del extracto metanólico de *Physalis angula* Linn. *Revista internacional Journal of Medicinal Plants Research*. [revista en internet]. 2011 [acceso, 18 de Julio de 2013]; Vol. 5(22), pp. 5351-5355. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jE0J8DFH9koJ:www.researchgate.net/publication/252931633_Antiasthmatic_activity_of_the_methanolic_extract_of_Physalis_angulata_Linn/file/3deec51f57638a9ee2.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe&client=firefox-a.
10. Jagdish B, Sandip A. Antiasthmatic Activity of *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Am leaves. *International Conference on Applied Mathematics and Pharmaceutical Sciences (ICAMPS)* [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 agosto del 2013]; 3: 335-339. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jE0J8DFH9koJ:www.researchgate.net/publication/252931633_Antiasthmatic_activity_of_the_methanolic_extract_of_Physalis_angulata_Linn/file/3deec51f57638a9ee2.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe&client=firefox-a.
11. Vasco P. Acción Broncodilatadora y antiinflamatoria del 1,8 - cineol en modelo experimental de asma en cobayos. [Tesis de doctorado]. Brasil: Universidad Federal de Ceará; 2009.
12. Vázquez J. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola I - Cuenca del Salado, PCIA. *Revista Buenos Aires Plant Med* [revista en internet]. 2011 [acceso, 12 de setiembre del 2013]; 1 (1): 132-150. Disponible en: <http://riunet.upv.es/handle/10251/12264>.

13. Castillo G, Woolrich Z. Identificación química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector UV de extractos etanólicos de propóleos recolectados en la zona córdoba-orizaba. [Tesis pregrado]. México: Universidad Veracruzana; 2009.
14. Luna L. Estudio del efecto de dos promotores inmunológicos de origen natural (propóleo, polen) y su incidencia en la producción de pollos de engorde, en el sector el Tejar, provincia de Imbabura. [Tesis pregrado]. Ecuador: PUSE-SI; 2011.
15. Palomino G. Caracterización físico - química y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. [Tesis de Maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia sede en Medellín; 2009.
16. Galarza R. Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentes en metritis puerperal bovina. [Tesis de maestría]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2013.
17. Campo F. Estudio Químico de Propóleos Rojos Cubanos. [Tesis de Doctorado]. Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de La Habana; 2007.
18. López V, Ubillús C. Estandarización del propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. [Tesis pregrado]. Lima: UNMSM; 2004.
19. Martínez G. Caracterización físico - química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. [Tesis de Maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia sede en Medellín; 2009.
20. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* [revista en internet]. 2004 [acceso 18 de noviembre del 2013] 45:1,21 - 43. Disponible en [http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/28176/1/Ars%20Pharm%202004%3B45\(1\)21-43.pdf](http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/28176/1/Ars%20Pharm%202004%3B45(1)21-43.pdf).
21. Hernández A, Rocha R. Manual de prácticas de producción apícola. Universidad Autónoma de Aguascalientes: Centro de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Zootecnia, Aguascalientes. México; 2007.
22. Rodríguez M. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaeróbicas frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical. [Tesis pregrado]. Lima: UNMSM; 2007.
23. Villar del Fresno A. *Farmacognosia General*. España: Síntesis; 1999.
24. Martínez S, Adela M. *Física y Química aplicada a la informática 1ª ed.* Buenos aires: Thomson Learning; 2006.
25. Cruz G. Relación Flavonoides Totales - Actividad Antidiabética (*in vitro* por difusión de glucosa) en extractos de *Colubrina elliptica*. [Tesis de pregrado]. México: Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2012.
26. López L. Flavonoides. *OFFARM*. Vol 21 núm. 4 abril: 108-114. México; 2002.
27. Bruneton J. *Flavonoides. Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas Medicinales, 2ªed.* Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España; 2001.
28. Tortora J, Derrickson B, Dvorkin M. *Principios de Anatomía y Fisiología. 11a ed.* México: Editorial Médica Panamericana; 2006.
29. Ross M, Wojciech P. *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5a ed.* Argentina Editorial Médica Panamericana; 2008.
30. Consuegra E, Salgado E, Salgado A. *Asma Bronquial. 2ª ed.* Colombia. Editorial Médica Panamericana; 2004.
31. Segarra E. *Fisiología de los Aparatos y Sistemas.* Ecuador: Imprenta de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca; 2006.

32. Pierre M. Manual de farmacología básica y clínica. 5ª ed. México. Editorial MC Graw - Hill Interamericana; 2010.
33. Tinco J. Farmacología básica y avanzada .1a ed. Vol. 2. Perú. AMI Ayacucho E.I.R.L; 2012.
34. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M Portolés A. Velázquez Farmacología. 18ª ed. España: Médica Panamericana; 2008.
35. Flores J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana 5ª ed. Barcelona: Editorial Elsevier Masson; 2008.
36. Hitner N, Nagle B. Introducción a la farmacología. 5ª ed. México: Editorial MC Graw - Hill Interamericana; 2005.
37. Tejada M. El paciente agudo grave. España: Editorial Masson S.A.; 2005.
38. Cotillo P. Atención farmacéutica Bases farmacológicas. Perú: Fondo editorial de UNMSM; 2004.
39. Schneider C, Bojacá M, Jaramillo A. Vademécum farmacológico peruano. Perú. Editorial Lexus; 2006.
40. Duran M. Farmacología para fisioterapeutas. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.
41. Torres A, Ortiz I. Cuidados intensivos respiratorios para enfermería. Barcelona: Editorial Springer - Verlag Ibérica; 1997.
42. Page C, Cuetis A, Sutter M.Hoffman. Farmacología integrada. España: Editorial Harcourt; 1998.
43. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana; 2000.
44. Ministerio de Agricultura del Brasil. Instrução Normativa nº 3 - ANEXO VI Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 19 jan. 2001. [Acceso 18 de noviembre del 2013] Disponible en <http://www.apacame.org.br/mensagemce/60/normas.htm>.
45. Bonkanka T. Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. [Tesis de doctorado]. España: Universidad de la Laguna - Caja Canarias; 2007.

ANEXOS

Anexo 1

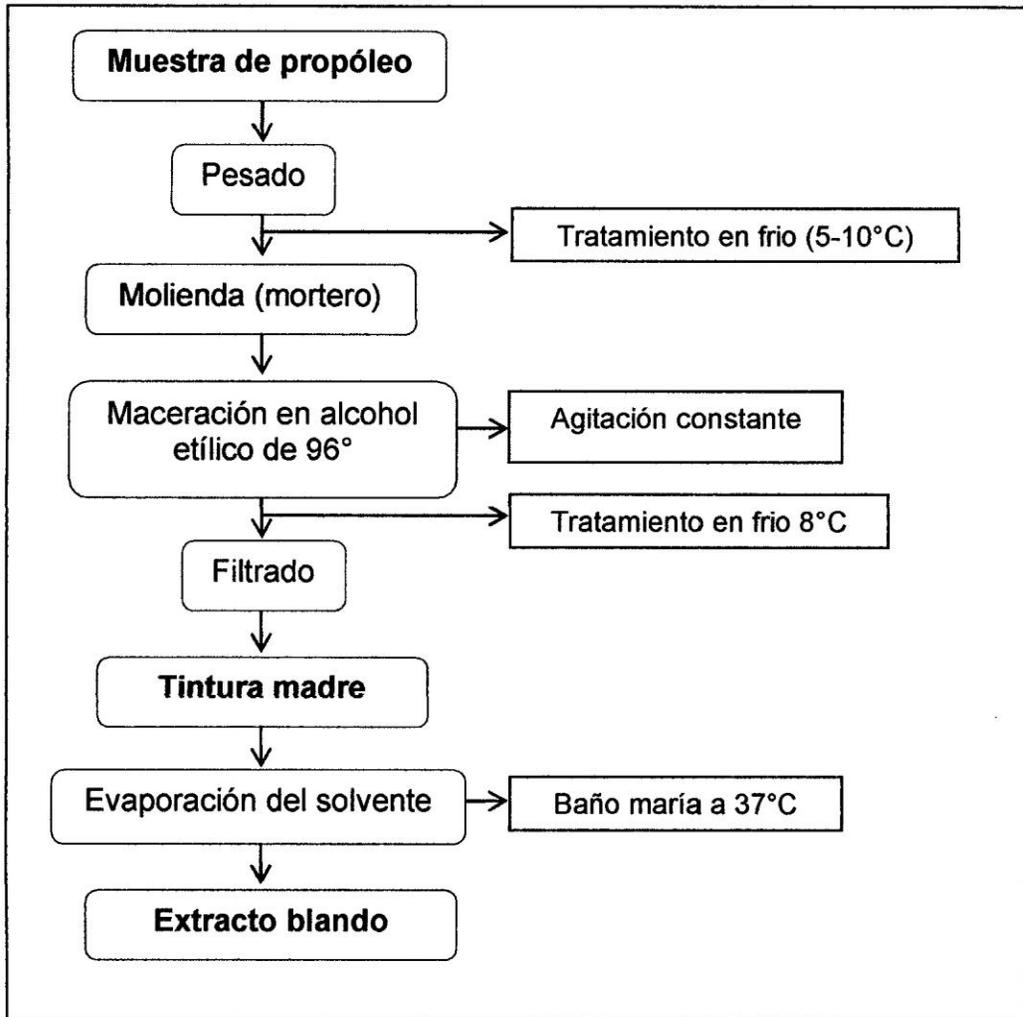


Figura 5. Esquema de la obtención del extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" del distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

Anexo 2



Figura 6. Recolección del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

Anexo 3

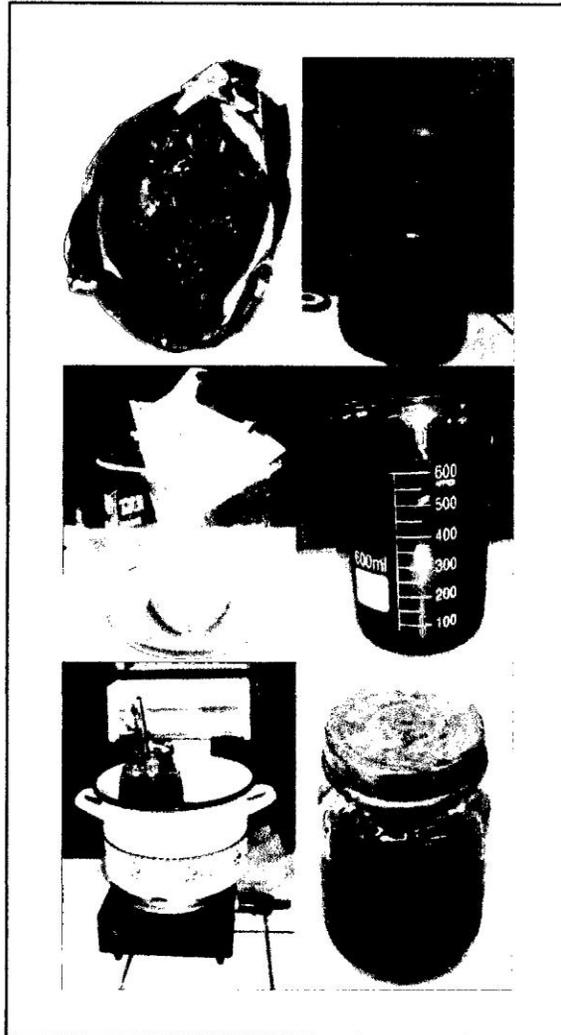


Figura 7. Propóleo, maceración, filtrado, tintura madre, concentración y extracto blando de la muestra.

Anexo 4

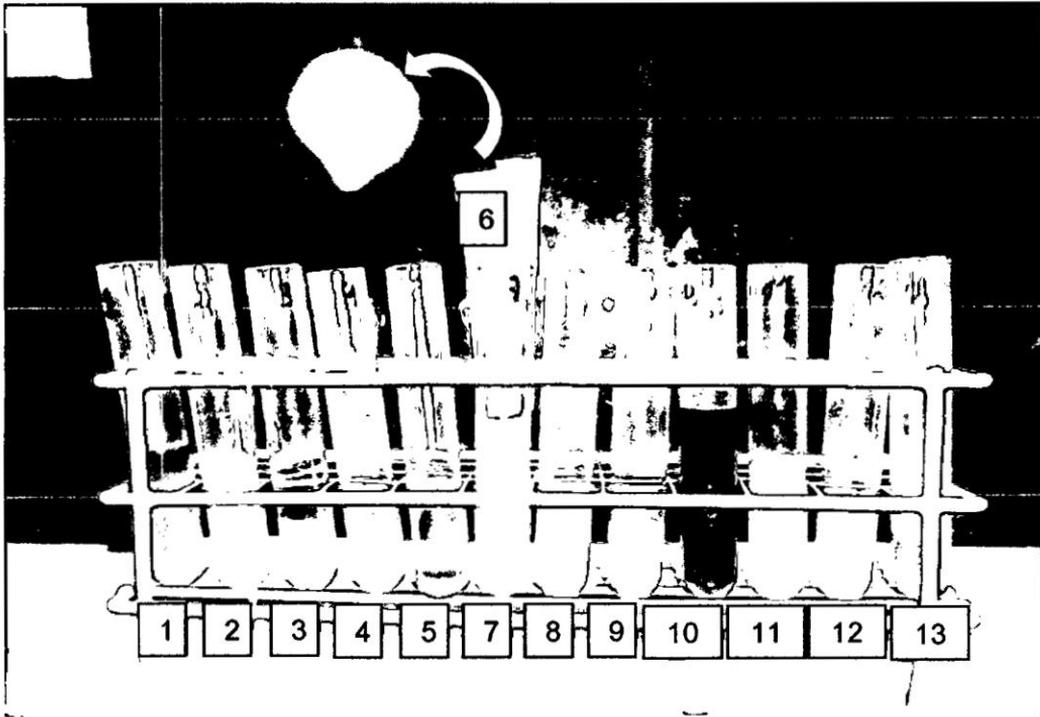


Figura 8. Tubos de prueba con el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico:

Leyenda:

Dragendorff (1), Mayer (2), Baljet (3), Bortrager (4), Lieberman-Burchard (5), Catequinas (6), Resinas (7), Benedict (8), Ninhidrina (9), Cloruro férrico (10), Espuma (11), Shinoda (12), Antocianidinas (13).

Anexo 5

Tabla 4. Composición del medio nutritivo Tyrode⁹.

| Componentes | Cantidad |
|--|--------------------|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| CaCl ₂ | 0,2 g |
| NaHCO ₃ | 1,0 g |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 0,05 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,2 g |
| H ₂ O | csp. para 1 000 ml |

Anexo 6

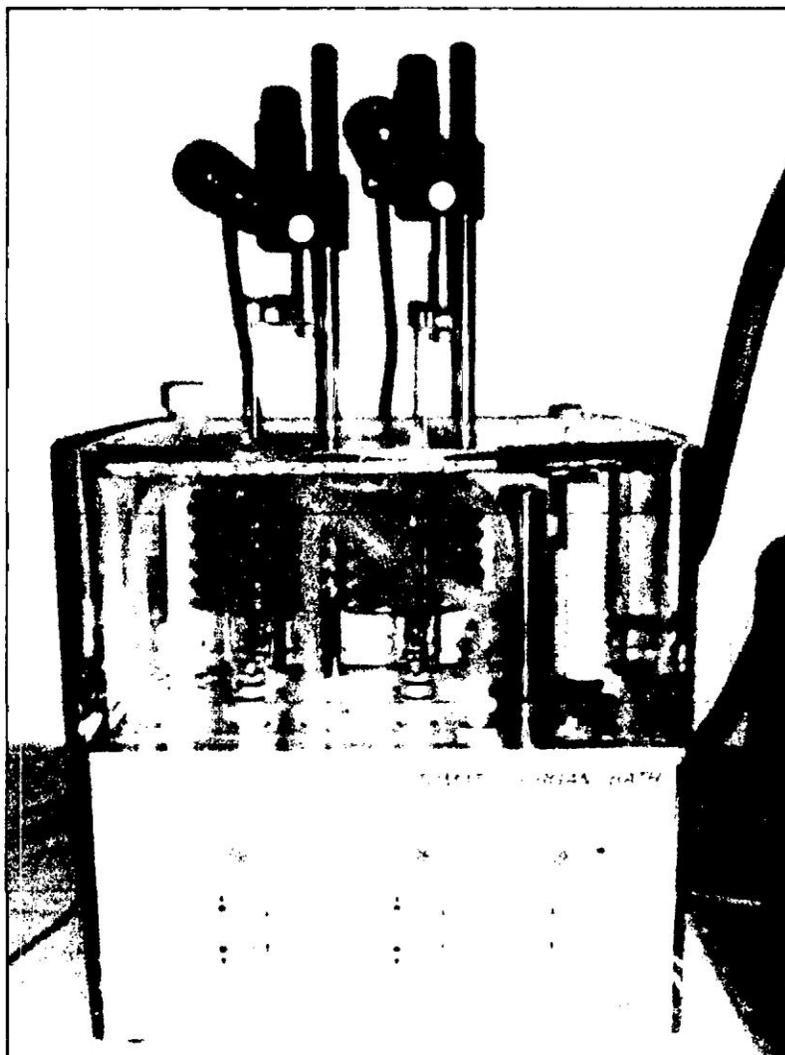


Figura 9. Quimógrafo automatizado Panlab Harvard.

Anexo 7

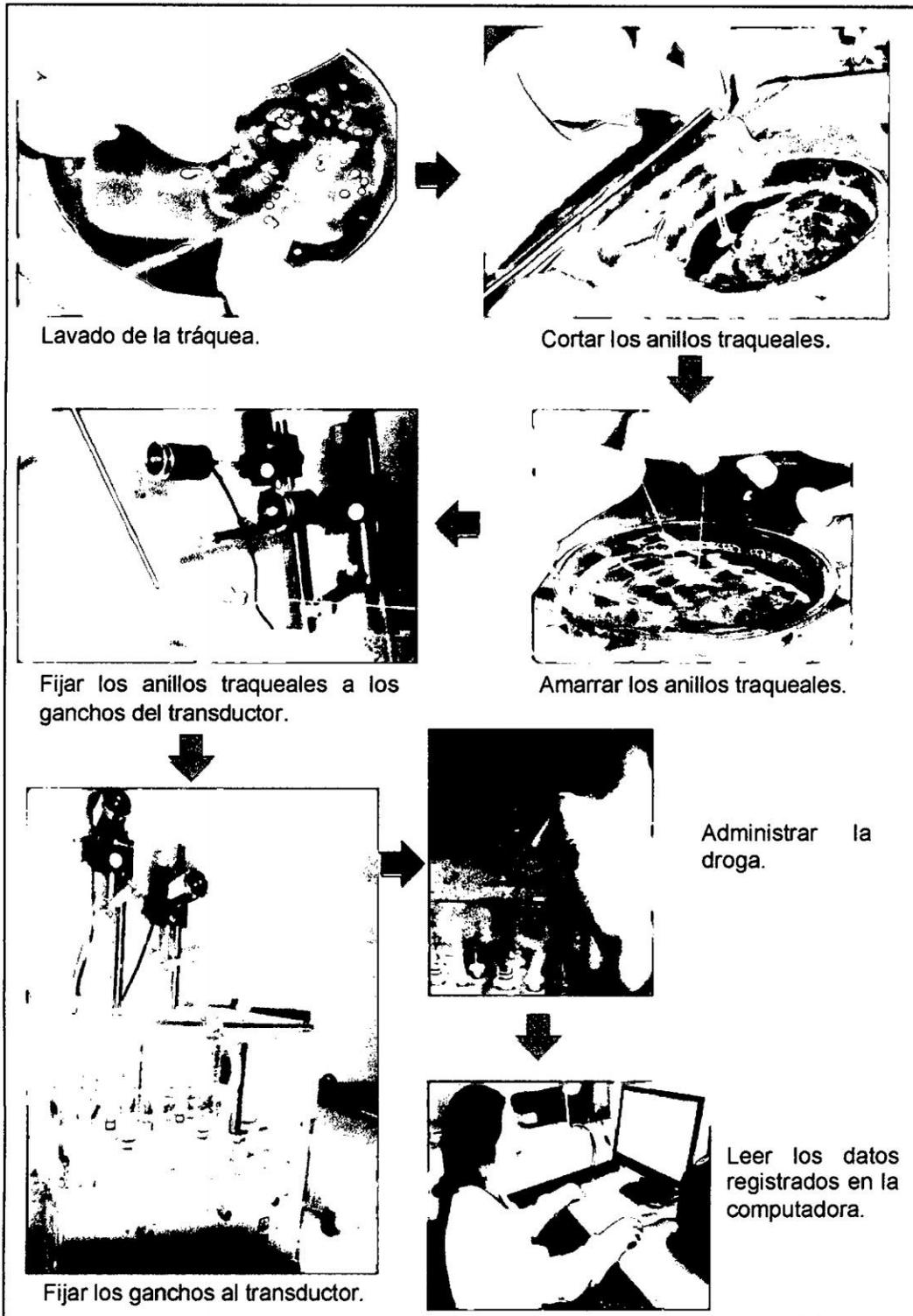


Figura 10. Flujograma del efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos".

Anexo 8

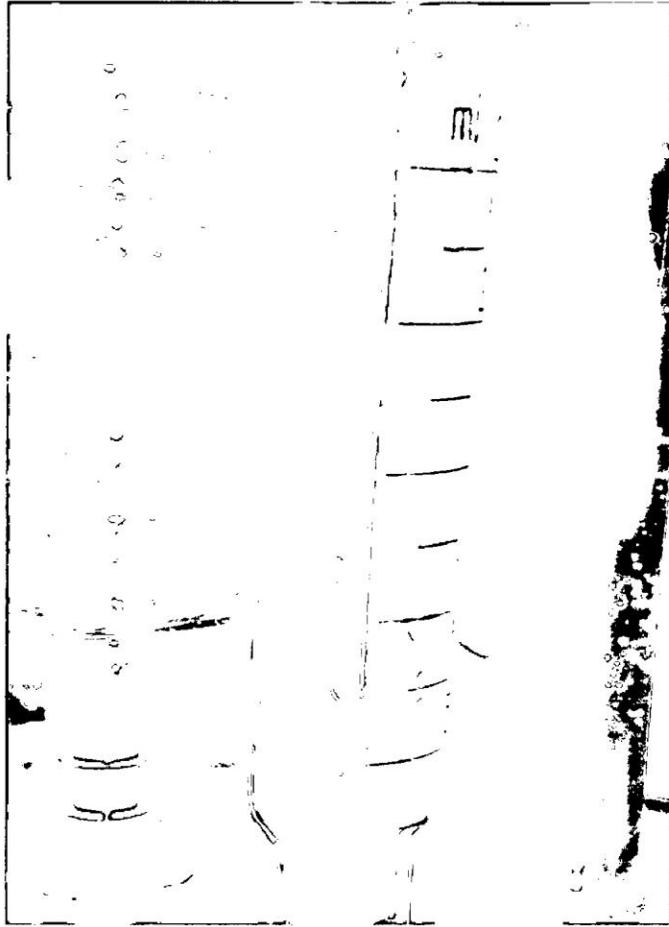


Figura 11. Anillos traqueales de cobayo en el baño de órganos.

Anexo 9

Tabla 5. Análisis de varianza de la tensión generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos.

| Tensión (g) | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Inter-grupos | 14,976 | 4 | 3,744 | 37,662 | ,000 |
| Intra-grupos | 1,988 | 20 | ,099 | | |
| Total | 16,965 | 24 | | | |

Anexo 10

Tabla 6. Prueba de Tukey de la tensión generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos.

| HSD de Tukey | | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|--------------|---|------------------------------|---------|---------|---------|
| | N | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 15% | 5 | 9,3700 | | | |
| 10% | 5 | | 10,2060 | | |
| 5% | 5 | | | 10,8180 | |
| Salbutamol | 5 | | | 10,8520 | |
| Histamina | 5 | | | | 11,7030 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 11

Tabla 7. Análisis de varianza del número de contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos.

| N° de contracciones | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Inter-grupos | 1793,200 | 4 | 448,300 | 257,644 | ,000 |
| Intra-grupos | 34,800 | 20 | 1,740 | | |
| Total | 1828,000 | 24 | | | |

Anexo 12

Tabla 8. Prueba de Tukey del número de contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos.

| HSD de Tukey | | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|--------------|---|------------------------------|---------|---------|---------|
| | N | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 15% | 5 | 9,8000 | | | |
| 10% | 5 | | 15,4000 | | |
| 5% | 5 | | | 19,2000 | |
| Salbutamol | 5 | | | 21,4000 | |
| Histamina | 5 | | | | 35,2000 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | ,101 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 13

Tabla 9. Análisis de varianza de la altura de las contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos.

| Altura (mm) | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Inter-grupos | 38,698 | 4 | 9,675 | 372,100 | ,000 |
| Intra-grupos | ,520 | 20 | ,026 | | |
| Total | 39,218 | 24 | | | |

Anexo 14

Tabla 10. Prueba de Tukey de la altura de las contracciones generada por la contracción de los anillos traqueales por efecto de los tratamientos.

| HSD de Tukey | | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|--------------|---|------------------------------|--------|--------|---------|
| | N | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 15% | 5 | 7,3000 | | | |
| 10% | 5 | | 8,4200 | | |
| 5% | 5 | | | 9,2400 | |
| Salbutamol | 5 | | | 9,5200 | |
| Histamina | 5 | | | | 11,0600 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | ,082 | 1,000 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Anexo 15

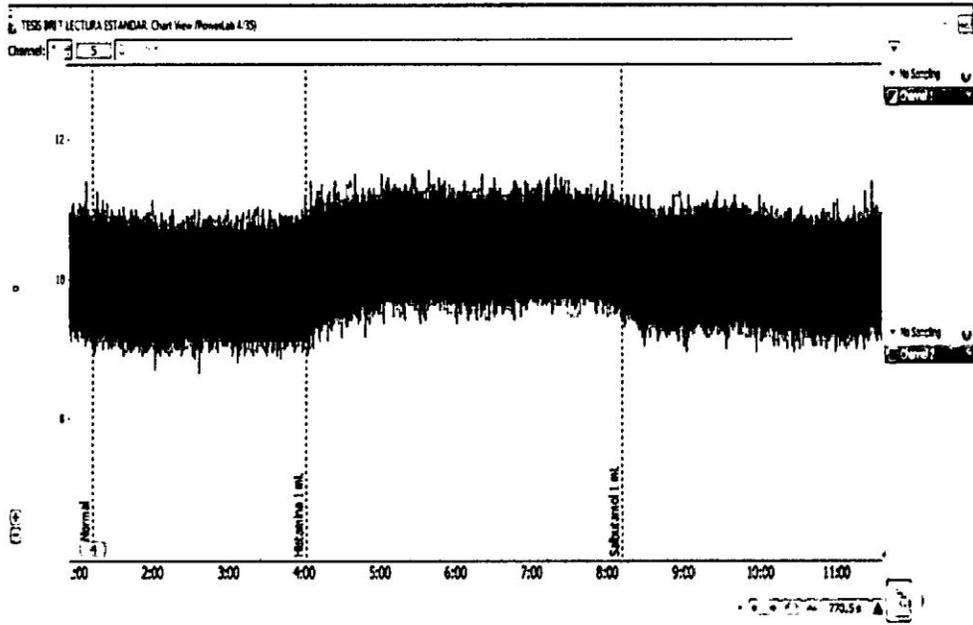


Figura 12. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina y salbutamol.

Anexo 16

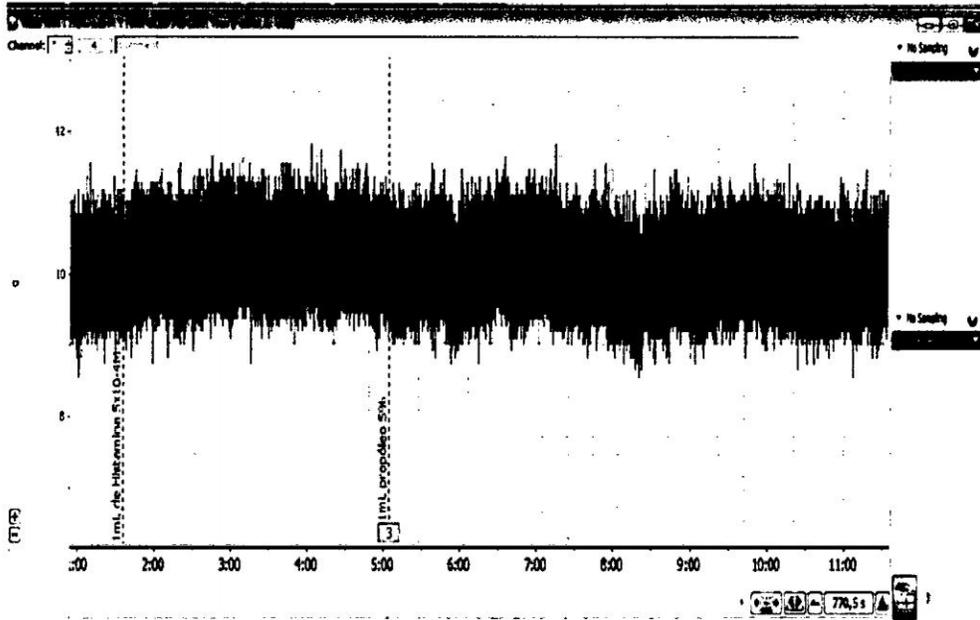


Figura 13. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina extracto hidroalcohólico de propóleo al 5%.

Anexo 17

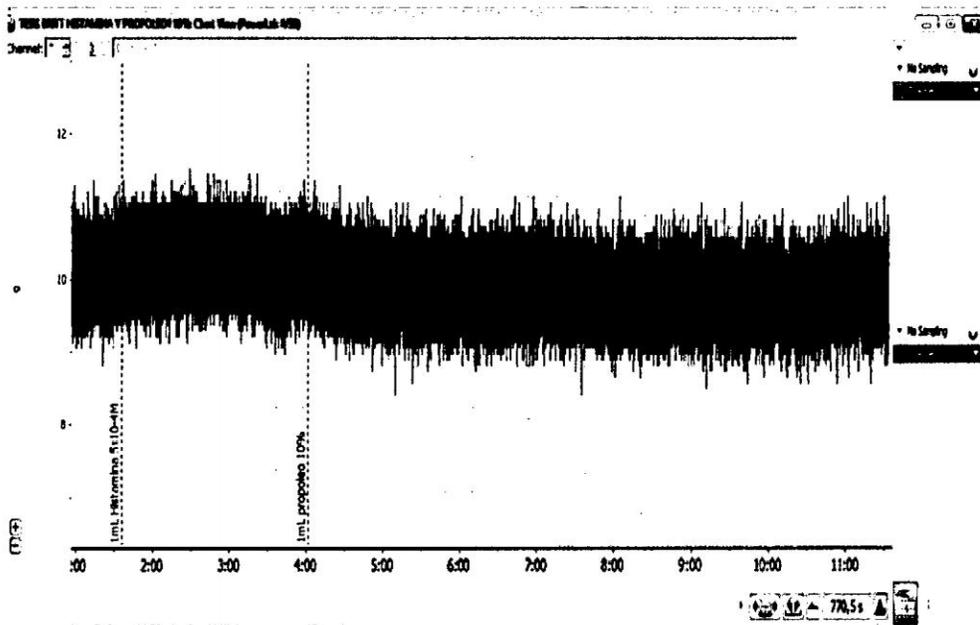


Figura 14. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina extracto hidroalcohólico de propóleo al 10%.

Anexo 18

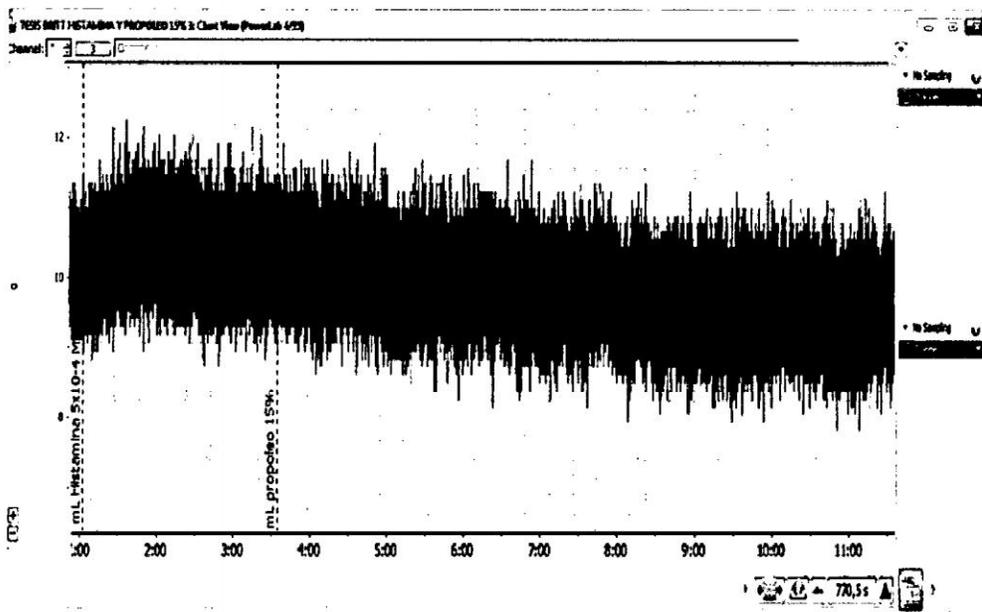


Figura 15. Respuesta gráfica de los anillos traqueales después de la aplicación de histamina extracto hidroalcohólico de propóleo al 15%.

Anexo 19
Tabla 11. Matriz de consistencia.

| TÍTULO | PROBLEMA | OBJETIVOS | HIPÓTESIS | VARIABLES | MARCO TEÓRICO | METODOLOGÍA |
|--|---|---|---|--|---|--|
| Efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" en anillos traqueales aislados de <i>Cavia porcellus</i> "cobayos". Ayacucho-2013. | ¿Tendrá efecto broncodilatador el extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" en anillos traqueales aislados de <i>Cavia porcellus</i> "cobayos"? | Objetivo general Evaluar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" en anillos traqueales aislados de <i>Cavia porcellus</i> "cobayos". Objetivos específicos: • Determinar las características organolépticas y físico-químicas del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja". • Identificar la presencia de metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja". • Determinar la concentración más eficaz del extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" con mayor efecto broncodilatador. • Comparar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" con un estándar en anillos traqueales aislados de <i>Cavia porcellus</i> "cobayos". | El extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" tiene efecto broncodilatador en anillos traqueales aislados de <i>Cavia porcellus</i> "cobayos". | Variable independiente • El extracto hidroalcohólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja". Indicadores • Concentraciones 5%, 10% y 15% del extracto hidroalcohólico del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja". Variable dependiente • Efecto broncodilatador. Indicadores • Tensión de las contracciones. • Número de contracciones. • Altura de las contracciones. | Propóleo. Es un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, de consistencia viscosa es recogido de ciertas partes de los vegetales, por las abejas <i>Apis mellifera</i> , que las transportan al interior de la colmena, modificándolas en parte con sus secreciones. Propiedades medicinales. Posee actividad antitusígena protegen y desinflan las vías respiratorias indicado en el caso de afecciones respiratorias de las vías altas como faringitis, laringitis, sinusitis bronquitis y tos afecciones respiratorias. Asma. Es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que se manifiesta como una obstrucción bronquial reversible en respuesta a diversos estímulos. Antecedentes Existen investigaciones químicas y farmacológicas tanto de la misma especie como de sus congéneres, entre las que destacan el efecto broncodilatador del extracto fluido de <i>Menta aff. arvensis</i> L. "hierba buena" en tráquea aislada de <i>Cavia porcellus</i> "cobayo" y el estudio sobre la acción broncodilatadora y antiinflamatoria del 1,8-cineol en modelo experimental de asma en cobayos. Salbutamol. Es un agonista β_2 selectivo de acción corta ampliamente utilizado para aliviar síntomas de asma agudo severo y para la prevención de asma nocturna y producida por el ejercicio. | Tipo de investigación: Básico – experimental. Población: Propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" que se produce en el distrito de Chalhuanca, provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. Muestra: 2 kg de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja" (en bruto). Animales de experimentación: 25 cobayos <i>Cavia Porcellus</i> , machos de 600 +/- 50 g de peso. Determinación del efecto broncodilatador El efecto broncodilatador será determinado según el método propuesto por Jagdish <i>et al.</i> , ¹⁰ que consiste en inducción de contracciones con histamina en anillos traqueales aislados de cobayo. Análisis estadístico Se evaluará la existencia de diferencias significativas de los diferentes tratamientos usando el análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. |

Efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos". Ayacucho - 2013.

Britt Loayza Cuba¹ y Johnny Aldo Tinco Jayo¹.

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El propóleo es usado en la medicina tradicional peruana para el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias como tos, bronquitis y asma. El presente trabajo se realizó con el propósito de determinar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos", desarrollado en los laboratorios de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de julio a diciembre del 2013. La muestra fue recolectada en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac. Al propóleo en bruto se le realizó la determinación de sus características organolépticas y físico-químicas mientras que al extracto hidroalcohólico, se le realizó el tamizaje fitoquímico. El efecto broncodilatador se determinó mediante el método de Jagdish *et al.*, modificado en anillos traqueales, haciendo uso de un quimógrafo automatizado, Panlab Harvard; las contracciones fueron inducidas por histamina 5×10^{-4} M, registrándose el aumento de tensión, número y altura de contracciones. Se usó como control salbutamol y se evaluó el extracto hidroalcohólico de propóleo a las concentraciones de 5%, 10% y 15%. El extracto hidroalcohólico de propóleo al 5% redujo la tensión a 10,818 g semejante a la del salbutamol (10,852 g), siendo menor al 10% y 15% a 10,206 g y 9,371 g respectivamente. El número y la altura de las contracciones fueron de 21,40 y 9,52 mm con salbutamol; 19,20 y 9,24 mm al 5%; 15,40 y 8,42 mm al 10% y finalmente 9,80 y 7,30 mm al 15% respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos ($p < 0,05\%$). Se concluye que el extracto hidroalcohólico de propóleo tiene efecto broncodilatador, mostrando mayor efecto al 15%.

Palabras clave: Propóleo, extracto hidroalcohólico, efecto broncodilatador.

SUMMARY

Propolis is used in peruvian traditional medicine for the treatment of various respiratory as cough, bronchitis, and asthma. The present work was carried out in order to determine the effect of bronchodilator in the hydroalcoholic extract of propolis from *Apis mellifera* "bee" in tracheal rings isolated from *Cavia porcellus* "cobayos", developed in the laboratories of Pharmacology and Pharmacognosy at the Faculty of Biological Sciences of the National University of San Cristóbal de Huamanga, during the months of July to December 2013. The sample was collected in Chalhuanca district province of Aymaraes in the region of Apurímac. Raw propolis was performed with the determination of its organoleptic characteristics and physical - chemical while the hydroalcoholic extract, was made the phytochemical screening. The bronchodilator effect was determined by the method of Jagdish *et al.*, modified in tracheal rings, making use of an automated quimografo, Panlab Harvard; the contractions were induced by histamine 5×10^{-4} M, registering increasing tension, number and height of contractions. It was used as a control salbutamol and assessed the hydroalcoholic extract of propolis to concentrations of 5%, 10% and 15%. The hydroalcoholic extract of propolis 5% reduced voltage similar to 10,818 g of salbutamol (10,852 g), being less than 10% and 15% at 10,206 g and 9,371 g respectively. The number and height of contractions were 21,40 and 9,52 mm with salbutamol; 19,20 and 9,24 mm at 5%; 15,40 and 8,42 mm 10% and finally 9,80 and 7,30 mm 15% respectively. Statistical analysis showed significant differences in the different treatments ($p < 0,05\%$). We conclude that the hydroalcoholic extract of propolis has bronchodilator effect, showing 15% greater effect.

Key words: Propolis, hydroalcoholic extract, bronchodilator effect.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es ampliamente utilizado en la medicina tradicional ha sido empleado extensamente desde tiempos antiguos reconocida por sus propiedades terapéuticas que se le han atribuido. En la medicina tradicional peruana el propóleo es utilizado en el tratamiento de afecciones respiratorias entre ellos el asma, se han venido resolviendo con el empleo alternativo de resinas y/o bálsamos; además de plantas medicinales, práctica que se ha transmitido de generación en generación, además de que continúan siendo un valioso arsenal de sustancias para la industria farmacéutica.

Según la OMS,¹ más de 235 millones de personas en el mundo padecen de asma; en la actualidad en todo el planeta, una de cada 250 muertes son causadas por el asma además más del 80 por ciento de las muertes por asma ocurren en países de ingresos bajos y medio - bajos.

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica colectado por las abejas obreras de la especie *Apis mellifera* "abeja", a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas. Los materiales colectados, son triturados, humedecidos con saliva y secreciones enzimáticas, mezclados con la cera producida por las glándulas ceras y finalmente transportadas por las abejas hacia la colmena, donde cumplen diversas funciones².

El propóleo es utilizado por la gran variedad de compuestos que presenta entre ellos compuestos fenólicos o polifenoles y flavonoides que han sido reconocidos por su amplio espectro de actividades biológicas, tales como anticancerígenos, analgésicos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antibacterianos, y antioxidantes³.

El propóleo de *Apis mellifera* "abeja", es empleado por su propiedad broncodilatadora en el asma y por esta razón se desarrolló el presente trabajo de investigación que estuvo orientado a conocer los principales metabolitos secundarios responsables de dicha actividad mediante un tamizaje fitoquímico y corroborar el efecto broncodilatador utilizando el modelo de anillos traqueales aislados de cobayo in vitro haciendo uso de un quimógrafo automatizado; este equipo tiene un transductor y amplificador con conexión a un computador que permitió registrar la actividad muscular del órgano aislado de

manera más precisa.

Por estas consideraciones, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron los siguientes.

Objetivo general

Evaluar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos".

Objetivos específicos:

- Determinar las características organolépticas y físico - químicas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".
- Identificar la presencia de metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" por medio del tamizaje fitoquímico.
- Determinar la concentración más eficaz del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" con mayor efecto broncodilatador.
- Comparar el efecto broncodilatador del extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" con el estándar salbutamol en anillos traqueales aislados de *Cavia porcellus* "cobayos".

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes de Farmacología y Farmacognosia, de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de julio a diciembre del 2013.

Materiales

Población

Propóleo de *Apis mellifera* "abeja" que se produce en el distrito de Chalhuanca una altura de 2 897 m.s.n.m., provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

Muestra

Se utilizó dos kg de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" (en bruto) recolectado de 30 colmenas en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes, el sistema de muestreo fue por conveniencia.

Animales de experimentación

Se extrajo la tráquea de 15 cobayos *Cavia porcellus* de la misma edad, sexo (macho) entre 600 +/- 50 g, procedentes del Instituto Nacional de Investigación Agraria - Ayacucho, los mismos que fueron acondicionados con alimentación balanceada

y agua a libertad en el bioterio del Laboratorio de Farmacología del área de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Diseño metodológico: Básico-experimental.

Procedimiento metodológico para la recolección de datos.

Recolección, selección y secado de la muestra

El propóleo se recolectó de la colmena en las horas de la mañana en un clima templado, durante el mes de julio del 2013; empleando el método de recolección raspado directo con espátula de todos los lugares de la colmena en los cuales las abejas hayan depositado el propóleo tratando que el producto permanezca en forma de escamas o trozos.

La muestra recolectada se depositó en una bolsa plástica oscura y luego procedió a la limpieza minuciosa con ayuda de una pinza para retirar los trozos de madera, astillas de la colmena, abejas muertas, etc.

Una vez seleccionada la muestra se dejó secar en la sombra en una habitación ventilada alejado de la luz en un recipiente de vidrio, aproximadamente por 15 días para luego ser conservado en frascos de vidrio color ámbar a temperatura ambiente.

Preparación de la tintura madre de propóleo

Para la preparación de la tintura madre previamente se redujo a polvo toda la muestra. Para facilitar la molienda se hizo un tratamiento con frío, congelando (5 a 10°C) como mínimo 2-3 horas, con la cual se logró una consistencia sólida, para luego ser molido.

Posteriormente se sometió a una maceración del propóleo en proporción 1:1 peso/volumen, con alcohol etílico de 96° durante 30 días y agitando cada día una media hora aproximadamente.

Se procedió a filtrar en frío previa refrigeración a 8°C aproximadamente para la remoción de ceras consiguiéndose así la tintura madre de propóleo.

Preparación del extracto blando de propóleo

Se concentró la tintura madre de propóleo en baño maría a 37°C aproximadamente. Una vez obtenido el extracto blando, se envasó en un frasco de vidrio herméticamente cerrado la cual se embolsó con cinta negra aislante para que no entrara la luz y se conservó en la refrigeradora hasta su empleo.

Evaluación de las características organolépticas

La evaluación de las características organolépticas se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, cuyo análisis se efectuó a través de una evaluación sensorial⁴.

Determinación de las características físico-químicas

Se realizó siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar⁴.

Determinación de humedad

Se pesó 5 g de la muestra en una luna de reloj, previamente tarada y secada; luego se desecó a 105°C, durante 3 horas, luego se enfrió a temperatura ambiente en un desecador y se pesó, colocándolo nuevamente en la estufa durante 1 hora y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

Determinación de cenizas

Se pesó 3 g del extracto hidroalcohólico de propóleo concentrado en un crisol de porcelana previamente incinerado y tarado, luego el crisol y la muestra se calentó suavemente en una cocinilla hasta carbón, luego se incineró a 500°C, en mufla por 3 horas se enfrió en el desecador, se pesó y se calculó mediante la siguiente fórmula:

M = Masa del crisol vacío (g).

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g).

M₂ = masa del crisol con la muestra (g).

100 = Factor matemático para los cálculos.

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Determinación de sólidos totales

Se colocó 5.0 ml de la muestra en una cápsula previamente tarada, luego se evaporó en una estufa a 105°C hasta peso constante (aprox. 3 horas), se retiró la cápsula de la estufa y se colocó en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente, luego se pesó.

Se realizó el cálculo mediante la siguiente fórmula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Dónde:

Pr = Masa de la cápsula más el residuo (g).

P = Masa de la cápsula vacía (g).

V = Volumen de la porción de ensayo.

100 = Factor matemático para el cálculo.

Tamizaje fitoquímico

Las reacciones de identificación de los diferentes metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico se realizó siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar⁴.

Fármaco de referencia

Cien tabletas salbutamol de 4 mg, fabricado por Laboratorios Medrock S.A.C., N° de lote 107312.

Preparación de la solución patrón

Se preparó la solución patrón utilizando como vehículo agua destilada, en la cual se pesó 20 mg de salbutamol por cada 10 ml de agua destilada.

Determinación de la actividad broncodilatadora

Fundamento: La metodología que se empleó para la determinación de la actividad broncodilatadora se basa en el método utilizado por Jagdish *et al.*,⁵ modificado. Consiste en la inducción de broncoconstricción de los anillos traqueales aislado de cobayos conservados en el medio nutricio de Tyrode con histamina y evaluación del efecto broncodilatador con la sustancia problema, utilizando como patrón de referencia salbutamol.

Materiales

- Histamina, se preparó en agua destilada a una concentración de 5×10^{-4} M.
- Cien tabletas de salbutamol 4 mg (Laboratorios Medrock Corporation S.A.C.). Las cuales se ha preparado en una proporción de veinte miligramos por cada 10 ml de agua destilada y luego se filtró obteniéndose así la solución patrón de salbutamol.
- Extracto hidroalcohólico de propóleo *Apis mellifera* "abeja" a diferentes concentraciones: 5%, 10% y 15%, que se prepararon con medio nutricio de Tyrode.

Procedimiento:

Se suspendió la alimentación de los animales con 24 horas de anticipación siendo mantenidas con agua a voluntad. Para iniciar el trabajo se encendió y calibró el quimógrafo automatizado Panlab Harvad, luego se sacrificó a los cobayos por traumatismo encéfalo craneano, se abrió la cavidad torácica y se extrajo la tráquea que fue sumergida de inmediato en la solución nutritiva Tyrode a 37°C, se lavó cuidadosamente y luego se cortó transversalmente entre los cartílagos para dejar libres los anillos traqueales. Amarrar estos anillos con seda quirúrgica por su parte

cartilaginosa y muscular incluido de tal manera que formen una cadena con sus partes musculares alternamente opuestas. Transferir al baño de órganos aislados los cuales fueron fijados con seda quirúrgica, por un extremo a un transductor y por el otro a la cámara para órgano aislado, con 25 ml de solución Tyrode, burbujeo constante y a 37°C. Se encendió el software (LarChart) y a los 4 minutos aproximadamente se adicionó 1 ml de histamina 5×10^{-4} M y se dejó en observación por 4 minutos aproximadamente (Grupo I). Para el caso de los Grupos II, III IV y V, se hizo un registro control durante 4 minutos aproximadamente y después se agregó 1 ml de histamina al baño que permaneció en contacto con los anillos traqueales durante 4 min aproximadamente, luego se adicionó 1 ml de salbutamol, extracto al 5%, 10% y 15% respectivamente para cada grupo y se dejó en observación durante 20 minutos más. Todos los cambios y movimientos fueron captados por un transductor y registrados en la computadora. Para cada uno de los grupos se utilizaron tejidos recién obtenidos y se acondicionaron aproximadamente por 10 min. Se realizaron cinco repeticiones por grupo, la dosis óptima de histamina y de salbutamol se determinaron en experiencias previas.

Diseño experimental

Las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" fueron sometidas a la evaluación del efecto broncodilatador. Los animales de experimentación se dividieron utilizando un diseño completamente aleatorizado en cinco grupos de cinco repeticiones cada una; procediéndose de la siguiente manera:

- Grupo I: Tratado con 1 ml solución de Histamina 5×10^{-4} M, blanco.
- Grupo II: Tratado con 1 ml solución de salbutamol 20mg/10ml, control
- Grupo III: Administrando 1 ml del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* a una concentración al 5%.
- Grupo IV: Administrando 1 ml del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* a una concentración al 10%.
- Grupo V: Administrando 1 ml del extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* a una concentración al 15%.

Análisis de datos

Se determinó el promedio de las diferencias de tensión generada con histamina, salbutamol y extracto hidroalcohólico de *Apis mellifera* "abeja" (5%, 10% y 15%). También se calculó el promedio y los valores de dispersión del número de las contracciones y las alturas alcanzadas (mm) por éstas para cada uno de los tratamientos. Los resultados se presentaron comparativamente en cuadros y gráficos estadísticos y fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) que permitió determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias intergrupos se analizaron por la prueba de Tukey, para el estudio se utilizó un nivel de confianza $p < 0,05$; el software estadístico SPSS versión 20,0.

RESULTADOS

Tabla 1. Características organolépticas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

| Características | Descripción |
|-----------------|---|
| Aspecto externo | Enteras y granos briqueteados. |
| Estructura | Heterogénea, presencia de impurezas. |
| Color | Pardo oscuro casi negro. |
| Olor | Característico, resinoso y aromático. |
| Sabor | Amargo picante. |
| Consistencia | A temperatura superior a 20°C, es viscoso, blando y pegajoso, a temperatura menor de 15°C es duro quebradizo. |

Tabla 2. Características físico - químicas del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac

| Características | Resultados |
|-----------------|------------|
| Humedad | 4,264% |
| Cenizas totales | 1,290% |
| Sólidos totales | 17,188% |

Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico del propóleo de *Apis mellifera* "abeja" recolectado en el distrito de Chalhuanca provincia de Aymaraes de la región de Apurímac.

| Metabolitos secundarios | Ensayo | Resultados | Observación |
|----------------------------|--------------------|------------|------------------|
| Triterpenos y/o esteroides | Lieberman-Burchard | +++ | Rosado a rojo |
| Catequinas | Catequinas | +++ | Verde carmelita |
| Resinas | Resinas | +++ | Precipitado |
| Azúcares reductores | Benedict | ++ | Precipitado rojo |
| Fenoles y/o Taninos | Cloruro férrico | +++ | Verde azulado |
| Flavonoides | Shinoda | +++ | Rojo |
| Flavonoides | Antocianidinas | +++ | Rojo a marrón |

Leyenda :

- (+++) : Abundante
- (++) : Moderado
- (-) : Leve

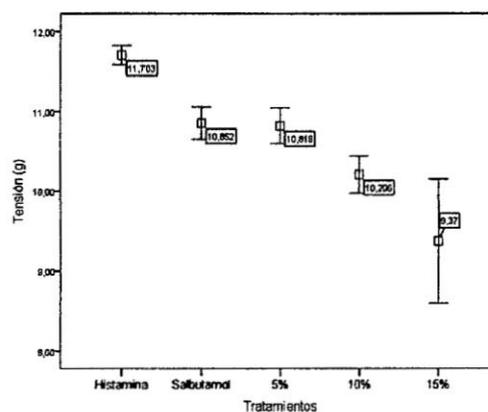


Figura 1. Tensión (g) de la contracción de los anillos traqueales según tratamientos.

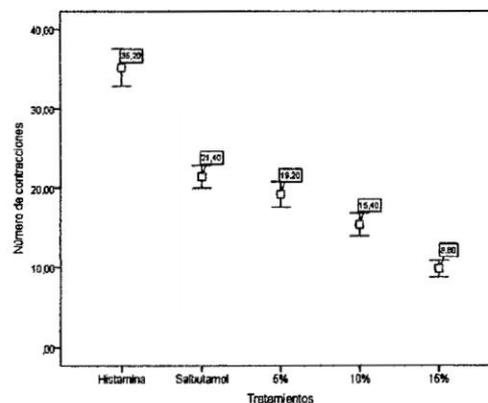


Figura 2. Número de contracciones de los anillos traqueales en respuesta a los tratamientos.

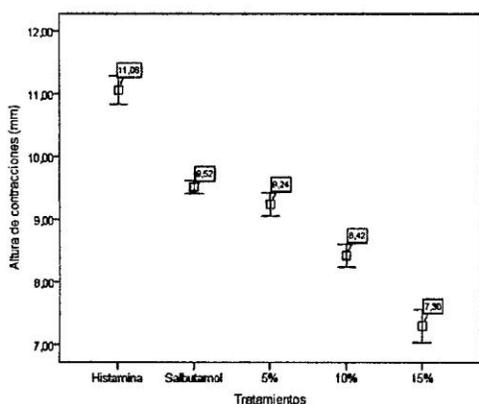


Figura 3. Altura de las contracciones de los anillos traqueales en respuesta a los tratamientos

DISCUSIÓN

Para determinar el efecto broncodilatador de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" objeto del presente estudio se procedió a realizar la preparación de tintura madre el cual se sometió a maceración con alcohol etílico de 96° a partir de ello se obtuvo el extracto blando de propóleo con el cual se realizó el estudio. La extracción con etanol de 96° se hizo teniendo en cuenta que es el disolvente más usado y adecuado para realizar la extracción de metabolitos presentes en el propóleo; además de que se extrae la mayor diversidad de compuestos químicos presentes en las drogas⁶.

Las características organolépticas del propóleo en bruto según estudio de diversos autores varían según el clima, el área geográfica, la latitud; asimismo estos factores determinan las propiedades del propóleo⁷.

En la Tabla 1 el propóleo presenta un aspecto externo entero con granos briqueteados de estructura heterogénea con presencia de impurezas, de color pardo oscuro casi negro, olor característico resinoso y aromático, sabor amargo picante. La consistencia a temperatura superior a 20°C es viscoso, blando y pegajoso, a temperatura menor a 15°C es duro quebradizo.

En nuestro país podemos encontrar diferentes tipos de propóleo de acuerdo a la ubicación geográfica de su producción, donde la altura de la zona de recolección y la escasa o nula contaminación de la región son características que le confieren un valor agregado al propóleo peruano⁸.

Con respecto a las características físico - químicas del propóleo presentes en la Tabla 2 se observa la presencia de humedad de 4,264%, cenizas totales 1,290% y sólidos totales 17,188%; estos valores indican que la muestra analizada cumple con la normativa vigente del Ministerio de Agricultura de Brasil,⁹ que indica que la humedad no debe ser superior al 8%, cenizas totales 5% y sólidos totales 40%. Además afirma Martínez,¹⁰ que entre menos humedad contenga la muestra presentará mayor concentración de compuestos bioactivos.

En el tamizaje fitoquímico, los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de propóleo se determinaron utilizando pruebas específicas de coloración y precipitación,⁵ donde se encontró abundante presencia de triterpenos y/o esteroides, catequinas, resinas, fenoles, y/o taninos y flavonoides; Chong,¹¹ señala la presencia de resinas, flavonoides, compuestos fenólicos antocianinas y cumarinas, pero en el presente estudio no se evidenció la presencia de cumarinas como afirma Chong.

Medina,⁷ evidenció mediante ensayos cromatográficos (CCF) y UV - visible la presencia de flavonoides como crisina, galangina, pinosebrina y apigenina aislados de propóleo.

La presencia de flavonoides en el propóleo permite sospechar que debe de existir una actividad biológica en las células debido a las propiedades conocidas por estos compuestos¹².

Así mismo según Ferré en el 2004,¹³ algunos de los componentes fenólicos del propóleo, como el ácido caféico y el éster del ácido fenil - etil caféico, la quercetina y la naringenina, ejercen efectos antiinflamatorios y actúan sobre la producción de eicosanoides, tanto *in vitro*, suprimiendo la generación de prostaglandinas y de leucotrienos en macrófagos peritoneales, como *in vivo*, en la inflamación peritoneal aguda inducida por la zimosina¹³.

El propóleo por vía oral suprime de forma significativa la vía de la lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico y, el éster del ácido fenil - etil caféico es, de entre los componentes conocidos del propóleo, el modulador más potente de la cascada del ácido araquidónico. Ambos productos disminuyen la actividad de la ciclooxigenasa en macrófagos, medida en función de la producción de prostaglandina E₂, y protegen, al tejido cartilaginoso y a los condrocitos

humanos, de los daños producidos por la interleuquina-1 β ¹³.

Este es el caso de la miricetina y la quercetina que, a concentraciones relativamente altas, son capaces de bloquear *in vitro* los mecanismos de acción de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, mientras que a concentraciones bajas inhiben sólo la acción de la lipoxigenasa. Estas propiedades antiinflamatorias también se han demostrado *in vivo* para numerosos flavonoides en distintos modelos de inflamación aguda y/o crónica. Entre ellos cabe mencionar: la nepetina, apigenina, rutina, crisina, quercetina, quercitrina y luteolina¹⁴.

Por lo expuesto se puede inferir que el propóleo no tiene un mecanismo específico de ser un broncodilatador, pero la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos son los que le confieren propiedades terapéuticas.

El ensayo farmacológico se realizó teniendo en cuenta que los anillos traqueales aislados de cobayo mantienen su función de contracción y relajación cuando se encuentran inmersos en soluciones adecuadas Jagdish *et al.*,⁵ por tal motivo los anillos traqueales se mantuvieron todo el tiempo inmerso en la solución de Tyrode a 37°C con una adecuada oxigenación constante en todo momento desde su aislamiento. Los resultados se observaron en la computadora gracias al software (LabChart) la que muestra la contracción y relajación del órgano aislado la cual modifica la tensión mecánica que ejerce, la que es convertida en señal eléctrica mediante un transductor de tensión; esta señal es ampliada y registrada para cuantificar los cambios de tensión ejercida por el órgano aislado.

En la Figura 1, se observó que el extracto hidroalcohólico de propóleo a la concentración de 5% redujo a 10,818 g la tensión generada por la histamina presentando un efecto similar a la del salbutamol (10,852 g), a diferencia de las que presentaron las concentraciones de 10% y 15% que redujeron aún más la tensión a 10,206 g y 9,371 g respectivamente. Estableciéndose así una relación dosis - respuesta puesto que a mayor dosis se obtuvo una mayor disminución de la tensión generada. La prueba de Tukey corrobora lo mencionado, donde el extracto de propóleo al 5% y el salbutamol poseen el mismo efecto farmacológico con respecto al grado de tensión.

Mientras en la Figura 2 se observa el número de contracciones generados por los tratamientos en la que se ve, que el salbutamol disminuye el número de contracciones generada por la histamina en un número de 21,40 seguida por el extracto de propóleo al 5% en 19,20 y de las concentraciones de 10% y 15% con 15,40; 9,80 respectivamente. La prueba de Tukey demuestra que el extracto de propóleo al 5% y el salbutamol tienen semejante efecto farmacológico con respecto al número de contracciones.

En la Figura 3, se observa que las alturas alcanzadas por las contracciones son más pequeñas en los tratamientos con salbutamol (9,52 mm) y las concentraciones al 5%, 10% y 15% que muestran alturas de 9,24; 8,42 y 7,30 mm respectivamente, a comparación del tratamiento con histamina que alcanzó una altura de 11,06 mm. Con respecto a la prueba de Tukey muestra que el salbutamol y el extracto de propóleo al 5% tienen respuestas estadísticamente semejantes.

Con respecto al análisis de varianza del grado de tensión, el número y altura de contracciones muestran que existen diferencias significativas en los diferentes tratamientos, mostrando que las tres concentraciones trabajadas tienen efecto broncodilatador.

Bautista,¹⁵ determinó el efecto broncodilatador del extracto fluido de *Mentha aff. arvensis L.* "hierba buena" en tráquea aislada de cobayo y reportó que el extracto fluido al 10% y 15% presentan valores de disminución estadísticamente similares. El extracto fluido al 20% y el salbutamol 2mg/5ml presentan una disminución de la respuesta contráctil estadísticamente similares ($p > 0,05$),¹⁵. En el presente trabajo el extracto de propóleo al 5% es estadísticamente similar al salbutamol (20mg/10ml), además que el extracto de propóleo al 15% disminuye aún más el número de contracciones (Figura 2), pero también se observa un inconveniente que conforme va pasando el tiempo va disminuyendo el número y la altura de contracciones; esto podría deberse a que no presenta mucha afinidad a los receptores histaminérgicos o presenta otro tipo de receptores.

La histamina es uno de los principales mediadores de la inflamación en la fase inmediata del asma, causando la incapacidad de respuesta de las vías respiratorias produciendo hiperinflamación de las vías

bronquiales. Chhaya *et al.*,¹⁶ determinó que en los modelos del músculo liso en PAL posee eficacia inhibitoria por 100% (1 µg), 133% (2 µg) y 126% (4 µg) en el íleon de cobayo frente a 1 µg de histamina; mientras en cadena traqueal el 86% (1 µg), 100% (2 µg) y 106% (4 µg) frente a 1 µg de histamina y en tira de fondo del ojo de rata 50% (1 µg), 75% (2 µg) y 100% (4 µg) frente a un µg de 5HT.

Esto nos permite corroborar que el conejillo de indias es altamente sensible a la histamina debido a la presencia de receptores histaminérgicos en el íleon y en el músculo liso traqueal.

También se puede mencionar que Jagdish *et al.*,⁵ demostró la actividad antiasmática de *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Arn leaves. Demostrándose así que 10 µg/ml de histamina produce contracción del íleon aislado y el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Leptadenia reticulata* a una concentración 0,8 mg/ml inhibió significativamente ($p < 0,01$) el efecto contráctil de la histamina. Así como también la histamina a la misma dosis administrada en cadena traqueal con el mismo extracto a una dosis de 1,2 mg/ml inhibió significativamente ($p < 0,01$) el efecto contráctil de la histamina. La actividad biológica se hace responsable a la presencia de flavonoides y saponinas identificadas en el extracto.

En el estudio *in vitro* se han encontrado que el 1,8 - cineol tiene efectos farmacológicamente importantes: relaja los músculos lisos de la tráquea de cobayos manteniéndolas un bajo tono basal, tiene propiedades antiinflamatorias significativas a través de su capacidad para reducir los niveles de los marcadores de procesos inflamatorios en las vías respiratorias. Cuando se realizó la respuesta contráctil con la histamina se realizó en tráquea aislada de cobayos el 1,8 - cineol era capaz de relajar la contracción lo que indica que su efecto relajante muscular también puede estar presente en la fase inicial broncoconstrictora¹⁷.

Finalmente a condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" ha evidenciado tener efecto broncodilatador a la concentración de 5% el cual presenta un efecto similar al del salbutamol; pero debe tenerse cuidado ya que a medida que pasa el tiempo va disminuyendo aún más el número de y altura de contracciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud [OMS] datos sobre el asma [revista en internet]. 2011 [acceso, 20 de Octubre del 2013]; Disponible en <http://www.who.int/features/factfiles/asthma/es/index.html>.
2. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia [revista en internet]. 2002 [acceso, 22 de setiembre del 2013]; 73 Suppl. 1, S1-S6. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/124957>.
3. Gómez C, Gómez R, Arráez R, Segura C, Fernández G, Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. [revista en internet]. 2006 [acceso, 22 de Setiembre del 2013]; 4 (3):728-736. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506002536>.
4. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad La Habana; 2000.
5. Jagdish B, Sandip A. Antiasthmatic Activity of *Leptadenia reticulata* (Retz) Wt & Arn leaves. International Conference on Applied Mathematics and Pharmaceutical Sciences (ICAMPS) [revista en internet]. 2013 [acceso, 14 agosto del 2013]; 3: 335-339. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jE0J8DFH9koJ:www.researchgate.net/publication/252931633_Antiasthmatic_activity_of_the_methanolic_extract_of_Physalis_angulata_Linn/file/3deec51f57638a9ee2.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe&client=firefox-a.
6. Luna L. Estudio del efecto de dos promotores inmunológicos de origen natural (propóleo, polen) y su incidencia en la producción de pollos de engorde, en el sector el Tejar, provincia de Imbabura. [Tesis pregrado]. Ecuador: PUUSE-SI; 2011.
7. Medina A. Flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad. [Tesis pregrado]. Chile: Universidad

- Austral de Chile; 2012.
8. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. [Tesis pregrado]. Lima: UNMSM; 2010.
 9. Ministerio de Agricultura del Brasil. Instrução Normativa nº 3 - ANEXO VI Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 19 jan. 2001. [Acceso 18 de noviembre del 2013] Disponible en <http://www.apacame.org.br/mensagem/ce/60/normas.htm>.
 10. Martínez G. Caracterización físico - química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. [Tesis de Maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia sede en Medellín; 2009.
 11. Chong A. Formulación y evaluación de la actividad antitusígena del jarabe elaborado a base de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja". [Tesis pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2008.
 12. Ángel C. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundinamarca y Boyacá. [Tesis de maestría]. Colombia: UN; 2012.
 13. Farré R, Frassetto I, Sánchez A. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* [revista en internet]. 2004 [acceso 18 de noviembre del 2013] 45:1,21 - 43. Disponible en [http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/28176/1/Ars%20Pharm%202004%3B45\(1\)21-43.pdf](http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/28176/1/Ars%20Pharm%202004%3B45(1)21-43.pdf).
 14. Bonkanka T. Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. [Tesis de doctorado]. España: Universidad de la Laguna - Caja Canarias; 2007.
 15. Bautista L. Evaluación del efecto broncodilatador del extracto fluido de *Mentha aff. arvensis* L. "hierba buena" en tráquea aislada de *Cavia porcellus* "cobayo" [Tesis pregrado]. Ayacucho: UNSCH; 2012.
 16. Chhaya K, Shobharam S, Lokesh D, Actividad antiasmática del extracto metanólico de *Physalis angula* Linn. *Revista internacional Journal of Medicinal Plants Research*. [revista en internet]. 2011 [acceso, 18 de Julio de 2013]; Vol. 5(22), pp. 5351-5355. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jE0J8DFH9koJ:www.researchgate.net/publication/252931633_Antiasthmatic_activity_of_the_methanolic_extract_of_Physalis_angulata_Linn/file/3deec51f57638a9ee2.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe&client=firefox-a.
 17. Vasco P. Acción Broncodilatadora y antiinflamatoria del 1,8 - cineol en modelo experimental de asma en cobayos. [Tesis de doctorado]. Brasil: Universidad Federal de; 2009.