



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**“ESTUDIO QUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE UN
EXTRACTO ACTIVO DE *BUDDLEJA GLOBOSA*
HOPE, BUDDLEJACEAE, MATICO Y DISEÑO DE
LA METODOLOGÍA ANALÍTICA”**

PROFESOR PATROCINANTE

DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

DIRECTORES DE MEMORIA

DRA. NADINE BACKHOUSE ERAZO

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

LEON EDUARDO GOÏTY VIVAR

SANTIAGO – CHILE

2007

***A mis padres
y abuelos
Ethel, Sixto y Raquel***

AGRADECIMIENTOS

Comienzo agradeciendo a Dios, Él dispuso para mi la orientación de todas las personas en quienes encontré todo lo necesario para el desarrollo personal hasta ahora alcanzado. En forma respectiva deseo agradecer a las profesoras Nadine Backhouse y Carla Delporte por ser mi constante incentivo con sus reflexiones y liderazgo académico

Agradezco a mis padres por ser la mayor escuela de mi vida y por entregarme todo su apoyo en los caminos que he elegido, y a mis hermanos Sebastián y Ethel por haberme permitido ser el mayor.

A Pamela y Javier por la amistad y compañerismo que me regalaron en estos casi seis años y por todos los momentos compartidos que ahora forman parte de hermosos recuerdos, su apoyo fue pilar fundamental de mis logros.

A Macarena por haber sido compañera desde el primer día de Universidad y una gran amiga que siempre supo hacerme reír en los momentos más difíciles y a Siria por su incondicional amistad, teniendo siempre la palabra precisa en el momento exacto.

Quiero agradecer también a Cecilia y Consuelo por la amistad y colaboración en mi trabajo.

A mis compañeras y amigas de laboratorio: Maité, Mariela, Gabriela, y también a las señoras Margarita Arellano y María Isabel Pino, ya que sin ustedes la alegría de ir a trabajar diariamente al laboratorio no hubiese sido la misma.

Finalmente quisiera agradecer de manera especial a mis abuelos Ethel, Sixto y Raquel por haber sido gran parte de mi formación en los inicios de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | IX |
| ABSTRACT..... | XI |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. HIPÓTESIS..... | 3 |
| III. OBJETIVOS..... | 4 |
| IV. ANTECEDENTES | |
| 1. Descripción botánica..... | 6 |
| 2. Usos en la medicina tradicional..... | 7 |
| 3. Estudios previos de <i>B. globosa</i> Hope | |
| 3.1. Estudios químicos anteriores..... | 7 |
| 3.2. Estudios farmacológicos anteriores..... | 8 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 1. Reactivos..... | 10 |
| 2. Estudios químicos | |
| 2.1. Obtención de los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> | 11 |
| 2.2. Estudios cromatográficos | |
| 2.2.1. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (c.c.f) y espectroscopía UV del EMAT-1..... | 11 |
| 2.2.2. Fraccionamiento en columnas cromatográficas | |
| 2.2.2.1. Columna I..... | 12 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2.2. Columna II..... | 13 |
| 2.2.3. Purificación en columna por medio de Sephadex LH-20..... | 13 |
| 3. Estudios farmacológicos <i>in vivo</i> | |
| 3.1. Animales de experimentación y muestras en estudio..... | 14 |
| 3.2. Evaluación de la actividad analgésica mediante el ensayo del latigazo de la cola (Tail flick test)..... | 15 |
| 3.2.1. Ensayo del latigazo de la cola vía oral..... | 16 |
| 3.2.1. Ensayo del latigazo de la cola vía tópica..... | 16 |
| 3.3. Evaluación de la actividad analgésica oral mediante el ensayo de las contorsiones abdominales..... | 17 |
| 3.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica mediante el ensayo de inducción de edema en oreja de ratón..... | 18 |
| 4. Análisis cuantitativo de los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> | |
| 4.1. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos activos de <i>B. globosa</i> por HPLC..... | 19 |
| 4.1.1. Preparación de las soluciones..... | 20 |
| 4.2. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos activos de <i>B. globosa</i> por espectrofotometría UV..... | 21 |
| 4.2.1. Método de Glories..... | 21 |
| 4.2.2. Método de Folin-Ciocalteu..... | 22 |

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudios químicos

| | |
|--|----|
| 1.1. Obtención de los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> | 23 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 1.2. Estudios cromatográficos..... | 24 |
| 1.2.1. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (c.c.f.) y espectroscopia UV de EMAT-1..... | 24 |
| 1.2.1.1. Caracterización del compuesto MAT-3..... | 25 |
| 1.2.1.2. Caracterización del compuesto MAT-5..... | 26 |
| 1.2.1.3. Caracterización de verbascósido..... | 27 |
| 2. Estudios farmacológicos <i>in vivo</i> | |
| 2.1. Evaluación de la actividad analgésica mediante el ensayo del latigazo de la cola (Tail flick test)..... | 28 |
| 2.1.1. Ensayo del latigazo de la cola vía oral para los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina..... | 28 |
| 2.1.2. Ensayo del latigazo de la cola vía tópica para los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina..... | 29 |
| 2.1.3. Ensayo del latigazo de la cola vía tópica para las formulaciones del EMAT-1 en gel y crema al 1% de EMAT-1..... | 31 |
| 2.2. Evaluación de la actividad analgésica oral mediante el ensayo de las contorsiones abdominales para los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina..... | 32 |
| 2.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica mediante el ensayo de inducción de edema en oreja de ratón..... | 33 |
| 3. Análisis cuantitativo de los extractos alcohólicos activos de <i>B. globosa</i> | |
| 3.1. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos activos de <i>B. globosa</i> por HPLC..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1. Diseño de la metodología | |
| 3.1.1.1. Selección del solvente de la muestra..... | 34 |
| 3.1.1.2. Selección de la longitud de onda..... | 35 |
| 3.1.1.3. Identificación de los compuestos en cromatograma de HPLC..... | 36 |
| 3.1.1.4. Calibración y selección de los marcadores estándar adecuados para la cuantificación de los compuestos activos de los extractos alcohólicos fraccionados de <i>B. globosa</i> | 38 |
| 3.1.1.5. Determinación de las absorptividades molares (ϵ) de verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina, ácido cafeico, rutina y luteolina a 365 nm y sus factores de proporcionalidad..... | 40 |
| 3.1.1.6. Establecimiento de curvas de calibración con compuestos aislados..... | 42 |
| 3.1.1.7. Análisis cuantitativo de los extractos | |
| 3.1.1.7.1. Valoración por HPLC empleando marcadores estándar..... | 42 |
| 3.1.1.7.2. Valoración por HPLC empleando los patrones secundarios verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina..... | 44 |
| 3.2. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos activos de <i>B. globosa</i> por espectrofotometría UV | |
| 3.2.1. Método de Glories..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2. Método de Folin-Ciocalteu..... | 50 |
| 3.2.3. Discusión general respecto a los métodos espectrofotométricos...50 | |
| VII. CONCLUSIONES..... | 52 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 54 |
| IX. ANEXOS..... | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | : Arbusto, flores y hojas de <i>B. globosa</i> Hope..... | 6 |
| Figura 2 | : Estructura química de 7-O-glucósido de luteolina..... | 7 |
| Figura 3 | : Estructura química de verbascósido..... | 8 |
| Figura 4 | : Esquema de obtención de los extractos alcohólicos seriados de <i>B. globosa</i> | 23 |
| Figura 5 | : Cromatografía en capa fina del EMAT-1 y de los compuestos purificados por columna Sephadex. Revelada con NP a UV-366 nm.. | 24 |
| Figura 6 | : Espectro de absorción UV del compuesto MAT-3 aislado por columna Sephadex..... | 25 |
| Figura 7 | : Espectro de absorción UV del compuesto MAT-5 aislado por columna Sephadex..... | 26 |
| Figura 8 | : Espectro de absorción UV de verbascósido..... | 27 |
| Figura 9 | : Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,15 mg/mL en MeOH: H ₂ O = 50: 50 a 365 nm..... | 35 |
| Figura 10 | : Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,70 mg/mL en MeOH 100% a 365 nm..... | 35 |
| Figura 11 | : Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,28 mg/mL en MeOH: H ₂ O = 50: 50 a 254 nm..... | 36 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 12 | : Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,28 mg/mL en MeOH: H ₂ O = 50: 50 a 330 nm..... | 36 |
| Figura 13 | : Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,28 mg/mL en MeOH: H ₂ O = 50: 50 a 365 nm..... | 36 |
| Figura 14 | : Identificación de compuestos en cromatograma HPLC de EMAT-1 en MeOH: H ₂ O = 50: 50 a 365 nm..... | 37 |
| Figura 15 | : Comparación de espectros de absorbancia UV de los compuestos luteolina, 7-O-glucósido de luteolina y rutina..... | 39 |
| Figura 16 | : Gráfico de abundancia de los principales compuestos de los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> obtenido por HPLC..... | 43 |
| Figura 17 | : Variación en la composición de los extractos en verbascósido..... | 45 |
| Figura 18 | : Variación en la composición de los extractos en 7-O-glucósido de luteolina..... | 46 |
| Figura 19 | : Gráfico de abundancia de las familia de especies fenólicas presentes en los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> según el método de Glories..... | 49 |
| Figura 20 | : Espectro de absorción UV para el EMAT-1..... | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 1 | : Tabla resumen ensayos farmacológicos previos para los extractos alcohólicos fraccionados de <i>B. globosa globosa</i> (Backhouse <i>et al.</i> , 2007)..... | 9 |
| Tabla 2 | : Esquema de fraccionamiento de columna I para EMAT-1 (40 g)..... | 12 |
| Tabla 3 | : Esquema de fraccionamiento de columna II para fracciones 194 a 305 de columna I (24,1 g)..... | 13 |
| Tabla 4 | : Concentraciones empleadas para las curvas de calibración del método de Glories..... | 21 |
| Tabla 5 | : Protocolo de preparación de soluciones para analizar por el método de Glories..... | 22 |
| Tabla 6 | : Caracterización cromatográfica de compuesto MAT-3..... | 25 |
| Tabla 7 | : Caracterización cromatográfica de compuesto MAT-5..... | 26 |
| Tabla 8 | : Caracterización cromatográfica de verbascósido..... | 27 |
| Tabla 9 | : Resultados del latigazo de la cola vía oral para 7-O-glucósido de luteolina..... | 28 |
| Tabla 10 | : Resultados del latigazo de la cola vía oral para verbascósido..... | 28 |

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 11 | : Efecto máximo posible para verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina a 98,56 y 137,6 mg/Kg respectivamente en ensayo del latigazo de la cola vía oral..... | 29 |
| Tabla 12 | : Resultados del latigazo de la cola vía tópica para 7-O-glucósido de luteolina..... | 29 |
| Tabla 13 | : Resultados del latigazo de la cola vía tópica para verbascósido..... | 29 |
| Tabla 14 | : Efecto máximo posible para verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina al 1% en DMSO en ensayo del latigazo de la cola vía tópica..... | 14 |
| Tabla 15 | : Resultados del latigazo de la cola vía tópica para gel al 1% de EMAT-1..... | 31 |
| Tabla 16 | : Resultados del latigazo de la cola vía tópica para crema al 1% de EMAT-1..... | 31 |
| Tabla 17 | : Efecto máximo posible para formulaciones en gel y crema al 1% de EMAT-1 en ensayo del latigazo de la cola vía tópica..... | 31 |
| Tabla 18 | : Efecto analgésico de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina por el método de las contorsiones abdominales..... | 32 |
| Tabla 19 | : Tiempos de retención para los principales compuestos de EMAT-1...37 | |
| Tabla 20 | : Curvas de calibración para HPLC a 365 nm y tiempos de retención de los patrones luteolina, rutina, quercetina y ácido cafeico..... | 38 |
| Tabla 21 | : Curvas de calibración para metodología HPLC con los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina..... | 42 |

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 22 | : Abundancia de los principales compuestos de los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> | |
| Tabla 23 | : Abundancia de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina obtenidos de las curvas de calibración con los compuestos aislados por HPLC..... | 44 |
| Tabla 24 | : Representabilidad de los marcadores estándar para los compuestos verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina..... | 44 |
| Tabla 25 | : Concentraciones finales de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina en los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> por HPLC..... | 45 |
| Tabla 26 | : Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de ác. cafeico para Método de Glories..... | 47 |
| Tabla 27 | : Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de luteolina para Método de Glories..... | 47 |
| Tabla 28 | : Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de ác. gálico para Método de Glories..... | 47 |
| Tabla 29 | : Curvas de calibración a 280, 320y 352 nm de rutina para Método de Glories | 47 |
| Tabla 30 | : Abundancia de flavonoides, feniletanoides y fenoles en extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> según método de Glories..... | 48 |
| Tabla 31 | : Concentraciones finales obtenidas de flavonoides, feniletanoides y otros fenoles obtenidas por el método de Glories en los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> | 48 |

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 32 | : Abundancia de fenoles totales hidrosolubles de los extractos alcohólicos de <i>B. globosa</i> obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu..... | 50 |
|----------|---|----|

ABREVIATURAS

| | | |
|-------------------------|---|---|
| BAW | : | n-butanol: ác. acético: agua = 4: 1: 5 |
| c.c.f | : | cromatografía en capa fina |
| DCM | ; | diclorometano |
| DMSO | : | dimetilsulfóxido |
| EC ₅₀ | : | concentración efectiva 50 |
| ED ₅₀ | : | dosis efectiva 50 |
| EMAT-1 | : | extracto metanólico seriado de hojas secas y molidas recolectadas en verano de <i>B.globosa</i> |
| EMG | : | extracto metanólico global de hojas secas y molidas recolectadas en verano |
| EPP | : | eritrodiseptesia palmar plantar |
| EtAc | : | acetato de etilo |
| ETMAT _{otoño} | : | extracto etanólico seriado de hojas secas y molidas recolectadas en otoño de <i>B.globosa</i> |
| ETMAT _{verano} | : | extracto etanólico seriado de hojas secas y molidas recolectadas en verano de <i>B.globosa</i> |
| EtOH | : | etanol |
| Fase A | : | EtAc: ác. fórmico: ác. acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6 |
| HEX | : | hexano |
| HPLC | : | cromatografía líquida de alta resolución |
| MeOH | : | metanol |
| n.e. | : | no ensayado |
| NP/PEG | : | Reactivo revelador para c.c.f. Natural Products/Polyethylenglycol |
| OD | : | oreja derecha |
| OI | : | oreja izquierda |
| TPA | : | 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato |
| UV | : | ultravioleta |

RESUMEN

La evaluación farmacológica y estudios químicos de *Buddleja globosa*, matico, realizados anteriormente en nuestro laboratorio y la importancia terapéutica en el tratamiento de afecciones a la piel que un extracto alcohólico fraccionado ha mostrado en estudios clínicos preliminares, nos impulsaron a desarrollar un estudio químico y farmacológico detallado que permita la estandarización de este extracto, además de identificar aquellos compuestos que posean la responsabilidad farmacológica de sus actividades antiinflamatoria y analgésica.

El análisis cualitativo de los extractos alcohólicos seriados de hojas recolectadas en verano y otoño (EMAT-1, ETMAT_{verano} y ETMAT_{otoño}) por cromatografía en capa fina y HPLC permitió evidenciar la presencia de cuatro compuestos mayoritarios, siendo los más abundantes verbascósido (feniletanoide) y el 7-O-glucósido de luteolina (flavona), seguido por otros dos que se denominaron MAT-3 y MAT-5.

La actividad analgésica de los dos compuestos mayoritarios fue evaluada en ratones mediante los ensayos del latigazo de la cola (vía tópica y oral) y de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético como métodos térmicos y químicos de dolor agudo a concentraciones y dosis equimolares al EC₂₅ ó ED₂₅ del ibuprofeno y del naproxeno sódico, utilizados como fármacos de referencia. El verbascósido mostró un 30,25 ± 7,29% y un 27,47 ± 3,81% de actividad tópica y oral, mientras que el 7-O-glucósido de luteolina presentó 24,46 ± 3,61% y un 28,24 ± 4,99% respectivamente en el ensayo del latigazo de la cola, en su mayoría levemente superiores al ibuprofeno y al naproxeno sódico. En el ensayo de las contorsiones abdominales el efecto del verbascósido fue muy superior al de la flavona (67,6 ± 2,6% y un 27,0 ± 9,1% respectivamente). Los resultados obtenidos permitirían atribuirle, en gran parte, a estos metabolitos la propiedad analgésica de los diferentes extractos alcohólicos. Ensayos preliminares para evaluar la actividad analgésica tópica (latigazo

de la cola) de dos formulaciones dermatológicas que se someterán a estudios clínicos (gel y crema conteniendo un 1% de EMAT-1) mostraron similar efecto analgésico: $47,93 \pm 4,23\%$ y $45,87 \pm 6,07\%$ respectivamente.

Para la estandarización química del extracto fue necesario desarrollar una metodología analítica que permita la cuantificación de sus metabolitos activos. Se logró establecer una metodología analítica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) obteniendo el perfil cromatográfico bajo las condiciones definidas. Se seleccionaron los patrones primarios ácido cafeico y rutina para expresar feniletanoides y flavonoides, respectivamente. Éstos permitieron la cuantificación de los principales compuestos presentes en el extracto, mediante el establecimiento de curvas de calibración. En los extractos se encontró respectivamente para verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina: $11,43 \pm 0,34\%$ y $1,20 \pm 0,03\%$ para ETMAT_{otoño}, $24,50 \pm 0,14\%$ y $1,23 \pm 0,01\%$ para ETMAT_{verano}, $25,45 \pm 0,32\%$ y $1,26 \pm 0,04\%$ para EMAT-1 y $18,12 \pm 0,10$ y $1,23 \pm 0,02\%$ para un extracto metanólico global (EMG). Con estos resultados se pudo apreciar que existe variación estacional en la composición de los extractos de los feniletanoides sin variar la cantidad de flavonoides, que no existe diferencia al usar metanol o etanol en la elaboración de los extractos y la importancia de obtener extractos alcohólicos seriados al ver la disminución de la concentración de los componentes activos en el EMG, el cual no corresponde a un extracto seriado.

Analizando los métodos espectrofotométricos actualmente empleados para el control de calidad de extractos de *B. globosa*, se comparó el método de Glories (adaptado en trabajos previos) y el de Folin-Ciocalteu con el método HPLC. Esta comparación confirmó las ventajas que posee la metodología HPLC sobre los métodos espectrofotométricos, puesto que el método de Glories presenta una baja exactitud en la expresión de los resultados debido a la interferencia que los feniletanoides generan sobre los flavonoides y que el método de Folin-Ciocalteu sólo entrega la concentración de fenoles totales hidrosolubles sin valorar particularmente a aquellos metabolitos activos de interés farmacológico.

ABSTRACT**“CHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDY OF AN ACTIVE EXTRACT OF
BUDDLEJA GLOBOSA HOPE, MATICO AND DESIGN OF ITS ANALYTICAL
METHODOLOGY”**

The pharmacological evaluation and chemical studies previously developed in our laboratory for *Buddleja globosa*, matico added to the therapeutic relevance in the treatment of skin ailments that one fractioned alcoholic extract has demonstrated in preliminary clinical studies stimulated us to develop a detailed chemical and pharmacological study which leads to the standardization of this extract and at the same time the identification of those compounds which own the pharmacological responsibility of its antiinflammatory and analgesic activities.

The qualitative analysis of the serial alcoholic extracts of the leaves collected in summer and autumn (EMAT-1, ETMAT_{summer} and ETMAT_{autumn}) through thin layer chromatography and HPLC allowed us to evidence the presence of four mayor compounds, being the most abundant verbascoside (phenylethanoid) and the luteolin 7-O-glycoside (flavone), followed by two others which were denominated MAT-3 and MAT-5.

The analgesic activity of the two mayor compounds was evaluated in mice through the tail flick test (topic and *per os*) and the writhing test (induced by acetic acid) as thermal and chemical methods of acute pain, in concentrations and equimolar doses to the EC₂₅ or ED₂₅ of ibuprofen and naproxen sodium used as reference drugs. Verbascoside showed a 30.25 ± 7.29% and a 27.47 ± 3.81% of topical and *per os* activity, meanwhile luteolin 7-O-glycoside showed a 24.46 ± 3.61% and a 28.24 ± 4.99% respectively in the tail flick test, slightly grater than ibuprofen. In the writhing test the effect of verbascoside was greatly higher than that of the flavone (67.6 ± 2.6% and 27.0 ± 9.1% respectiv

ely). The obtained results would permit to attribute, in big part, to these metabolites the analgesic property found in the different alcoholic extracts. Preliminary assays for the topic analgesic activity evaluation (tail flick test) of two dermatological formulations (gel and cream 1% of EMAT-1) which will undergo clinical trial, showed similar analgesic effect: $47.93 \pm 4.23\%$ and $45.87 \pm 6.97\%$ respectively.

For the chemical standardization of the extract, was necessary to develop a method which will allow quantifying its active metabolites. The establishment of a high performance liquid chromatography (HPLC) method was accomplished; the chromatographic profile under the already defined conditions was set. The primary standards caffeic acid and rutin were chosen to express phenylethanoids and flavonoids respectively. These permitted the quantification of the main compounds present in the extract by means of the setting of the respective calibration curves. In the extracts was found respectively for verbascoside and luteolin 7-O-glycoside: $11.43 \pm 0.34\%$ and $1.20 \pm 0.03\%$ for ETMAT_{otoño}, $24.50 \pm 0.14\%$ and $1.23 \pm 0.01\%$ for ETMAT_{verano}, $25.45 \pm 0.32\%$ and $1.26 \pm 0.04\%$ for EMAT-1 and 18.12 ± 0.10 and $1.23 \pm 0.02\%$ for a global methanolic extract (EMG). With these results was possible to observe that seasonal variation exists in the composition of extracts of the phenylethanoids with no variation in the amount of flavonoids, there is no difference between using methanol or ethanol in the elaboration of the extracts and the importance of producing serial alcoholic extract given the fact that the concentration of the active compounds decrease in the EMG, which was not a serial extract.

Analyzing the existent spectrophotometric methods, presently used for the quality control of *B. globosa* extracts, the Glories method (adapted in previous works) and the Folin-Ciocalteu method with the HPLC method. This comparison confirmed the advantages that the HPLC methodology owns over the spectrophotometric methods, since the Glories method holds low accuracy in the expression of results because the interference phenylethanoids cause over flavonoids and that the Folin-Ciocalteu methods only gives the concentration of total water soluble phenols instead of particularly quantifying those active metabolites of pharmacological interest.

I. INTRODUCCIÓN

Buddleja globosa es una especie nativa de Chile, Perú y Argentina que en Chile habita desde Santiago hasta la Patagonia (Navas, 1979). La medicina popular le atribuye a *B. globosa*, propiedades cicatrizantes, es así como el infuso de las hojas es usado en forma tópica para el tratamiento de heridas, de quemaduras y de úlceras externas e internas. Estudios químicos de esta especie han permitido aislar flavonoides glicosídicos (Marín *et al.*, 1979), feniletanoides (Pardo *et al.*, 1993), iridoides (Houghton y Hikino, 1989), triterpenoides (López *et al.*, 1979), di y sesquiterpenoides (Houghton *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 1999).

La evaluación farmacológica de extractos seriados obtenidos a partir de hojas de *Buddleja globosa* ha permitido demostrar las propiedades antiinflamatoria vía oral y tópica, analgésica vía oral, cicatrizante y antioxidante de los extractos hexánico, de diclorometano y metanólico, resultando más activos los dos últimos. Del extracto hexánico se ha aislado una mezcla de α y β -amirinas como sus componentes mayoritarios. Del extracto bioactivo de diclorometano se ha aislado una mezcla de esteroides siendo el glucósido de β -sitosterol el más abundante, junto con stigmasterol, stigmastenol, stigmastanol, campesterol y β -sitosterol (Backhouse *et al.*, 2007). Los feniletanoides y flavonoides fueron los compuestos más abundantes del extracto metanólico, en especial verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina, quercetina, 7-O-glucósido de apigenina siendo los dos primeros los mayoritarios (Backhouse *et al.*, 2007; Apablaza 2006; Apablaza *et al.*, 2006a). Sólo el extracto metanólico resultó hipoalergénico en pruebas de sensibilidad y de irritación dérmica, con resultados de eficacia positiva en estudios preliminares en el tratamiento de la EPP (Eritrodisestesia Palmar Plantar) (Rosales *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2004). Por esta razón se ha escogido este extracto para complementar sus estudios químicos y farmacológicos, elaborar preparados farmacéuticos y establecer metodologías analíticas que permitan estandarizar los extractos para así asegurar la calidad del producto terminado.

Se compararon las propiedades químicas y farmacológicas (analgésicas y antiinflamatorias) de cuatro extractos alcohólicos de *B. globosa*, matico (EMAT-1, ETMAT_{otoño} ETMAT_{verano} de hojas recolectadas en otoño y verano y EMG) con la finalidad de estudiar la variación estacional y el impacto del solvente utilizado en la preparación del extracto. Los extractos de hojas recolectadas en verano presentaron mayor actividad farmacológica siendo más ricos en compuestos como flavonoides y feniletanoides (Apablaza *et al.*, 2006b) y no se encontró diferencias (químicas y farmacológicas) al utilizar metanol o etanol. Numerosas son las referencias en que los flavonoides han demostrado tener actividad antiinflamatoria y otras actividades farmacológicas relacionadas (Alcaraz, 1988; Bendt, 2002; Pelzer *et al.*, 1998). Por otra parte se han podido aislar de EMAT-1 derivados del ácido cafeico como el verbascósido que han sido descritos anteriormente por Mensah como parte de un extracto acuoso con capacidad de estimular el crecimiento de los fibroblastos *in vitro* (Mensah *et al.*, 2001). Al verbascósido se le han demostrado propiedades tales como antioxidante (previniendo el estrés oxidativo), protector del endotelio vascular, promotor para patologías cardiovasculares, además de su actividad antiinflamatoria, que estaría justificando las propiedades encontradas para EMAT-1 (Lin *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Chiou *et al.*, 2004).

El interés de formular productos farmacéuticos en base a plantas medicinales con propiedades farmacológicas demostradas es creciente. Por esta razón es muy importante establecer metodologías analíticas que permitan estandarizar los extractos para así asegurar la calidad del producto terminado. Actualmente el análisis cuantitativo propuesto para el aseguramiento de la calidad de un extracto hidroalcohólico global de *B. globosa* se basa en la valoración de los grupos fenólicos totales hidrosolubles presentes, sin su diferenciación específica. Será necesario valorar de manera diferenciada los tipos de compuestos fenólicos presentes, ya que la responsabilidad de las propiedades farmacológicas encontradas se les atribuye principalmente a feniletanoides (verbascósido) y a flavonoides (7-O-glucósido de luteolina), marcadores que deberán ser determinados en futuras preparaciones dermatológicas.

II. HIPÓTESIS

Establecer la metodología analítica (por espectrofotometría y HPLC) del extracto farmacológicamente activo (EMAT-1) de *Buddleja globosa* asegurará su calidad y su eficacia clínica; permitirá la estandarización química y farmacológica de éste, determinando además la mejor época de recolección de la droga vegetal para la preparación de dicho extracto.

III. OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Establecer metodologías analíticas que permitan la estandarización química de un extracto alcohólico, farmacológicamente activo, de *B. globosa* y validarlas.
2. Complementar los estudios farmacológicos que permitan proponer mecanismos de acción, y los estudios químicos que permitan la identificación de otros metabolitos presentes (activos o no).
3. Redactar la monografía del análisis químico del EMAT-1 como base para asegurar la eficacia de futuros preparados farmacéuticos.

Objetivos específicos

1. Aislar otros metabolitos presentes en el extracto EMAT-1 y si es posible, identificarlos.
2. Evaluar la actividad analgésica oral de los metabolitos 7-O-glucósido-luteolina y verbascósido en dos métodos diferentes que permitan postular posibles mecanismos.
3. Evaluar la actividad antiinflamatoria tópica de 7-O-glucósido de luteolina y verbascósido en el edema de oreja inducido por TPA.
4. Diseñar y validar un método por HPLC para la cuantificación de flavonoides y feniletanoides presentes en extractos alcohólicos de *B. globosa*, basándonos en estudios previos.

5. Establecer el perfil cromatográfico por HPLC para el EMAT-1.
6. Establecer curvas de calibración de luteolina, 7-O-glucósido de luteolina, verbascósido y ácido cafeico y otros flavonoides disponibles, para la metodología HPLC diseñada y validada que permitan cuantificar los metabolitos activos del EMAT-1.
7. Comparar el contenido de principios activos (verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina y otros posibles metabolitos mayoritarios) en los extractos alcohólicos preparados a partir de hojas recolectadas en otoño y verano.
8. Comparar la metodología espectrofotométrica (adaptación método de Glories), ya validada en nuestros estudios preliminares y el método comúnmente usado para la determinación de fenoles totales hidrosolubles (método de Folin-Ciocalteu) con la metodología HPLC.

IV. ANTECEDENTES

1. Descripción botánica

| | |
|--------------------------|---|
| FAMILIA | : Buddlejaceae |
| GÉNERO | : <i>Buddleja</i> |
| ESPECIE | : <i>B. globosa</i> |
| NOMBRE CIENTÍFICO | : <i>Buddleja globosa</i> Hope |
| NOMBRE VULGAR | : matico, palquil o pañil (Montes y Wilkomirsky, 1985). |

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA : Chile, Argentina y Perú. En Chile habita desde Santiago hasta la Patagonia, generalmente en sitios húmedos (Navas, 1979). También es ampliamente cultivada como ornamento en parques y jardines de Gran Bretaña (Houghton, 1984)

Buddleja globosa Hope es un arbusto de 1,5 a 3 metros de altura con ramas jóvenes pubescentes amarillentas. Sus hojas son opuestas, lanceoladas y agudas, de 3 a 15 cm de ancho. La inflorescencia es en mono o bicabezuela, de 1 a 2 cm de diámetro, formando un racimo de 2 a 15 cabezuelas. Sus flores son numerosas, compactas, de color anaranjado, amarillo y rojo. El fruto es una cápsula subglobosa. Florece desde noviembre a mayo (Navas, 1979).



Figura 1: Arbusto, flores y hojas de *B. globosa* Hope

2. Usos en medicina tradicional

La medicina tradicional la ha utilizado como infusión de las hojas y corteza en el tratamiento de quemaduras, úlceras internas y externas y en la cicatrización de heridas (Pardo *et al.*, 1993). El decocto de las hojas es utilizado para lavar heridas y las hojas pulverizadas para curar úlceras y viejas heridas. La infusión de las hojas se administra oralmente para tratar disentería crónica, hemorroides, hepatitis y catarro. El tratamiento de úlceras y verrugas usando los jugos e infusiones de las hojas, también ha sido descrito. La infusión de las hojas también se ha empelado como antiséptico urogenital (Houghton, 1984).

3. Estudios previos de *B. globosa* Hope

3.1. Estudios químicos anteriores

Los estudios químicos previos han sido resumidos en la introducción. Se identificaron los dos componentes mayoritarios (Apablaza, 2006) del extracto metanólico fraccionado EMAT-1: el feniletanoide verbascósido y el flavonoide 7-O-glucósido de luteolina que serán parte importante de esta investigación:

7-O-glucósido de luteolina

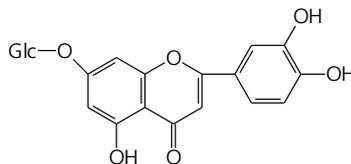


Figura 2: Estructura química de 7-O-glucósido de luteolina

| | |
|----------------|---|
| Sinónimos | : Cinarósido |
| Fórmula | : C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ |
| Peso molecular | : 448,40 g/mol |
| Número Cas | : 5373-11-5 |

Verbascósido

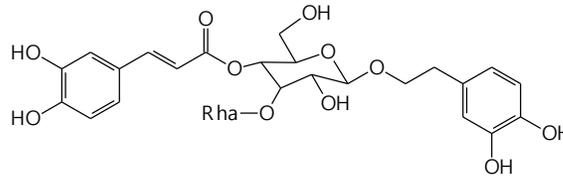


Figura 3: Estructura química de verbascósido

| | |
|----------------|---|
| Sinónimos | : Acteósido, kusaginina |
| Fórmula | : C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ |
| Peso molecular | : 624.60 g/mol |
| Número Cas | : 61276-17-3 |

3.2. Estudios farmacológicos anteriores

Previamente (Backhouse *et al.*, 2007), a los extractos alcohólicos ETMAT_{verano}, ETMAT_{otoño}, ETMAT-1 y EMG se le realizaron los ensayos farmacológicos expresados en la introducción y se resumen en la tabla 1:

| Ensayos | Dosis | Extractos | | | |
|---|------------|------------------------|-------------------------|--------------|--------------|
| | | ETMAT _{otoño} | ETMAT _{verano} | EMAT-1 | EMG |
| | | Efecto ± SEM | Efecto ± SEM | Efecto ± SEM | Efecto ± SEM |
| Analgesia tópica Formalina en la cola* | 5% | 68,9 ± 7,8 | 90,8 ± 3,3 | 73,6 ± 10,9 | 85,7 ± 4,2 |
| Analgesia tópica Latigazo de la cola** | 5% | 40,5 ± 4,5 | 51,6 ± 4,7 | 54,0 ± 4,2 | 26,8 ± 5,1 |
| | 2,50% | 25,0 ± 4,6 | n.e. | 40,4 ± 2,7 | n.e. |
| | 1,25% | 16,8 ± 1,7 | n.e. | 30,3 ± 2,8 | n.e. |
| | 0,63% | 8,6 ± 1,7 | n.e. | 11,6 ± 2,0 | n.e. |
| Analgesia oral Latigazo de la cola*** | 200 mg/Kg | 32,7 ± 5,4 | 77,2 ± 9,3 | 56,6 ± 6 | 47,0 ± 4,7 |
| | 100 mg/Kg | 16,1 ± 3,2 | 89,7 ± 4,7 | 36,5 ± 5,5 | 19,4 ± 4,3 |
| | 50 mg/Kg | 15,7 ± 1,7 | 18,5 ± 5,1 | 16,0 ± 1,8 | 15,8 ± 1,9 |
| | 25 mg/Kg | 5,7 ± 1,8 | 13,4 ± 2,5 | 8,3 ± 0,2 | 5,8 ± 1,4 |
| Analgesia oral Contorsiones abdominales† | 200 mg/Kg | 59,5 ± 5,4 | 85,5 ± 4,2 | 79,8 ± 14 | 64,1 ± 3,2 |
| | 100 mg/Kg | 36,3 ± 3,9 | n.e. | 57,9 ± 3,9 | n.e. |
| | 50 mg/Kg | 21,1 ± 4,4 | n.e. | 51,1 ± 8,3 | n.e. |
| | 25 mg/Kg | 9,0 ± 1 | n.e. | 34,2 ± 3,4 | n.e. |
| Antiinflamaotria tópica Edema de oreja inducida por TPA‡ | 3 mg/20 µL | 22,8 ± 5,1 | 52,2 ± 7 | 56,7 ± 13,5 | 61,1 ± 6,6 |

Tabla 1: Tabla resumen ensayos farmacológicos previos para los extractos alcohólicos fraccionados de *B. globosa* (Backhouse *et al.*, 2007). Fármacos de referencia: *Ibuprofeno (ED₇₅ 5%), **Ibuprofeno (EC₂₅ 0,8%), *Ibuprofeno (ED₅₀ 45.9 mg/Kg), †Naproxeno sódico (ED₇₀ 12,5 mg/Kg), ‡Indometacina (ED₈₀ 0,5 mg/20 µL/oreja), n.e.: no ensayado.**

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Acetonitrilo y metanol LiChrosolv para HPLC, ácido fórmico 98-100% p.a., ácido clorhídrico 36%, los solventes de grado de laboratorio empleados para realizar las extracciones, columnas cromatográficas, columnas Sephadex, placas de cromatografía en capa fina y los solventes p.a. para las determinaciones espectrofotométricas fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua desionizada fue preparada empleando un sistema Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA).

Los patrones primarios quercetina (337951-25G), rutina (R5143-50G), luteolina (L9283-50MG), ácido cafeico (C0625-25G) y apigenina (A3145-100MG) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, USA). El patrón ácido gálico (9005271) y el reactivo Folin-Ciocalteu (1.09001.0500) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). En cuanto a los patrones secundarios 7-O-glucósido de luteolina y verbascósido, con un 95 y 93% de pureza respectivamente (determinada por HPLC), fueron separados y purificados en nuestro laboratorio. Sus estructuras fueron confirmadas por sus perfiles UV, RMN y ¹³CRMN los cuales fueron comparados con la literatura (Apablaza, 2006)

2. Estudios químicos

2.1. Obtención de los extractos alcohólicos de *B. globosa*

Las hojas de *B. globosa* con las que se realizaron los estudios fueron recolectadas en el sector de Padre las Casas, Temuco, IX Región, Chile durante el mes de octubre del año 2000 conservando un testigo herbario (#SQF: 22219). De éstas se obtuvo el extracto metanólico seriado EMAT-1 (274,81 g), por extracciones secuenciales de la hoja seca y molida (4,82 Kg) con solventes de polaridad creciente hexano, diclorometano y metanol. Además se preparó el extracto metanólico global (EMG 21,8 g) a partir de una nueva cantidad de material vegetal (227 g).

Una nueva recolección se realizó en abril (otoño) (#SQF 22297) y diciembre (verano) del 2005 (#SQF 22258) para preparar extractos etanólicos seriados ETMAT_{otoño} y ETMAT_{verano} respectivamente de la misma manera anteriormente descrita, para evaluar la influencia estacional y la del solvente. A partir de 1 Kg de material seco y molido se obtuvieron, en ambos casos, 90 g de extracto seco.

2.2. Estudios cromatográficos

2.2.1. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (c.c.f.) y espectroscopia UV del EMAT-1

Las c.c.f. se realizaron en cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ de Merck. Como fases móviles se emplearon acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6 (Fase A) y n-butanol: ácido acético: agua = 4: 1: 5 (BAW). Se observaron las placas bajo luz UV a las longitudes de onda de 254 y 366 nm y se revelaron con 2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol (NP Natural Products) (D9754-5G, Sigma-Aldrich). Los flavonoides presentaron fluorescencia anaranjada-rojiza y los feniletanoides, amarillo o amarillo verdoso, al UV-366 nm.

2.2.2. Fraccionamiento en columnas cromatográficas

2.2.2.1 Columna I

Con la finalidad de obtener mayores cantidades de verbascósido (MAT-1), 7-O-glucósido de luteolina (MAT-2) aislados en un trabajo anterior (Apablaza, 2006) y de otros dos compuestos que denominamos MAT-3 y MAT-5, se realizó un fraccionamiento de EMAT-1 (40 g) en columna de gel de sílice 60 H de Merck (6 x 40 cm con cabeza de 4 cm sobre 18 cm de gel de sílice) eluyendo con mezclas de solventes de polaridad creciente, de hexano, diclorometano, acetato de etilo, y metanol. Las fracciones fueron analizadas por c.c.f., en las que se detectó la presencia de los compuestos mencionados (fase móvil: Fase A) juntando aquellas de igual composición química, como se indica en el esquema de fraccionamiento [Tabla 2]

| Fracción | Solvente | Proporción | Compuestos | Rf |
|-----------|-------------|------------|----------------------------|-----|
| 1 - 4 | Hexano | 100 | | |
| 5 | Hex : DCM | 75 : 25 | | |
| 6 | Hex : DCM | 50 : 50 | | |
| 7 - 8 | Hex : DCM | 25 : 75 | | |
| 9 - 21 | DCM | 100 | | |
| 22 - 28 | DCM : EtAc | 90 : 10 | | |
| 29 - 41 | DCM : EtAc | 80 : 20 | | |
| 42 - 71 | DCM : EtAc | 70 : 30 | | |
| 72 - 89 | DCM : EtAc | 60 : 40 | | |
| 90 - 99 | DCM : EtAc | 50 : 50 | | |
| 100 - 111 | DCM : EtAc | 40 : 60 | | |
| 112 - 129 | DCM : EtAc | 30 : 70 | Verbascósido | 0,4 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0,5 |
| 130 - 153 | DCM : EtAc | 20 : 80 | Verbascósido | 0,4 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0,5 |
| 154 - 211 | EtAc | 100 | Verbascósido | 0,4 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0,5 |
| 212 - 338 | EtAc : MeOH | 95 : 5 | Verbascósido | 0,4 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0,5 |
| | | | MAT-3 | 0,3 |
| 339 - 347 | EtAc : MeOH | 92 : 8 | Verbascósido | 0,4 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0,5 |
| | | | MAT-3 | 0,3 |
| | | | MAT-5 | |

| | | | | |
|-----------|-------------|---------|----------------------------|-----|
| 348 - 393 | EtAc : MeOH | 90 : 10 | Verbascósido | 0,4 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0,5 |
| | | | MAT-3 | 0,3 |
| | | | MAT-5 | 0,2 |
| 394 - 401 | EtAc : MeOH | 80 : 20 | MAT-3 | 0,3 |
| | | | MAT-5 | 0,2 |
| 402 - 558 | EtAc : MeOH | 75 : 25 | MAT-3 | 0,3 |
| | | | MAT-5 | 0,2 |
| 509 | MeOH | 100 | MAT-3 | 0,3 |
| | | | MAT-5 | 0,2 |

Tabla 2: Esquema de fraccionamiento de columna I para EMAT-1 (40 g)

2.2.2.2 Columna II

De las fracciones 194 a 305 (24,1 g) obtenidas de la columna I, que contenían mayoritariamente MAT-3 y MAT-5, fueron sometidas a una columna rápida de gel de sílice eluyendo de la siguiente manera [Tabla 3]

| Fracción | Solvente | Proporción | Compuestos | Rf* |
|----------|-------------|------------|----------------------------|------|
| 1 | Hexano | 100 | | |
| 2 - 3 | DCM | 100 | | |
| 4 - 5 | DCM : EtAc | 50 : 50 | | |
| 6 - 7 | DCM : EtAc | 20 : 80 | Verbascósido | 0.68 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0.72 |
| 8 - 19 | EtAc | 100 | Verbascósido | 0.68 |
| | | | 7-O-glucósido de luteolina | 0.72 |
| 20 - 24 | EtAc : MeOH | 99 : 1 | MAT-3 | 0.60 |
| | | | MAT-5 | 0.55 |
| 25 - 28 | EtAc : MeOH | 95 : 5 | MAT-3 | 0.60 |
| | | | MAT-5 | 0.55 |

Tabla 3: Esquema de fraccionamiento de columna II para fracciones 194 a 305 de columna I (24,1 g).

* Fase móvil A para c.c.f

2.2.3. Purificación en columna por medio de Sephadex LH-20

Para el aislamiento y purificación de los compuestos se recurrió a sucesivas columnas de Sephadex LH-20 (Fluka Chemie, Suiza), usando HEX: DCM: MEOH = 0,5: 1,5: 2,0 como fase móvil.

La columna de Sephadex LH-20 permite la separación de los compuestos según su peso molecular. Se utilizó una columna de 1,5 cm diámetro y de 58 cm de largo y una altura de Sephadex decantado de 18,5 cm. Previo a la preparación de la columna se suspendió éste por media hora en metanol; y una vez incorporado en la columna se ambientó agregando tres veces la fase móvil (HEX: DCM: MEOH = 0,5: 1,5: 2,0). Se incorporó la muestra disuelta en la mezcla de solvente y se eluyó con la fase mencionada.

Las muestras purificadas por Sephadex corresponden al concentrado 1 de la colección de fracciones de 306 a 310 de la columna I de gel de sílice, empleada para el aislamiento y purificación principalmente de los compuestos MAT3 y MAT5 además de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina, y el concentrado 2 que correspondió a las fracciones que contenían MAT-3 y MAT-5 obtenidas por elusión en la columna II. La purificación de los compuestos se logró luego de repetir sucesivamente este proceso hasta lograr la máxima separación de los compuestos respectivos [Tabla 2 y 3].

3. Estudios farmacológicos *in vivo*

El trabajo con los animales de experimentación, se ajustó a principios éticos, contemplados en las Normas Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales, elaboradas por el consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 108 (5-6): 637-641). Actualmente aplicadas por la Unidad de Mantención de Animales del Instituto de Salud Pública de Chile y por el Programa de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, centros donde se realizaron estos ensayos.

3.1. Animales de experimentación y muestras en estudio.

Para evaluar la actividad analgésica mediante distintos métodos de inducción química y térmica de dolor agudo y la actividad antiinflamatoria tópica se emplearon

ratones de la cepa CF-1 de ambos sexos, entre 28 ± 2 g los cuales fueron ambientados a las condiciones del laboratorio dos horas previas a los ensayos y se mantuvieron en ayunas por doce horas antes de cada experimento y con agua *ad libitum*.

Las muestras ensayadas correspondieron a los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina, los que fueron administrados vía oral y vía tópica de acuerdo al ensayo a dosis y concentraciones equimolares al fármaco de referencia. Además se evaluaron las formulaciones en crema y gel de EMAT-1 (1%).

3.2. Evaluación de la actividad analgésica mediante el ensayo del latigazo de la cola (Tail Flick Test)

Para este ensayo se empleó un algesiómetro Ugo-Basile (Milán, Italia). Este dispositivo induce dolor agudo térmico en la cola del ratón, haciéndole incidir radiación I.R. y registra el tiempo el cual el ratón es capaz de soportar el calor (tiempo de latencia), lo cual es proporcional al efecto analgésico de la muestra (Miranda *et al.*, 2003). Para el ensayo se utilizaron grupos de 6 ratones. Se determinaron y compararon los tiempos de latencia de los animales controles y los animales tratados.

Los resultados fueron expresados como la diferencia en el tiempo de latencia (media \pm S.E.M.) entre la media de las dos lecturas de controles y la diferencia de latencia experimental, con estos datos se calculó el Efecto Máximo Posible (E.M.P.) mediante la ecuación:

$$\% E.M.P. = \frac{100 \times (Lat_f - Lat_i)}{t_{cut-off} - Lat_i}$$

Donde:

Lat_f : Tiempo de latencia posterior a la administración de la muestra.

Lat_i : Tiempo de latencia previa a la administración de la muestra.

t_{cut-off} : Tiempo máximo de exposición de la cola al calor. En este caso corresponde a 8 segundos.

La significancia estadística entre los grupos fue calculada por el test de student. Valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.2.1. Ensayo del latigazo de la cola vía oral

Se administró a cada uno de los 6 ratones por vía oral 0,4 mL de una suspensión o solución en concentración equimolar al ED₂₅ (45,4 mg/Kg, 0,22 mmol/Kg) del fármaco de referencia, ibuprofeno. Para esto se administró 98,56 mg/Kg de 7-O-glucósido de luteolina en suspensión y 137,6 mg/Kg de verbascósido en solución acuosa, equivalentes a 0,22 mmol/Kg. Luego de la administración se esperaron 30 minutos antes de realizar la algiesimetría para permitir la absorción de los compuestos en el tracto gastrointestinal.

3.2.2. Ensayo del latigazo de la cola vía tópica

Se prepararon soluciones al 1% p/v de ambos compuestos en DMSO, concentraciones similares al ED₂₅ (0,8%) del fármaco de referencia, ibuprofeno. Se sumergió la cola del ratón por un tiempo de tres minutos y luego se esperó cinco minutos previos a la algiesimetría. Para las formulaciones en gel y crema de EMAT-1 se aplicó manualmente sobre la cola del ratón una porción de estas hasta cubrirla completamente, una vez transcurridos los 3 minutos se limpió la cola y se esperó cinco minutos previos a la algiesimetría.

3.3. Evaluación de la actividad analgésica oral mediante el ensayo de las contorsiones abdominales

Mediante este ensayo se evaluó la capacidad analgésica vía oral de los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina a dosis equimolar al ED₇₀ del fármaco de referencia, naproxeno sódico (0,05 mmol/Kg) e inferior al ED₅₀ de ibuprofeno (0,07 mmol/Kg).

Por medio de una sonda gástrica se administró una dosis de 30,80 mg/Kg de verbascósido y de 22,04 mg/Kg de 7-O-glucósido de luteolina en 0,4 mL de solución acuosa. Transcurridos 30 minutos de la administración de la muestra, los animales fueron inyectados por vía i.p. con 0,1 mL/10 g ratón de ácido acético al 0,6% y se contabilizó el número de contorsiones abdominales durante un intervalo de 5 minutos. Se considera contorsión a la contracción de los músculos abdominales, acompañados por una elongación del cuerpo y extensión de las patas traseras.

La actividad antinociceptiva fue calculada comparando la mediana del número de contorsiones de los animales tratados con respecto a la mediana de los animales controles, los cuales sólo recibieron el vehículo, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%EAN = 100 - \left(\frac{M_{CT}}{M_{CC}} \right) \times 100$$

Donde:

%EAN : Porcentaje de efecto antinociceptivo.

M_{CT} : Mediana del número de contorsiones de animales tratados.

M_{CC} : Mediana del número de contorsiones de animales controles.

La significancia estadística fue calculada mediante el método de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

3.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica mediante el ensayo de inducción de edema en oreja de ratón.

La actividad antiinflamatoria tópica de los compuestos fue evaluada mediante el método de inducción de edema en oreja de ratón por un agente inflamatorio. Se evaluaron 6 animales para cada compuesto.

Para el ensayo se empleó como agente inflamatorio acetato de tetradecanoilforbol (TPA), el cual al ser aplicado localmente produce una reacción inflamatoria aguda caracterizada por el aumento de la permeabilidad vascular, edema e influjo celular al estimular la liberación de leucotrienos, entre otros mediadores químicos, generando una inflamación máxima a las 4 horas de ser aplicado (Lloret y Moreno, 1995; Delporte *et al.*, 2002).

Los compuestos aislados fueron disueltos en etanol 75% aplicando tópicamente una dosis por ratón de 0,87 mg/20 μ L para verbascósido y 0,63 mg/20 μ L para 7-O-glucósido de luteolina, tanto en la cara interna como en la externa de la oreja derecha (OD) de cada animal. Las dosis anteriormente descritas son equimolares al ED₈₀ del fármaco de referencia, indometacina (1,4 mmol/20 μ L/oreja). En la oreja izquierda (OI) se aplicó sólo el solvente. Luego de 5 minutos se aplicaron 10 μ L de solución 1,5 mg/10 μ L de TPA en acetona por cada cara de la OD y en la OI se aplicó el vehículo del mismo modo que en la OD. Luego de 4 horas se sacrificaron los animales por dislocación cervical y mediante un sacabocado se extrajeron trozos de 6 mm de diámetro de cada oreja del ratón. De este modo, la inflamación se estableció como el aumento de peso (edema) de la porción de oreja derecha que recibió el agente y el compuesto aislado respecto el peso de la porción de oreja izquierda que sólo recibió tópicamente el vehículo (Delporte *et al.*, 2002).

El porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico (%EAIT) se calculó comparando la mediana de las diferencias de peso de las OD y OI de los ratones tratados con la mediana de las diferencias de peso de las OD y OI de 16 controles en la siguiente fórmula:

$$\%EAIT = \frac{M_{ODC-OIC} - M_{ODT-OIT}}{M_{ODC-OIC}} \times 100$$

Donde:

- %EAIT : Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico.
- $M_{ODC-OIC}$: Mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales controles.
- $M_{ODT-OIT}$: Mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales tratados.

La significancia estadística fue calculada mediante el método de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

4. Análisis cuantitativo de los extractos alcohólicos de *B. globosa*

4.1. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos activos de *B. globosa* por HPLC

La cuantificación de los componentes de los extractos alcohólicos seriados de *B. globosa* se realizó por HPLC, basándose en la metodología para la cuantificación de los flavonoides de *Ginkgo biloba* (Dubber y Kanfer, 2004). Esta metodología fue adaptada para nuestros propósitos (Apablaza, 2006), estableciéndose las condiciones óptimas para la correcta definición de los extractos en HPLC (Apablaza, 2006).

Estas condiciones corresponden a:

- Columna : C₁₈ 4,6 x 250 mm, Inertsil ODS-3 5,0 μ m
GL Sciences Inc. (4DI86103), Japón.
- Flujo : 1,5 mL/min
- Fase móvil : ácido fórmico 0,1%: acetronitrilo = 75: 25
- Volumen de inyección : 20 μ L
- Longitud de onda : 365 nm

Todos los análisis fueron desarrollados en un equipo HPLC Waters 486, bomba Waters 600 y acoplado a un detector UV/Visible Waters 986 con arreglo de diodos. Para el análisis de datos se empleó el software Millennium³² 4.00.

Bajo estas condiciones se trabajó en todos los ensayos determinándose los tiempos de retención para los patrones, el establecimiento de las curvas de calibración y la identificación de los compuestos presentes en el extracto de acuerdo a los cromatogramas obtenidos.

Se evaluó además el efecto de variar la longitud de onda de detección, buscando obtener la mejor resolución de los compuestos del extracto en el cromatograma. Los cromatogramas fueron extraídos a la longitud de onda de 365 nm.

4.1.1. Preparación de soluciones

Para obtener las curvas de calibración se prepararon soluciones stock de 400 ppm de los patrones luteolina, quercetina, apigenina, rutina y ácido cafeico en metanol LiChrosolv para HPLC. Tanto para 7-O-glucósido de luteolina y verbascósido se preparó una solución stock de 300 ppm en metanol: agua = 50: 50 y metanol, respectivamente. Antes de completar el volumen de la solución de 7-O-glucósido de luteolina fue necesario calentar durante 1 minuto en baño de agua a 60° C para lograr total disolución. De las soluciones anteriores se obtuvieron por dilución las concentraciones necesarias para los puntos de la recta concentración versus área.

Para determinar las mejores condiciones de análisis y cuantificar las especies presentes en los extractos se prepararon soluciones de EMAT-1, ETMAT_{otoño}, ETMAT_{verano} y EMG en metanol y metanol: agua = 50: 50, las cuales fueron sometidas a sonicación por 5 minutos y filtradas por membrana GV (Durapore) 0,22 µm de poro (GVWP01300) en un dispositivo Swinnex (SX0001300) adquiridos de Millipore Corp., Billerica, MA, USA y acoplado a jeringa de vidrio.

4.2. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos activos de *B. globosa* por espectrofotometría UV

Para los análisis cuali y cuantitativos se empleó un espectrofotómetro UV/Visible Unicam UV3. Las muestras se filtraron empleando papel filtro Whatman 40.

4.2.1. Método de Glories:

La valoración de distintas familias de compuestos de los extractos de *B. globosa* se realizó mediante el método de Glories (Mazza *et al.*, 1999), el cual fue previamente adaptado y validado (Apablaza *et al.*, 2006; Apablaza, 2006), estableciéndose las curvas de calibración con los patrones quercetina, ácidos cafeico y gálico a 360, 320 y 280 nm, respectivamente. Éste método permite la cuantificación diferenciada de compuestos fenólicos midiendo las abosbancias a tres longitudes de onda de una muestra rica en compuestos fenólicos.

Para una mejor representabilidad de los resultados se propuso utilizar otros flavonoides como compuestos de referencia para la determinación de éstos, basado en mayores similitudes estructurales con 7-O-glucósido de luteolina, flavonoide mayoritario del extracto. Se eligió rutina y luteolina: el primero difiere en la osa compuesta de glucosa y ramnosa, esterificando el OH del carbono 3, y el segundo corresponde a la genina (ausencia de glucosa esterificando el OH del carbono 7). Las curvas de calibración con los patrones ácido gálico (λ_{\max} 280 nm), ácido cafeico (λ_{\max} 320), luteolina (λ_{\max} 350 nm) y rutina (λ_{\max} 359), se realizaron a las longitudes de onda 280, 320 y 352 y 360 nm con cada uno a las siguientes concentraciones [Tabla 4]:

| Patrón | Concentración $\mu\text{g/mL}$ | | | | |
|---------------|--------------------------------|------|------|------|------|
| Ácido gálico | 7,5 | 12,5 | 15,0 | 17,5 | 20,0 |
| Ácido cafeico | 2,5 | 5,0 | 6,0 | 7,5 | 10,0 |
| Luteolina | 3,8 | 5,7 | 7,6 | 9,5 | 11,5 |
| Rutina | 3,8 | 5,7 | 7,6 | 9,5 | 11,5 |

Tabla 4: Concentraciones empleadas para las curvas de calibración del método de Glories

Para la valoración de los extractos se preparó una solución a 1 mg/mL en etanol 95% por triplicado, la cual se sometió a ultrasonido por 15 minutos y se filtró (papel Whatman 40) para preparar la solución a leer en el espectrofotómetro de acuerdo al siguiente protocolo [Tabla 5]:

| Solución filtrada del extracto | HCl 0,1% en etanol al 95% | HCl 2% | Volumen total |
|--------------------------------|---------------------------|--------|---------------|
| 0,5 mL | 0,5 mL | 9 mL | 10 mL |

Tabla 5: Protocolo de preparación de soluciones para analizar por el método de Glories

4.2.2. Método de Folin-Ciocalteu:

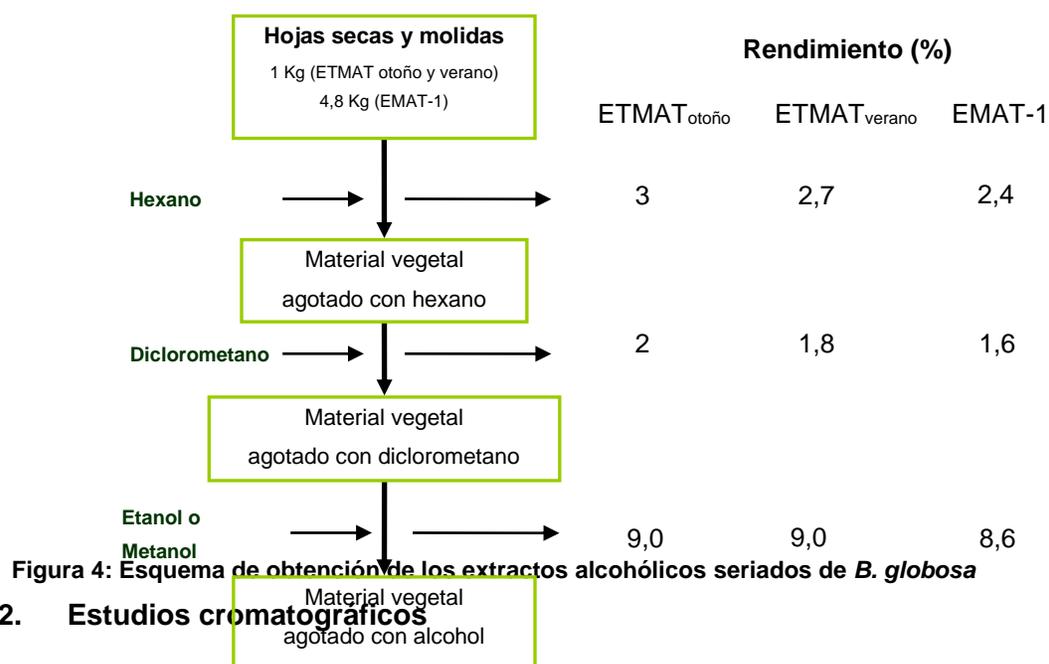
La cuantificación de fenoles totales hidrosolubles de los extractos EMAT-1, ETMAT_{verano}, ETMAT_{otoño} y EMG se realizó por el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994), lo que permitió comparar los resultados obtenidos por ambas metodologías. La curva de calibración se realizó usando ácido gálico en un rango de concentración de 0,5 a 30 $\mu\text{g/mL}$. Se preparó una solución acuosa del extracto a la concentración de 1 mg/mL en agua, se sonicó por 15 minutos y se filtró (Whatman 40).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudios químicos

1.1. Obtención de los extractos alcohólicos de *B. globosa*

De la extracción de las hojas secas y molidas de *B. globosa* con solventes de polaridad creciente se obtuvo el extracto metanólico seriado (EMAT-1) con un 8,6% de rendimiento como se indica en el esquema de la figura 4. Del material vegetal recolectado en otoño y verano y extraídos con etanol de la misma forma que EMAT-1 se obtuvieron los extractos ETMAT_{otoño} y ETMAT_{verano} [Figura 4] con un rendimiento del 9%. De estos resultados se puede concluir que no hubo diferencias en los rendimientos de las hojas recolectadas en diferentes épocas del año, sin embargo cabe resaltar que esto no permite concluir que no exista una variación estacional en la abundancia de los compuestos activos de los extractos.



1.2. Estudios cromatográficos

El fraccionamiento del EMAT-1 en columna de gel de sílice llevó a la obtención de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina a partir de las fracciones eluidas con DCM: EtAc = 30: 70 hasta EtAc: MeOH = 90: 10 [Tabla 3] (concentrado 1) los cuales fueron separados en una columna rápida de gel de sílice (columna II) y posteriormente en columnas sucesivas de Sephadex obteniéndose 350 mg de verbascósido y 220 mg de 7-O-glucósido de luteolina de pureza superior al 93% (determinado por HPLC).

A partir de las eluciones obtenidas en columna I desde EtAc: MeOH = 92: 8 se obtuvo la mezcla de los compuestos MAT-3 y MAT-5, las que fueron sometidas a una nueva columna rápida y posteriormente a columnas Sephadex obteniéndose 66 mg de MAT-3 y 1,30 g de MAT-5.

1.2.1. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (c.c.f.) y espectroscopia UV del EMAT-1

Del estudio por c.c.f. se pudo observar la presencia de cuatro componentes principales que presentaron fluorescencia al UV-366 nm y dieron reacción positiva con NP/PEG. Entre ellos los mayoritarios verbascósido, luteolina 7-O-glucósido y en menor proporción MAT-3 y MAT-5 cuyas estructuras se encuentran en vías de identificación.

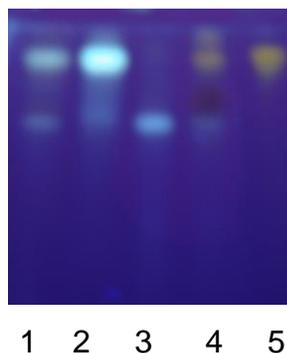


Figura 5: Cromatografía en capa fina del EMAT-1 y de los compuestos purificados por columna Sephadex. Revelada con NP a UV-366 nm (Fase móvil A)
1) EMAT-1; 2) Verbascósido; 3) MAT-5; 4) 7-O-glu-luteolina, MAT-3 y MAT-5; 5) 7-O-glu-luteolina

1.2.1.1. Caracterización del compuesto MAT-3

El compuesto MAT-3, el cual se purificó por cristalizaciones sucesivas desde el metanol, obteniéndose 66 mg de un sólido cristalino amarillo pálido. Su Rf y fluorescencia al UV y con reactivos reveladores se resumen en la Tabla 6.

Se determinó su espectro de absorción al UV (220 a 400 nm) [Figura 6] presentando máximos de absorbancia a 284 y 346 nm, banda I característica posiblemente de un flavonol con OH en el C-3 libre (352 – 385 nm).

| Revelador | Coloración | Rf |
|-------------------|---|------|
| NH ₃ | Amarillo anaranjado (Vis) Morado oscuro (UV) | 0,62 |
| AlCl ₃ | Café anaranjado (UV) | |
| NP | Rojo (UV) | |

Tabla 6: Caracterización cromatográfica de compuesto MAT-3
(Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6)

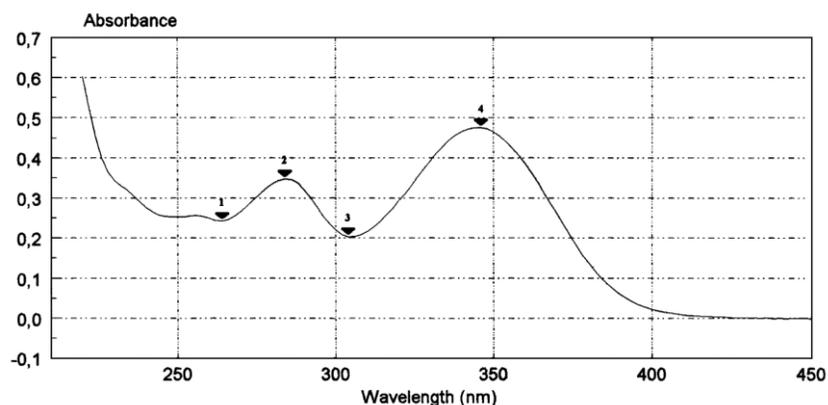


Figura 6: Espectro UV compuesto MAT-3 aislado por columna Sephadex
1) 264 nm; 2) 284 nm 3) 304 nm 4) 346 nm

1.2.1.2. Caracterización del compuesto MAT-5

Por evaporación de solvente se aislaron 1,30 g del compuesto MAT-5, siendo una sustancia semi sólida de color pardo amarillento, altamente soluble en metanol y en agua. Su Rf y fluorescencia al UV y con reactivos reveladores se resumen en la Tabla 7

| Revelador | Coloración | Rf |
|-------------------|-----------------------|------|
| NH ₃ | Amarillo pálido (Vis) | 0,63 |
| | Naranja palido (UV) | |
| AlCl ₃ | Celeste | |
| NP | Amarillo verdoso (UV) | |

Tabla 7: Caracterización cromatográfica de compuesto MAT-5
(Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6)

Se determinó también su espectro de absorción al UV (220 – 400 nm) el cual resultó ser característico de un derivado del ácido cafeico [Figura 7].

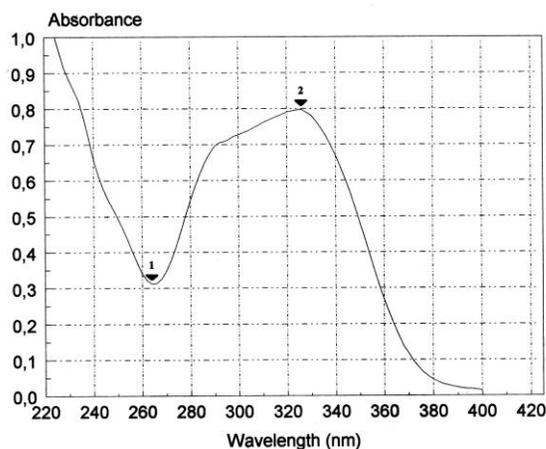


Figura 7: Espectro UV compuesto MAT-5 aislado por columna Sephadex
1) 264 nm; 2) 326 nm

1.2.1.3. Caracterización de verbascósido

Por evaporación de solvente de las fracciones recolectadas en la separación y purificación de los compuestos de EMAT-1 tanto de columnas de gel de sílice (Columnas I y II) y columnas sucesivas de Sephadex se obtuvo una cantidad de 350 mg de verbascósido el cual demostró ser un compuesto semi sólido de color pardo oscuro con un espectro de absorción UV (220 – 400 nm) mostrado en la figura 8.

Sus características cromatográficas se detallan en la tabla 8:

| Revelador | Coloración | Rf |
|-------------------|-------------------------|------|
| NH ₃ | No hay coloración (Vis) | |
| | Celeste (UV) | 0,87 |
| AlCl ₃ | Celeste | |
| NP | Verde claro (UV) | |

Tabla 8: Caracterización cromatográfica de verbascósido
(Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua = 10: 1,1: 1,1: 2,6)

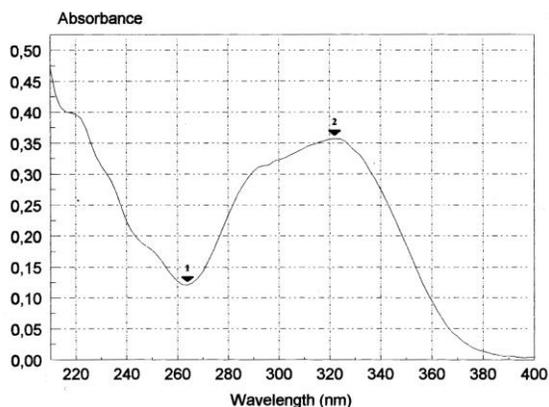


Figura 8: Espectro de absorción UV de verbascósido
1) 264 nm; 3) 322 nm

2. Estudios farmacológicos *in vivo*

Se han descrito en la literatura las propiedades antiinflamatoria, analgésica y antioxidante de dos de los compuestos mayoritarios, aislados e identificados en los estudios cromatográficos del EMAT-1: verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina. Se propuso evaluar las propiedades analgésica y antiinflamatoria de estos compuestos, basándonos en los estudios *in vitro* reportados por los autores además de los resultados obtenidos previamente con los extractos alcohólicos seriados (Backhouse *et al.*, 2007)

2.1. Evaluación de la actividad analgésica mediante el ensayo del latigazo de la cola (Tail flick test)

Este ensayo nos permitió evaluar la actividad analgésica central de los compuestos mencionados y demostrar que la actividad de los extractos alcohólicos de *B. globosa* se debe a la presencia de estos metabolitos.

2.1.1. Ensayo del latigazo de la cola vía oral para los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina

Los resultados experimentales obtenidos para una dosis de 98,56 mg/Kg para 7-O-glucósido de luteolina y 137,6 mg/Kg para verbascósido (equimolares a la ED₂₅ de ibuprofeno) son los siguientes:

| Latencia control promedio (s) | Latencia experimental promedio (s) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 2,9 | 4,1 |
| 2,6 | 3,9 |
| 2,6 | 4,9 |
| 2,4 | 3,1 |
| 2,6 | 3,9 |
| 2,2 | 4,6 |

Tabla 9: Resultados del latigazo de la cola vía oral para 7-O-glucósido de luteolina

| Latencia control promedio (s) | Latencia experimental promedio (s) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 2,8 | 3,9 |
| 2,6 | 4,3 |
| 2,4 | 4,2 |
| 2,9 | 3,6 |
| 2,8 | 4,9 |
| 2,6 | 4,0 |

Tabla 10: Resultados del latigazo de la cola vía oral para verbascósido

De los cuales se obtienen los siguientes efectos máximos posibles (E.M.P.) [Tabla 11]:

| Compuesto | Δ latencia (s) | Efecto máximo posible (%) |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 7-O-glucósido de luteolina | 1,54 \pm 0,27 | 28,24 \pm 4,99 |
| Verbascósido | 1,46 \pm 0,20 | 27,47 \pm 3,81 |

Tabla 11: Efecto máximo posible para verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina a 98,56 y 137,6 mg/Kg, respectivamente en ensayo del latigazo de la cola vía oral.

Se puede apreciar un efecto analgésico central levemente superior al del fármaco de referencia.

2.1.2. Ensayo del latigazo de la cola vía tópica para los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina

Los resultados experimentales obtenidos para 7-O-glucósido de luteolina y verbascósido se expresan en las tablas 12 y 13:

| Latencia control promedio (s) | Latencia experimental promedio (s) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 2,5 | 4,3 |
| 2,3 | 5,6 |
| 2,8 | 3,8 |
| 2,5 | 4,5 |
| 2,6 | 3,9 |
| 2,8 | 3,3 |

Tabla 12: Resultados del latigazo de la cola vía tópica para 7-O-glucósido de luteolina

| Latencia control promedio (s) | Latencia experimental promedio (s) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 2,8 | 3,5 |
| 2,5 | 4,5 |
| 2,4 | 3,5 |
| 2,7 | 3,9 |
| 2,4 | 3,5 |
| 2,7 | 4,4 |

Tabla 13: Resultados del latigazo de la cola vía tópica para verbascósido

De los resultados experimentales para soluciones al 1% de 7-O-glucósido de luteolina y verbascósido en DMSO (equivalentes a la ED₂₅ de ibuprofeno) se obtiene los siguientes E.M.P. [Tabla 14]:

| Compuesto | Δ latencia (s) | Efecto máximo posible (%) |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 7-O-glucósido de luteolina | 1,63 \pm 0,39 | 30,25 \pm 7,29 |
| Verbascósido | 1,33 \pm 0,20 | 24,46 \pm 3,61 |

Tabla 14: Efecto máximo posible para verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina al 1% en DMSO en ensayo del latigazo de la cola vía tópica.

Se aprecia que el 7-O-glucósido de luteolina posee un efecto analgésico tópico mayor al oral. Esto podría deberse a que el glucósido de luteolina es difícilmente absorbible en el tracto intestinal como tal y debe ser sometido a la acción enzimática de la microflora para así ser absorbido como aglicona (Shimoi *et al.*, 1998), pudiendo ser el tiempo esperado para realizar las mediciones inferior al necesario para que las β -glucuronidasas bacterianas hidrolicen una cantidad superior del glucósido para obtener efectos analgésicos mayores. Además, estudios *in vivo* de penetración en piel de flavonoides han demostrado que pueden ser absorbidos de la superficie dérmica y penetrar en capas cutáneas más profundas (Merfort *et al.*, 1994) lo cual justificaría su mayor actividad tópica.

Con respecto al verbascósido, su actividad analgésica tópica es también importante, aportando al efecto analgésico total del extracto.

2.1.3. Ensayo del latigazo de la cola vía tópica para las formulaciones del EMAT-1 en gel y crema al 1% de EMAT-1.

Se evaluó la actividad analgésica tópica a dos formulaciones dermatológicas que se someterán a estudios clínicos:

| Latencia control promedio (s) | Latencia experimental promedio (s) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 2,8 | 5,2 |
| 2,6 | 5,6 |
| 2,4 | 5,2 |
| 2,8 | 6,0 |
| 2,4 | 5,0 |
| 2,4 | 4,0 |

Tabla 15: Resultados del latigazo de la cola vía tópica para gel al 1% de EMAT-1

| Latencia control promedio (s) | Latencia experimental promedio (s) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 2,5 | 4,2 |
| 2,2 | 4,9 |
| 2,6 | 4,1 |
| 2,6 | 5,9 |
| 2,9 | 5,3 |
| 2,4 | 5,9 |

Tabla 16: Resultados del latigazo de la cola vía tópica para crema al 1% de EMAT-1

Obteniendo los siguientes E.M.P.:

| Formulación | Δ latencia (s) | Efecto máximo posible (%) |
|-------------|-----------------------|---------------------------|
| Gel | 2,61 \pm 0,23 | 47,93 \pm 4,23 |
| Crema | 2,50 \pm 0,33 | 45,87 \pm 6,07 |

Tabla 17: Efecto máximo posible para formulaciones en gel y crema al 1% de EMAT-1 en ensayo del latigazo de la cola vía tópica.

El efecto analgésico obtenido para ambas formulaciones nos entregó una noción preliminar de la actividad analgésica tópica de dos preparados dermatológicos que se someterán a estudios clínicos, mostrando un efecto analgésico similar al de los compuestos aislados.

2.2. Evaluación de la actividad analgésica oral mediante el ensayo de las contorsiones abdominales para los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina

El dolor peritoneovisceral que presentan los ratones puede ser causado tanto por reflejos viscerales como somáticos debido a que la región peritoneana recibe también innervación somática (Le Bars *et al.*, 2001). Considerando que la nocicepción visceral incluye componentes de dolor periférico (Vergnolle, 2004), este ensayo entregó información sobre actividad analgésica central y/o periférica de los compuestos aislados.

Respecto a la mediana del número de contorsiones abdominales de los ratones control ($18,5 \pm 0,7$ contorsiones) se obtuvieron los siguientes resultados:

| | Animales tratados | | Efecto (%) | | |
|----------------------------|------------------------|-------|------------|----------|--------|
| | Número de contorsiones | | Mediana | ± S.E.M. | p |
| Verbascósido | 6,0 | ± 0,4 | 67,6 | ± 2,3 | 0,0002 |
| 7-O-glucósido de luteolina | 13,5 | ± 1,9 | 27,0 | ± 9,1 | 0,0083 |

Tabla 18: Efecto analgésico de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina por el método de las contorsiones abdominales

Se observa que el compuesto verbascósido posee una elevada actividad analgésica vía oral respecto al 7-O-glucósido de luteolina. Si consideramos que el verbascósido es altamente soluble en agua y que el 7-O-glucósido de luteolina sólo pudo ser administrado como suspensión acuosa y como se mencionó anteriormente se requiere de biotransformación del glucósido de luteolina previamente a ser absorbido, La diferencia en el efecto podrían ser atribuibles tanto a la diferencia de solubilidad de los compuestos como a la facilidad que tengan los mismos por atravesar las paredes del tracto gastrointestinal además de las características farmacológicas intrínsecas a su estructura química.

2.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica mediante el ensayo de inducción de edema en oreja de ratón.

No se encontró efecto antiinflamatorio por este método para ninguno de los compuestos, por lo que el posible mecanismo para el extracto de origen EMAT-1 sería por otra vía. Se requerirán de otros ensayos en investigaciones futuras para dilucidar el mecanismo antiinflamatorio de estos compuestos.

3. Análisis cuantitativo de los extractos alcohólicos activos de *B. globosa*

Para asegurar la calidad de un futuro fitofármaco en base al extracto alcohólico seriado de *B. globosa* es necesario establecer su estandarización química mediante una metodología que sea repetible, precisa y específica.

3.1. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos activos de *B. globosa* por HPLC

En búsqueda de una mayor especificidad en la cuantificación de los metabolitos activos, se propuso establecer una metodología HPLC que entregue de manera rápida y eficiente la abundancia de cada uno de ellos. Como se pudo comprobar en los estudios farmacológicos, el feniletanoide varbascósido y el flavonoide 7-O-glucósido de luteolina son importantes responsables de la actividad analgésica del extracto, por esta razón los hemos considerado los principales marcadores en la relación concentración-efecto.

3.1.1. Diseño de la metodología

3.1.1.1. Selección del solvente de la muestra

Para seleccionar el solvente más adecuado de la muestra para el análisis del extracto se obtuvieron cromatogramas a UV-365 nm de soluciones 2,70 mg/mL y 2,15 mg/mL en MeOH: H₂O = 50: 50 y MeOH 100%, respectivamente; obteniéndose los siguientes cromatogramas [Fig 9 y 10].

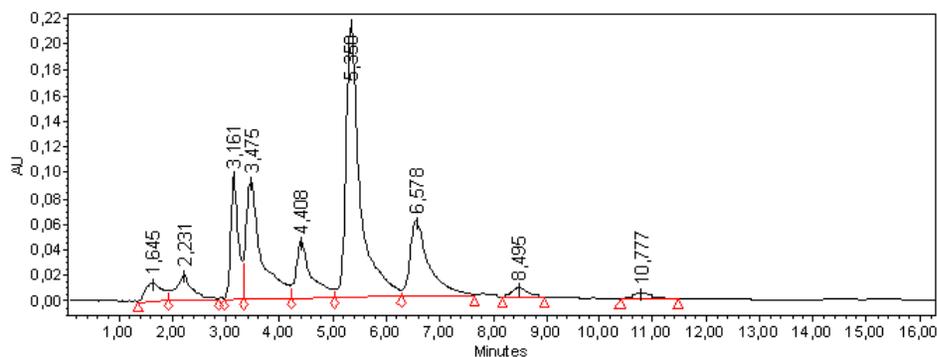


Figura 9: Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,15 mg/mL en MeOH: H₂O = 50: 50 a 365 nm

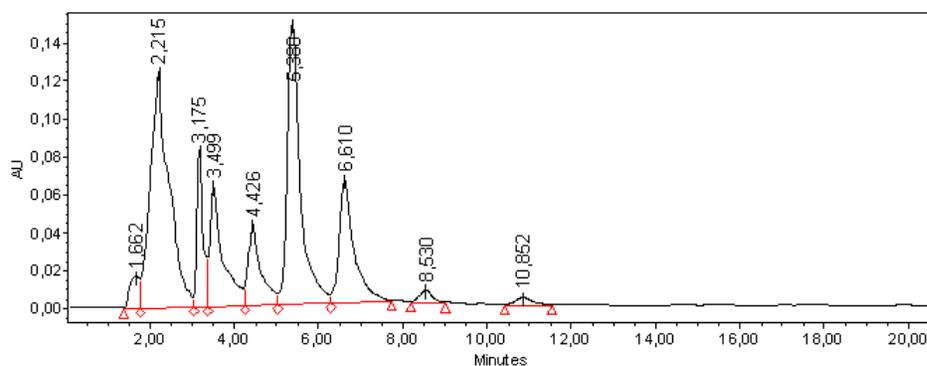


Figura 10: Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,70 mg/mL en MeOH 100% a 365 nm

La mejor solubilidad se obtiene con una solución del extracto en MeOH: Agua = 50: 50 de los compuestos, especialmente el que posee un tiempo de retención de 2,215 min cuya área se ve aumentada significativamente al solubilizar en MeOH 100% y podría estar interfiriendo con la cuantificación de los otros compuestos.

3.1.1.2. Selección de la longitud de onda

Para seleccionar la longitud de onda que defina mejor los cromatogramas de los extractos se comparó el perfil cromatográfico de EMAT-1 2,28 mg/mL a distintas longitudes de onda: 254, 330 y 365 nm [Figuras 11, 12 y 13]

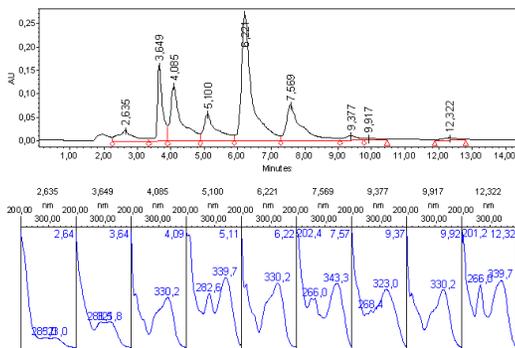


Figura 11: Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,28 mg/mL en MeOH: H₂O = 50: 50 a 254 nm

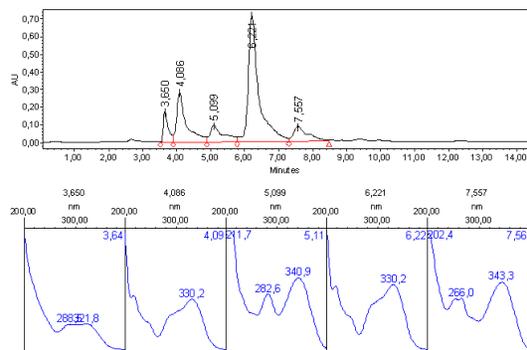


Figura 12: Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,28 mg/mL en MeOH: H₂O = 50: 50 a 330 nm

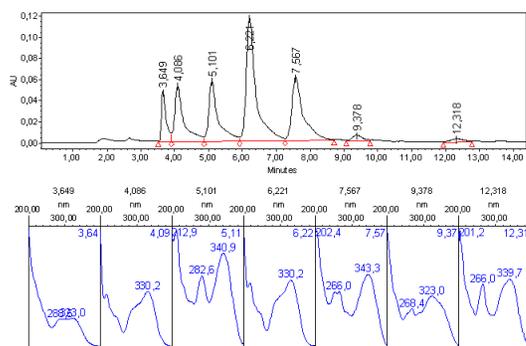


Figura 13: Cromatograma HPLC para EMAT-1 2,28 mg/mL en MeOH: H₂O = 50: 50 a 365 nm

La longitud de onda de detección que mejor define el cromatograma de los extractos alcohólicos de *B. globosa* correspondió a 365 nm. Ésta permitió, mediante el detector de arreglo de diodos, una adecuada identificación de los principales compuestos presentes en los extractos.

3.1.1.3. Identificación de los compuestos en cromatograma de HPLC

Con las condiciones analíticas establecidas se determinaron los tiempos de retención para los compuestos responsables de la actividad farmacológica del extracto alcohólico [Figura 14 y Tabla 19]. Para esto se compararon los espectros UV y los tiempos de retención de los metabolitos del extracto con los obtenidos al inyectar tanto patrones primarios como secundarios (purificados por columnas Sephadex sucesivas y

seguidos por c.c.f.) en las mismas condiciones. Los espectros UV fueron también comparados con la literatura (Mabry *et al.*).

Se pudo identificar los siguientes compuestos:

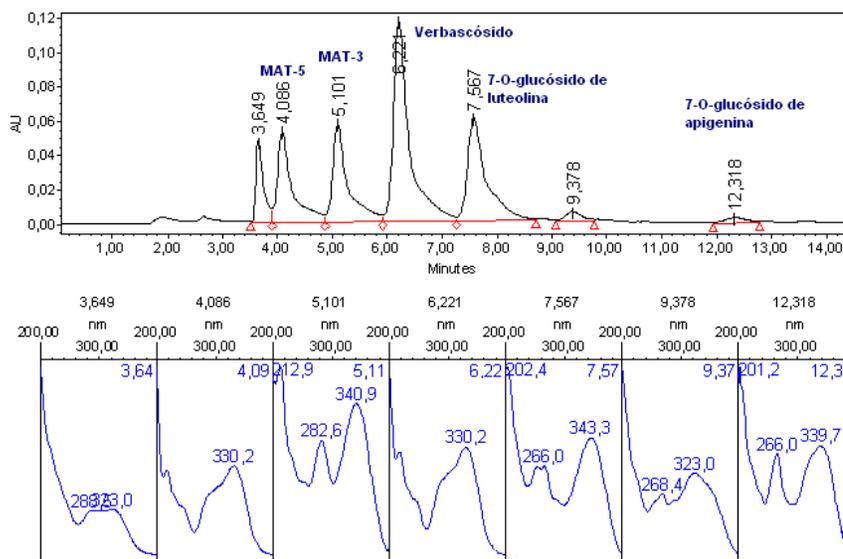


Figura 14: Identificación de compuestos en cromatograma HPLC de EMAT-1 en MeOH: H₂O = 50: 50 a 365 nm

| Compuesto | EMAT-1 |
|--------------------------|----------------------------|
| | Tiempos de retención (min) |
| MAT-5 | 4,09 |
| MAT-3 | 5,10 |
| Verbascósido (MAT1) | 6,22 |
| 7-O-glu-luteolina (MAT2) | 7,57 |
| 7-O-glu-apigenina | 12,32 |

Tabla 19: Tiempos de retención para los principales compuestos de EMAT-1

El compuesto MAT-5, con tiempo de retención 4,09 min, posee el mismo grupo cromóforo que el compuesto mayoritario verbascósido. La diferencia en tiempos de

retención entre ambos compuestos podría estar relacionada a una variación estructural que le otorga una mayor polaridad a este compuesto.

3.1.1.4. Calibración y selección de los marcadores estándar adecuados para la cuantificación de los compuestos activos de los extractos alcohólicos fraccionados de *B. globosa*.

Para seleccionar un estándar que permita expresar los compuestos del extracto, se determinaron los tiempos de retención para cada uno de aquellos patrones primarios que representen molecularmente a los feniltanoides y a los heterósidos de flavonoides. Los flavonoides luteolina (286,23 g/mol), rutina (610,51 g/mol) y quercetina (302,23 g/mol) fueron evaluados como posibles marcadores de los heterósidos de flavonoides y el ácido cafeico (180,15 g/mol) como marcador de los feniletanoides. Se establecieron por regresión lineal las ecuaciones que representan las curvas de calibración para cada uno de ellos [Tabla 20].

| Patrón | Tiempo de retención (min) | Regresión lineal Ecuación | r |
|---------------|---------------------------|------------------------------|--------|
| Luteolina | 17,40 | $y = 60050x - 48504$ | 1,0000 |
| Rutina | 5,57 | $y = 27964x - 111155$ | 0,9994 |
| Quercetina | 48,75 | $y = 82783x + 3112$ | 0,9999 |
| Ácido cafeico | 5,50 | $y = 7850x - 110155$ | 0,9993 |

Tabla 20: Curvas de calibración para HPLC a 365 nm y tiempos de retención de los patrones luteolina, rutina, quercetina y ácido cafeico.

Se eligieron como marcadores estándar los patrones rutina y ácido cafeico. Rutina posee la misma estructura resonante que el flavonoide mayoritario de los extractos, 7-O-glucósido de luteolina [Figura 15]. El grupo ramnoglucosil en la posición 3 le otorga al flavonoide la polaridad necesaria para que su tiempo de retención sea apropiado para una determinación rápida en el HPLC, a diferencia de los demás

flavonoides estudiados cuyos tiempos de retención superan los 15 minutos haciendo que una curva de calibración sea inconveniente de realizar.

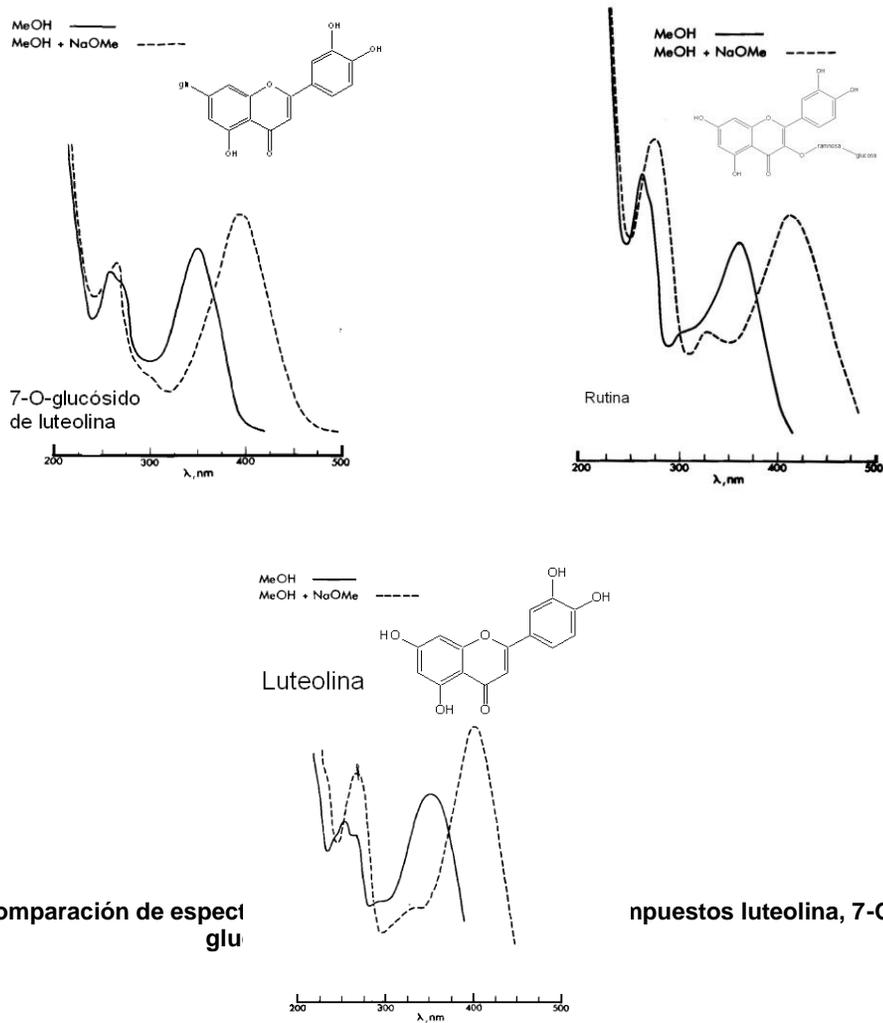


Figura 15: Comparación de espectro de absorción de luteolina, 7-O-glucosido de luteolina y Rutina.

puestos luteolina, 7-O-

3.1.1.5. Determinación de las absorptividades molares (ϵ) de verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina, ácido cafeico, rutina y luteolina a 365 nm y sus factores de proporcionalidad.

Para determinar la correlación molar existente para cada uno de los compuestos mayoritarios del extracto y su correspondiente marcador estándar, fue necesario determinar por espectrofotometría la absorptividad molar tanto de los compuestos aislados y purificados del EMAT-1, verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina como de los patrones elegidos para representar la abundancia de cada uno.

Si consideramos que estructuralmente el patrón primario rutina y el flavonoide mayoritario del extracto 7-O-glucósido de luteolina comparten la misma estructura resonante [Figura 15] sería esperable que sus absorptividades molares fueran similares.

Para una solución etanólica de rutina $1,64 \times 10^{-5}$ M se obtuvo una absorbancia de 0,424 al UV 365 nm, para una solución de luteolina $1,99 \times 10^{-5}$ M una absorbancia de 0,375 y para una solución de 7-O-glucósido de luteolina $2,14 \times 10^{-5}$ M la absorbancia fue 0,405, a la misma longitud de onda. De acuerdo a la ecuación de Beer se pudo calcular los valores de ϵ para cada compuesto, obteniéndose lo siguiente:

$$\epsilon_{rutina}^{365nm} = \frac{0,424}{1cm \times 1,64 \times 10^{-5} M} = 25853 \text{ cm}^{-1} M^{-1} \Rightarrow \log \epsilon_{rutina}^{365nm} = 4,41$$

$$\epsilon_{luteolina}^{365nm} = \frac{0,375}{1cm \times 1,99 \times 10^{-5} M} = 18831 \text{ cm}^{-1} M^{-1} \Rightarrow \log \epsilon_{luteolina}^{365nm} = 4,27$$

$$\epsilon_{7-O-glu-luteolina}^{365nm} = \frac{0,405}{1cm \times 2,14 \times 10^{-5} M} = 18925 \text{ cm}^{-1} M^{-1} \Rightarrow \log \epsilon_{7-O-glu-luteolina}^{365nm} = 4,28$$

Así, los factores de proporcionalidad (fp_{rutina} y $fp_{luteolina}$) entre los marcadores estándar y el compuesto 7-O-glucósido de luteolina quedaron determinados de la siguiente manera:

$$fp_{rutina} = \frac{\epsilon_{7-O-glu-luteolina}^{365nm}}{\epsilon_{rutina}^{365nm}} = 0,73$$

$$fp_{luteolina} = \frac{\epsilon_{7-O-glu-luteolina}^{365nm}}{\epsilon_{luteolina}^{365nm}} = 1,00$$

De igual forma se procedió para el segundo compuesto mayoritario, obteniendo una absorbancia de 0,215 (UV 365 nm) para una solución etanólica de concentración $2,44 \times 10^{-4}$ M de ácido cafeico, y de 0,381 para una solución de verbascósido $2,32 \times 10^{-4}$ M, obteniéndose las absortividades molares siguientes:

$$\epsilon_{ác. cafeico}^{365nm} = \frac{0,215}{1cm \times 2,44 \times 10^{-4} M} = 881 \text{ cm}^{-1} M^{-1} \Rightarrow \log \epsilon_{ác. cafeico}^{365nm} = 2,94$$

$$\epsilon_{verbascósido}^{365nm} = \frac{0,381}{1cm \times 2,14 \times 10^{-4} M} = 1780 \text{ cm}^{-1} M^{-1} \Rightarrow \log \epsilon_{verbascósido}^{365nm} = 4,25$$

Con un factor de proporcionalidad ($fp_{ác. cafeico}$) entre el marcador estándar ácido cafeico y verbascósido de:

$$fp_{ác. cafeico} = \frac{\epsilon_{verbascósido}^{365nm}}{\epsilon_{ác. cafeico}^{365nm}} = 2,02$$

El factor de proporcionalidad obtenido era esperable, puesto que si se observa la estructura química del compuesto verbascósido [Figura 3] vemos que además de la estructura resonante del grupo cafeoil (igual cromóforo del ácido cafeico), se suma una segunda estructura resonante: el grupo difeniletanol, el cual debe aportar a la absortividad total del compuesto, superior a la del ácido cafeico por sí solo.

3.1.1.6. Establecimiento de curvas de calibración con compuestos aislados

Para comprobar que existe proporcionalidad al expresar los compuestos en sus respectivos marcadores estándar, se establecieron curvas de calibración con los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina a 365 nm [Tabla 21]

| Compuesto | Regresión lineal | | |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------|--------|
| | Ecuación | Rango de concentración (ppm) | r |
| Verbascósido | $y = 2857x + 236828$ | 211 - 760 | 0,9879 |
| 7-O-glucósido de luteolina | $y = 30536x - 216545$ | 100 - 400 | 0,9927 |

Tabla 21: Curvas de calibración para metodología HPLC con los compuestos aislados verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina

3.1.1.7. Análisis cuantitativo de los extractos

3.1.1.7.1. Valoración por HPLC empleando marcadores estándar

Con la metodología HPLC establecida se cuantificaron los principales compuestos de los extractos EMAT-1, ETMAT_{verano}, ETMAT_{otoño} y EMG a partir de las áreas bajo la curva [Anexo 5] expresando a los feniletanoides como ácido cafeico y a los heterósidos de flavonoides como rutina [Tabla 22y Figura16]

| Compuestos | Abundancia (%) | | | |
|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------|-------------|
| | ETMAT _{otoño} | ETMAT _{verano} | EMAT-1 | EMG |
| 7-O-glu-luteolina* | 2,25 ± 0,06 | 2,3 ± 0,02 | 2,36 ± 0,07 | 2,31 ± 0,04 |
| MAT-3* | 2,05 ± 0,05 | 1,75 ± 0,06 | 1,77 ± 0,04 | 2,55 ± 0,02 |
| 7-O-glu-apigenina* | 0,21 ± 0,00 | 0,26 ± 0,00 | 0,27 ± 0,01 | 0,19 ± 0,00 |
| Verbascósido** | 5,66 ± 0,17 | 12,1 ± 0,07 | 12,6 ± 0,16 | 8,97 ± 0,05 |
| MAT-5** | 3,11 ± 0,09 | 5,71 ± 0,13 | 5,83 ± 0,17 | 4,87 ± 0,05 |

Tabla 22: Abundancia de los principales compuestos de los extractos alcohólicos de B. globosa. *Expresados en rutina, **Expresados en ácido cafeico.

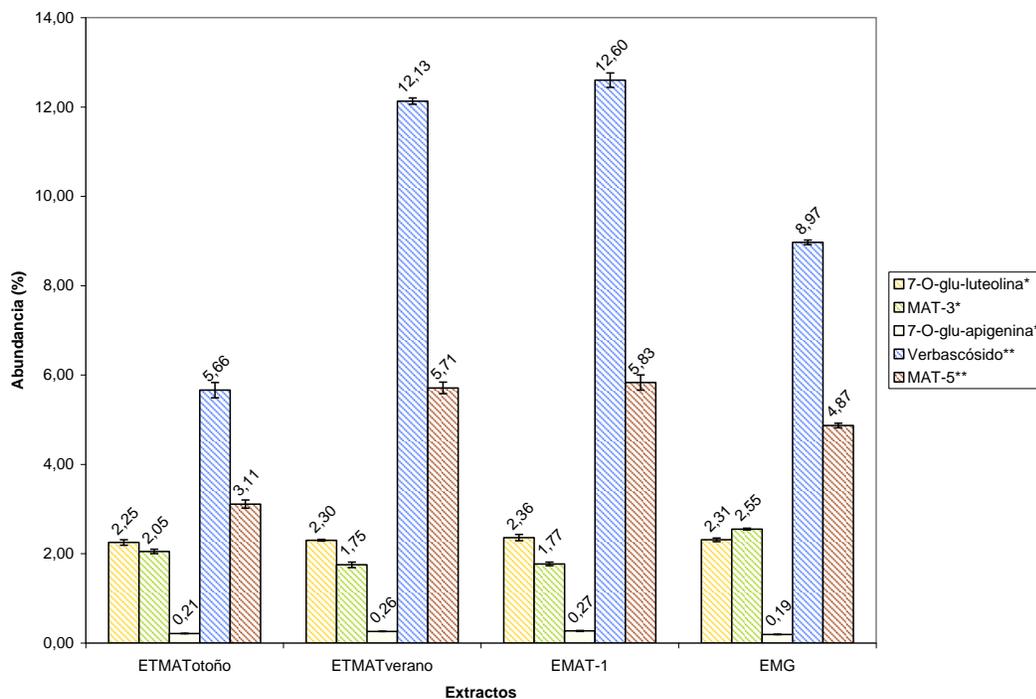


Figura 16: Gráfico de abundancia de los principales compuestos de los extractos alcohólicos de *B. globosa* obtenido por HPLC. *Expresados en rutina, **Expresados en ácido cafeico.

Los resultados indican que existe variación estacional en la composición de los extractos del componente activo mayoritario, verbascósido y al compuesto MAT-5 que posiblemente también es un feniletanoide derivado del ácido cafeico. La abundancia del flavonoide mayoritario 7-O-glucósido de luteolina no se ve afectada por cambios estacionales, siendo similar en todos los extractos. El análisis también nos permitió evidenciar la importancia en realizar el fraccionamiento del extracto, al apreciar que el EMG posee una cantidad significativamente menor de verbascósido.

3.1.1.7.2. Valoración por HPLC empleando los patrones secundarios verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina.

Se determinó la abundancia de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina en función de las ecuaciones obtenidas de la calibración realizada con los mismos compuestos, previamente aislados y purificados por columnas cromatográficas, para comprobar que los marcadores estándar ácido cafeico y rutina son representativos de feniletanoides y flavonoides. Se obtuvieron los siguientes resultados [Tabla 23]:

| Compuestos | Abundancia (%) | | | |
|-------------------|------------------------|-------------------------|--------------|--------------|
| | ETMAT _{otoño} | ETMAT _{verano} | EMAT-1 | EMG |
| 7-O-glu-luteolina | 2,20 ± 0,06 | 2,25 ± 0,02 | 2,31 ± 0,06 | 2,40 ± 0,03 |
| Verbascósido | 10,72 ± 0,47 | 28,18 ± 0,19 | 29,29 ± 0,43 | 19,64 ± 0,14 |

Tabla 23: Abundancia de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina obtenidos de las curvas de calibración con los compuestos aislados por HPLC.

Al comparar los resultados obtenidos para verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina en EMAT-1 expresados ya sea en su marcador estándar o como tales por las curvas de calibración con los patrones secundarios, se puede observar que el factor de proporcionalidad obtenido entre las absorptividades molares a 365 nm se mantiene entre los resultados obtenidos [Tabla 24], con una desviación que se puede atribuir a que la pureza de los patrones secundarios no era absoluta (93%).

| | Expresado en su marcador estándar (A) | Por curva con compuesto aislado (B) | B/A | Factor de proporcionalidad según absorptividades molares |
|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------|--|
| Verbascósido | 12,60% | 29,29% | 2,32 | 2,02 |
| 7-O-glu-luteolina | 2,36% | 2,31% | 0,98 | 0,73 |

Tabla 24: Representabilidad de los marcadores estándar para los compuestos verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina

De esta forma se concluye que los marcadores estándar seleccionados son representativos de las cantidades de estos compuestos. Y se debe considerar el factor

de proporcionalidad obtenido con las absorptividades molares a 365 nm para obtener la cantidad real de verbascósido y glucósido de luteolina en la muestra:

$$C_{\text{verbascósido}} = C_{\text{verbascósido exp. ác. cafeico}} \times fp_{\text{cafeico}}$$

$$C_{7\text{-O-glucósido-luteolina}} = C_{7\text{-O-glucósido-luteolina exp. rutina}} \times fp_{\text{rutina}}$$

Aplicando los factores de proporcionalidad a los resultados obtenidos en la valoración de los extractos obtenemos los siguientes resultados:

| Compuestos | Abundancia (%) | | | |
|-------------------|------------------------|-------------------------|--------------|--------------|
| | ETMAT _{otoño} | ETMAT _{verano} | EMAT-1 | EMG |
| 7-O-glu-luteolina | 1,20 ± 0,03 | 1,23 ± 0,01 | 1,26 ± 0,04 | 1,23 ± 0,02 |
| Verbascósido | 11,43 ± 0,34 | 24,50 ± 0,14 | 25,45 ± 0,32 | 18,12 ± 0,10 |

Tabla 25: Concentraciones finales de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina en los extractos alcohólicos de *B. globosa* por HPLC

Variación en la composición de los extractos en verbascósido

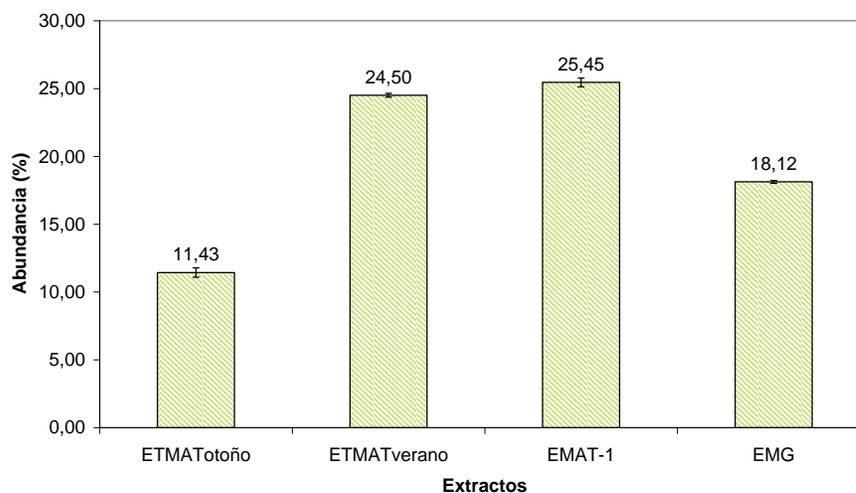


Figura 17: Variación en la composición de los extractos en verbascósido

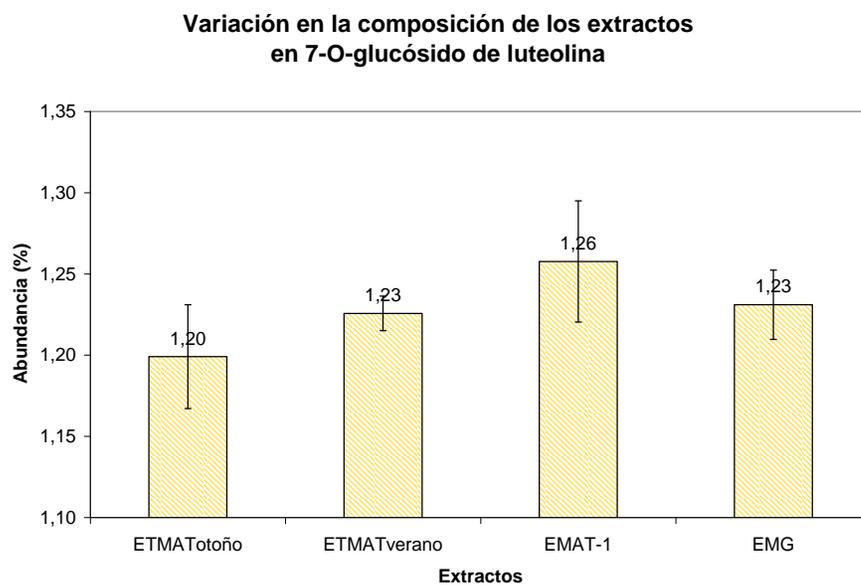


Figura 18: Variación en la composición de los extractos en 7-O-glucósido de luteolina

3.2. Valoración de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos activos de *B. globosa* por espectrofotometría UV

Debido a que la metodología utilizada actualmente para cuantificar metabolitos activos en extractos constituidos por compuestos fenólicos es la espectrofotometría UV, se propuso estudiar dos de estos métodos: El método de Glories y el método de Folin-Ciocalteu. El método de Glories permite la cuantificación diferenciada de familias de compuestos fenólicos (Apablaza, 2006), a diferencia del método de Folin-Ciocalteu que entrega la cantidad de fenoles totales (incluyendo a aquellos compuestos inactivos).

3.2.1. Método de Glories:

Se valoró de manera diferenciada los feniletanoides, flavonoides y derivados del ácido gálico en el extracto alcohólico de *B. globosa*. Para ello se establecieron curvas de calibración con los patrones [Tabla 26 a 29]

| λ | Regresión lineal | |
|-----------|------------------------|--------|
| | Ecuación | r |
| 280 nm | $y = 0,0417x + 0,0337$ | 0,9991 |
| 320 nm | $y = 0,0814x + 0,0151$ | 0,9996 |
| 360 nm | $y = 0,0162x + 0,0009$ | 0,9994 |

Tabla 26: Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de ác. cafeico para Método de Glories

| λ | Regresión lineal | |
|-----------|------------------------|--------|
| | Ecuación | r |
| 280 nm | - | - |
| 320 nm | $y = 0,0479x - 0,0034$ | 0,9998 |
| 360 nm | $y = 0,0673x - 0,0126$ | 0,9996 |

Tabla 27: Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de luteolina para Método de Glories

| λ | Regresión lineal | |
|-----------|------------------------|--------|
| | Ecuación | r |
| 280 nm | $y = 0,0451x - 0,0450$ | 0,9978 |
| 320 nm | - | - |
| 350 nm | - | - |

Tabla 28: Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de ác. gálico para Método de Glories

| λ | Regresión lineal | |
|-----------|------------------------|--------|
| | Ecuación | r |
| 280 nm | $y = 0,0194x + 0,0022$ | 0,9981 |
| 320 nm | $y = 0,0268x + 0,0034$ | 0,9980 |
| 350 nm | $y = 0,0393x + 0,0004$ | 0,9976 |

Tabla 29: Curvas de calibración a 280, 320 y 352 nm de rutina para Método de Glories

Se analizaron los extractos EMAT-1, ETMAT_{verano}, ETMAT_{otoño} y EMG de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, obteniéndose los siguientes resultados:

| Extracto | Abundancia (%) | | |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|
| | Flavonoides* | Feniletanoides** | Otros fenoles*** |
| ETMAT _{otoño} | 9,44 ± 0,01 | 5,57 ± 0,01 | 12,26 ± 0,13 |
| ETMAT _{verano} | 11,68 ± 0,34 | 7,31 ± 0,14 | 12,56 ± 0,10 |
| EMAT-1 | 11,95 ± 0,03 | 7,56 ± 0,03 | 13,12 ± 0,03 |
| EMG | 10,00 ± 0,16 | 4,61 ± 0,06 | 13,04 ± 0,33 |

Tabla 30: Abundancia de flavonoides, feniletanoides y fenoles en extractos alcohólicos de *B. globosa* según método de Glories.

*Expresados en luteolina, **Expresados en ácido cafeico,

***Expresados en ácido gálico.

Aplicando los factores de proporcionalidad según absorvidades molares determinados en la sección 3.1.1.5. ($fp_{luteolina}$ 1,00 y $fp_{ác. cafeico}$ 2,02), se obtienen los siguientes resultados finales expresados en los componentes mayoritarios de los extractos:

| Extracto | Abundancia (%) | | |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|
| | Flavonoides* | Feniletanoides** | Otros fenoles*** |
| ETMAT _{otoño} | 9,44 ± 0,01 | 11,26 ± 0,02 | 12,26 ± 0,13 |
| ETMAT _{verano} | 11,68 ± 0,34 | 14,78 ± 0,29 | 12,56 ± 0,10 |
| EMAT-1 | 11,95 ± 0,03 | 15,28 ± 0,06 | 13,12 ± 0,03 |
| EMG | 10,00 ± 0,16 | 9,32 ± 0,12 | 13,04 ± 0,33 |

Tabla 31: Concentraciones finales obtenidas de flavonoides, feniletanoides y otros fenoles obtenidas por el método de Glories en los extractos alcohólicos de *B. globosa*.

*Exp. en 7-O-glucósido de luteolina **Exp. en verbascósido ***Exp. en ácido gálico

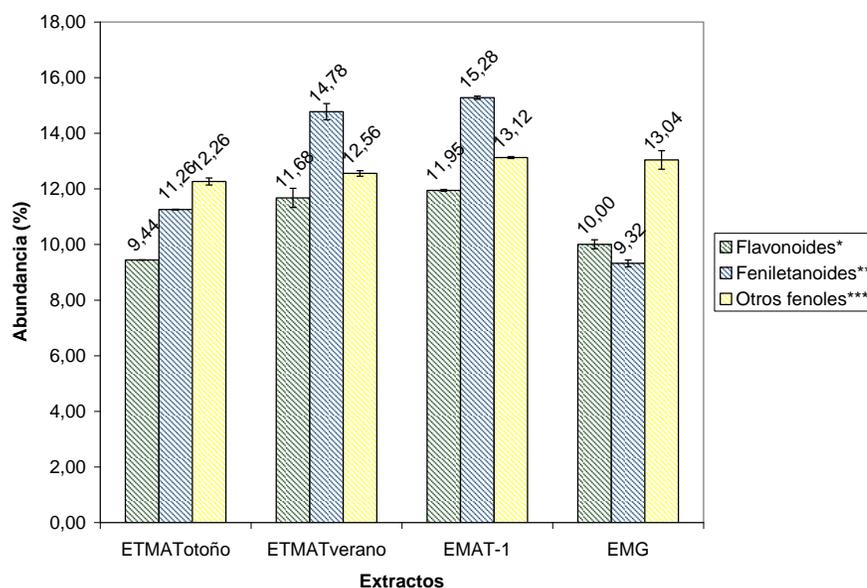


Figura 19: Gráfico de abundancia de las familia de especies fenólicas presentes en los extractos alcohólicos de *B. globosa* según el método de Glories. *Expresados en 7-O-glucósido de luteolina, **Expresados en verbascósido, *Expresados en ácido gálico.**

Al comparar los ETMAT de otoño y de verano, se puede apreciar que la variación estacional en el contenido de compuestos fenólicos, evidenciada por la valoración por HPLC, se mantiene.

Sin embargo, los resultados no coinciden a los obtenidos por HPLC. Esto implica que el método de Glories no sería representativo de la concentración real de las especies químicas con importancia farmacológica.

3.2.2. Método de Folin-Ciocalteu:

Se valoró la cantidad de fenoles totales hidrosolubles expresados en ácido gálico en soluciones de EMAT-1, ETMAT_{verano}, ETMAT_{otoño} y EMG. Se obtuvieron los siguientes resultados:

| Extracto | Abundancia (%) | |
|-------------------------|------------------|--------|
| | Fenoles totales* | |
| ETMAT _{otoño} | 12,55 | ± 0,00 |
| ETMAT _{verano} | 17,19 | ± 0,57 |
| EMAT-1 | 17,88 | ± 0,23 |
| EMG | 14,48 | ± 0,00 |

Tabla 32: Abundancia de fenoles totales hidrosolubles de los extractos alcohólicos de *B. globosa* obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu
*Exp. en ác. gálico

3.2.3. Discusión general respecto a los métodos espectrofotométricos

Podemos ver que el espectro UV del extracto EMAT-1 [Figura 20] se presenta como una banda ancha con un máximo de absorbancia cercano a los 320 nm, de forma muy similar a la obtenida para el compuesto mayoritario verbascósido [Figura 8] y al compuesto MAT-5 [Figura 7]. Esto demuestra la gran influencia de los feniletanoides sobre la absorbancia total, debido a la mayor concentración que poseen por sobre los otros compuestos fenólicos.

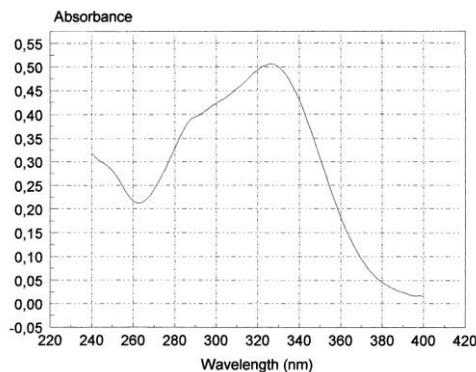


Figura 20: Espectro de absorción UV para el EMAT-1

Si reemplazamos directamente la absorbancia obtenida por el extracto EMAT-1 a 320 nm [Anexo 6] en la ecuación del ácido cafeico obtenemos una concentración de $14,67 \pm 0,05\%$ de feniletanoides expresados como ácido cafeico, resultado muy cercano al entregado por el análisis HPLC para verbascósido ($12,6 \pm 0,16\%$ exp. en ácido cafeico). Esto demuestra la poca influencia de los flavonoides en la composición total del extracto y la baja exactitud del método de Glories por la interferencia que los feniletanoides ejercerían sobre los otros compuestos fenólicos.

Como se mencionó anteriormente, el método de Folin-Ciocalteu entrega la concentración total de fenoles hidrosolubles de los extractos, haciéndolo muy inespecífico para nuestros propósitos.

Los análisis espectrofotométricos realizados en este trabajo confirmaron las ventajas que posee el método HPLC sobre los métodos actualmente empleados para el control de calidad de extractos de *B. globosa*.

VII. CONCLUSIONES

- La extracción de hojas secas y molidas de *B. globosa* con etanol no es diferente en rendimiento a la realizada con metanol, sin embargo esto no implica que no existe variación estacional en la abundancia de los metabolitos secundarios activos.
- El compuesto MAT-3 fue caracterizado como un flavonoide y el compuesto MAT-5 como un feniletanoide, ambos en vías de su identificación química.
- Los compuestos de los extractos alcohólicos de *B. globosa*: verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina poseen importante actividad analgésica tópica y oral.
- Dos formulaciones dermatológicas (gel y crema al 1% de EMAT-1) que serán sometidas a estudios clínicos demostraron poseer actividad analgésica tópica en un ensayo preliminar.
- Los marcadores estándar más adecuados para realizar una valoración por HPLC son ácido cafeico (para feniletanoides) y rutina (para flavonoides). Poseen tiempos de retención apropiados para una metodología analítica eficiente y son representativos de la abundancia real de los metabolitos secundarios de los extractos alcohólicos.
- Mediante HPLC se identificaron los compuestos mayoritarios de los extractos EMAT-1, ETMAT_{verano}, ETMAT_{otoño} y EMG, siendo verbascósido el más abundante de todos, seguido por el 7-O-glucósido de luteolina, MAT-3 y MAT-5.
- Existe variación estacional en la composición de los extractos en feniletanoides, la composición en flavonoides no varía estacionalmente.
- Los extractos alcohólicos seriados poseen una mayor concentración de los metabolitos de interés farmacológico que un extracto metanólico global. Esto se relaciona directamente a la diferencia en sus actividades farmacológicas, encontradas en trabajos previos.
- El método HPLC planteado en este trabajo posee grandes ventajas respecto los métodos espectrofotométricos. El método de Glories presenta baja exactitud en la expresión de los resultados debido a la interferencia que los feniletanoides

generan sobre los flavonoides y el método Folin-Ciocalteu sólo entrega la concentración de fenoles totales hidrosolubles sin valorar particularmente a aquellos metabolitos activos de interés farmacológico.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APABLAZA C. (b), Delporte C., Negrete R., Erazo S., Miranda H.F., Di Meglio F., Goity L., Castro C. Backhouse N. *Buddleja globosa*: variación estacional y su influencia sobre las propiedades analgésicas. En: Congreso Italo Latinoamericano: SILAE: septiembre, 2006. Perugia, Italia. Pág P66.

APABLAZA C. (a), Delporte C., Negrete R., Erazo S., Di Meglio F., Goity L., Backhouse N. Propiedades analgésicas de un extracto purificado de *Buddleja globosa*, matico y la importancia de su estandarización. En: VII Jornadas de Investigación en Ciencia y Tecnología: Innovación como Herramienta para la Competitividad: abril 2006. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

APABLAZA C. Diseño de la estandarización química y evaluación de la actividad analgésica tópica de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae, matico (Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2006.

BACKHOUSE, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodríguez, J., Delporte, C. Analgesic, antiinflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae. Journal of Ethnopharmacology. En prensa, 2007.

CHIOU, W.F., Lin L.C., Chen C.F. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 743-748, 2004.

DELPORTE, C., Muñoz, O., Rojas, J., Ferrándiz, M., Payá, M., Erazo, S., Negrete, R., Maldonado, S., Negrete, R., San Feliciano, A., Backhouse, N. Pharmacotoxicological study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. Zeitschrift für Naturforschung 57c, 100–108, 2002.

DUBBER, M. and Kanfer, I. High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7(3):303-309, 2004.

HOUGHTON, P.J. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. Journal of Ethnopharmacology, 11(3): 293-308., 1984.

HOUGHTON, P.J. Phenolic fatty acid esters from *Buddleja globosa* stem bark. Phytochemistry, 28(10): 2693-5, 1989

HOUGHTON, P.J. and Mensah, A.Y. Biologically-active compounds from *Buddleja* species. Recent advances in Phytochemistry, 33rd Ed. J.T. Romeo, Kluwer Academic / Plenum, New York, 343-68, 1999.

HOUGHTON P.J. and Hikino H. Anti-hepatotoxic activity for extracts and constituents of *Buddleja* species. Planta Medica, 55(2): 123-6, 1989.

HOUGHTON, P.J., Woldemariam T.Z., Candau M., Barnardo A., Khen Alafu O., Shangxiao L. Buddlejone a diterpene from *Buddleja albiflora*. Phytochemistry, 42(2): 485-488, 1996.

KIM, S.S., Son Y.O., Chun J.C., Kim S.E., Cheng G.H., Hwang K.J., Lee J.C. Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. Redox Report, 10(6): 311-8, 2005.

LE BARS, D., Gozariu, M. and Cadden, S. Animal models of nociception, Pharmacological Reviews 53:628–651, 2001.

LI, L.; Tsao, R.; Liu, Z.; Liu, S.; Yang, R.; Young, J.C.; Zhu, H.; Deng, Z.; Xie, M.; Fu, Z. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A, 1063(1-2):161-169, 2005.

LIAO, Y., Houghton, P.J., Houtt, J.R.S. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. Journal of Natural Products, 62(9): 1241-45, 1999.

LIN, L.C., Wang YH., Hou YC., Chang S., Liou KT., Chou YC., Wang WY., Shen YC. The inhibitory effect of phenylpropanoid glycosides and iridoid glucosides on free radical production and beta2 integrin expression in human leucocytes. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 58: 129-35, 2006.

LLORET, S. and Moreno, J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiinflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoil phorbol dermal application. Biochemical Pharmacology. 50(3): 347-52, 1995.

LÓPEZ, J., Sierra, M., Vegazo E. and Cortés, M. Chemical Constituents of *Buddleja globosa* Lam., Fitoterapia 50(5): 195-8, 1979.

MABRY, T.J., Markham, K.R. y Thomas, M.B. The systematic identification of flavonoids. 2nd Ed. New York, USA. Springer-Verlag, 1970.

MARÍN, G., Giménez, B., Cortés, M., Pardo, F., Núñez J. y Naranjo J. Estudio Fitoquímico de *Buddleja globosa* Lam. (Buddlejaceae). Revista Latinoamericana de Química, 10(1):19-21, 1979.

MAZZA G., Fukumato L., Delaquis P., Girad B., Ewer B. Anthocyanins, phenolic and color Cabernet, Franc, Merlot and Pinot noir wines from British Columbia. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:4009-17, 1999.

MERFORT, I., Heilmann, J., Hagedorn-Leweke U., and Lippold B.C. In vivo skin penetration studies of camomile flavones. Pharmazie 49:509–511, 1994.

MIRANDA, H.F., Lemus I., Pinardi G. Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Brain Research Bulletin 61: 417-425, 2003.

MONTES, M. y Wilkomirsky T. Medicina tradicional chilena. Editorial de la Universidad de Concepción. Concepción, Chile, 1998.

NAVAS, L.E. Flora de la cuenca de Santiago de Chile, Tomo III, Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile, 1979.

PARDO F., Perich, F., Torres, R. Un nuevo glicósido de *Buddleja globosa* con actividad bactericida. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 42(1): 101-104, 1997.

PARDO F., Perich, F., Villarroel L., Torres, R. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. Journal of Ethnopharmacology, 39:221-222, 1993.

ROSALES, L. "Estudio químico, evaluación de las actividades analgésica y antiinflamatoria de un extracto farmacológicamente activo de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae. Diseño de un preparado dérmico (Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2003.

ROSALES, L., Backhouse N., Costa E., Miranda D., Fernández M., Correa O. Investigación de las propiedades cicatrizantes de *Buddleja globosa* n.c. matico: Desarrollo de un preparado cicatrizante. En: Congreso de Cosmética COLAMIC XVI COLAMIQC (Congreso Latinoamericano de Químicos Cosméticos). 2003, Cartagena de Indias, Colombia.

RUBIO, B., Jara G., Gallardo J., Costa E., Correa O., Bartsch V., Delporte C., Negrete R., Erazo S., Backhouse N. Evaluación de la eficacia clínica de un preparado de matico en pacientes con tratamiento quimioterápico que presentan eritrodisestesia

palmar– plantar. En: XV Congreso Chileno de Cancerología: III Jornadas de Enfermería y III Jornadas de Química y Farmacia Oncológica. Septiembre 2004, Valdivia, Chile.

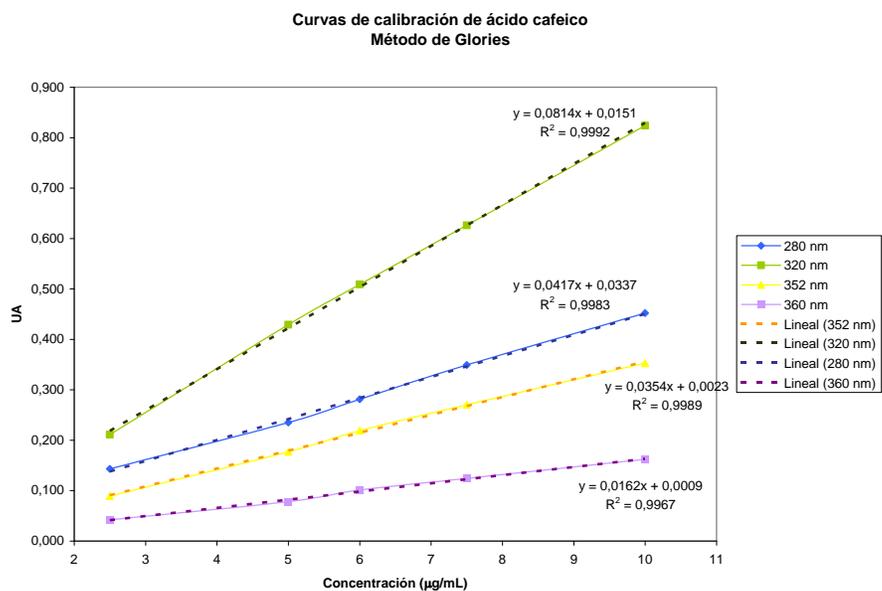
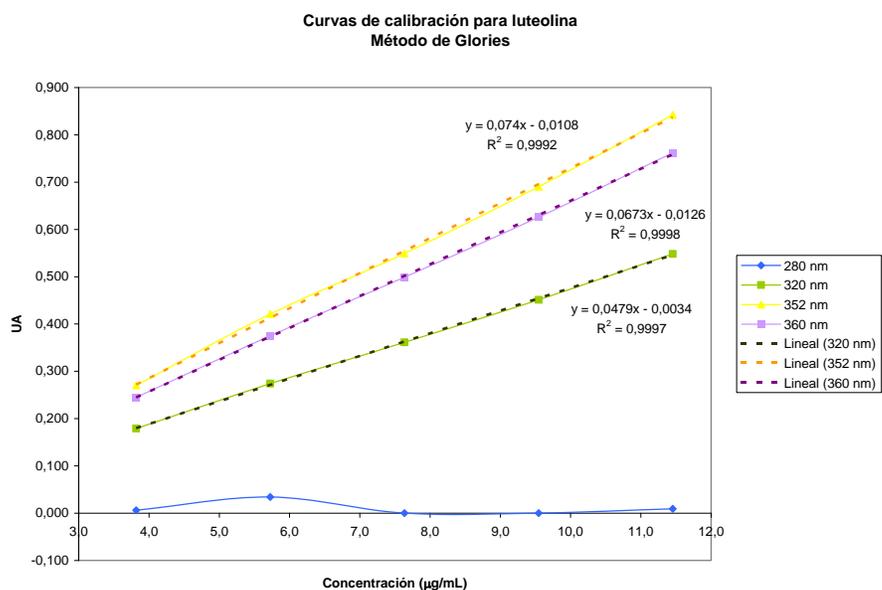
SHIMOI, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H., Kinae, N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-L-glucoside in rats and humans. FEBS Letters 438 220-224, 1998.

VERGNOLLE, N. Modulation of visceral pain and inflammation by protease activated receptors. British Journal of Pharmacology 141:1264–74, 2004.

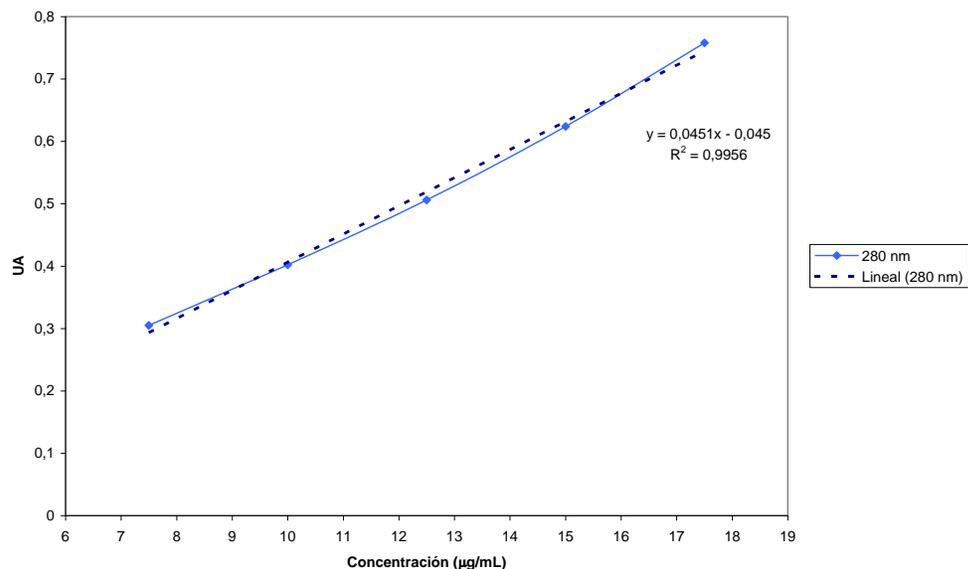
WATERMAN, P., Mole S., Análisis of Phenolic Plant Metabolites. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1994, 83-85.

X. ANEXOS

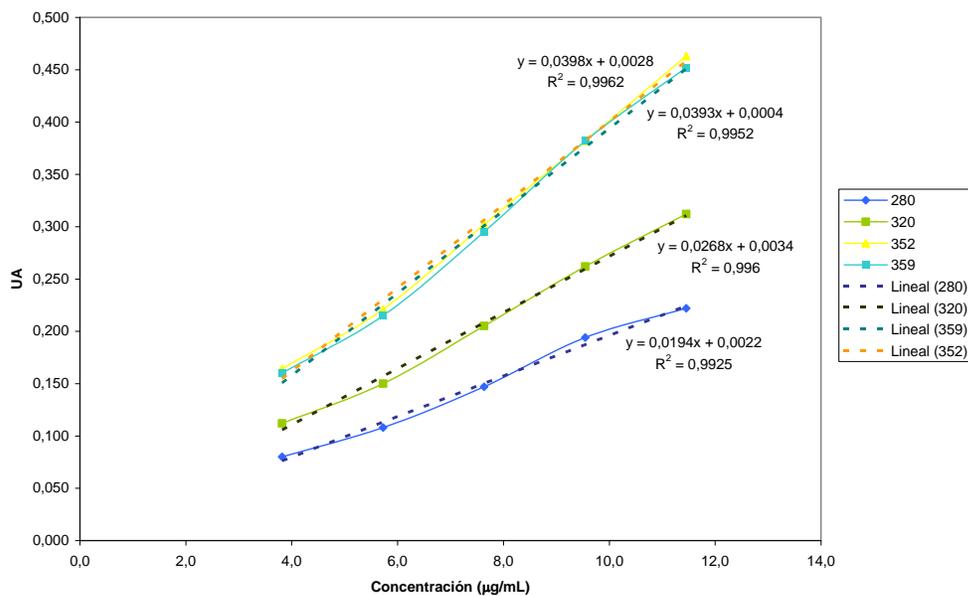
1. Curvas de calibración Método de Glories



Curva de calibración de ácido gálico
Método de Glories

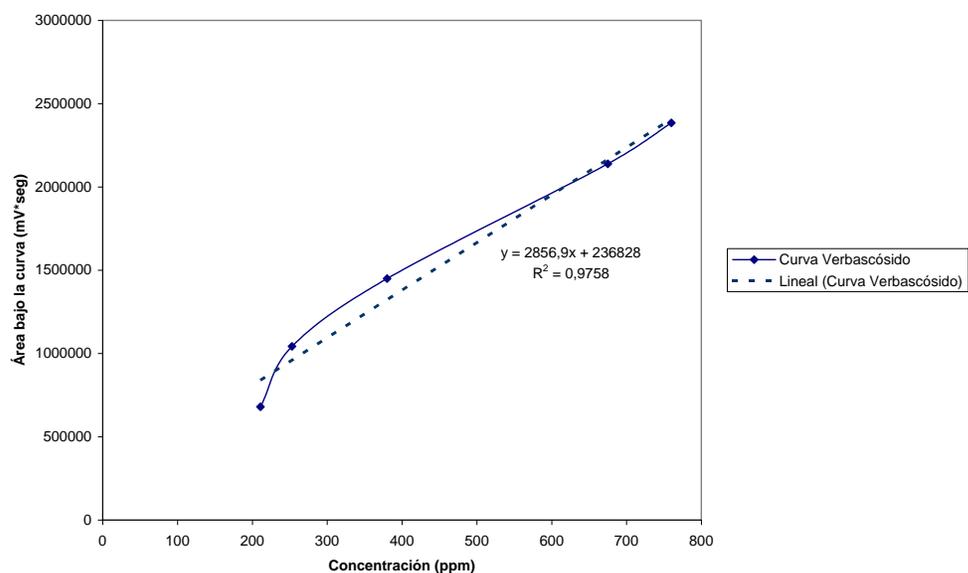


Curvas de calibración de rutina
Método de Glories

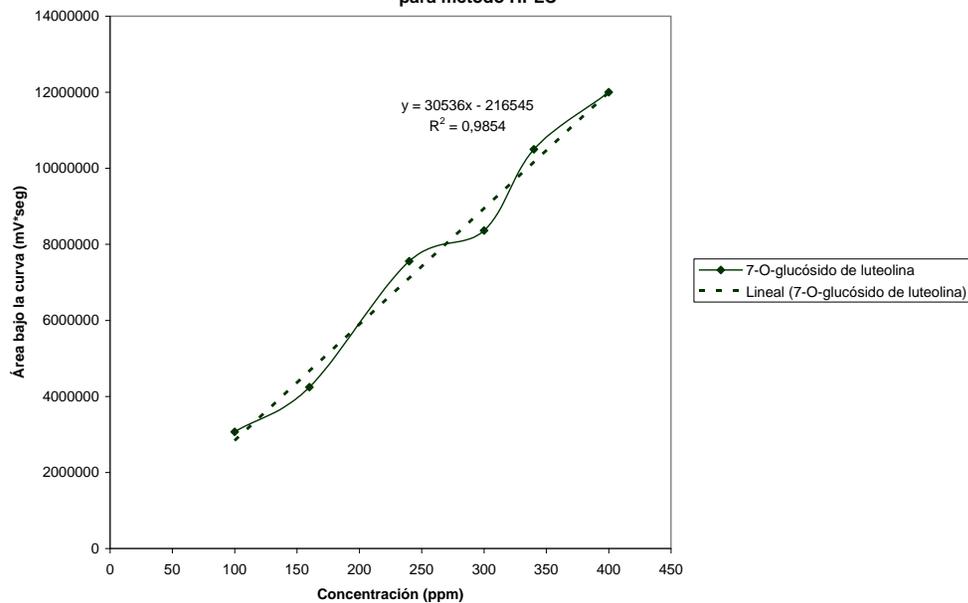


4. Curvas de calibración para metodología HPLC con patrones secundarios

Curva de calibración de verbascósido como patrón secundario para método HPLC



Curva de calibración de 7-O-glucósido de luteolina como patrón secundario para método HPLC



5. Áreas bajo la curva de los principales compuestos de los extractos alcohólicos de *B. globosa* obtenidos por la metodología HPLC descrita.

| ETMAT _{otoño} 2,52 mg/mL | | | |
|-----------------------------------|---------------|---------|---------|
| Compuesto | Área (mV*seg) | | |
| | A | A' | A'' |
| MAT-5 | 486241 | 511810 | 519272 |
| MAT-3 | 1296715 | 1342380 | 1369864 |
| Verbascósido | 971119 | 1035246 | 1019959 |
| 7-O-glu-luteolina | 1424826 | 1491968 | 1504386 |
| 7-O-glu-apigenina | 38956 | 40055 | 41320 |

Tabla : Áreas bajo la curva de los principales compuestos de ETMAT_{otoño} en HPLC

| ETMAT _{verano} 2,36 mg/mL | | | |
|------------------------------------|---------------|---------|---------|
| Compuesto | Área (mV*seg) | | |
| | A | A' | A'' |
| MAT-5 | 974700 | 936363 | 930678 |
| MAT-3 | 1088682 | 1030898 | 1017121 |
| Verbascósido | 2122799 | 2141274 | 2147378 |
| 7-O-glu-luteolina | 1394134 | 1404757 | 1420552 |
| 7-O-glu-apigenina | 59386 | 60069 | 62734 |

Tabla : Áreas bajo la curva de los principales compuestos de ETMAT_{verano} en HPLC

| EMAT-1 2,28 mg/mL | | | |
|-------------------|---------------|---------|---------|
| Compuesto | Área (mV*seg) | | |
| | A | A' | A'' |
| MAT-5 | 912120 | 967326 | 919490 |
| MAT-3 | 994637 | 1048277 | 1010626 |
| Verbascósido | 2131547 | 2176933 | 2126365 |
| 7-O-glu-luteolina | 1390204 | 1441630 | 1351579 |
| 7-O-glu-apigenina | 54470 | 63886 | 55159 |

Tabla : Áreas bajo la curva de los principales compuestos de EMAT-1 en HPLC

| EMG 2,42 mg/mL | | | |
|-------------------|---------------|---------|---------|
| Compuesto | Área (mV*seg) | | |
| | A | A' | A'' |
| MAT-5 | 808317 | 810573 | 825159 |
| MAT-3 | 1604787 | 1614594 | 1627647 |
| Verbascósido | 1584888 | 1603806 | 1595558 |
| 7-O-glu-luteolina | 1426371 | 1464638 | 1471420 |
| 7-O-glu-apigenina | 15868 | 19294 | 16173 |

Tabla : Áreas bajo la curva de los principales compuestos de EMG en HPLC

6. Absorbancias obtenidas para los extractos en el análisis por el método de Glories.

| Extractos | Absorbancias | | |
|-----------|-----------------------|-------|-------|
| | Longitud de onda (nm) | | |
| | 280 | 320 | 360 |
| EMAT-1 | 0,500 | 0,688 | 0,441 |
| | 0,501 | 0,689 | 0,441 |
| | 0,503 | 0,692 | 0,443 |
| ETMATv | 0,607 | 0,834 | 0,533 |
| | 0,609 | 0,839 | 0,539 |
| | 0,606 | 0,842 | 0,564 |
| EtTMATo | 0,456 | 0,559 | 0,365 |
| | 0,461 | 0,563 | 0,370 |
| | 0,463 | 0,564 | 0,371 |
| EMG | 0,404 | 0,477 | 0,348 |
| | 0,415 | 0,485 | 0,355 |
| | 0,423 | 0,491 | 0,360 |