

# **IRRITABILIDAD OFTÁLMICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS DE MELIPONA BECHEE.**

*AUTORES: Esvieta Tenorio Borroto\*, Rafael Sosa Martínez\*, Remigio Cortes\*, Osmany Marrero\*, Armando Morales\*.*

*\* Centro de Bioactivos Químicos . Universidad Central de las Villas.*

El propóleo, que se obtiene a partir de fuentes naturales, posee múltiples, exclusivas y muy valiosas propiedades. Tras la realización de vastas pesquisas, han sido demostrados sus efectos antibacterianos, antivirales, analgésicos, antiinflamatorios, epitelizantes, antiparasitarios, anestésicos, inmunomoduladores, citostáticos, hipotensores, cicatrizantes, antioxidantes, antialérgicos, entre otros, lo que es atribuible a la amplia gama de elementos o compuestos que lo forman; por esto se considera uno de los derivados apícolas más heterogéneos. Por ello se reporta que estas propiedades varían, entre otras razones, en dependencia del origen del propóleo, lo que trae como consecuencia cambios en la composición química de los mismos. Por esta razón, nos dimos a la tarea de realizar un estudio fitoquímico del propóleo recolectado en un apiario de Remedios, el cual posteriormente se formuló en diferentes vehículos, hasta encontrar una formulación adecuada que nos permitió acometer ensayos toxicológicos posteriores, según lo establecen las normas internacionales. Entre ellos un estudio de irritabilidad oftálmica donde se emplearon 6 conejos de raza nueva Zelanda con un peso entre 2 a 3 Kg las alteraciones en córnea, iris y conjuntiva se observaron a la 1, 24,48 y 72 horas no se presentaron efectos adversos en las mismas.

Palabras Claves: propóleos, conejos, irritabilidad

Email: [esvieta2000@yahoo.es](mailto:esvieta2000@yahoo.es)

## **Materiales y métodos**

El estudio se desarrolló en las instalaciones del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas (UCLV), las que cuentan con los requerimientos necesarios que permiten el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y los procedimientos normalizados de trabajo, estando acorde con lo establecido internacionalmente para estos estudios.

### **Experimento# 1**

El esquema que proponemos utiliza la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente, con la finalidad de lograr el mayor agotamiento de las sustancias, ensayándose en cada extracto los metabolitos que de acuerdo a su solubilidad pueden ser extraídos en estos solventes.

Se partió de 10 a 20 gramos de propóleos recién colectado, procedente de Remedios (Villa Clara); empleándose un volumen de solvente equivalente a 10 veces el peso de la droga. La extracción se realizó disolviendo el propóleos en los solventes establecidos, por un tiempo no menor de 48 h; obteniéndose:

Extracto etéreo

Extracto etanólico

Extracto acuoso

Posteriormente, a cada uno de los extractos se les realizaron los ensayos siguientes: Extracto etéreo:

- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Sudán III (ácidos grasos).

#### Extracto etanólico:

- Ensayo de Resinas
- Ensayo de Liebermann- Burchard (triterpenos y/o esteroides)
- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Nihidrina (aminoácidos libres)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Baljet (coumarinas)
- Ensayo de Kedde (glicósidos cardiotónicos)
- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Borntrager (quinonas)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)
- Ensayo de antocianidinas

#### Extracto acuoso:

- Ensayo de Espuma (saponinas)
- Ensayo de Fehling (carbohidratos reductores)
- Ensayo de Shinoda (flavonoides)
- Ensayo de Cloruro férrico (fenoles y/o taninos)
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (alcaloides)
- Ensayo de Principios amargos
- Ensayo de mucílagos.

#### Experimento # 2

El estudio se realizó en tres conejos albinos de la raza Nueva Zelandia, de ambos sexos, con una masa corporal entre 2 y 3 kg, procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), previamente seleccionados mediante estudio de las estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales para conejos y durante todo el experimento la temperatura ambiental fue de  $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa de  $55 \pm 5\%$ . La alimentación consistió en pienso (pellets) para conejos producido por el CENPALAB, suministrado según las necesidades de los animales y agua "*ad libitum*".

El se aplicó a dosis única según el siguiente procedimiento: en el ojo derecho se aplicó en el fondo del saco conjuntival 100 mg e inmediatamente se unieron los párpados durante 10 segundos, con el fin de garantizar la distribución uniforme del formulado, no procediéndose al lavado posterior del órgano. El ojo izquierdo se reservó como control negativo.

Los animales se inspeccionaron diariamente desde el inicio del experimento y al finalizar del mismo se realizó la evaluación final mediante tinción corneal con fluoresceína sódica al 2% y posterior lavado con solución fisiológica para eliminar el exceso de ésta , El cálculo de la irritabilidad oftálmica se realizó según el método propuesto para estos casos por la OECD.

## **Resultados y discusión**

Los resultados mostraron que en la fase etérea se hallaron coumarinas, triterpenos y/o esteroides y lípidos y/o aceites esenciales; en la alcohólica, resinas, triterpenos y/o esteroides, azúcares reductores y flavonoides, y en la fase acuosa compuestos fenólicos en general.

Cabe resaltar la importancia de los resultados obtenidos al analizar el extracto acuoso, ya que corroboran la solubilidad de determinados componentes del propóleo en este solvente, y los resultados obtenidos por diversos investigadores, contrarrestando lo planteado por Fernández y Cabrera (1998), acerca de lo innecesario de realizar este tipo de ensayos.

Es importante señalar que los datos que se obtiene al concluir este tipo de estudio ofrecen solo una visión sobre la sustancia evaluada, que no puede tomarse en ningún caso, como un resultado concluyente acerca de la presencia o no de un metabolito, ya que en ello pueden influir de forma determinante: la época y las variaciones ocurridas en el proceso de recolección, la concentración de los metabolitos, su solubilidad en el solvente empleado y la interferencia de otros metabolitos.

El hecho de que la mayor cantidad de componentes fuera encontrada en el extracto alcohólico nos llevó a realizar los restantes experimentos utilizando soluciones etanólicas de propóleos.

En la fase preclínica son muchos los test utilizados para evaluar la toxicidad, la técnica aplicada en nuestro trabajo nos aporta criterios muy concluyentes acerca del empleo de un producto ya sea para uso humano o veterinario.

En este estudio se observan los efectos adversos que ocasiona el producto reportado como efectivo desde el punto de vista terapéutico como antiinflamatorio antiparasitario, analgésico, etc. La evaluación se efectúa después de una aplicación única concluyendo que es no irritante para las estructuras oculares (córnea iris y conjuntiva). En la tabla 1 se observan los resultados de la irritabilidad no observándose daños significativos pues no aparecen daños en la cornea, criterio concluyente para retirar el producto debido a que la opacidad es la que provoca mayores consecuencias dramáticas en caso de ocasionarse la irritación.

Aunque debemos destacar la presencia en el conejo #2 de un ligero enrojecimiento de color carmesí con vasos individuales fácilmente discernibles manifestación que solo se persistió durante 24 horas es decir en curso relativamente breve. Considerando los criterios de reversibilidad se necesita un tiempo determinado para que la estructura vuelva a la normalidad (3) y se ha adoptado por múltiples instituciones reguladoras que sea de aproximadamente 7 días entre ellas la FDA (4) esto lo tuvimos en cuenta para emitir nuestras conclusiones finales sobre la irritabilidad del Propoleos clasificándolo como no irritante.

## **Conclusiones**

1. El Propóleos aplicado en el saco conjuntival, no produce efectos irritantes en la córnea, iris y conjuntiva del conejo.

TABLA #1 Evaluación de la Irritabilidad Oftálmica del Propóleo

Número del animal	Estructura	Tiempo Evaluado		
		24	48 horas	72
	Córnea	0	0	0
1	Iris	0	0	0
	Conjuntiva	0	0	0
	Córnea	0	0	0
2	Iris	0	0	0
	Conjuntiva	4	0	0
	Córnea	0	0	0
3	Iris	0	0	0
	Conjuntiva	0	0	0
	Córnea	0	0	0
4	Iris	0	0	0
	Conjuntiva	0	0	0
	Córnea	0	0	0
5	Iris	0	0	0
	Conjuntiva	0	0	0
	Córnea	0	0	0
6	Iris	0	0	0
	Conjuntiva	0	0	0

### Bibliografía

- 1-Draize, J.H., Woodard, G. y Ralvery, H.O.: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol and Exp. Therap. 82:377. 1944.
- 2- OECD Guideline 403, 1997
- 3- Sharke R: The Draize test motivation for change. Food Chem.Toxicol.: 139, 1985
- 4- FDA. Food and Drug Administration: Title 21. p. 191. 1973