



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Desarrollo de la metodología analítica y ensayo preclínico de un colutorio a base de un extracto estandarizado de hojas de *Buddleja globosa Hope*

PROFESOR PATROCINANTE

M Sc. OLOSMIRA CORREA BRIONES
Depto. de Ciencias y Tecnología Farmacéutica.

DIRECTORA DE TESIS

M Sc. OLOSMIRA CORREA BRIONES
Depto. de Ciencias y Tecnología Farmacéutica.

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CARLA DELPORTE VERGARA
Depto. de Química Farmacológica y Toxicológica.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

IRENE RIMEU MONTERO ARRIAGADA

SANTIAGO-CHILE

2016

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto transversal en investigación y desarrollo (PTID) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

A mi abuelo Arturo

Agradecimientos

Agradezco a todos los que contribuyeron en la realización de este trabajo en especial a mis directoras Olosmira Correa y Carla Delporte, a los integrantes de los laboratorios de Tecnología Farmacéutica y de Productos Naturales, y del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Con especial afecto a mi familia y amigos.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN.....	5
IV. HIPÓTESIS.....	8
V. OBJETIVOS	9
1. OBJETIVO GENERAL	9
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
VI. ANTECEDENTES.....	10
1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	10
2. USO FOLCLÓRICO.....	10
3. ESTUDIOS PREVIOS	11
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1. MATERIALES.....	14
a. <i>Reactivos.....</i>	<i>14</i>
b. <i>Materias primas.....</i>	<i>14</i>
c. <i>Instrumentos.....</i>	<i>14</i>
d. <i>Equipos</i>	<i>15</i>
2. METODOLOGÍA.....	15
a. <i>Obtención del EMAT.....</i>	<i>15</i>
b. <i>Valoración del EMAT.....</i>	<i>15</i>
c. <i>Preparación del colutorio.....</i>	<i>16</i>
d. <i>Cuantificación de los componentes mayoritarios del EMAT en el producto terminado.....</i>	<i>17</i>
e. <i>Estudio de estabilidad del EMAT</i>	<i>17</i>
f. <i>Estudio de estabilidad del producto terminado.....</i>	<i>17</i>
g. <i>Animales.....</i>	<i>18</i>
h. <i>Análisis Histológico.....</i>	<i>19</i>
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1. OBTENCIÓN DEL EMAT	21
2. DESARROLLO DE LOS COLUTORIOS.....	22
3. ESTANDARIZACIÓN DEL EMAT	23
4. ESTANDARIZACIÓN EN LOS COMPONENTES ACTIVOS DEL PRODUCTO TERMINADO ...	27
5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL EMAT.....	29
6. ESTUDIO ESTABILIDAD PRODUCTO TERMINADO	30
7. ESTUDIO IN VIVO.....	32
a. <i>Peso corporal</i>	<i>32</i>

b. Consumo de alimento.....	33
c. Grado de mucositis.....	34
8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	35
<i>Descripción cualitativa de mucosa lingual.....</i>	<i>35</i>
IX. CONCLUSIONES.....	47
X. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA VERBASCÓSIDO.....	13
FIGURA 2. ESTRUCTURA 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA	13
FIGURA 3. EXTRACCIÓN SERIADA DE HOJAS DE <i>Buddleja globosa</i> HOPE.....	21
FIGURA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN CON EL VERBASCÓSIDO.....	23
FIGURA 5. CURVA CALIBRACIÓN CON EL 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA.	24
FIGURA 6. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR VERBASCÓSIDO.	25
FIGURA 7. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA.....	25
FIGURA 8. CROMATOGRAMA EMAT.....	26
FIGURA 9. CROMATOGRAMA COLUTORIO 1% EMAT.....	29
FIGURA 10. CAMBIO DE PESO RATAS AL CABO DE 15 DÍAS DE TRATAMIENTO.....	33
FIGURA 11. CONSUMO ALIMENTO PROMEDIO POR DÍA.	34
FIGURA 12. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO CONTROL SANO.	36
FIGURA 13. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO CONTROL MUCOSITIS	37
FIGURA 14. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO CON TRATAMIENTO DE REFERENCIA (GLUTAMINA)..	38
FIGURA 15. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO COLUTORIO 1% EN EMAT VÍA ORAL.....	39
FIGURA 16. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO COLUTORIO 5% EN EMAT VÍA ORAL.....	40
FIGURA 17. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO COLUTORIO 1% EN EMAT VÍA TÓPICA.	41
FIGURA 18. MUCOSA ESPECIALIZADA (ME) Y MUCOSA DE REVESTIMIENTO (MR) DE LA LENGUA EN GRUPO COLUTORIO 5% EN EMAT VÍA TÓPICA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FÓRMULAS COLUTORIOS CON 1% Y 5% DE EMAT RESPECTIVAMENTE.....	16
TABLA 2. ESCALA DE PUNTUACIÓN PARA MUCOSITIS ORAL	19
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS, VISCOSIDAD Y PH DE COLUTORIO AL 1% Y 5%	22
TABLA 5. CONCENTRACIONES DE VERBASCÓSIDO Y DEL 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA EN EL EMAT	26
TABLA 6. CONCENTRACIONES DE VERBASCÓSIDO Y EL 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA EN EXTRACTO ETANÓLICO GLOBAL.....	27
TABLA 7. CONCENTRACIONES DE VERBASCÓSIDO Y DE 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA EN EL COLUTORIO A BASE DE 1% DE ETMAT	27
TABLA 8. CONCENTRACIONES DE VERBASCÓSIDO Y DE 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA EN EL COLUTORIO A BASE DE UN 5% DE EMAT.....	28
TABLA 9. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE LOS COLUTORIOS.....	28
TABLA 10. PORCENTAJE DE VERBASCÓSIDO Y DE 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA CONTENIDOS EN EL EMAT A TIEMPO 0 Y 3 MESES.....	29
TABLA 11. PORCENTAJE DE VERBASCÓSIDO Y DE 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA CONTENIDOS EN EL EMAT A TIEMPO 0 Y 1 AÑO.	30
TABLA 12. PORCENTAJE DE VERBASCÓSIDO Y DE 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA EN LOS COLUTORIOS AL 1% Y AL 5% A TIEMPO 0,1, 2 Y 3 MESES.....	31

Abreviaturas

EMAT: extracto etanólico semipurificado de hojas de *B.globosa*

EPP: eritrodisestesia palmo-plantar

CLAE: cromatografía líquida de alta eficiencia

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

DPPH: radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado

UV: ultravioleta

csp: cantidad suficiente para

I. Resumen

Buddleja globosa Hope es una planta nativa de Chile que ha demostrado efectos analgésicos, antioxidantes, antiinflamatorio, antibacterianos y antifúngicos. En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se han realizado estudios que comprueban su actividad analgésica, antiinflamatoria y antioxidante. Además se han evaluado preparados farmacéuticos (crema y gel) en el tratamiento de eritrodisestesia palmo-plantar secundaria a terapia antineoplásica y radioepitelitis. Con estos antecedentes se propone la elaboración de un colutorio a base de un extracto de *B. globosa* para el tratamiento de mucositis oral, una enfermedad inflamatoria resultante de la terapia contra el cáncer, cuya incidencia es del 40-90% y se manifiesta como lesiones inflamatorias y/o ulcerativas del tracto oral y/o gastrointestinal. Este efecto secundario puede no sólo comprometer la salud de los pacientes que la presentan, sino también, la terapia a la que están sujetos. Hasta hoy no existe ningún producto aprobado para su uso en mucositis oral que haya demostrado eficacia en su prevención y/o tratamiento.

El objetivo general de este trabajo consiste en estandarizar un extracto alcohólico de hojas de *B. globosa* y evaluar mediante un ensayo preclínico la efectividad de un colutorio a base de dicho extracto estandarizado en sus componentes activos.

Para la elaboración del extracto etanólico semipurificado (EMAT) se utilizó material vegetal (hojas) recolectado en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Santiago. Con el material seco y molido se realizaron extracciones seriadas con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y etanol).

La valoración de EMAT y colutorio se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) cuantificando los metabolitos verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina mediante curvas de calibración elaboradas con los respectivos patrones.

Se evaluó la estabilidad de EMAT y colutorio en estufa a 40°C y a temperatura ambiente.

Se realizó un estudio *in vivo* con Ratas hembras Sprague-Dawley, se estudiaron 7 grupos (control sano, control de mucositis, tratamiento de referencia (glutamina), colutorio al 1% EMAT vía oral, colutorio 5%EMAT vía oral, colutorio 1% EMAT vía tópica y colutorio 5% EMAT vía tópica) evaluando grado de mucositis, peso corporal y consumo de alimento. Además, se realizaron análisis histológicos a muestras de lengua.

La metodología CLAE permitió cuantificar los componentes principales (verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina) en EMAT ($90,58 \pm 1,377$ ppm y $9,823 \pm 0,131$ ppm) y en las dos formulaciones elaboradas del colutorio, al 1% en EMAT ($80,37 \pm 4,454$ ppm y $7,068 \pm 0,3942$ ppm) y al 5% en EMAT ($325,1 \pm 9,668$ ppm y $38,42 \pm 1,367$ ppm)

Con respecto a la estabilidad química de los compuestos activos del colutorio, se estableció que se produce degradación, llegando a un 8,09% de verbascósido al tercer mes en estufa a 40°C y 18,96% en el caso de 7-O-glucósido de luteolina. Mientras que en EMAT la concentración del verbascósido fue un 77,63% al cabo de tres meses en estufa a 40°C y el 7-O-glucósido de luteolina de un 82,24% respecto a la concentración inicial.

El colutorio a base de EMAT al ser un producto estandarizado en sus compuestos activos asegura la reproducibilidad lote a lote, la trazabilidad de la composición química del producto y por ende su acción farmacológica.

En el estudio *in vivo* no se observan signos físicos de desarrollo de mucositis oral en ningún grupo y no se observan diferencias estadísticamente significativas en el peso y consumo de alimento entre los grupos estudiados. Sin embargo, en el análisis histológico de mucosa lingual revela diferencias entre los grupos, principalmente en el grosor epitelial que se ve más delgado en los grupos de control de mucositis y tratamiento de referencia, no así en los grupos tratados con colutorios que se asemejan más al control sano.

En base a los resultados obtenidos en el estudio histológico, se encuentran evidencias que los colutorios al 1% y 5% en EMAT, tanto por vía oral como tópica, podrían ser efectivos en el tratamiento de la mucositis oral inducida por busulfán.

II. Abstract

“DEVELOPMENT OF THE ANALYTICAL METHODOLOGY AND PRECLINICAL TEST OF A MOUTHWASH BASED ON A STANDARDIZE EXTRACT OF GLOBULAR BUDDLEJA HOPE”

Buddleja globosa Hope is a native plant from Chile that has shown analgesic, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal effects. In the Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, studies that verify its analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activity have been carried out. In addition, pharmaceutical formulations (cream and gel) have been evaluated in the treatment of palmar-plantar erythrodysesthesia secondary to antineoplastic therapy and radioepithelitis. With this background it is proposed the development of a mouthwash based on an extract of *Buddleja globosa* Hope for the treatment of oral mucositis, an inflammatory disease resulting from cancer therapy. Oral mucositis' incidence is 40-90% and is manifested as inflammatory and/or ulcerative lesions of the oral and/or gastrointestinal tract. This side effect may not only compromise the health of the patients presenting it, but also the therapy to which they are subject. To the date there is no approved product in the treatment and/or prevention of oral mucositis that has been demonstrated efficacious.

The general objective of this work is to standardize an alcoholic extract of leaves of *Buddleja globosa* Hope and to evaluate, by a preclinical test, the effectiveness of a mouthwash based on this standardized extract in its active components.

For the elaboration of fractionated ethanolic extract (EMAT) plant material (leaves), collected in the Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Santiago, was used. With the dry and milled material, serial extractions were carried out with increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane and ethanol).

The analysis of the extract and mouthwash was performed by HPLC methodology, quantifying the metabolites verbascoside and luteolin 7-O-glucoside using calibration curves elaborated with the respective standards.

Stability of the extract and mouthwash was evaluated in an oven at 40 ° C and at room temperature.

An *in vivo* study was performed with 7 groups of female Sprague-Dawley rats (healthy control, mucositis control, standard treatment (glutamine), mouthwash 1% EMAT orally, mouthwash 5% EMAT orally, mouthwash 1% EMAT topically and mouthwash 5% EMAT topically) evaluating the degree of mucositis, body weight and food intake. In addition, histological analyzes were performed on tongue samples.

The HPLC methodology allowed quantification of the major components (verbascoside and luteolin 7-O-glucoside) in EMAT (90.58 ± 1.377 ppm and 9.823 ± 0.131 ppm) and in the two formulations of the mouthwash, 1% in EMAT ($80, 37 \pm 4.454$ ppm and 7.068 ± 0.3942 ppm) and 5% in EMAT (325.1 ± 9.668 ppm and 38.42 ± 1.367 ppm)

Regarding the chemical stability of the active compounds of the mouthwash it was established that degradation occurs, reaching 8.09% verbascoside at the third month in an oven at 40 ° C and 18.96% in the case of luteolin 7-O- glucoside, while in the dry extract EMAT the concentration of verbascoside was 77.63% after three months in a stove at 40 ° C and luteolin 7-O-glucoside of 82.24% in relation to the initial concentration.

The EMAT-based mouthwash as a standardized product concerning its active compounds ensures batch-to-batch reproducibility, traceability of the chemical composition of the product and thus its pharmacological action.

In the *in vivo* study no physical signs of oral mucositis development were observed in any group and no statistically significant differences were observed in weight and feed intake among the groups studied; however, the histological analysis of lingual mucosa reveals differences between them, mainly in the epithelial thickness that was thinner in the control group of mucositis and standard treatment group, but not in the ones treated with mouthwashes, where a resemble to the healthy control group was observed.

Based on the results obtained in the histological study, there is evidence that 1% and 5% mouthwashes in EMAT, both orally and topically, could be effective in the treatment of oral mucositis induced by busulfan.

III. Introducción

Chile es reconocido por su vasta flora nativa, de la cual el hombre se ha beneficiado desde tiempos remotos no sólo como fuente de alimento, sino también por sus propiedades farmacológicas. Un ejemplo de ello es *Buddleja globosa* Hope, comúnmente conocida como matico. Dentro de la medicina tradicional, el matico destaca por sus propiedades cicatrizantes¹. Estudios realizados en distintos extractos obtenidos desde las hojas de *B. globosa* han demostrado que poseen varios efectos: cicatrizantes, analgésicos, antioxidantes, antiinflamatorio, antibacterianos y antifúngicos².

En el año 2000, se inicia una línea de investigación sobre *B. globosa*, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Dentro de los estudios realizados se estudiaron químicamente extractos alcohólicos de las hojas de *B. globosa*, desarrollándose una metodología analítica por CLAE-DAD para la cuantificación de metabolitos bioactivos y posterior estandarización del extracto³. Con estos extractos se realizaron estudios farmacológicos que demostraron los efectos analgésicos, antiinflamatorios y antioxidantes². Posteriormente se desarrollaron formulaciones farmacéuticas (crema y gel) a base del extracto alcohólico y se realizó un estudio clínico con 180 pacientes oncológicos en el que se demostró efectividad de las formulaciones en el tratamiento de reacciones adversas a la piel (eritrodisestesia palmo plantar y radioepitelitis) como consecuencia del tratamiento de cáncer⁴. En este último estudio, se pudo constatar una aplicación del extracto de *B. globosa*. Siguiendo esta misma línea, se propone en esta memoria el desarrollo y evaluación preclínica de un colutorio para combatir otra patología asociada al tratamiento del cáncer, la mucositis oral.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8,2 millones de defunciones y se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas⁵. En Chile, los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte, con una tasa de mortalidad de 133,7 por 100.000 habitantes en el 2009. Sin embargo, en las regiones de Arica y Parinacota, Iquique, Antofagasta y Aisén el cáncer pasa a ser la primera causa de muerte^{6,7}. Es por esto que la prevención y tratamiento de esta enfermedad pasa a ser un tema primordial en salud a nivel mundial y nacional.

Si bien, se ha avanzado en cuanto a los tratamientos de esta enfermedad, las técnicas y fármacos utilizados en éstos no están exentos de importantes reacciones adversas, ya que las terapias suelen ser muy agresivas, comprometiendo la salud y calidad de vida de los pacientes. Una de ellas, es la mucositis oral, la cual se manifiesta como lesiones inflamatorias y/o ulcerativas del tracto oral y/o gastrointestinal⁸. Ésta se puede presentar con signos y síntomas que van desde eritema, edema, ardor y un aumento de la sensibilidad a alimentos calientes, pudiendo llegar hasta el desarrollo de úlceras. Además, de ser un proceso doloroso para los pacientes, también aumenta el riesgo de originar una infección local o sistémica y puede dificultar la alimentación del paciente, muchas veces llegando a necesitar alimentación parenteral, comprometiendo no sólo el estado nutricional del paciente sino que también el cumplimiento de la terapia o bien aumentando el tiempo de esta última.

El 85% de los pacientes sometidos a tratamiento oncológico con dosis elevadas de radioterapia y/o quimioterápicos mucotóxicos, desarrollan complicaciones en la cavidad oral. La incidencia de la mucositis oral es del 40-90%, con mayor proporción en pacientes jóvenes y en mujeres⁹.

La mucositis oral se presenta tanto en pacientes sometidos a quimioterapia como a radioterapia⁹. En el caso de la quimioterapia, los grupos principales de fármacos que generan mucositis oral son: agentes alquilantes (busulfán, ciclofosfamida, mecloretamina, procarbazona y tiotepa), antimetabolitos (citosina, 5-fluorouracilo, hidroxiurea, metotrexato, 6-mercaptopurina y 6-tioguanina), taxanos (docetaxel y paclitaxel), alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina), antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina y epirubicina), antibióticos antitumorales (actinomicina D, amsacrina, bleomicina, mitramicina C y mitomicina) y otros (etopósido, tenipósido y mostazas nitrogenadas)¹⁰.

Por otro lado, en la radioterapia de altas dosis en cánceres de cabeza y cuello la incidencia de mucositis oral grado 3 o 4, según la escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) alcanza el 85%, mientras que todos los pacientes tratados muestran algún grado de mucositis oral⁸.

Por tales razones, la mucositis oral se considera un problema de relevancia clínica en los pacientes con tratamiento de cáncer y se busca prevenir la aparición de esta reacción adversa o revertir la situación de su aparición.

En general las guías clínicas dan recomendaciones para la prevención de la mucositis oral como un buen cuidado de la higiene oral, crioterapia en algunos casos y utilización del medicamento palifermina en pacientes con cáncer de tipo hematológico que requieren altas dosis de quimioterapia y radiación total del cuerpo.

Actualmente, no existe ningún producto aprobado que haya demostrado ser eficaz de manera significativa en la prevención y/o reducción de la severidad de la mucositis oral inducida por quimioterapia y/o radioterapia¹¹. De aquí nace el interés y necesidad de buscar un tratamiento que pueda combatir la mucositis oral de manera efectiva de fácil uso y seguro para los pacientes.

IV. Hipótesis

- 1) La estandarización de un extracto etanólico semipurificado de hojas de *Buddleja globosa* Hope (EMAT) permitirá asegurar la calidad del producto elaborado en base a este extracto, asegurando homogeneidad respecto de la eficacia entre distintos lotes ya que el producto tiene la concentración necesaria de principios activos para ejercer su acción terapéutica.
- 2) Un colutorio a base de EMAT es efectivo para tratar la mucositis oral en ratas tratadas con busulfán.

V. Objetivos

1. Objetivo general

Estandarizar un extracto alcohólico de hojas de *Buddleja globosa* Hope y evaluar mediante un ensayo preclínico la efectividad de un colutorio a base de dicho extracto estandarizado en sus componentes activos.

2. Objetivos específicos

- 1) Estandarizar la metodología de elaboración del EMAT.
- 2) Cuantificar los principios activos de *B. globosa*. (verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina) utilizando metodología CLAE.
- 3) Evaluar características organolépticas, pH, viscosidad y estabilidad química del colutorio.
- 4) Valorar la concentración de principios activos del producto terminado.
- 5) Determinar la efectividad del colutorio en un modelo animal de mucositis oral inducida por un quimioterapéutico
- 6) Comprobar la efectividad del colutorio, en el modelo animal, a través de un análisis histológico de mucosa lingual.

VI. Antecedentes

1. Descripción botánica

Familia: Buddlejaceae

Género: *Buddleja*

Especie: *B. globosa* Hope

Nombre vulgar: matico, matico chileno, pañil, palguín, yerba del soldado, chuzalongo (español), migla (Ecuador)

Parte usada: hojas

Distribución: Chile, Perú y Argentina. En Chile habita desde Santiago hasta la Patagonia, generalmente en sitios húmedos.



B. globosa es un arbusto siempre verde de 1,5 - 3 m de altura, con tallos subleñosos amarillentos. Hojas opuestas, de 3 - 15 cm de largo por 1 - 5 cm de ancho, oval-lanceoladas, rugosas, blanquecinas en su cara inferior, agudas en la punta. Flores anaranjadas, amarillas y rojas, dispuestas en cabezuelas globosas de 1-2 cm. Fruto en cápsula de 3 mm de diámetro. Semillas numerosas, poliédricas, menores de 1 mm de largo¹.

2. Uso folclórico

En medicina folclórica se utiliza el infuso de las hojas como diurético, antiinflamatorio, antiséptico local y cicatrizante¹². También este extracto acuoso es utilizado en úlceras digestivas y lesiones en las mucosas, trastornos espasmódicos, diarrea, colitis, afecciones hepáticas y de la vesícula. En forma externa se emplea para lavar heridas y úlceras, y en lavados vaginales¹.

3. Estudios previos

Estudios realizados en la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas a extractos de *B. globosa*² demostraron su actividad antiinflamatoria (oral y tópica), analgésica y antioxidante. Para esto se realizaron estudios a un extracto metanólico global y a distintos extractos semipurificados obtenidos en forma sucesiva con hexano, diclorometano y metanol. La actividad analgésica, se evaluó mediante la disminución de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético. Para determinar la actividad antiinflamatoria oral se utilizó la prueba de edema plantar inducido por carragenina y la actividad antiinflamatoria tópica mediante edema inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), todos estos modelos in vivo². La actividad antioxidante fue evaluada in vitro mediante inhibición de la actividad de la xantina oxidasa, apagamiento del anión superóxido, inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos y el ensayo de decoloración de radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH)².

El EMAT presentó actividad antiinflamatoria por vía oral y tópica (61,4% y 56,7% respectivamente), actividad analgésica (38,5%) y antioxidante (68% de inhibición del anión superóxido, 59% de inhibición de la lipoperoxidación, y en el ensayo de decoloración del radical DPPH, la IC₅₀ fue de 6 µg/mL). Además, desde el punto de vista químico, en el mismo estudio se purificaron, aislaron e identificaron en el EMAT verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina, quercetinay el 7-O-glucósido de apigenina, siendo los dos primeros los compuestos mayoritarios².

La composición en principios activos de una droga vegetal puede variar de acuerdo a la época de recolección de ésta. En un estudio realizado en extractos de *B. globosa* se demostró que la mejor época de recolección del material vegetal para esta especie es durante su floración, en verano, estos extractos mostraron mayor actividad farmacológica, lo que se respalda con una mayor cantidad de flavonoles y feniletanoides dentro de los cuales estarían los compuestos responsables de la actividad farmacológica. Es destacable que en el mismo estudio se concluye que el uso de metanol o etanol en la preparación de los extractos no influye en su composición química¹³.

Con el fin de estandarizar el EMAT de *B. globosa*, se desarrolló una metodología analítica por CLAE que permite cuantificar los dos compuestos principales del extracto, a los cuales se les atribuye el efecto farmacológico, estos son verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina. El método de cuantificación por CLAE muestra grandes ventajas por sobre los métodos espectrofométricos, siendo más exacto y permitiendo identificar específicamente los compuestos de interés farmacológico³.

Al comparar el EMAT con el extracto etanólico global se encontró que el primero posee mayor cantidad de los compuestos verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina³.

El EMAT es hipoalergénico¹⁴.

Otros investigadores han realizado estudios para comprobar la eficacia de extractos acuosos de *B. globosa* en la sanación de heridas, dónde se evaluó si aumenta la proliferación de fibroblastos y la capacidad antioxidante, dos mecanismos involucrados en el proceso de reparación. El extracto acuoso presentó un leve efecto estimulador en la proliferación de fibroblastos y un efecto antioxidante significativo¹⁵.

Un estudio realizado en nuestra facultad sobre la capacidad cicatrizante de *B. globosa* demostró que un extracto metanólico global incrementó el número de fibroblastos de piel humana normal en cultivo y un extracto metanólico fraccionado aumentó el depósito de fibronectina de fibroblastos de piel humana normal y aumentó la migración de fibroblastos humanos en cultivo¹⁶.

En otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación se evaluaron dos formulaciones a base del EMAT estandarizado para el tratamiento de eritrodisestesia palmo-plantar (EPP) secundaria a terapia antineoplásica y radioepitelitis secundaria a radioterapia. Una loción o/w con el EMAT al 1% de concentración resultó más eficaz en disminuir los síntomas de la EPP comparada con la loción placebo. Un gel con EMAT al 1% de concentración demostró ser más efectivo en retrasar en tiempo e intensidad la radioepitelitis comparado con el placebo⁴.

Respecto a los dos principales compuestos del EMAT, se ha demostrado que verbascósido (figura 1) posee diversas propiedades farmacológicas como antioxidante y antiinflamatorio, además presenta propiedades antineoplásicas, cicatrizantes y neuroprotectivas¹⁷, también ha probado ser bactericida en concentraciones de 100, 200 y 400 ug/mL¹⁸. Por otra parte 7-O-glucósido de luteolina (figura 2) posee propiedades

antioxidantes y actividad antiinflamatoria, además de un efecto inhibitorio de las metaloproteinasas 2 y 9, lo cual puede contribuir a la modulación en la degradación y remodelación de la matriz extracelular¹⁹.

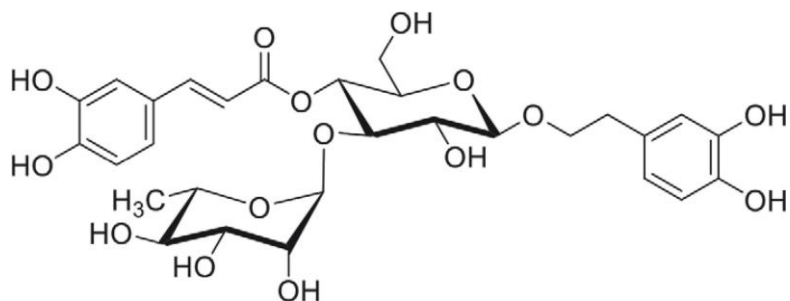


Figura 1. Estructura verbascósido

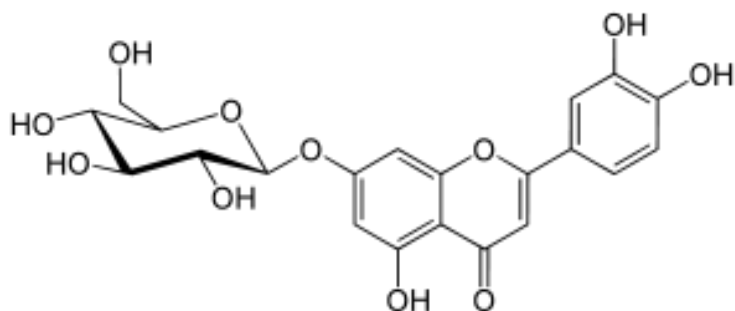


Figura 2. Estructura 7-O-glucósido de luteolina

VII. Materiales y Métodos

1. Materiales

a. Reactivos

En la extracción se utilizaron los solventes: hexano, diclorometano y etanol, todos de grado técnico adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania).

Para el análisis CLAE se utilizaron patrones primarios de referencia de verbascósido (HWI analytik GMBH pharma solutions) y 7-O glucósido de luteolina (Sigma Aldrich, Oakville, ON, USA), solventes: Metanol, ácido fórmico y acetonitrilo, todos aptos para CLAE (J.T.BAKER, BiosLabchile), y agua desionizada preparada empleando un sistema Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA)

Para el análisis histológico se utilizó parafina Paraplast (Leica) y se realizaron las tinciones utilizando Hematoxilina (Merck KGaA. HX55648153) & Eosina (Merck KGaA. FN1266035525) y Giemsa (Merck KGaA. HX56879304).

b. Materias primas

Para la elaboración del colutorio se utilizó carboximetilcelulosa (CMC), benzoato de sodio, glicerina, polisorbato 80 y agua destilada. Todas las materias primas fueron grado farmacéutico (USP), provenientes de Alemania.

Para el estudio *in vivo* se utilizó busulfan (Sigma Aldrich, Oakville, ON, USA), l-glutamina (Merck, Darmstadt, Alemania) en solución de polisorbato 80 al 3%v/v, colutorios al 1% y 5% en EMAT.

c. Instrumentos

1. Sistema de Cromatografía Líquido CLAE, DIONEX modelo ULTIMATE 3000, UV-Vis Detection, Thermo Scientific, columna Symmetry® C18 5µm 4.6x250mm Waters.
2. Viscosímetro Brookfield DV2T, (MA, USA)
3. Balanza analítica Denver Instrument P-114, (NY, USA)
4. Microscopio óptico Zeiss Axio Lab A1 (NY, USA)
5. Ph metro de mesa PH 211, Hanna Instrument, (USA)

d. Equipos

1. Rotavapor Buchi RE 12, (Países bajos)
2. Sonificador VWR Scientific Aquasonic 75T Ultrasonic, (USA)
3. Estufa Memmert (Alemania)
4. Cámara de temperatura y humedad LabTech LHT-0150E, (UK)
5. Micrótopo Reichert-Jung 1130/Biocut, (Alemania)
6. Algesiómetro Ugo-Basile (Italia)
7. Centro de inclusión y placa fría Thermo Scientific, (UK)
8. Autotécnico para procesamiento de muestras para inclusión en parafina Shandon Elliott, (USA)
9. Cámara digital para microscopio Canon DS 126291, (USA)

2. Metodología

a. Obtención del EMAT

Para la elaboración del extracto etanólico semipurificado (EMAT) se utilizó el material vegetal (hojas) recolectado en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Santiago. La recolección se llevó a cabo el 19 de enero del 2015, conservando un testigo de herbario (SQF: 22602) en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las hojas se secaron a temperatura ambiente, luego se molieron con molino de cuchillas. Con el material seco y molido se realizaron extracciones seriadas con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y etanol) obteniéndose los extractos de hexano, diclorometano y etanólico (EMAT). Cada extracción se realizó hasta agotamiento del material vegetal. Se dejó secar el material antes de cambio de solvente. Las extracciones se realizaron en triplicado.

b. Valoración del EMAT

Se realizó la cuantificación de los metabolitos verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina del EMAT según el método CLAE³. Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Columna: Symmetry® C18 5 µm 4,6 x 250 mm.

Flujo: 1,5 mL/min

Fase móvil: ácido fórmico 0,1%: acetonitrilo = 75: 25

Volumen de inyección: 20 µL

Longitud de onda: 365 nm

Temperatura: 20-25°C

Para la realización de las curvas de calibración se disolvieron los estándares en metanol, para el verbascósido se prepararon soluciones de 5, 10, 50, 60, 80 y 100 ppm; en el caso del 7-O-glucósido de luteolina se prepararon soluciones de 1, 5, 10, 20, 30 y 40 ppm.

Para el análisis del EMAT se pesó y disolvió en metanol la cantidad suficiente para obtener una solución madre de 1000 ppm, esta se diluyó obteniendo soluciones de 500 ppm para realizar el análisis.

Todas las mediciones se realizaron en triplicado.

c. Preparación del colutorio

En la tabla 1 se puede observar la composición de los colutorios a base del EMAT al 1% y 5%.

Tabla 1. Fórmulas colutorios con 1% y 5% de EMAT respectivamente.

	Colutorio 1% EMAT	Colutorio 5% EMAT
	%	%
Carboximetilcelulosa	0,4%	0,4%
Benzoato de sodio	0,1%	0,1%
EMAT	1,0%	5,0%
Glicerina	10,0%	10,0%
Agua destilada	csp 100,0%	csp 100,0%

Método de preparación

1.- En un recipiente previamente tarado se calentó aproximadamente la mitad del agua total. Luego se fue agregando la carboximetilcelulosa (CMC) tratando de que no se

formaran aglomerados. Se agitó con agitador mecánico Bamix para lograr total dispersión de la CMC. Luego, sin enfriar, se adicionó el benzoato de sodio y la glicerina y se esperó hasta que la temperatura fuera aprox. 25°C (Solución A).

2.- En otro recipiente se pesó el EMAT y se disolvió en el resto de agua agitando con bagueta. Se filtró con papel filtro en plegado simple (Solución B).

3.- Cuando la solución A se enfrió se le agregó la solución B, agitando hasta homogeneidad. Se llevó a peso final con agua.

Finalmente se realizó la evaluación de características organolépticas, viscosidad y pH.

Se midió la viscosidad de las formulaciones utilizando un viscosímetro Brookfield LV, aguja número 1 a 200 rpm, a 20°C.

Se midió directamente el pH de las formulaciones a una temperatura de 20°C, utilizando un equipo marca Hanna modelo HI 111.

d. Cuantificación de los componentes mayoritarios del EMAT en el producto terminado

Se realizó la cuantificación de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina en los colutorios al 1 y 5% en EMAT. A partir del colutorio, se preparó una solución metanólica madre de 1000 ppm respecto al contenido de EMAT, para esto se pesó la cantidad necesaria del colutorio en un matraz volumétrico de 250ml y se aforó con metanol. A partir de ésta se prepararon soluciones de 500 ppm, las cuales se sonicaron y filtraron para separar la CMC contenida en el colutorio, se lavó el filtro 3 veces con pequeñas cantidades de metanol y luego se llevó a volumen final. Las valoraciones se realizaron por triplicado.

e. Estudio de estabilidad del EMAT

Se evaluó la estabilidad del EMAT en estufa a 40°C por 3 meses y a temperatura ambiente por un año. Se tomaron muestras a tiempo cero, al tercer mes y al año. Para la determinación de la concentración de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina se utilizó el método de valoración anteriormente descrito.

f. Estudio de estabilidad del producto terminado

Se evaluó la estabilidad de ambos colutorios por 3 meses en cámara de estabilidad asegurando condiciones de temperatura (25°C) y humedad (60%) y en estufa a 40°C. Se tomaron muestras al primer, segundo y tercer mes del estudio, midiendo las

concentraciones de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina por la metodología descrita anteriormente.

g. Animales

El estudio contó con la aprobación del comité de bioética para la investigación de animales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (N°CBE2015-24).

Se utilizaron 42 Ratas Sprague-Dawley hembras, entre 180 a 250 g de peso y de 2 a 3 meses de edad. Las ratas provenían y fueron mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Los animales se identificaron mediante una marca efectuada en la cola con marcador indeleble siguiendo un código establecido en el laboratorio y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22-23°C), humedad (50 +/- 5 %) y luz (12 /12 h luz y oscuridad)

Las ratas se mantuvieron en jaulas separadas (una rata por jaula) con acceso libre al alimento y agua. Se dividieron en 7 grupos de 6 individuos cada uno. Los grupos y régimen de cada uno se detallan a continuación:

Grupo 1 (control normal): se les administraron 3 mL del vehículo (polisorbato 80 al 3% v/v)

Grupo 2 (control mucositis): se les administraron 3 mL de vehículo.

Grupo 3 (tratamiento de referencia): se les administraron 3 mL del tratamiento de referencia correspondiente a l-glutamina 1g/kg p.o. disuelto en el vehículo.

Grupo 4 (colutorio al 1% de EMAT por vía oral): se les administraron 10 mL/Kg del colutorio administrado mediante una sonda orogástrica.

Grupo 5 (colutorio al 5% de EMAT por vía oral): se les administraron 10 mL/Kg del colutorio administrado por sonda orogástrica.

Grupo 6 (colutorio al 1% de EMAT por vía tópica): se les aplicaron 10 mL/Kg del colutorio sólo en la boca con una jeringa.

Grupo 7 (colutorio al 5% de EMAT por vía tópica): se les aplicaron 10 mL/Kg del colutorio al 5% aplicado sólo en la boca con jeringa.

Todos los grupos fueron pre-tratados con sus respectivos regímenes durante 3 días antes de inducir la mucositis.

Se indujo la mucositis en el día 1 a los grupos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 utilizando busulfán una vez al día por vía oral a una dosis de 4 mg/ kg durante cuatro días. Además, las lenguas de los animales se expusieron a radiación infrarroja con el aparato de tail flick, 40 mV/cm² por 5 segundos en los días 1, 4 y 10. Para esto, las ratas fueron previamente anestesiadas con ketamina 60 mg/kg más xilacina 10 mg/kg intraperitoneal. Recibieron el tratamiento correspondiente a su grupo hasta el día 15.

Los animales fueron observados diariamente determinando el cambio de peso, consumo de alimento y el grado de mucositis mediante una escala de puntuación desarrollada por Parkins et al. (1983)²⁰. La escala se observa en la tabla 3.

Tabla 2. Escala de puntuación para mucositis oral²⁰

Puntaje	Descripción
0	Normal
0.5	Ligeramente rosado
1	Ligeramente rojo
2	Enrojecimiento severo
3	Descamación focal
4	Exudación
5	Ulceración completa de mucosa

Las ratas se sacrificaron al día 15. Se colectaron muestras de lengua para el análisis histológico.

h. Análisis Histológico

Fijación y preparación de las muestras

Una vez eutanasiadas las ratas, los tejidos linguales fueron rápidamente disecados, lavados en suero fisiológico y fijados en paraformaldehído 4% en PBS pH7,4 por 48 horas. Luego fueron lavados en PBS (3 lavados de 3 horas a 4 °C) y procesados en

autotécnico para deshidratación en alcoholes de grado creciente (alcohol 70°, alcohol 95°, alcohol 100°), aclaramiento (2 baños de Xilol) e impregnación (2 baños de parafina líquida) durante 1 noche. Luego las muestras impregnadas fueron incluidas en parafina en el sistema autotécnico para procesamiento de muestras para inclusión en parafina.

Se realizaron cortes de 4 µm con micrótopo. Los cortes fueron procesados para su tinción con Hematoxilina & Eosina, y Giemsa. Se realizó un estudio morfológico con fotografías de los cortes teñidos obtenidos de los 7 grupos (control, control mucositis, tratamiento de referencia, colutorio al 1% de EMAT vía oral, colutorio al 5% de EMAT por vía oral, colutorio al 1% de EMAT por vía tópica y colutorio al 5% de EMAT por vía tópica) usando un microscopio óptico Zeiss Axio Lab A1, con una cámara digital Canon EOS Rebel-T3, montada para microscopio, con software EOS Utility para transferencia de imágenes. Se analizaron muestras de 3 animales por grupo.

Sobre las microfotografías digitales a 40X (aumento final 200x), se analizaron las siguientes características de las mucosas:

- i) En epitelio: grosor, solución de continuidad, aspecto de sus estratos (hiperqueratosis, acantosis, atrofia y displasia), cambio premaligno del epitelio, caracterizado por una combinación de alteraciones celulares y arquitectónicas (formación de crestas epiteliales bulbosas, hiperplasia de la capa basal, hiper celularidad con pérdida de la homogeneidad celular)
- ii) En conectivo: Presencia o ausencia de inflamación, presencia de células inflamatorias (linfocitos, polimorfonucleados, células compatibles con macrófagos, mastocitos), presencia de células tipo fibroblastos, ordenamiento de fibras, características morfológicas de la matriz extracelular amorfa (presencia de edema); morfología de vasos sanguíneos.

Los análisis histológicos fueron realizados por la Dra. María Angélica Torres en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y luego por análisis de comparaciones múltiples Tukey's, utilizando el programa GraphPad Prism 6.

VIII. Resultados y Discusión

1. Obtención del EMAT

Se realizó la obtención del extracto con el método señalado anteriormente, se estandarizó el proceso de obtención registrando la cantidad de solvente usado en cada extracción y el número de extracciones. Las extracciones se realizaron en triplicado en matraces Erlenmeyer de 2000 mL, cada uno con 250 g de material vegetal. Para las primeras dos extracciones con hexano se utilizaron 1,6 litros de solvente y luego se continuó con 1,2 litros debido a que el material vegetal absorbe el solvente aumentando el volumen de éste realizando 18 extracciones más. En las extracciones con diclorometano y etanol se utilizaron 1,2 litros de solvente para cada extracción, se realizaron 19 extracciones con diclorometano y 24 con etanol.

En la figura 1 se muestra el número de extracciones y el rendimiento obtenido.

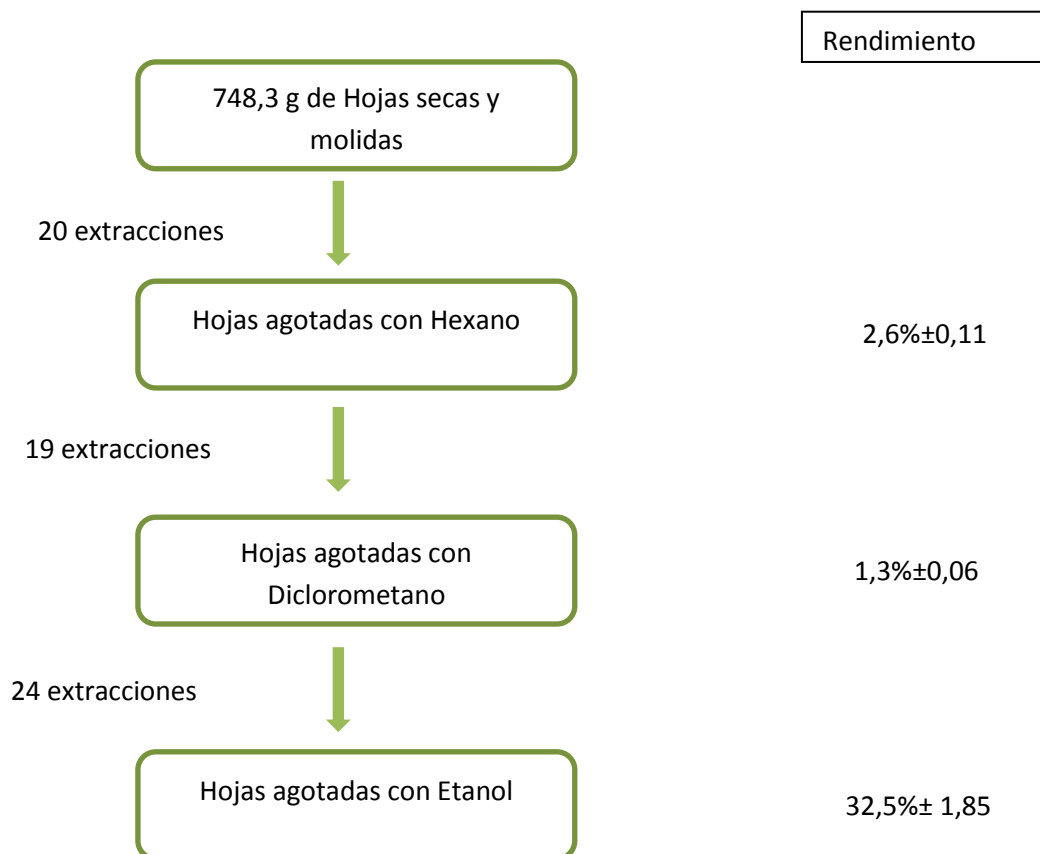


Figura 3. Extracción seriada de hojas de *Buddleja globosa* Hope

Se debe destacar que el rendimiento del EMAT ($32\% \pm 1,85$) se ve aumentado significativamente con respecto a estudios anteriores donde sólo alcanzaba el $9\%^3$. El procedimiento de extracción utilizado en esta memoria fue más exhaustivo con 24 extracciones de 1,2 litros de etanol cada una, a diferencia de nuestros trabajos anteriores en que el número de extracciones no fue informado. El rendimiento del proceso de obtención del EMAT es muy importante ya que de él depende la viabilidad de una futura industrialización Tanto del proceso de extracción como del desarrollo del colutorio.

2. Desarrollo de los colutorios

Se preparó un litro de cada colutorio (1% y 5% del EMAT) según la fórmula señalada en las tablas 1 y 2. Luego, se evaluaron sus características organolépticas, viscosidad y pH (tabla 4)

Tabla 3. Características organolépticas, viscosidad y pH de colutorio al 1% y 5%

	Colutorio 1% EMAT	Colutorio 5% EMAT
Características organolépticas	Líquido color pardo, olor característico, sabor levemente dulce.	Líquido color café oscuro, olor característico, sabor amargo.
Viscosidad	90 cPs	100 cPs
pH	6,2	6,3

Las características organolépticas del colutorio al 1% resultan adecuadas para su administración ya que posee un sabor y olor agradable, sin necesidad de adicionar saborizante o endulzante, su pH es compatible con el de la saliva (6,5-7) y su viscosidad es adecuada para su uso. Por otra parte la mayor concentración de EMAT en el colutorio al 5%, resulta en características organolépticas menos aptas, en especial por el sabor amargo, que podría producir rechazo en los pacientes, esto último se podría mejorar enmascarando el sabor con la adición de saborizantes.

3. Estandarización del EMAT

Se construyeron las curvas de calibración con los estándares de verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina.

Para el verbascósido se utilizaron concentraciones desde los 5 ppm y hasta los 80 ppm. Se obtuvo una curva de calibración lineal (figura 4) con la siguiente ecuación:

$$Y = 0,0255X - 0,04659 \quad r^2 = 0,9917$$

El valor de r^2 es acorde al modelo lineal, además se realizó una prueba de carencia de ajuste cuyo resultado indicó que no hay evidencia para rechazar el modelo lineal.

Prueba de carencia de ajuste:

$$F_{\text{cal}} = 0,5055 \quad F_{\text{cal}} < F_{\text{tabla}}$$

$$F_{\text{tabla}} = 3,70$$

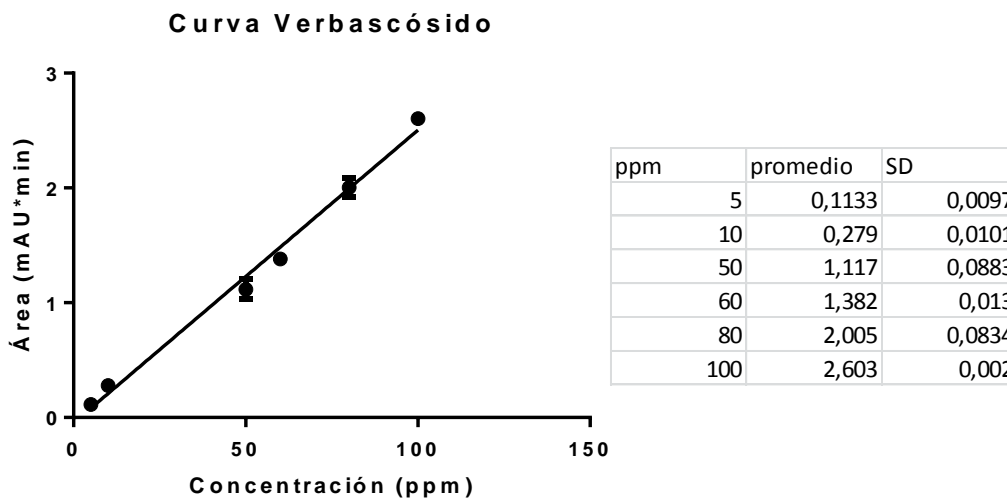


Figura 4. Curva de calibración con el verbascósido. Cada punto de la curva se realizó en triplicado, se muestra barra de desviación estándar.

Para el 7-O-glucósido de luteolina se tomaron concentraciones desde los 1 ppm hasta los 40 ppm. Se obtuvo una curva de calibración lineal (figura 5) con la siguiente ecuación:

$$Y = 0,2271X + 0,08850 \quad r^2 = 0,9992$$

El valor de r^2 es acorde al modelo lineal, además se realiza una prueba de carencia de ajuste cuyo resultado nos indica que no hay evidencia para rechazar el modelo lineal.

Prueba de carencia de ajuste

$$F_{cal} = 1,8984 \quad F_{cal} < F_{tabla}$$

$$F_{tabla} = 3,708$$

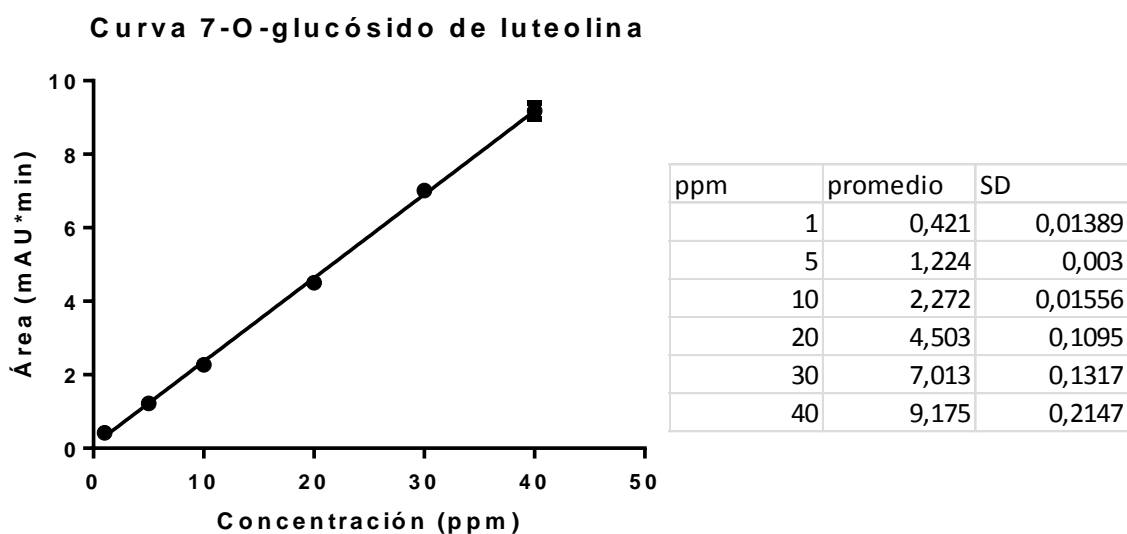


Figura 5. Curva calibración con el 7-O-glucósido de luteolina. Cada punto de la curva se realizó en triplicado, se muestra barra de desviación estándar.

En las figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas de los estándares de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina. El verbascósido está a una concentración de 80 ppm y tuvo tiempo de retención de 2,27 minutos. El 7-O-glucósido de luteolina está a una concentración de 5 ppm y tuvo tiempo de retención de 3,11 minutos.

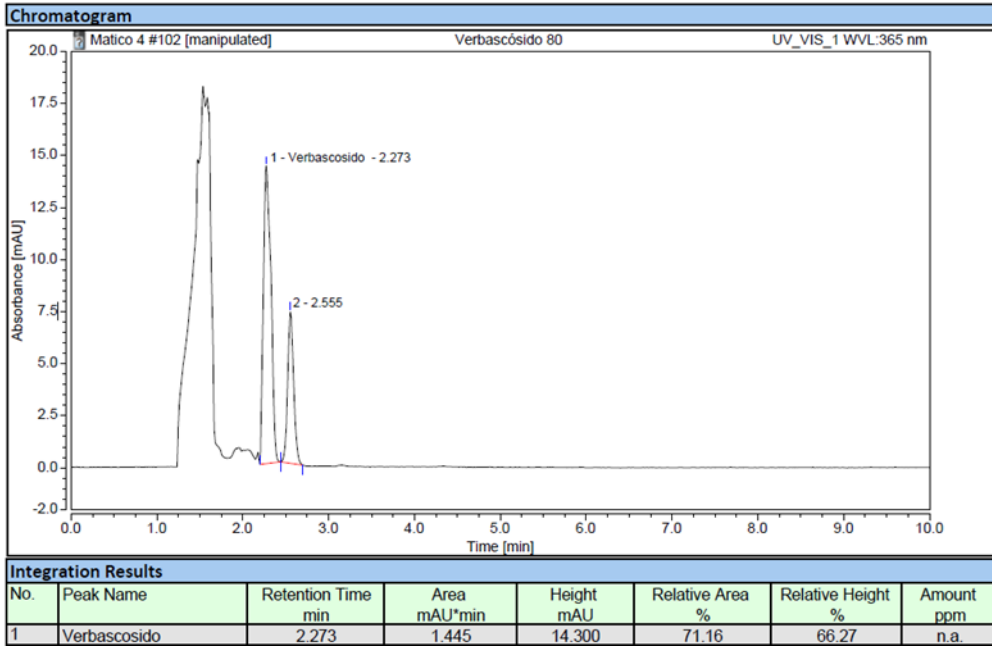


Figura 6. Cromatograma del estándar verbascóido.

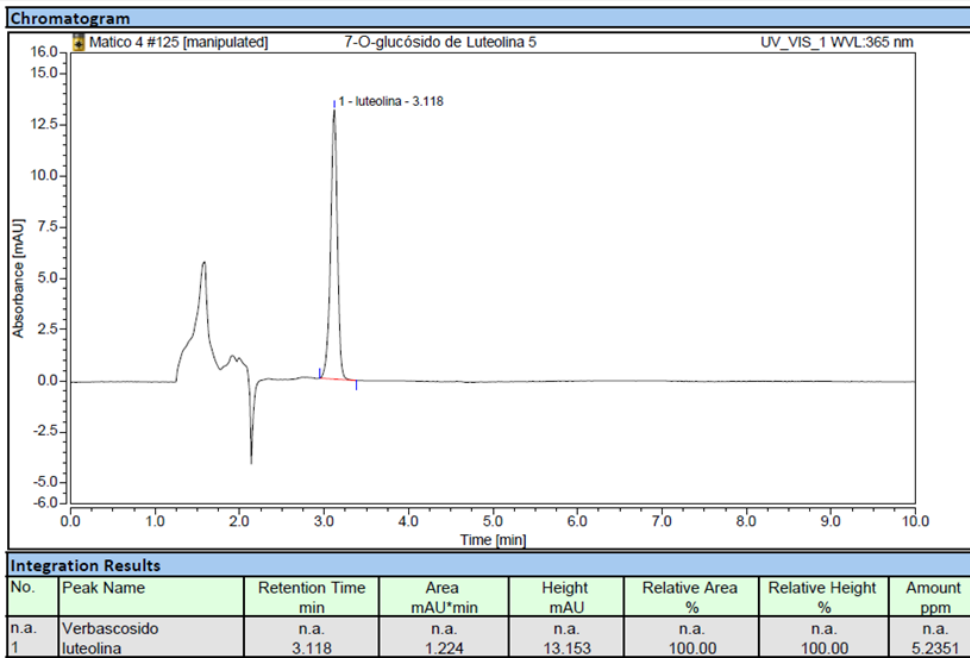


Figura 7. Cromatograma del estándar 7-O-glucósido de luteolina.

Se determinó la concentración de verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina del EMAT en solución. En la tabla 5 se muestran las concentraciones obtenidas. Las mediciones se realizaron en triplicado.

Tabla 4. Concentraciones de verbascósido y del 7-O-glucósido de luteolina en el EMAT

	Ppm	SD
Verbascoído	90,58	1,377
7-O-gluc-luteolina	9,823	0,131

En la figura 6 se muestra el cromatograma de EMAT, se logró una buena separación de los componentes principales y su reconocimiento al comparar los tiempos de retención con los cromatogramas de los estándares.

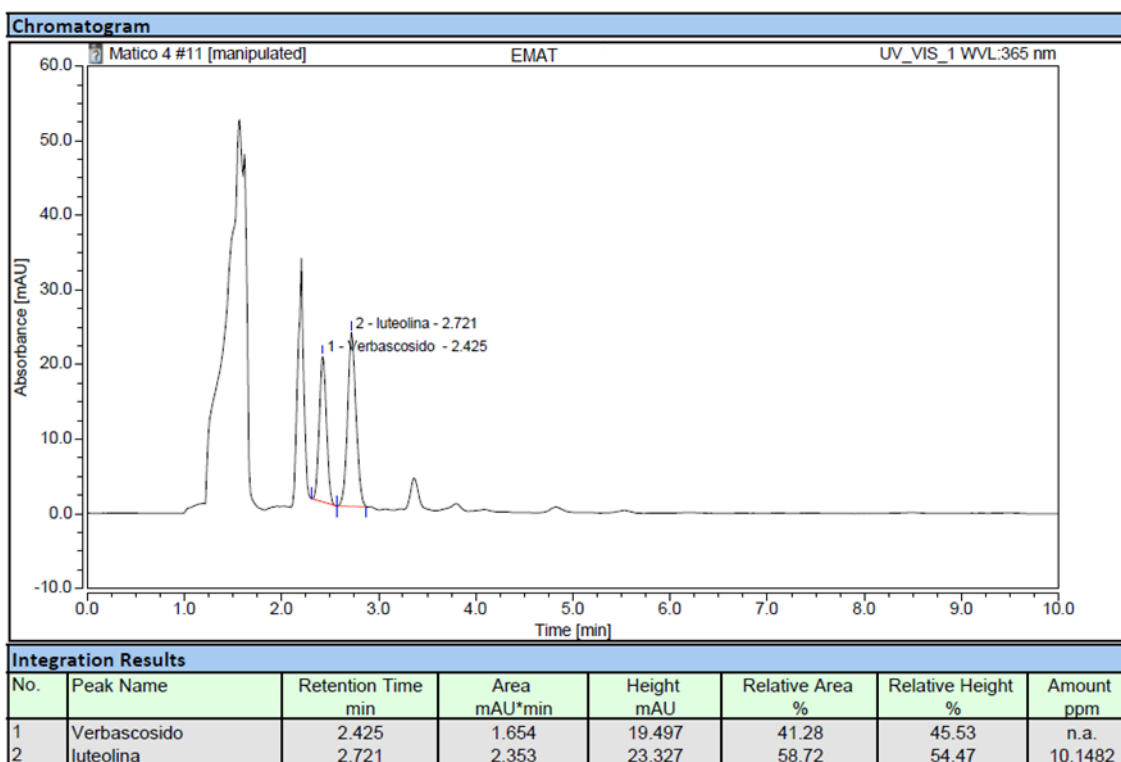


Figura 8. Cromatograma EMAT. Se realizó la medición de EMAT a una concentración de 500ppm.

Además, se determinó la concentración de Verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina en el extracto etanólico global en solución. En la tabla 6 se muestran las concentraciones obtenidas.

Tabla 5. Concentraciones de verbascósido y el 7-O-glucósido de luteolina en extracto etanólico global

	ppm	SD
Verbascósido	55,65	5,591
7-O-gluc-luteolina	5,821	0,6313

Al comparar ambos extractos (EMAT y extracto etanólico global) se observa que la concentración de metabolitos es mayor en el EMAT, por lo tanto la extracción seriada es el método de elección para obtener una mayor concentración de verbascósido y de 7-O-glucósido de luteolina lo que contribuiría a una mayor acción farmacológica.

Estos datos coinciden con los obtenidos en estudios realizados anteriormente en que se comparó la composición química de un extracto etanólico seriado (semipurificado) con un extracto etanólico global¹³.

4. Estandarización en los componentes activos del producto terminado

Se midieron las concentraciones en ppm de verbascósido y de 7-O-glucósido de luteolina de ambos colutorios al 1% y 5% en EMAT. Los resultados se muestran en las tablas 7 y 8.

Tabla 6. Concentraciones de verbascósido y de 7-O-glucósido de luteolina en el colutorio a base de 1% de ETMAT

Colutorio 1%	Concentración (ppm)	SD
Verbascósido	80,37	4,454
7-O-glu-luteolina	7,068	0,3942

Tabla 7. Concentraciones de verbascósido y de 7-O.glucósido de luteolina en el colutorio a base de un 5% de EMAT

Colutorio 5%	Concentración (ppm)	SD
Verbascósido	325,1	9,668
7-O-glu-luteolina	38,42	1,367

Si se realiza una comparación con las concentraciones obtenidas en el EMAT y los colutorios se puede observar que hay una disminución en las concentraciones de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina, lo que indica que la recuperación del EMAT es menor al 100%, esto debido a que se debe separar la CMC del colutorio para poder hacer la medición en CLAE, quedando retenido parte del EMAT en la CMC. En base a esto se calcula el % de recuperación para cada colutorio (tabla 9)

Tabla 8. Porcentaje de recuperación en la determinación de principios activos de los colutorios.

% Recuperación	Colutorio 1%	Colutorio 5%
Verbascósido	88,73	71,78
7-O-glu-luteolina	71,95	78,22

En la figura 9 se muestra el cromatograma del colutorio a 1% en EMAT. Se logró la identificación de los componentes principales a través de los tiempos de retención, no se encontraron interferentes en el cromatograma por lo que el tratamiento previo de la muestra fue efectivo.

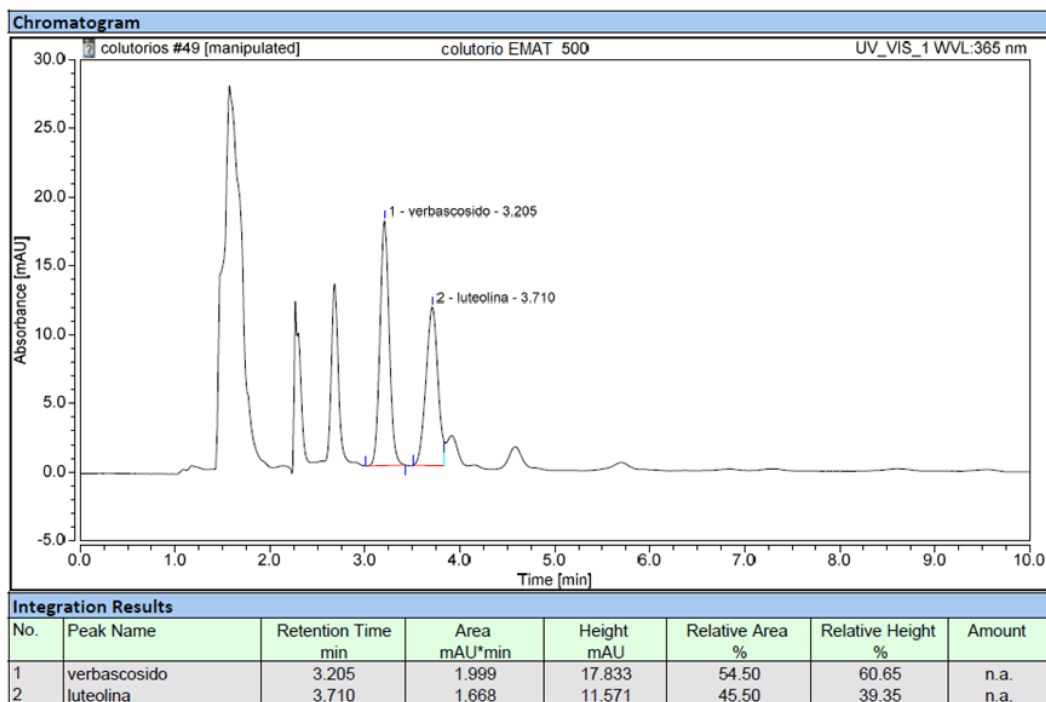


Figura 9. Cromatograma colutorio 1% EMAT.

5. Estudio de estabilidad del EMAT

Se estudió la estabilidad del EMAT seco en estufa a 40°C por 3 meses (estudio de estabilidad acelerada) y a temperatura ambiente protegido de la luz por un año dando los siguientes resultados (tabla 10 y 11)

Tabla 9. Porcentaje de verbascósido y de 7-O-glucósido de luteolina contenidos en el EMAT a tiempo 0 y 3 meses.

	EMAT tiempo 0	EMAT 3°mes estufa a 40°C
	%	%
Verbascósido	100%	77,63%
7-O-gluc-luteolina	100%	82,24%

Tabla 10. Porcentaje de verbascósido y de 7-O-glucósido de luteolina contenidos en el EMAT a tiempo 0 y 1 año.

	EMAT tiempo 0	EMAT al año t° ambiente
	%	%
Verbascósido	100%	81,75
7-O-gluc-luteolina	100%	78,51

Al cabo de 3 meses en estufa a 40°C la concentración de verbascósido disminuyó a un 21,82% y la de 7-O-glucósido de luteolina a un 17,76%, mientras que luego de un año almacenado a temperatura ambiente disminuye a un 18,25% y 21,49% respectivamente.

En un estudio de estabilidad de verbascósido realizado a extractos metanólicos de hojas de *Lippia javanica* se concluye que la mejor forma de almacenamiento es en seco a temperatura ambiente y protegido de la luz, ya que al cabo de 6 meses el extracto presenta un 71,1% de verbascósido²¹. En nuestro caso el verbascósido se mantiene en un 81,75% luego de un año de almacenamiento en seco y protegido de la luz, mostrando una estabilidad mayor, por lo que el almacenamiento en seco y protegido de la luz sería el indicado para la mejor conservación de EMAT.

Es importante tener en cuenta la disminución en la concentración de principios activos a la hora de elaborar nuestro producto en base a EMAT, ya que se debe asegurar que la concentración de estos activos es la adecuada para ejercer efecto farmacológico, podría ser necesario añadir una mayor cantidad de EMAT de acuerdo al tiempo que lleva el EMAT almacenado desde su elaboración. Por esto se debe realizar el análisis CLAE al EMAT antes de utilizarlo en la elaboración del colutorio, para conocer la concentración de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina y realizar los ajustes de concentración correspondientes de ser necesario.

6. Estudio estabilidad producto terminado

Se estudió la estabilidad de ambos colutorios en estufa a 40°C y temperatura ambiente por 3 meses. El colutorio al 1% se midió a tiempo 0, 1 mes, 2 meses y 3 meses y el colutorio al 5% se midió a tiempo 0, 1 mes y 2 meses (tabla 12)

Tabla 11. Porcentaje de verbascósido y de 7-O-glucósido de luteolina en los colutorios al 1% y al 5% a tiempo 0,1, 2 y 3 meses.

		Colutorio 1% estufa	Colutorio 1% ambiente	Colutorio 5% estufa	Colutorio 5% ambiente
Tiempo 0	verbascósido	100%	100%	100%	100%
	7-O-gluc- luteolina	100%	100%	100%	100%
1°mes	verbascósido	41,97%	45,43%	48,32%	66,07%
	7-O-gluc- luteolina	42,12%	45,79%	74,11%	74,13%
2°mes	verbascósido	14,66%	40,78%	31,70%	43,86%
	7-O-gluc- luteolina	26,64%	25,85%	47,87%	50,48%
3°mes	verbascósido	8,090%	38,79%	-	-
	7-O-gluc- luteolina	18,96%	20,29%	-	-

Si bien ambos compuestos verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina muestran una disminución de su concentración a lo largo del tiempo, el verbascósido tiene una baja más importante llegando al 8% al cabo del tercer mes a 40°C en el colutorio al 1%. En la literatura podemos encontrar estudios de estabilidad realizados a verbascósido que avalan estos resultados. En una infusión de cedrón se describe una rápida disminución del verbascósido e isoverbascósido en condiciones de almacenamiento a 70°C, 80°C y 90°C²².

Se describe también que el pH influye en la estabilidad del verbascósido, siendo estable a pH 3 e inestable a pH 7²³.

Soluciones etanólicas de verbascósido fueron evaluadas a distintos pH (5, 6 y 7), al cabo de 60 días la solución a pH 5 muestra el mejor porcentaje de recuperación de verbascósido (73%), mientras a pH 6 y 7 el verbascósido es degradado completamente. En adición a esto se evaluó la estabilidad del verbascósido dentro de una formulación cosmética en dónde al cabo de 150 días en estufa a 40°C se observó una disminución en un 30% del verbascósido²⁴.

Para solucionar el problema de estabilidad de los colutorios, se propone en estudios posteriores, evaluar la adición de un compuesto que actúe como antioxidante. Debido a que esta es una formulación acuosa el antioxidante debe ser soluble en agua. Al realizar una revisión bibliográfica sobre este tema se encontró un único compuesto soluble en agua aprobado en uso farmacéutico que es un derivado de vitamina E, denominado Vitamin E Polyethylene Glycol Succinate (Kolliphor ®TPGS) adecuado para uso oral y tópico, por lo que es un excipiente apropiado para el colutorio desarrollado. Otra alternativa es evaluar variar el pH de la formulación a pH 5, lo cual podría mejorar la estabilidad del verbascósido. Por último, si ninguna alternativa fuera viable, se puede realizar una preparación extemporánea del colutorio, es decir, realizar la preparación al momento de usarla, para esto se puede disponer de la base del colutorio por una parte y el extracto en polvo por otro, el polvo debe disolverse en la cantidad de agua necesaria y luego adicionarse a la base del colutorio, de esta forma se conservaría la concentración de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina necesaria para el efecto farmacológico al almacenarse en seco y protegido de la luz.

7. Estudio in vivo

a. Peso corporal

Todos los grupos estudiados mostraron un aumento de peso al cabo de los 15 días de tratamiento, los pesos iniciales fueron de 183-293 g y los finales de 218-316 g, se debe considerar que las ratas se encontraban en etapa de crecimiento por lo que el aumento de peso es normal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo, los grupos de control de mucositis, tratamiento de referencia, colutorio 1% EMAT vía oral y colutorio 5% EMAT vía oral muestran una menor tendencia al aumento que los grupos control, colutorio 1% EMAT vía tópica y colutorio 5% EMAT vía tópica, siendo el caso del tratamiento de referencia (10,2 g) el menor, seguido por los grupos mucositis (14,2 g), colutorio 1% vía oral (14,2g) y colutorio 5% vía oral (13,8 g). El uso de la sonda en los grupo de mucositis, tratamiento de referencia y de ambos colutorios por vía oral podría tener relación con el menor aumento de peso, ya que los grupos en los que hubo sólo aplicación tópica tienen una mayor tendencia al aumento de peso, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 6)

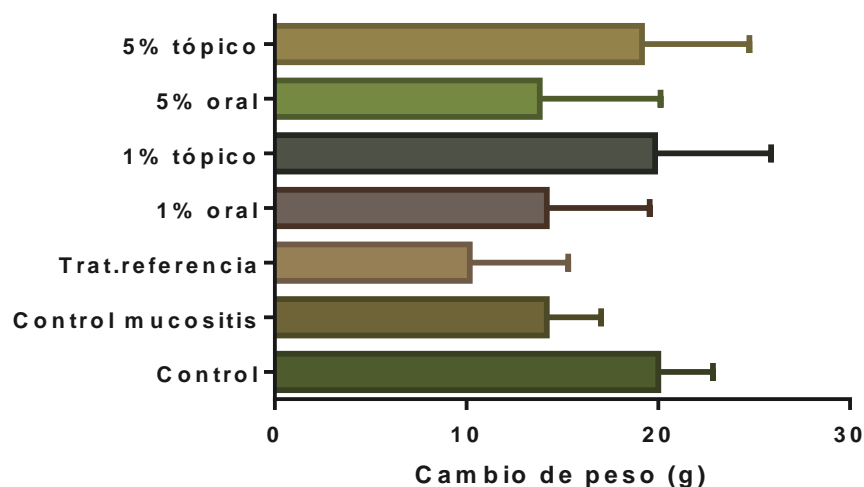


Figura 10. Cambio de peso ratas al cabo de 15 días de tratamiento. En la figura se muestran los cambios de peso de los 7 grupos estudiados (de abajo para arriba): control (sano), control mucositis, tratamiento de referencia, colutorio al 1% en EMAT por vía oral, colutorio al 1% en EMAT vía tópica, colutorio al 5% en EMAT vía oral y colutorio al 5% en EMAT vía tópica. Todos los grupos tienen n=6. Los valores se expresan como promedio \pm ESM utilizando ANOVA seguido de Tukey's

b. Consumo de alimento

El consumo de alimento promedio por día de los 7 grupos varía entre 15 a 20 g diarios, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Al no haber diferencias en el consumo de alimento, la diferencia en el aumento de peso observada anteriormente no se relaciona con la ingesta de alimento (figura 7)

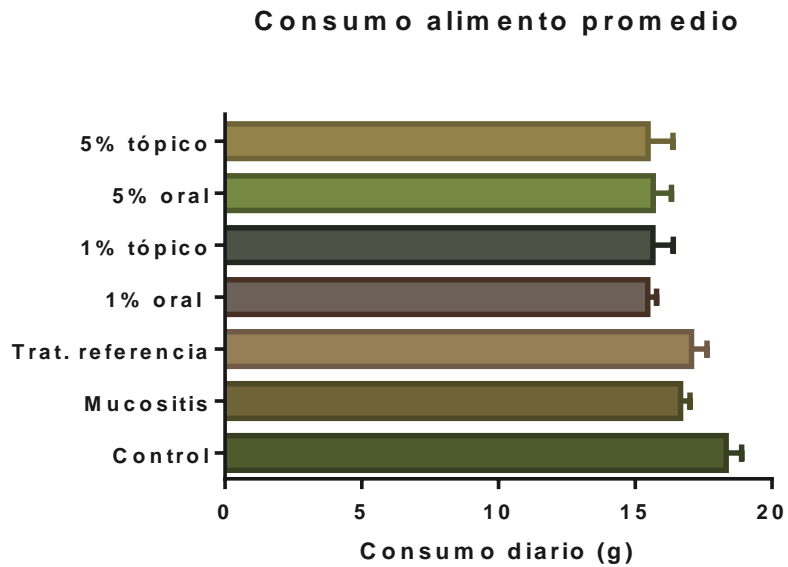


Figura 11. Consumo alimento promedio por día. Se muestran los cambios de peso de los 7 grupos estudiados (de abajo hacia arriba): control (sano), control mucositis, tratamiento de referencia, colutorio al 1% en EMAT por vía oral, colutorio al 1% en EMAT vía tópica, colutorio al 5% en EMAT vía oral y colutorio al 5% en EMAT vía tópica. Todos los grupos tienen $n=6$. Los valores se expresan como promedio \pm ESM utilizando ANOVA seguido de Tukey's.

c. Grado de mucositis

A la observación directa ninguna rata mostró signos físicos de desarrollo de mucositis. De los 6 grupos con inducción de mucositis (control mucositis, tratamiento de referencia, colutorio a base de 1% de EMAT vía oral, colutorio a base de 5% de EMAT vía oral, colutorio 1% vía tópica y colutorio 5% vía tópica) todos presentaron color y forma similar al control, se consideraron todos con puntuación 0. Sin embargo, esto no es evidencia suficiente para afirmar que las ratas no sufrieron los efectos de la mucositis oral, ya que podría haber cambios a nivel celular. Es por esto, que se realizó un estudio histológico.

8. Análisis Histológico

Descripción cualitativa de mucosa lingual

Se observaron cortes de mucosa lingual teñidos con Hematoxilina/Eosina y Giemsa, a continuación se describen las características generales para cada grupo, se hace la diferencia entre mucosa especializada (dorso lingual) y mucosa de revestimiento (parte inferior)

Control

Se observó una mucosa de revestimiento con un epitelio estratificado ortoqueratinizado, con 5 a 6 capas ordenadas conformando las papilas principalmente de tipo filiforme, el espesor de la capa córnea aparece normal y descamando. Se observó una lámina propia con papilas del corion de conectivo laxo y una zona más reticular directamente en relación con fibras musculares esqueléticas organizadas en fascículos. Abundantes vasos sanguíneos de diámetro regular, no todos dilatados. Con la tinción Giemsa se detectaron algunos mastocitos en la parte profunda de la lámina propia y entre las fibras musculares. Las observaciones indican un estado normal de la mucosa lingual. En la figura 8 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

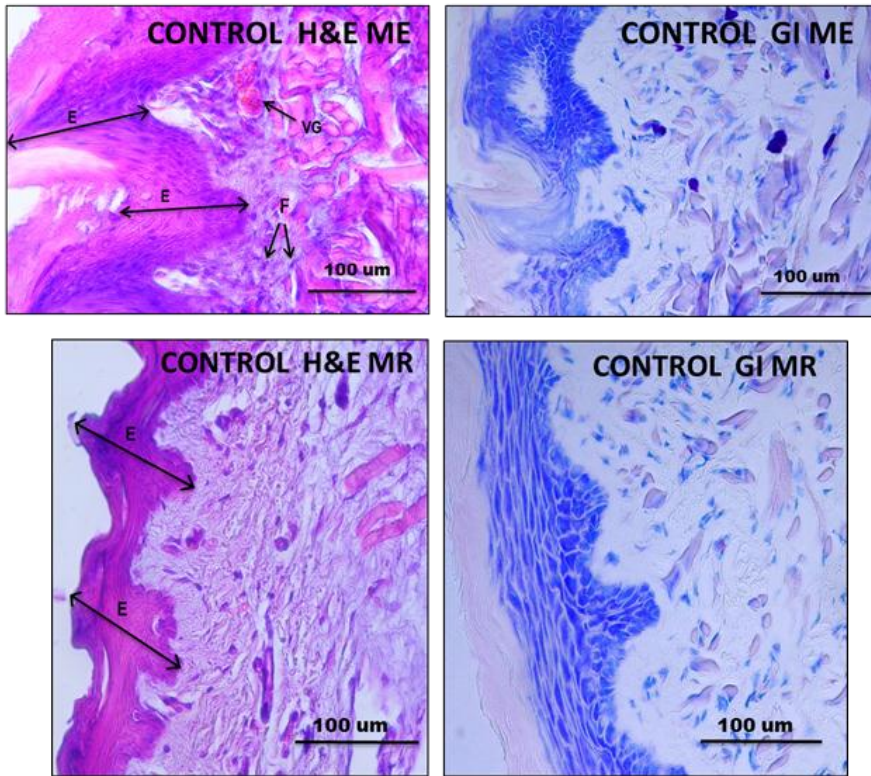


Figura 12. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo control sano. Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; VG: vasos grandes; F; células tipo fibroblastos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

Control mucositis

En general se observó tanto en mucosa de revestimiento como en mucosa especializada un epitelio con gran desorganización de sus capas, más delgado y muy poco queratinizado respecto a lo observado en el control.

El epitelio de mucosa especializada presentó con más frecuencia a nivel de la capa granulosa grandes células globosas de citoplasma claro y células con núcleos picnóticos. Estas células claras se observaron en algunos cortes de mucosa especializada control pero ninguno muestra núcleos picnóticos en la zona.

En la lámina propia se observó abundante contenido celular pero sobretodo una gran cantidad de vasos sanguíneos de grandes calibres muy dilatados, llenos de sangre, es decir, una hiperemia en la región. Pero también presentó una gran cantidad de vasos sanguíneos de pequeño calibre, también dilatados y pletóricos de sangre. Además en la

lámina propia se presentó abundante cantidad de mastocitos. Los resultados indicaron que se produjo un daño en la mucosa lingual, lo que estaría acorde con una mucositis oral inducida por quimioterápico (busulfán). En la figura 9 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

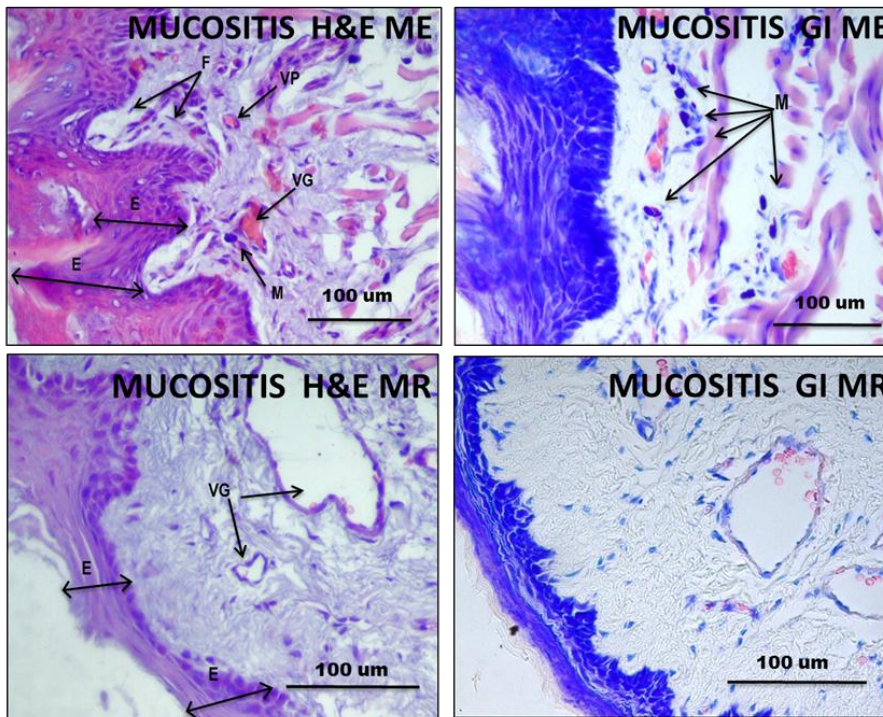


Figura 13. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo control mucositis. Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; VG: vasos grandes; VP: vasos pequeños; F: células tipo fibroblastos; M: mastocitos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

Tratamiento con la sustancia de referencia glutamina

El epitelio de la mucosa de revestimiento se presentó muy delgado casi sin queratinización.

El epitelio de la mucosa especializada presentó queratinización normal pero se observó acantosis en capas granulosa con extrema alta cantidad de núcleos picnóticos.

A nivel de lámina propia se observó tanto en mucosa de revestimiento como en mucosa especializada gran cantidad de vasos sanguíneos dilatados y muchísimos mastocitos. Los

resultados indican que la mucosa se encuentra dañada, por lo que el tratamiento no fue efectivo para prevenir la mucositis oral. En la figura 10 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

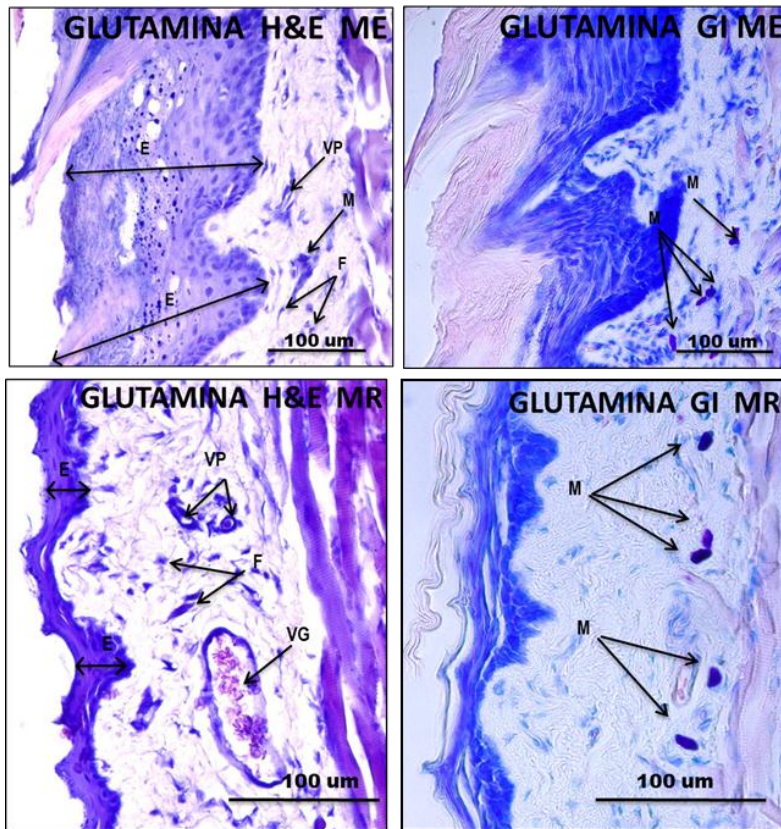


Figura 14. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo con tratamiento de referencia (glutamina). Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; VG: vasos grandes; F; células tipo fibroblastos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

Colutorio al 1% vía oral

El epitelio de la mucosa de revestimiento mostró en este grupo acantosis con células claras y células con núcleos picnóticos, al igual que la mucosa especializada lo que no se observó en los otros grupos anteriores.

El epitelio de la mucosa especializada se observó con queratinización similar al control pero aumento en el número de capas del estrato granuloso con abundantes células de

citoplasma claro y múltiples células con núcleos picnóticos, aparentemente más que lo observado en el control y tal vez respecto a tratamiento con glutamina.

La lámina propia tanto de mucosa especializada como de mucosa de revestimiento se observó más fibrosa respecto a los controles, con aumento de la cantidad de vasos y de mastocitos. En la figura 11 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

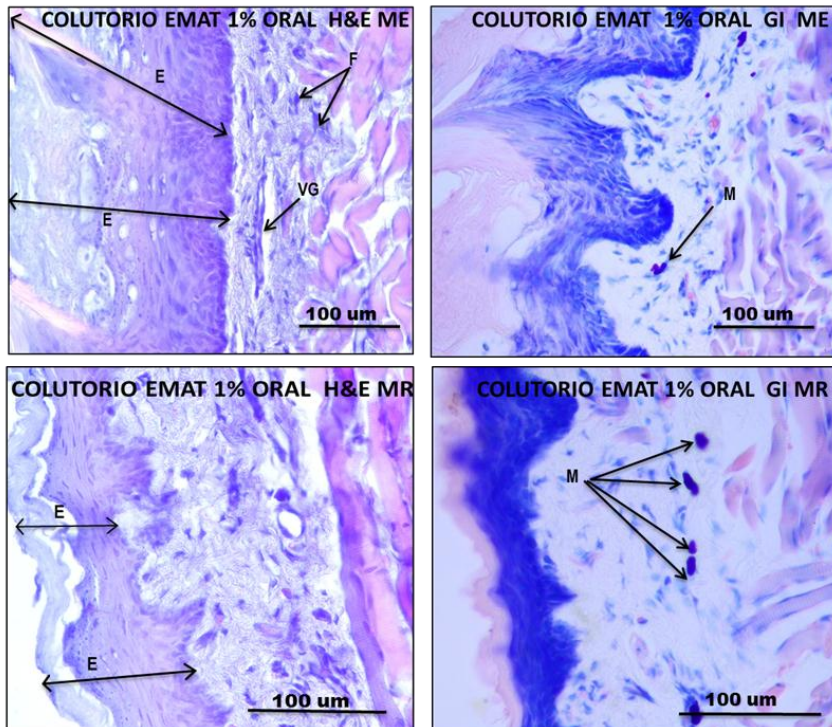


Figura 15. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo colutorio 1% en EMAT vía oral. Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; VG: vasos grandes; F: células tipo fibroblastos; M: mastocitos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

Colutorio al 5% vía oral

El epitelio de la mucosa de revestimiento se observó aparentemente más grueso que en los controles con aumento en la capa granulosa y aparición franca de una capa córnea. Se observaron células de citoplasma claro y algunas células con núcleos picnóticos aunque muy pocas.

En la mucosa de especializada se observaron las mismas características descritas en las anteriores.

Tanto la mucosa de revestimiento como la mucosa especializada en lámina propia presentan muchos vasos y abundantes mastocitos. En la figura 12 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

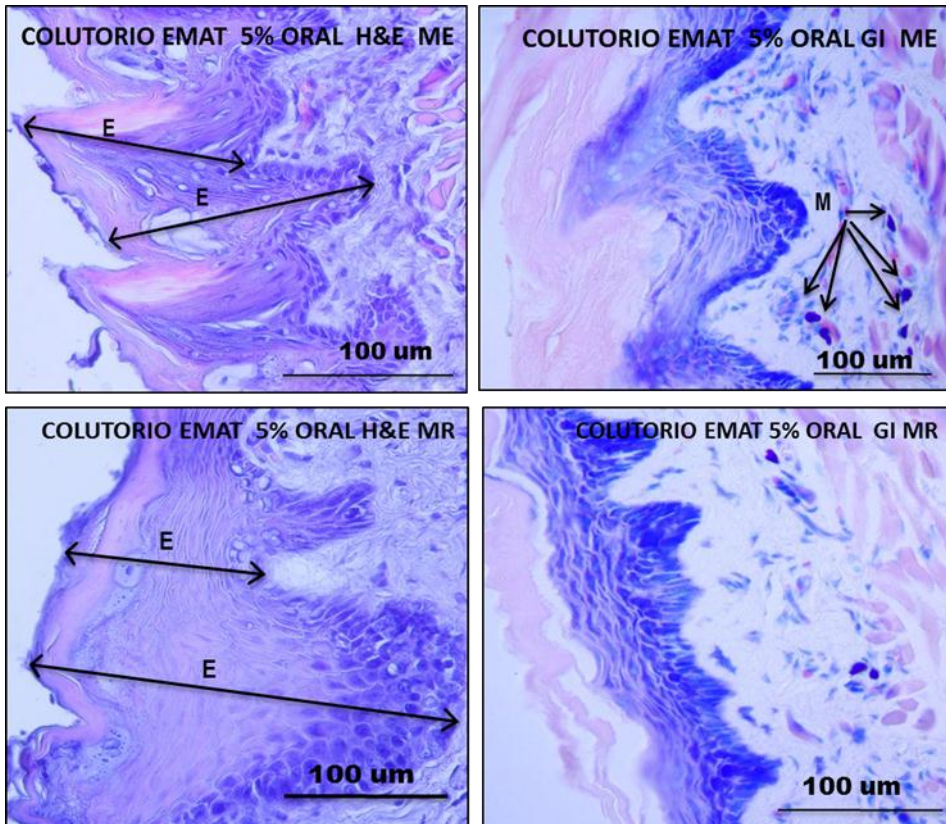


Figura 16. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo colutorio 5% en EMAT vía oral. Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; M: mastocitos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

Colutorio al 1% vía tópica

Tanto la mucosa de revestimiento como la mucosa especializada presentaron una capa córnea gruesa. La mucosa de revestimiento, a diferencia del control, también presentó células de citoplasma claro a nivel de la capa granulosa y presentó capa córnea, lo cual es diferente de lo visto anteriormente.

En la lámina propia tanto la mucosa de revestimiento como en la especializada presentaron abundante cantidad de células tipo fibroblastos. La concentración celular es mayor a lo observado en los otros tratamientos y presenta gran cantidad de vasos sanguíneos dilatados principalmente de gran calibre. En la figura 13 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

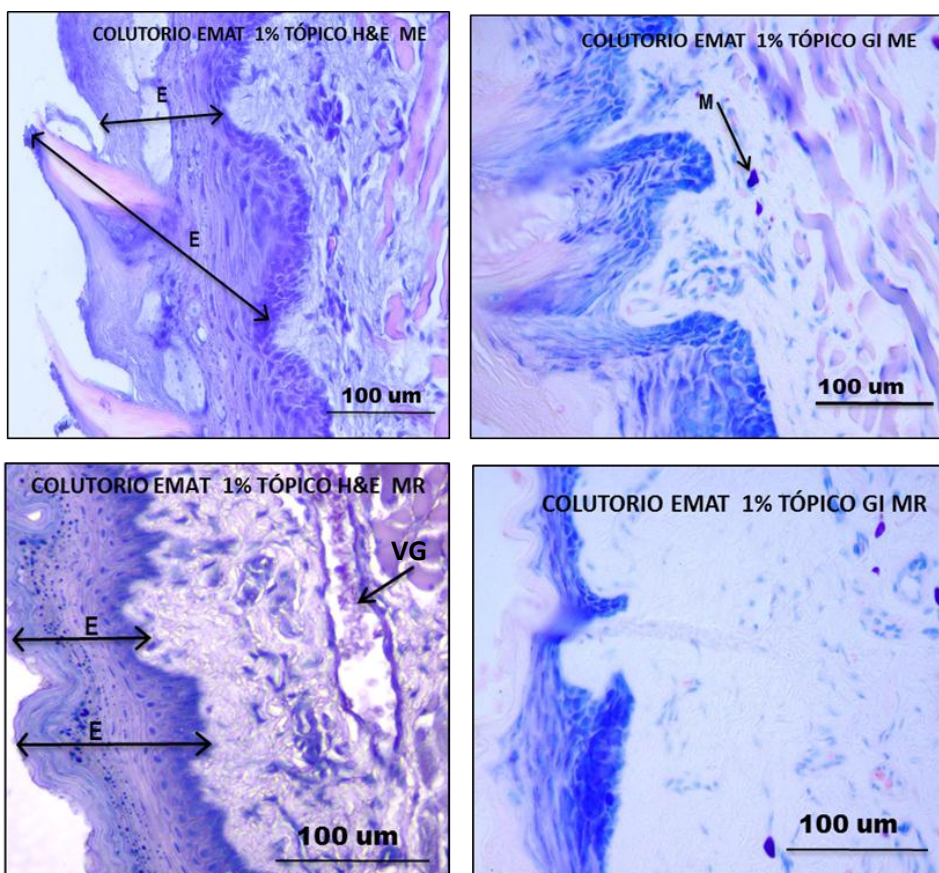


Figura 17. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo colutorio 1% en EMAT vía tópica. Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; VG: vasos grandes; M: mastocitos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

Colutorio al 5% vía tópica

No se observan diferencias morfológicas evidentes respecto a lo observado en tratamiento tópico con colutorio al 1%. En la figura 14 se muestran fotografías de la mucosa especializada y de revestimiento de este grupo, ambas en tinción Hematoxilina/Eosina y Giemsa. Se indican las estructuras de interés.

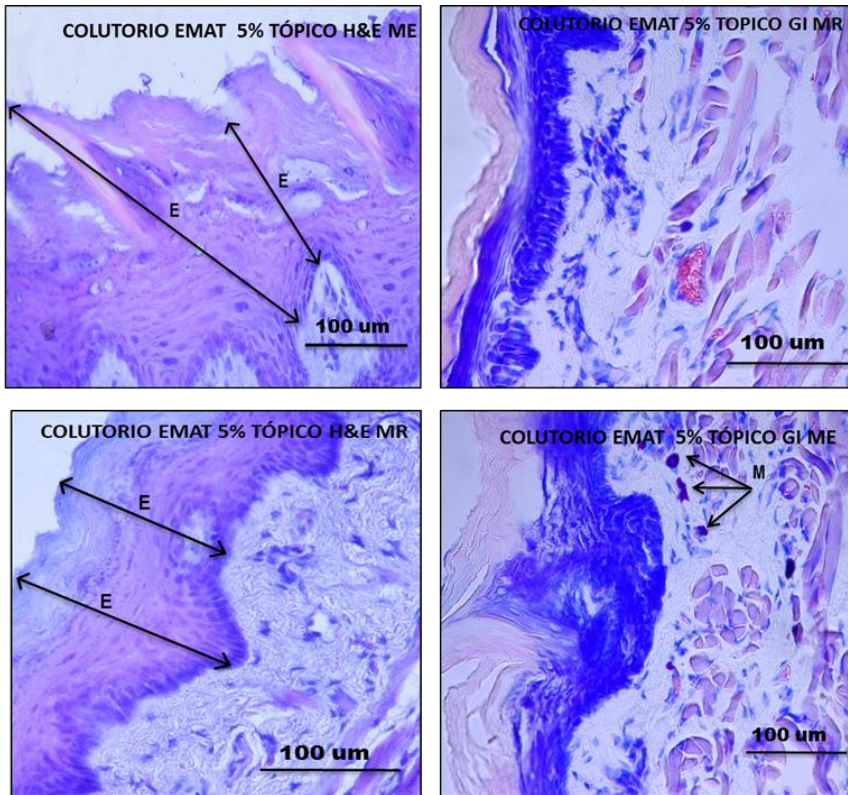


Figura 18. Mucosa especializada (ME) y mucosa de revestimiento (MR) de la lengua en grupo colutorio 5% en EMAT vía tónica. Se muestra tinción Hematoxilina/Eosina (H&E) y Giemsa (GI). E: epitelio; M: mastocitos. (n= 3 ratas, se muestran fotografías representativas)

La descripción cualitativa nos ayuda a evaluar en forma general el estado de la mucosa lingual en cada grupo. Una característica relevante es el estado del epitelio en cada grupo, en el grupo control de mucositis, se observa una desorganización en las capas de epitelio y disminución del grosor y queratinización epitelial, si bien no se observan infiltrados ni edema (característico de la mucositis oral) la presencia de vasos dilatados hiperémicos junto a los cambios epiteliales, evidencia un daño en el tejido; esto puede indicar que la mucositis no se logró desarrollar por completo pero que las ratas se encontraban en una etapa inicial de mucositis oral caracterizada por el daño en el conectivo, lamina propia y submucosa, junto con cambios epiteliales. El tratamiento de referencia con glutamina muestra un epitelio delgado y poco queratinizado en la mucosa de revestimiento, en la mucosa especializada hay signos de acantosis lo que concuerda con un daño en el tejido. En el tratamiento con colutorio al 1% vía oral se observa una

queratinización similar al control sano en la mucosa especializada. El tratamiento con colutorio al 5% vía oral muestra un grosor mayor del epitelio respecto al grupo de mucositis, lo que se acerca más al control sano, además es importante destacar la aparición de una capa córnea en la mucosa de revestimiento, lo que puede ser indicativo de un proceso reparativo. En los tratamientos por vía tópica, no se observan mayores diferencias entre las concentraciones de 1% y 5%, en ambos se observa nuevamente una capa córnea y un grosor epitelial que se asemeja más al control sano. Considerando sólo el grosor epitelial pareciera ser que el tratamiento con el colutorio en todas sus formas mantiene un grosor adecuado o estimula la proliferación y maduración completa de los queratinocitos.

Otra característica que indica un daño celular es la presencia de núcleos picnóticos los cuales aparecen en el grupo control de mucositis, con tratamiento de referencia de glutamina, tratamiento con colutorio vía oral al 1% y vía oral al 5%, aunque en este último habría una aparente disminución.

En el tratamiento con colutorio al 1% vía tópica se identifica la presencia de fibroblastos. Estos últimos están implicados en el proceso de reparación tisular, por lo tanto un aumento de ellos favorecería la reparación del tejido.

En un estudio de modelo animal para mucositis oral²⁰ el grupo control mostró un epitelio intacto y el grupo al que se le indujo la mucositis presentó una alteración en el grosor epitelial, sin embargo en este estudio el grupo tratado con glutamina (tratamiento de referencia) presentó un epitelio normal, no así en nuestro caso donde hay una disminución del grosor.

En este análisis no se evidencia una diferencia entre el tratamiento tópico con los colutorios al 1% y al 5% de EMAT, esto se puede deber a que la aplicación en forma tópica del colutorio es errática, si bien se le aplica una misma cantidad de colutorio no se puede asegurar la cantidad y tiempo de contacto del colutorio con la mucosa oral de la rata, puesto que estas no pueden mantener el colutorio en la cavidad oral. Además el colutorio al 5% de EMAT posee un sabor amargo y no fue bien tolerado por los animales, la tendencia fue que las ratas eliminaron rápidamente el contenido.

En resumen, en base a los resultados obtenidos en el estudio histológico se encuentran evidencias que los colutorios al 1% y 5% producen una mejoría de la mucosa lingual, esto debido a las propiedades farmacológicas del EMAT y sus componentes principales.

Se debe destacar que el modelo de inducción de mucositis oral en que se basó este estudio contemplaba una dosis de busulfán de 6mg/kg, sin embargo se decidió disminuir la dosis a 4mg/kg, por sugerencia del Comité de ética para aumentar la sobrevivencia de las ratas, ya que en dicho modelo había una tasa de mortalidad del 100% en el grupo control de mucositis, asociada a la toxicidad del busulfán. En nuestro estudio ninguna rata murió a causa de la administración del quimioterapéutico debido a su baja dosis, esto probablemente sea la causa de que la mucositis no se manifestara clínicamente. Sin embargo, el estudio histológico demostró que el tratamiento fue efectivo. Para complementar estos promisorios resultados se propone hacer un nuevo estudio *in vivo*, con una dosis mayor de busulfán para lograr la evidencia clínica tanto de mucositis como de mejoría. También, será necesario realizar un estudio histológico más completo con un análisis cuantitativo de los cambios en la mucosa lingual.

Otra consideración es que en el modelo en que se basó este estudio se utilizaron ratas Wistar, nosotros en cambio utilizamos la cepa Sprague Dawley, la cual según bibliografía es más sensible a mucositis, esta es otra razón para la disminución de dosis de busulfán, sin embargo es difícil predecir el comportamiento de las ratas al quimioterapéutico, debemos tener en consideración que las ratas tienen un epitelio más queratinizado lo que dificulta inducir una mucositis oral visible²⁶, por lo tanto se debe encontrar una dosis adecuada de busulfán que sea suficiente para inducir la mucositis pero que cause el menor daño sistémico posible para evitar la muerte prematura de las ratas en estudio.

Por otra parte, desde el punto de vista fisiopatológico la mucositis oral se puede dividir en 5 etapas: iniciación, respuesta primaria al daño, amplificación de señal, ulceración y sanación. En la etapa de iniciación se produce un daño celular en el epitelio basal y submucosa, además se generan especies reactivas de oxígeno (ERO), en esta etapa la mucosa no presenta daños aparentes, luego en la respuesta primaria al daño se activan diversas vías de transducción que activan factores transcripcionales como p53 y el factor nuclear B (FN-kB), este último siendo activado por las ERO y uno de los que produce mayor toxicidad en la mucosa. Por otro lado, se producen citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IL-1 e IL-6, su presencia estimularía el daño temprano en el tejido conectivo y endotelio, resultando en daño y muerte celular del epitelio²⁵. Los fibroblastos de la

submucosa son otro blanco del daño generado por radiación y quimioterapia, podría ocurrir un daño directo pero es más probable que sea mediado por la activación de la proteína activadora 1 (AP1) que estimula la secreción de las metaloproteinasas (MMPs)²⁵ La MMP1 causa destrucción de la matriz de colágeno subepitelial, mientras que MMP3 rompe la membrana basal del epitelio y promueve la diseminación de otras señales destructivas. Durante la etapa de amplificación de la señal, se acumulan diversas proteínas activas cuyo blanco son los tejidos de la submucosa, además se produce un *feedback* positivo que amplifica la respuesta primaria al daño, en esta etapa puede haber presencia de eritema, sin embargo, la mayoría de los pacientes tienen pocos síntomas, al contrario de lo que ocurre en la etapa de ulceración, en donde se pierde la integridad de la mucosa resultando en lesiones extremadamente dolorosas y propensas a colonización bacteriana, además las células inflamatorias migran a la base de la lesión. A pesar de que la mucositis se resuelve sola en la mayoría de los casos al terminar la terapia de cáncer, la agresividad y tiempo pueden variar dependiendo del tipo de tratamiento, la dosis y duración de la terapia, además, muchas veces se debe interrumpir la terapia para dar tiempo a la sanación de las heridas, lo cual dificulta el éxito de ésta²⁵.

En cada una de estas etapas existen diversos factores responsables del desarrollo de mucositis, el colutorio a base de EMAT posee la ventaja de intervenir en distintas vías debido a las propiedades farmacológicas de EMAT, como antioxidante puede reducir la formación de ERO, como antiinflamatorio disminuyendo el daño producido por las citoquinas pro-inflamatorias en la etapa de respuesta primaria al daño y en la etapa de ulceración, disminuyendo la inflamación producida, como analgésico en el manejo del dolor causado por la ulceración, además, la capacidad cicatrizante de EMAT ayuda al proceso reparativo al incrementar el número de fibroblastos que se ven disminuidos, a esto sumamos las propiedades de sus compuestos principales verbascósido y 7-o-glucósido de luteolina, el primero cuya actividad bactericida ayudaría a evitar o controlar la posible colonización bacteriana en la etapa ulcerativa¹⁸ y el 7-O-glucósido de luteolina con efecto inhibitorio de metaloproteinasas contribuiría a la modulación de la degradación y remodelación de la matriz extracelular¹⁹.

En el mercado no existe ningún producto aprobado para el tratamiento de la mucositis oral, diversas alternativas se están estudiando en donde los mecanismos de acción incluyen la reducción de citoquina pro-inflamatorias, efectos antioxidantes para combatir la generación de ERO y la supresión de la activación del FN-kB²⁵, sin embargo, es difícil

encontrar un sólo fármaco que actúe en estos diversos blancos farmacológicos. Una de las ventajas de los extractos provenientes de especies vegetales es que contienen diversos compuestos activos que pueden actuar en distintos niveles presentando un espectro más amplio de acción cómo lo es en el caso del EMAT.

En Chile se comercializa un colutorio para mucositis oral llamado Dentoxol de la empresa INGALFARMA LTDA, sin embargo se encuentra en proceso de patentamiento ya que carece de estudios clínicos, los cuales se encuentran en proceso. Al revisar antecedentes de los propietarios de Dentoxol se encontraron dos patentes internacionales asociadas a uno de los creadores del colutorio "Composición farmacéutica antiséptica útil para la higiene bucal y el tratamiento de las enfermedades orales de origen microbiano" WO 2011020206 A1y "Oral antiseptic composition for treating oral mucositis" WO 2014121411 A1 ^{30,31} esos colutorios tienen una composición muy distinta al colutorio en base a EMAT y su objetivo es curar más que prevenir la mucositis oral.

IX. Conclusiones

1.
 - 1.1. La metodología de extracción desarrollada y estandarizada en cuanto al número y volumen de solvente permitió mejorar el rendimiento del EMAT respecto de estudios anteriores.
 - 1.2. La metodología CLAE permite cuantificar los componentes principales (verbascósido y 7-o-glucósido de luteolina) en EMAT y en los colutorios de forma confiable asegurando que se cuente con las concentraciones de activos necesarias para la acción farmacológica.
 - 1.3. El colutorio a base de EMAT al ser un producto estandarizado en sus compuestos activos asegura la reproducibilidad lote a lote y trazabilidad de la composición química del colutorio.
 - 1.4. La estabilidad del colutorio se ve afectada por el contenido de agua de la formulación y condiciones de almacenamiento.
2. El estudio preclínico y el análisis histológico sugieren que los colutorios al 1% y 5% en EMAT tanto por vía oral como tópica podrían ser efectivos en el tratamiento de la mucositis oral inducida por busulfán.

Proyecciones

Como tareas pendientes se propone realizar un nuevo estudio preclínico aumentando la dosis del quimioterapéutico buscando evidencia clínica de mucositis en las ratas y realizar un estudio histológico más acabado (cuantitativo). Asimismo se plantea desarrollar un estudio clínico en pacientes oncológicos para corroborar los resultados obtenidos en nuestro estudio.

X. Bibliografía

1. Medicamentos Herbarios Tradicionales, Matico [en línea] <<http://web.minsal.cl/portal/url/item/7d98ad06d34483d5e04001011f016dbb.pdf>> [consulta: 20 enero 2015]
2. Backhouse N., Rosales L., Apablaza C., Erazo S., Negrete R., Theodoluz C., Rodríguez J., Delporte C. (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae*. *J Ethnopharmacology* 116 (2): 263-269
3. Goity L. (2007) "Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, *Buddlejaceae*, matico y diseño de la metodología analítica". Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas 84p.
4. 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.
5. OMS 2015 Cáncer [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>> [consulta: 14 enero 2015]
6. Corporación nacional del cáncer CONAC, Cáncer en el mundo [en línea] <<http://www.conac.cl/c%C3%A1ncer-en-el-mundo.html>> [consulta: 14 enero 2015]
7. Itriago, L., Silva, N., Cortes, G. (2013). Cáncer en Chile y el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24(4): 531–552.
8. Peterson, D. E., Bensadoun, R.J., Roila, F. (2011). Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 22 (6):78–84.
9. Castaño, F. L., Sánchez, R. E. O., Chicano, R. R., Carmen, M., Merino, C. (2005). Valoración de la mucositis secundaria a tratamiento oncohematológico mediante distintas escalas. *Revisión, Med Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 2005; (10):412–421.

10. P. Alonso Castell, P., Basté dencàs, M.A., Creus Viles, M., Del pino Gaya, B., Gómez Blasco, C., Gómez Gener, A., Gorgas Torner, M., Muro Perea, N., Pellicer Jacomet, M.A., Sotoca Momblona, J.M., Trullàs Altisen, M., Vallés Fernández, R., (2001). Prevención y tratamiento de la mucositis en el paciente onco-hematológico, *Farmacia hospitalaria* 25 (3)139-149.
11. Tejada Domínguez, F.J., Ruiz Domínguez, MR. (2010) Mucositis Oral: Decisiones sobre el cuidado bucal en pacientes sometidos a radioterapia y quimioterapia conforme a la evidencia. *Enfermería Global*; 9 (1): 1–22.
12. Muñoz O., Montes M. y Wilkomirisky T. (1999). Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología .2º edición. Santiago de Chile. Editorial universitaria S.A. 333 p.
13. APABLAZA C. (2006) 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. 77p.
14. 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.
15. MENSAH A., Houghthon P., Hughes M., Cherry G (1998) In vitro investigation of the wound healing properties of *Buddleja globosa*. *J. Pharm. Pharmacol*, 50-83.
16. Miranda D. (2004). Evaluación de las propiedades cicatrizantes de *Buddleja globosa* Hope (Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
17. Alipieva, K., Korkina, L., Erdogan, I., & Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside — A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065–1076.
18. Avila, J., de Liverant, J., Martínez, A., Martínez, G., Muñoz, J., Arciniegas, A., Romo de Vivar, A. (1999) Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 75–78.
19. Ende, C., Gerbhardt, R., (2004). Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Medica* 70, 1006–1008.

20. Alkesh Patel; S Rajesh; Shivprakash Rathnam; Karishma Shah; V M Chandrashekhar; C Mallikarjuna Rao; K Nandakumar. (2013) A rat model against chemotherapy plus radiation-induced oral mucositis. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 399–403
21. Oyourou, J., Combrinck, S., Regnier, T., & Marston, A. (2013). Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. *Industrial Crops & Products*, 43, 820–826.
22. Abderrahim F., Estrella S., Susin C., Arribas S., González M. and Condezo-Hoyos L., (2011). The Antioxidant Activity and Thermal Stability of Lemon Verbena (*Aloysia triphylla*) Infusion. *Journal of medicinal food* 14 (5), 517–527.
23. Imperio, M. D., Cardinali, A., Antuono, I. D., Linsalata, V., Minervini, F., Redan, B. W., & Ferruzzi, M. G. (2014). Stability – activity of verbascoside, a known antioxidant compound, at different pH conditions. *FRIN*, 66, 373–378.
24. Vertuani, S., Beghelli, E., Scalambra, E., Malisardi, G., Copetti, S., Toso, R. D., Manfredini, S. (2011). Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations, 7068
25. Sonis, Stephen T. (2004). The pathobiology of mucositis, *Nature Reviews*, (4) 277-284.
26. Patel, P., Panchal, I., Shah, S., Jyoti, D. (2013), Preclinical and clinical aspects of oral mucositis: a systemic review, *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, (3), 2548-2563.
27. MENSAH A. Y., Sampson P. J., Houghton P., Hylands P.J., Westbrook J., Dunn M., Hughes M.A., Cherry G.W. (2001) Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 77: 219-226.
28. Houghton, P. J., Hylands, P. J., Mensah, a. Y., Hensel, a., & Deters, a. M. (2005). In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 100–107.
29. Ficha producto registro sanitario, [en línea] <<http://registrosanitario.ispch.gob.cl/Ficha.aspx?RegistroISP=861C-2/12>> [consulta: 1 junio 2016]
30. Composición antiséptica oral para tratamiento de mucositis oral, [en línea] <<https://www.google.com/patents/WO2014121411A1?cl=en17>> [consulta: 2 junio 2016]

31. Composición farmacéutica antiséptica útil para la higiene bucal y el tratamiento de las enfermedades orales de origen microbiano, [en línea] <<https://www.google.com/patents/WO2011020206A1?cl=es>> [consulta: 2 junio 2016]