



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

**“Estudio preclínico para evaluar la efectividad de una emulsión
crema gel elaborada con extractos de *Buddleja globosa* y de *Ugni
molinae*, para el tratamiento de dermatitis atópica inducida con
oxazolona en ratones cf-1”**

PROFESOR PATROCINANTE
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA¹

DIRECTORES DE TESIS

PROF. OLOSMIRA CORREA BRIONES²

DRA. PAULA AEDO CASARINO³

DRA. PATRICIA GONZALEZ TOLEDO³

(1) Depto. Química Farmacológica y Toxicológica

(2) Depto. Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

(3) Unidad de pruebas biológicas Instituto de Salud Pública

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACEÚTICA

CAMILA ANDREA AGUIRRE FUENTES

Santiago, Chile

2019

Dedicada a mis padres y hermano, que siempre me dieron la fuerza para seguir adelante.

Dedicada a todas las mujeres que nunca llegaron a cumplir sus sueños porque alguien calló su voz demasiado pronto. Por ustedes, para ustedes.

“Seas quien seas, hagas lo que hagas, cuando desees con firmeza alguna cosa, es porque este deseo nació en el alma del universo. Es tu misión en la tierra”

AGRADECIMIENTOS

Ser una alumna de región es difícil cuando vivimos en un país en que Santiago es Chile, fue un viaje largo, lleno de altos y bajos, de tristezas y alegrías, de estrés y paz, de estudiar y estudiar, pero no todo fue tan malo, conocí gente maravillosa y encontré en mí misma una garra que ni siquiera sabía que podía llegar a tener. Fue un gran camino que no recorrí sola, tuve mucha ayuda, en los siguientes párrafos expreso mi entera gratitud a todas las personas que me ayudaron a hacer esto posible.

Primero que todo agradezco a mi familia por darme la oportunidad de cumplir mis sueños, especialmente a mi padre Manuel Aguirre, gracias por tu esfuerzo, por tu preocupación, por tu gran ayuda y por ser el hombre con más aguante que conozco. A mi madre Rosa Fuentes, mi gran confidente, mi gran amiga, gracias por tu garra, por tus intervenciones, por tu esfuerzo e infinito amor. A mi hermano Bryan Aguirre, gracias por tus mensajes, por tus palabras de apoyo, y por ser el mejor hermano menor. Fue duro, pero todo mi esfuerzo no habría servido de nada sin complementarse con el suyo, les agradezco infinitamente por su inmensa fuerza y dedicación.

Le agradezco enormemente a mi pololo, mi Esteban, por siempre estar a mi lado, por nunca dejarme bajar los brazos, por siempre entregarme su amor incondicionalmente y por tener esas palabras de aliento que muchas veces fueron mi gran contención. Gracias por levantarme cuando ya no podía más.

A mi equipo de Balonmano tanto femenino como masculino, fueron una parte muy importante en mi paso por la universidad, gracias por todos los momentos vividos, y por la garra que le pusieron siempre, de igual manera agradezco a mi entrenador Matías Salinas, por formarme en este deporte tan bonito y demostrarme que el estrés se puede sacar fuera haciendo lo que uno disfruta.

A mis amigas, gracias por escucharme, por apoyarme, por entenderme, por ayudarme, por calmar mis colapsos prepruebas, por retarme cuando correspondía, y, sobre todo, gracias por sacarme una sonrisa cuando todo se venía abajo.

No puedo dejar de agradecer a una persona que es como mi segunda mamá, mi tía Jacqueline, gracias por todo el apoyo que me entregó, por los consejos, por su preocupación, por tratarme

como una hija más. De igual modo agradezco a mis primas Barbara, Karina y Vanessa por siempre apoyarme, especialmente en mis partidos, y a mi tío David por hacerme parte de su familia.

Agradezco también a las Doctoras Paula Aedo y Patricia González, a María José y Tomás de la unidad de pruebas biológicas del instituto de salud pública, muchas gracias por el apoyo, por las gestiones, por toda la ayuda que me brindaron durante la realización de mi memoria, sin su ayuda, no habría sido posible realizar mi estudio. Infinitas gracias.

Finalmente, debo expresar mi gran gratitud y respeto a las profesoras Carla Delporte y Olosmira Correa, gracias por el interés prestado en la realización de esta memoria, por las gestiones realizadas y por el tiempo dedicado a esto, muchas gracias.

INDICE GENERAL

Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Tratamientos No Farmacológicos	2
Tratamientos Farmacológicos	2
Corticoides Tópicos	2
Inhibidores de Calcineurina.....	3
Productos Cosméticos	3
Antecedentes	4
Etiopatogenia de la Dermatitis Atópica	4
Mecanismos Inmunológicos	4
Clínica	5
Descripción Botánica de las Plantas	6
Matico	6
Murtilla	8
Metabolitos secundarios presentes en los extractos.....	9
Extracto etanólico de Matico.....	9
Verbascósido.....	9
7-O-glucósido de Luteolina.....	9
Extracto acetato de etilo de Murtilla.....	10
Ácido Ursólico y Oleanólico.....	10
Ácido Asiático.....	10
Hipótesis	11
Objetivos	11
General	11
Específicos	11
Materiales y Métodos	12

Material Vegetal y Obtención de Extractos	12
Desarrollo del Preparado Dermatológico	12
Elaboración de la Formulación.....	12
Desarrollo de la Emulsión Base	13
Desarrollo de la Emulsión con Extractos.....	13
Controles de Producto Terminado	13
Oxazolona.....	14
Triamcinolona	14
Animales	14
Aspectos Éticos a Considerar para el Trabajo Con Animales	14
Estudio in-vivo	15
Pre-Ensayo	15
Ensayo Farmacológico Vía Tópica.....	15
Inducción de Dermatitis	15
Evaluación de Efecto Farmacológico.....	15
Obtención de Resultados	16
Resultados y Discusión	17
Formulación de Emulsiones	18
Controles de Producto Terminado	18
Pre-Ensayo	18
Ensayo.....	19
Inducción de Dermatitis Atópica	19
Evaluación del Efecto Farmacológico	20
Efecto de Emulsión con Extracto.....	21
Efecto de Corticoide Tópico	23
Evolución Natural de la Dermatitis	26
Efecto de la Emulsión Base	28
Porcentaje de Disminución de Edema	31
Conclusiones	34

Referencias	35
Anexos	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de autoamplificación y retroalimentación de la dermatitis atópica	4
Figura 2: Signos de dermatitis atópica.....	5
Figura 3: Ficha SCORAD	6
Figura 4: Flores y hojas de <i>Buddleja globosa</i>	7
Figura 5: Flores y hojas de <i>Ugni molinae</i>	8
Figura 6: Estructuras de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina.....	9
Figura 7: Estructuras compuestos presentes en EAEmur.....	10
Figura 8: Estructura química en 2D de Oxazolona	14
Figura 9: Evolución de las OD tratadas con oxazolona durante la inducción de DA.....	20
Figura 10: Evolución durante el tratamiento con EE.....	21
Figura 11: Evolución durante el tratamiento con corticoide tópico (C+)	24
Figura 12: Evolución del grupo control negativo, durante el tratamiento	26
Figura 13: Evolución durante el tratamiento con emulsión base.....	29
Figura 14: Gráficos de porcentajes de disminución de peso	32

Figura 15: Comparación de signos en las ODs al último día de tratamiento.....32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios de Hanifin y Rajka.....	5
Tabla 2: Formulaciones de las emulsiones utilizadas	17
Tabla 3: Evolución de los signos en la OD durante el tiempo de inducción de DA.	19
Tabla 4: Características del grupo EE el día final del estudio	22
Tabla 5: Características del grupo C+ el día final del estudio	25
Tabla 6: Características del grupo C- el día final del estudio	27
Tabla 7: Características del grupo E el día final del estudio.....	30
Tabla 8: Porcentajes de disminución de grosor y peso.....	31

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Análisis estadístico del peso	41
Anexo 2: Análisis estadístico del grosor	45
Anexo 3: Gráfico datos brutos del grosor.	49
Anexo 4: Gráfico datos brutos del peso	49
Anexo 5 Gráfico de Ranks Grosor	50
Anexo 6: Gráfico de Ranks Peso	50
Anexo 7: Materias primas utilizadas en la formulación de emulsiones.....	51

Abreviaturas

AAC	:	Alkyl Acrylate Crosspolymer
AC	:	Acetona pura
C-	:	Control negativo
C+	:	Control positivo
COX-2	:	Ciclooxigenasa 2
Cps	:	Centipoise
CT	:	Corticoide tópico
DA	:	Dermatitis atópica
E	:	Emulsión base
EAEmur	:	Extracto acetato de etilo murtila
EE	:	Emulsión con extracto
EETmat	:	Extracto etanólico de matico
igE	:	Inmunoglobulina E
iNOS	:	Óxido nítrico Sintasa inducible
ISP	:	Instituto de salud pública de Chile
NO	:	Óxido nítrico
OD	:	Oreja Derecha
OI	:	Oreja Izquierda
OX	:	Oxazolona
PgE2	:	Prostaglandina E2
TA	:	Triamcinolona acetónido
TCC	:	Triglicérido cáprico caprílico
Th2	:	Linfocitos Th2

“Estudio preclínico para evaluar la efectividad de una emulsión crema gel elaborada con extractos de *Buddleja globosa* y de *Ugni molinae*, para el tratamiento de dermatitis atópica inducida con oxazolona en ratones Cf-1”

Resumen

La dermatitis atópica, es una dermatosis cuya principal característica es la presencia de xerosis, prurito, eritema y edema, produciéndose una fuerte picazón que puede llevar a la formación de heridas e infecciones en la piel.

Existen diversos antecedentes que demuestran que la dermatitis atópica ha aumentado su prevalencia dentro de los últimos años, el tratamiento muchas veces supone un desafío debido a que se presenta mayormente en niños entre 3 y 6 meses de edad. El tratamiento farmacológico consiste principalmente en el uso de corticoides tópicos, a los cuales están asociados una serie de efectos adversos (RAMs) cuando son utilizados de manera crónica en niños, por esta razón, es importante buscar otro tipo de tratamiento con una menor cantidad de RAMs para los pacientes.

Uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar una emulsión de tipo crema gel con extracto etanólico de *Buddleja globosa* (matico) y acetato de etilo de *Ugni molinae* (murtilla) (1:1); la emulsión, fue preparada al 0,2% y se sometió a ensayos de estabilidad, los cuales resultaron positivos.

El objetivo principal de esta investigación radicó en demostrar que la emulsión disminuye los síntomas de la dermatitis atópica inducida en ratones CF-1.

El ensayo dermatológico fue realizado en ratones machos de la cepa CF-1 y se dividió en dos etapas; la primera fue la inducción de la dermatitis atópica, en la cual se utilizó como inductor oxazolona (OX) al 0,5% y la segunda, que consistió en la aplicación diaria de la emulsión elaborada.

El efecto de la emulsión fue evaluado comparando mediante fotografías y por medio de las diferencias entre el grosor de las orejas y el peso de los edemas formados en los animales tratados y los animales controles.

Los resultados de esta investigación permitieron demostrar que la emulsión del tipo crema gel elaborada con extractos de matico y murtilla redujo de manera significativa los síntomas

principales de la dermatitis atópica inducida en ratones CF-1, como la formación de edema, el enrojecimiento y la hinchazón del área afectada, en este caso el lóbulo de la oreja derecha.

En comparación con el tratamiento estándar, en este caso un corticoide tópico (CT), la emulsión disminuyó en un mayor porcentaje el edema formado y la hinchazón producida en el lóbulo de la oreja derecha de los ratones.

"Preclinical study to evaluate the effectiveness of a gel cream emulsion made with *Buddleja globosa* and *Ugni molinae* extracts, for the treatment of atopic dermatitis induced by oxazolone in Cf-1 mice"

Abstract

Atopic dermatitis is a skin disease whose main characteristic is the presence of xerosis, pruritus, erythema and edema, occurs severe itching that can lead to wounds and skin infections.

There are several antecedents that show that atopic dermatitis has increased its prevalence in recent years, treatment is often a challenge because it occurs mostly in children between 3 and 6 months, pharmacological treatment consists mainly of the use of Topical corticosteroids, which are associated with a series of adverse effects when used chronically in children, for this reason it is important to seek another type of treatment that involves fewer adverse effects for patients.

One of the objectives of our work was to elaborate an emulsion with ethanolic extract of *Buddleja globosa* (matico) and ethyl acetate extract of *Ugni molinae* (murtilla), the emulsion, of the gel cream type, was prepared at 0.2% and subjected to stability tests, which were positive.

The main objective of this research was to demonstrate that the emulsion manages to reduce the symptoms of atopic dermatitis induced in cf-1 mice.

The dermatological test was performed on male cf-1 mice and divided into two parts; the first was the induction of atopic dermatitis, in which oxazolone was used as an inducer at 0.5% and the second part, which consisted in the daily application of the elaborated emulsion.

The effect of the emulsion was evaluated by means of comparative photographs and by means of the differences between the thickness of the ears and the weight of the edemas formed in them.

The results of this investigation allowed us to demonstrate that the emulsion of the gel cream type elaborated with extracts of matico and murtilla effectively reduces the main symptoms of atopic

dermatitis induced in CF-1 mice, such as the formation of edema, redness and swelling of the affected area, in this case the lobe of the ear.

In comparison with the standard treatment, in this case a topical corticoid, the emulsion managed to decrease in a greater percentage the edema formed, and the swelling produced in the ear of the mice.

The results of this investigation allowed us to demonstrate that the emulsion of the gel cream type elaborated with extracts of matico and murtila effectively reduces the main symptoms of atopic dermatitis induced in CF-1 mice, such as the formation of edema, redness and swelling of the affected area, in this case the lobe of the ear.

In comparison with the standard treatment, in this case a topical corticoid, the emulsion managed to decrease in a greater percentage the edema formed, and the swelling produced in the ear of the mice.

Introducción

La dermatitis atópica (DA), es una dermatosis inflamatoria crónica, que afecta hasta el 25% de los niños y 2-3% de los adultos. Su inicio es más común a la edad de 3 a 6 meses y un 60% de los pacientes desarrollan erupciones en el primer año de vida y un porcentaje menor las presenta a los 5 años. Hay pacientes que eliminan los síntomas en edad adulta, pero hay entre un 10 a 30% de éstos que no presenta mejoría con la madurez. Sin embargo, existen pacientes que nunca presentaron erupciones a edades tempranas, pero éstas aparecieron en edad adulta.

La dermatitis se presenta con eritema, edema, xerosis, erosiones, exudado y prurito ^[1]. Estos síntomas son molestos y muchas veces interfieren con la vida diaria de los pacientes, por lo que se hace de suma importancia tratarlos de manera eficaz y con menores RAMs.

El prurito, es uno de los síntomas que más afecta la calidad de vida de los pacientes, debido a que genera una sensación de comezón que empeora con el rascado, además de existir otros desencadenantes, como el sudor, contacto con telas sintéticas y estrés ^[2].

Este tipo de dermatosis no tiene cura, por lo que los tratamientos se limitan solo a tratar los síntomas. Actualmente el tratamiento más utilizado consiste en la administración de corticoides tópicos. Debido a su buena capacidad de absorción, éstos pueden generar una serie de efectos adversos tales como Síndrome de Cushing, supresión suprarrenal sintomática, disminución del crecimiento lineal, Diabetes Mellitus e hipertensión que pueden afectar principalmente a niños pequeños ^[3]. Debido a los problemas generados por la utilización de corticoides es importante buscar una alternativa a este tratamiento, que genere alivio similar, pero sin los efectos adversos.

Los productos naturales han sido objeto de investigación para tratar esta dermatosis, debido a que se han presentado buenos resultados en este contexto por las diversas propiedades que poseen. Se han realizado estudios en plantas como la *Salvia officinalis* y el fruto de *Tribulus terrestris* los que han demostrado poseer un alto efecto antiinflamatorio, siendo de utilidad para tratar este tipo de dermatosis ^[4,5]. Sin embargo, estos estudios se han realizado directamente con extractos de las especies mencionadas, y no se ha indagado más allá si es que pueden ser utilizadas en algún tipo de preparado cosmético o dermatológico.

También se han realizado estudios con metabolitos secundarios aislados de algunas especies, tales como verbascósido y el 7 O-glucósido de luteolina, ambos presentes en las hojas del matico ^[6], para los cuales se ha descrito una alta potencia antiinflamatoria en modelos *in vivo* ^[7,8]. También se han realizado estudios con metabolitos secundarios presentes en la murtila ^[9] como los ácidos ursólico, oleanólico y asiático que, al aplicarlos en piel lesionada de ratón, lograron acelerar el recobro de la barrera cutánea ^[10,11,12]. Actualmente en el mercado, no existe un producto ya sea cosmético o dermatológico que contenga productos naturales para tratar la dermatitis atópica, es por esto que uno de los objetivos de esta memoria fue desarrollar un preparado que contenga extractos de matico y de murtila para ser utilizado en el tratamiento de esta patología.

Tratamientos de uso común.

1. Tratamientos no farmacológicos de la dermatitis atópica (DA)

Con el propósito de disminuir los síntomas de la DA, se pueden tratar las erupciones de diferentes maneras que no involucren fármacos, como lo es: disminuir el tiempo de duchas, utilizar agua tibia, no utilizar jabones en las zonas erupcionadas, hidratar lo que más se pueda las zonas con placas eritematosas, para eso se utilizan formulaciones con emolientes tales como glicol y estearatos de glicerilo, agentes oclusivos como vaselina y agentes hidratantes como glicerina ^[13]. Se deben evitar los rascados frecuentes para evitar la formación de costras y la aparición de alguna infección debido al contacto con las uñas.

2. Tratamientos farmacológicos de la DA

2.1 Corticoides tópicos

Se usan en el tratamiento de la DA, tanto en adultos como en niños y son el pilar de la terapia antiinflamatoria. Actúan sobre una variedad de células inmunes, incluidos linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas, lo que interfiere con el procesamiento del antígeno y suprime la liberación de citoquinas proinflamatorias. Se comienzan a utilizar cuando las terapias no farmacológicas no dan resultado. Se dividen en 7 grupos según su potencia, los más utilizados; clobetasol, mometasona, triamcinolona (TA), dexametasona e hidrocortisona, siendo el clobetasol el más potente y la hidrocortisona menos potente ^[1]

2.2 Inhibidores de calcineurina tópicos

Son producidas naturalmente por la bacteria *Streptomyces* e inhiben la activación de las células T dependientes de la calcineurina, bloqueando la producción de citoquinas proinflamatorias y demás mediadores de inflamación.^[1]

De este grupo farmacológico se encuentran disponible el tacrolimus y el pimecrolimus, éstos tienen una utilidad particular en sitios de piel sensibles, como los pliegues de la cara y la piel, donde existe un perfil de RAMs mayor con corticoides tópicos (CT)^[1,13]. El principal problema es que presentan como efectos adversos ardor y enrojecimiento del área tratada, que tiende a desaparecer con el tiempo, pero que genera una disminución en la adherencia del tratamiento.

2.3 Productos cosméticos

Podemos encontrar en el mercado, preparados cosméticos, tales como aguas termales, emulsiones emolientes, bloqueadores con formulaciones hidratantes, limpiadores hidratantes, jabones, entre otros productos, cuya principal finalidad es hidratar la piel y evitar así la xerosis tópica, uno de los síntomas más molestos, debido a que causa ardor y picazón.^[1]

Antecedentes

1.- Etiopatogenia de la dermatitis atópica

1.1 Mecanismos inmunológicos

En el eczema atópico, los factores inmunológicos se encuentran alterados, se produce un ciclo que se retroalimenta, y lleva del prurito al rascado y viceversa lo que desencadena la liberación de una serie de mediadores inmunológicos principalmente citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-18 y TNF- α , estos mediadores, reclutan leucocitos a la piel. Los distintos leucocitos van experimentando cambios, los linfocitos se diferencian por la vía Th-2, inducidos por las células dendríticas, aumentando su capacidad presentadora de antígeno y se unen a los complejos IgE-antígeno, estos complejos inducen la agregación y activación de mastocitos. Las células Th2 activadas liberan IL-4 e IL-13, que suprimen la producción de péptidos antimicrobianos, es en estas circunstancias cuando virus, bacterias y hongos sacan provecho de esta situación, colonizando la piel y liberando mediadores proinflamatorios (superantígenos, proteoglicanos y ácido lipoteicoico) que amplificarán la activación leucocitaria. Con esta activación, aumenta aún más la liberación de elementos proinflamatorios que perpetúan el prurito. [14]

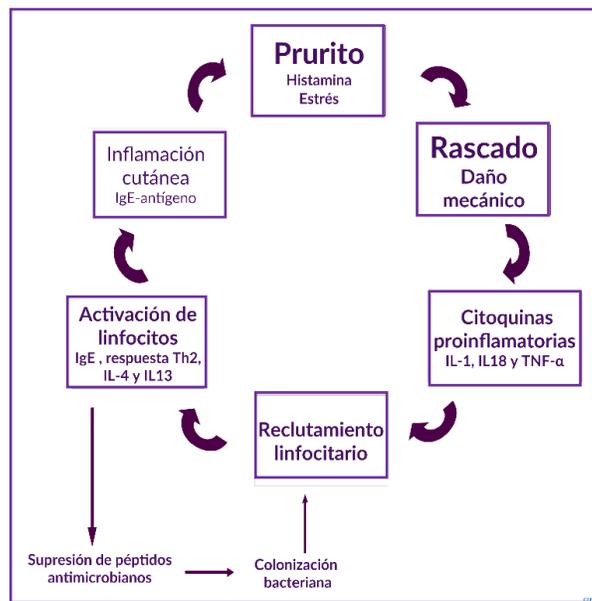


Figura 1: Ciclo de autoamplificación y retroalimentación de la dermatitis atópica.

Adaptado de Conde-Taboada et. al 2008

1.2 Clínica

El síntoma más común de esta dermatosis es el prurito, es un picor intenso que inicia el ciclo de inflamación ^[15], también se produce una disfunción de la barrera epidérmica que incluye una falla en las ceramidas del estrato córneo, esta situación aumenta el rascado, el cual estimula a los queratinocitos a la liberación de citoquinas inflamatorias que agravan el cuadro. Otros síntomas presentes son: eritema, edema, excoriación, liquenificación e ictiosis ^[16], con menor frecuencia se presenta eritrodermia y pitiriasis.

Para diagnosticar la DA, se usan diferentes escalas y criterios, el criterio de uso más común es el desarrollado por Hanifin y Rajka (tabla 1), para definir si se está en presencia de esta dermatosis, se debe contar con la presencia de 3 criterios mayores y 3 criterios menores. Para definir la severidad se utiliza la ficha SCORAD (figura 3), ésta se basa en 6 criterios, con una escala de valores del 1 al 3 según la intensidad, midiéndose cada síntoma en una parte representativa del cuerpo. La extensión de la enfermedad se mide con la regla de los 9, esta ficha también evalúa visualmente el prurito y subjetivamente los trastornos del sueño causados por la patología, para determinar si la dermatitis es leve se debe tener un puntaje menor a 15, si el puntaje se encuentra entre 15 y 40, se habla de dermatitis media, finalmente si el resultado es mayor a 40, es dermatitis severa ^[2].

Tabla 1: Criterios de Hanifin y Rajka
CRITERIOS MAYORES
1. Prurito. 2. Morfología y distribución características: Liquenificación en flexuras en adultos. Compromiso de cara, flexuras y superficies de extensión en niños y jóvenes. 3. Curso crónico y recidivante. 4. Historia personal o familiar de atopía.
CRITERIOS MENORES
1. Xerosis. 2. Ictiosis / hiperlinealidad palmar / queratosis pilar. 3. Reactividad cutánea inmediata (Tipo I) a los test cutáneos. 4. Elevación de niveles séricos de IgE. 5. Edad precoz de comienzo. 6. Tendencia a infecciones cutáneas y déficit de la inmunidad celular. 7. Tendencia a dermatitis inespecíficas de pies y manos. 8. Eczema de pezón. 9. Queilitis. 10. Conjuntivitis recidivante. 11. Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan. 12. Queratocono. 13. Catarata subcapsular anterior. 14. Oscurecimiento periocular. 15. Palidez facial o eritema en cara. 16. Pitiriasis alba. 17. Pliegues en la parte anterior de cuello. 18. Prurito provocado por sudoración. 19. Intolerancia a la lana y los solventes de las grasas. 20. Acentuación perifolicular. 21. Intolerancia a algunos alimentos. 22. Evolución influenciada por factores ambientales y emocionales.



Figura 2: Signos de dermatitis atópica ^[17]

(A) EXTENSIÓN: (Entre paréntesis para niños menores de 2 años)

(B) INTENSIDAD:

Gradación: 0 ausente; 1 leve; 2 moderado; 3 severo

Criterios	Intensidad
Eritema
Edema/pápula
Exudado/costra
Escoriación
Liquenificación
Sequedad
Suma	<input type="text"/>

SCORAD: $A/5 + 7B/2 + C$

(C) SÍNTOMAS SUBJETIVOS:

PRURITO (0 A 10) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

+ PÉRDIDA DE SUEÑO (0 a 10) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Escala analógica visual (media en los últimos 3 días o noches)

OBSERVACIONES:

Figura 3: Ficha SCORAD

2.- Descripción botánica de las especies vegetales

2.1 Matico

- **FAMILIA** : Buddlejaceae
- **GÉNERO** : *Buddleja*
- **ESPECIE** : *B. globosa*
- **NOMBRE CIENTÍFICO** : *Buddleja globosa* Hope
- **NOMBRE VULGAR** : Matico, palquil o pañil ^[18]
- **Distribución geográfica** : Chile, Argentina y Perú

Buddleja globosa Hope es un arbusto de 1,5 a 3 m 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 bicabezuela, de 1 a 2 cm de diámetro, formando un racimo de 2 a 15 cabezuelas. Sus flores son numerosas, compactas y de color anaranjado, amarillo y rojo. El fruto es una cápsula subglobosa. florece desde noviembre a mayo ^[19].

La medicina tradicional ha empleado el matico por sus múltiples propiedades terapéuticas destacando el uso de las hojas y corteza en infusión, para ayudar en la cicatrización de heridas, en el tratamiento de quemaduras y de úlceras externas e internas. ^[20]

Se ha descrito en estudios anteriores que el EETmat presenta una marcada actividad antiinflamatoria tópica *in vivo*. ^[8] En el extracto etanólico, los compuestos predominantes son: verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina, ambos han presentado efectos antiinflamatorios al ser estudiados como metabolitos aislados. ^[16,21,22]



Figura 4: Flores y hojas de *Buddleja globosa* ^[23]

2.2 Murtilla

- **FAMILIA** : Myrtaceae
- **GÉNERO** : *Ugni*
- **ESPECIE** : *U. molinae*
- **NOMBRE CIENTIFICO** : *Ugni molinae* Turcz.
- **NOMBRE VULGAR** : Murtilla, Murta o Uñi [24]
- **DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA** : Chile

Ugni molinae Turcz., es un arbusto perteneciente a la familia Myrtaceae, crece de manera silvestre en las regiones australes de Chile y puede alcanzar hasta 2 m de altura. Sus hojas son ovaladas, lanceoladas o elípticas, con algunos pelos tectores dispersos. Los pecíolos son superficialmente canalizados.

Sus frutos son bayas globosas de color rojo oscuro y miden alrededor de 1 cm de diámetro. [25]

En la medicina popular se le atribuyen propiedades aromáticas, estimulantes, y astringentes [26]

En estudios anteriores se demostró que el extracto de acetato de etilo de murtilla (EAEmur), presenta un marcado efecto antiinflamatorio tópico *in vivo*, el cual se debe principalmente a la presencia de ácidos, asiático, ursólico y oleanólico [27]



Figura 5: Frutos y hojas de *Ugni molinae* [25]

3.-Metabolitos secundarios presentes en los extractos

3.1 Extracto etanólico de matico

Se ha descrito que en el extracto etanólico de matico los principales metabolitos secundarios presentes son el verbascósido y el 7-O-glucósido de Luteolina ^[21]

3.1.1 Verbascósido

Como metabolito secundario aislado, se han realizado estudios *in vitro* en donde en células mononucleares sometidas a inflamación inhibe el factor transcripcional para citoquinas proinflamatorias AP-1, disminuye el óxido nítrico y la síntesis de PgE₂. ^[21] Se ha estudiado también en un modelo *in vivo* de DA inducida con 2,4 dinitroclorobenceno en ratones BALB/c, en este estudio, se logró demostrar que es capaz de disminuir la severidad de la DA, debido a que logra atenuar la liberación de IgE, Th2 y citoquinas proinflamatorias como IL-4 e IL-13, también inhibir la expresión de TNF- α e IL-6 y bloquear la vía NF κ B. ^[28]

3.1.2 7-O-glucósido de Luteolina

En estudios *in vitro* en células RAW 264.7 logró inhibir iNOS y COX-2^[29]. En estudios *in vivo* en DA inducida con oxazolona, redujo la infiltración celular de mastocitos, disminuyó los niveles de IgE e IL-4 y redujo considerablemente la pérdida de agua transepidermica. ^[30]

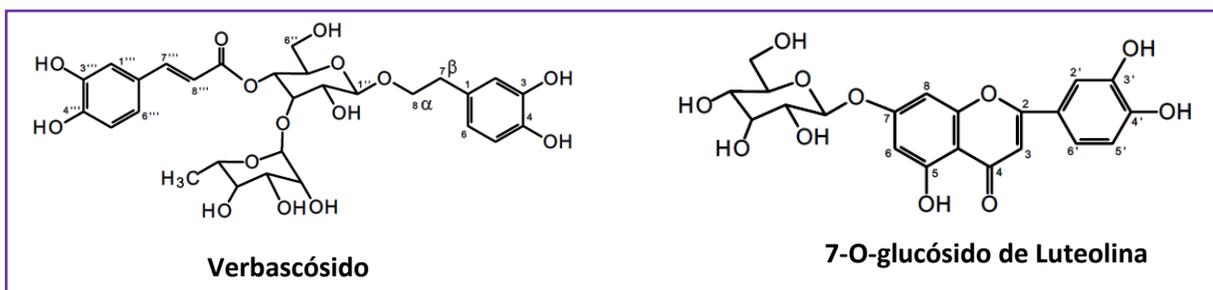


Figura 6: Estructuras de verbascósido y 7-O-glucósido de luteolina ^[23]

3.2 Extracto acetato de etilo de murtila

Se ha descrito que en el extracto acetato de etilo los principales metabolitos secundarios presentes son los ácidos ursólico, oleanólico, asiático y corosólico. [25]

3.2.1 Ácidos ursólico y oleanólico

Son isómeros que en la mayoría de los casos se presentan juntos, en estudios *in vivo* de células queratinocitos dañadas, lograron acelerar el recobro de la barrera cutánea, generaron un aumento en las ceramidas y aumentaron la filagrina y la involucrina.[10]

3.2.2 Ácido asiático

En estudios *in vivo* en ratones ICR tratados con ácido acético, el ácido asiático logró disminuir el óxido nítrico (NO), el TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2 y NF κ β , todos mediadores que participan en la vía inflamatoria [31]

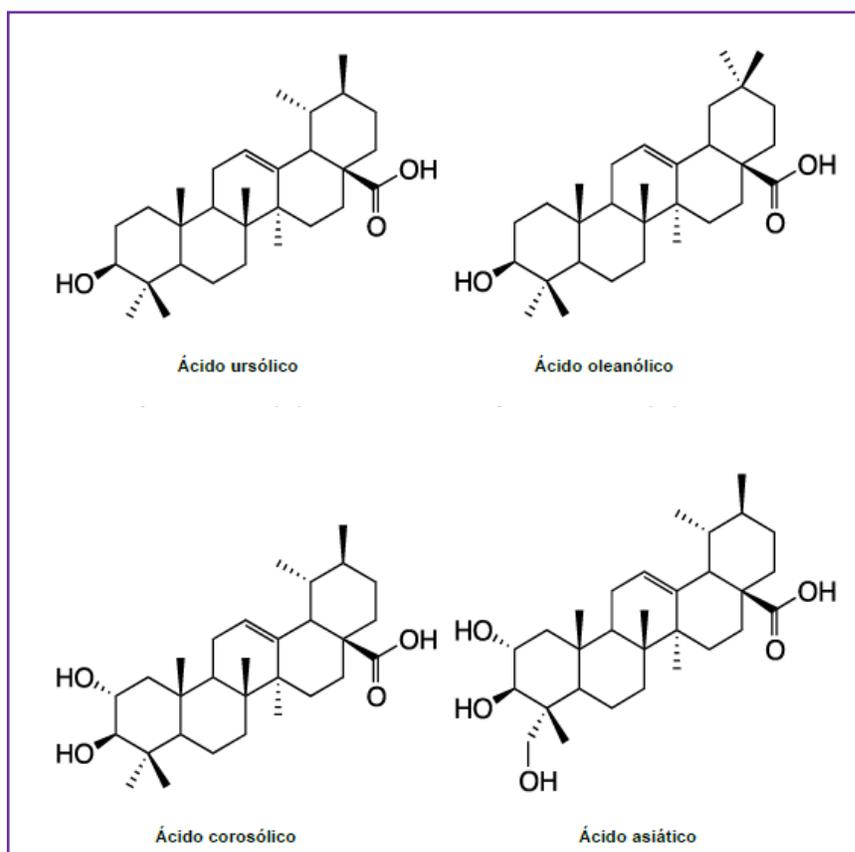


Figura 7: Estructuras compuestos presentes en EAEmur [25]

Hipótesis

Una emulsión crema gel que contiene extracto etanólico de hojas de matico (EETmat) y extracto acetato de etilo de hojas de murtila (EAEmur), disminuirá los principales signos de dermatitis atópica (DA) inducida con oxazolona al 0,5% en el lóbulo de la oreja de ratones CF-1.

Objetivos

1. Objetivo general

- Demostrar que los signos de dermatitis atópica inducida con oxazolona en la oreja de ratones CF-1 disminuyen luego de la aplicación diaria de una emulsión crema gel elaborada con extractos de matico y murtila.

2. Objetivos específicos

- Determinar incompatibilidades del tipo química en el desarrollo de la emulsión con los EETmat y EAEmur.
- Establecer los parámetros de estabilidad tanto química como física de la emulsión desarrollada.
- Establecer mediante un ensayo *in vivo* que el tratamiento de la DA puede abordarse con una alternativa distinta a los corticoides tópicos.
- Demostrar que la mezcla de los EETmat y EAEmur disminuyen los principales signos de la DA.
- Comparar el efecto antiinflamatorio tópico de la emulsión crema gel con EETmat y EAEmur con el de la emulsión con triamcinolona acetónido.

Materiales y métodos

1.- Material vegetal y obtención de extractos

Los EETmat y EAEmur utilizados en este estudio fueron obtenidos en estudios anteriores, las hojas de *Buddleja globosa* fueron recolectadas, extraídas y estandarizadas en el estudio realizado por Montero I., 2016. La recolección de las hojas de murtila, su extracción y estandarización EAEmur fue realizado por Peña et al., 2017.

2.- Desarrollo del preparado dermatológico

2.1 Elección de la Formulación

Se eligió una formulación crema gel, debido al alto contenido de agua de este tipo de preparaciones. Como se mencionó anteriormente, la xerosis es uno de los principales síntomas de la DA, por lo que era necesaria una formulación con alta capacidad de absorción de agua, se logra generar un factor externo de hidratación.

La emulsión gel se elaboró utilizando un emulgente polimérico Pemulen TR1® *Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (AAC)* debido a sus ventajas sobre otro tipo de emulgentes, ya que permite darle una mayor estabilidad a las emulsiones O/W, y se pueden utilizar en concentraciones más pequeñas ya que son capaces de emulsificar grandes cantidades de componentes grasos, además son estables en un amplio rango de pH. Las emulsiones a base de ACC tienen ventajas respecto las tradicionales formuladas con surfactantes ya que son de menor potencial de irritación y dejan una sensación superior de humectación en la piel. [32,33] También en la formulación se incorporó carbomer, que actúa como viscosante mejorando la estabilidad de la emulsión. En la fase acuosa se incorporó glicerina como humectante. En la fase grasa se incorporó también triglicérido cáprico/caprílico que actúa como emoliente, debido a que tiene la capacidad de hidratar el estrato córneo y así evitar posibles fisuras debido a la gran resequedad que se presenta en la piel. [23]

Los extractos se incorporaron al 1,0% cada uno. Para ser agregados a la emulsión, el EETmat fue incorporado a la fase acuosa, y el EAEmur se agregó a la fase grasa, ambos se disolvieron en las respectivas fases, no se observó problemas en la disolución de los extractos.

2.2 Desarrollo de la emulsión base (E)

Para el desarrollo de la formulación, primero se dispersó el Carbomer en agua, dejándolo reposar por 5 min, luego se incorporó glicerina y se homogenizó. En un recipiente distinto se fundieron las materias grasas, en esta fase grasa se incorporó el triglicérido cáprico/ caprílico (TCC), el emulgente y el alcohol cetearílico, ambos recipientes se calentaron hasta llegar a 60°C. Se vertió la fase grasa sobre la acuosa, y se mezcló con un agitador de paleta durante 30 min, luego se ajustó el pH hasta 6 con NaOH 1%.

2.3 Desarrollo de la emulsión con los extractos EAEmur y EETmat

Para el desarrollo de la formulación, primero se dispersó el Carbomer en agua, dejándolo reposar por 5 min, luego se incorporó glicerina y el EETmat y se homogenizó. En un recipiente distinto se fundieron las materias grasas, en esta fase grasa se incorporó el triglicérido cáprico/caprílico, el emulgente, el alcohol cetearílico y el EAEmur, ambos recipientes se calentaron hasta llegar a 60°C. Se vertió la fase grasa sobre la acuosa, y se mezcló con un agitador de paleta, durante 30 min luego se ajustó pH hasta 6 con NaOH 1%.

2.4 Controles producto terminado

2.4.1 Estabilidad

Se sometió a ambas emulsiones a los siguientes ensayos de estabilidad:

- En estufa a 40°C durante 3 meses.
- Estantería, 25°C durante 6 meses.
- Centrífuga durante 20 minutos a 3000 RPM.

2.4.2 Viscosidad

Se midió la viscosidad de ambas emulsiones con viscosímetro Brookfield HB DV2T a 22°C con aguja número 7 a 200 RPM.

2.4.3 pH

El pH de la emulsión se determinó en forma directa utilizando medidor de pH Jenco, a 20°C.

3.- Oxazolona

Se utilizó la OX (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one, figura 8) como irritante, ésta fue adquirida del laboratorio Sigma- Aldrich. Para ser aplicada, se disolvió en acetona pura, y luego fue diluida en el mismo vehículo hasta obtener concentraciones de 0,2, 0,5 y 1,0%.

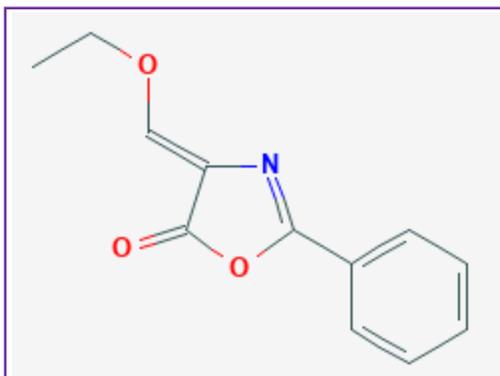


Figura 8: Estructura química en 2D de Oxazolona ^[34]

4.- Triamcinolona acetónido (corticoide tópico)

El corticoide utilizado como control positivo, fue preparado por el recetario magistral de Farmacias Ahumada. Se preparó TA al 0,025% en base crema fría, que tiene como ingredientes parafina líquida, cera alba, estearato de glicerilo, alcohol cetílico, C20-40 PARETH-10 y agua.

5.- Animales

Los animales utilizados, fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Se utilizaron ratones de la cepa CF-1, machos, de 20-25 g, alimentados con agua y comida *ad libitum*.

5.1 Aspectos éticos a considerar para el trabajo con animales

El presente estudio fue evaluado y aprobado por el comité de bioética del ISP, éste se encarga de evaluar el trato ético y mitigador del dolor de los animales utilizados, considerando las "Normas Internacionales en Investigación Biomédicas que involucra el uso de animales" ^[35]. Esta reglamentación ha sido elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas en Ginebra (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 1986).

6.- Estudio *in vivo*

6.1 Pre-ensayo

El objetivo del pre-ensayo fue determinar la concentración óptima de OX y el tiempo en que los ratones presentaron signos visibles de DA moderada.

Para el pre-ensayo se utilizaron 12 ratones de las características antes mencionadas, se dividieron en 3 grupos (n=4), separados en jaulas con 4 animales cada una. Cada grupo fue tratado con concentraciones distintas de OX; 0,2, 0,5 y 1,0%. Se aplicaron 20 μ L de OX en el dorso de la oreja derecha (OD) y 20 μ L de acetona en el dorso de la oreja izquierda (OI), este procedimiento se realizó una vez al día, a la misma hora.

6.2 Ensayo farmacológico vía tópica

Para el ensayo farmacológico se utilizaron 24 ratones divididos en 4 grupos (n=6) se separaron en jaulas con 3 ejemplares cada una.

6.2.1 Inducción de la DA

Todos los grupos fueron tratados con 20 μ L de OX 0,5% en la OD y 20 μ L de acetona pura (vehículo) en la OI. Este procedimiento, fue realizado diariamente, una vez al día, a la misma hora y en una duración total de 7 días.

La concentración de OX y el tiempo óptimo para la inducción de DA fueron determinados en el pre-ensayo.

6.2.2 Evaluación del efecto farmacológico

Los grupos 1, 2 y 3 fueron tratados con emulsión base (E), emulsión con extractos (EE) y TA (C+) respectivamente, se consideró como control negativo (C-) al cuarto grupo.

Al grupo tratado con E se aplicó aproximadamente 3 mg/Kg por día de emulsión base, al grupo tratado con EE se aplicó aproximadamente 3 mg/Kg por día de emulsión con extractos, mientras que al grupo tratado con corticoide se aplicó aproximadamente 3 mg/Kg por día de TA.

6.2.2.1 Obtención de resultados

Los resultados de la evolución de la DA se obtuvieron por comparación fotográfica de imágenes obtenidas diariamente, todos los días luego de la aplicación del tratamiento, se tomó una fotografía a la OD y una a la OI de cada grupo, se evaluó la evolución de las OD comparándolas entre grupos y con su respectiva OI, los signos observados fueron: enrojecimiento, xerosis y edema.

Para evaluar el efecto antiinflamatorio tópico de la emulsión que contiene los extractos, se midió la capacidad de ésta de disminuir el edema formado en la ODs de los ratones, la medición se realizó pesando las orejas para calcular el porcentaje de disminución de peso. También se determinó la disminución del grosor, que es indicativo de una cicatrización anómala. Los porcentajes mencionados fueron calculados según las siguientes fórmulas:

$$\%DP = \left[\frac{G \text{ mediana } c - G \text{ mediana } t}{G \text{ mediana } c} \right] \times 100$$

$$\%DG = \left[\frac{P \text{ mediana } c - P \text{ mediana } t}{P \text{ mediana } c} \right] \times 100$$

La significancia estadística de dos o más grupos fue evaluada usando el test Kruskal–Wallis seguido por el test de Wilcoxon para las comparaciones individuales, los resultados se expresarán de la siguiente manera:

- % disminución de grosor ± SEM
- % efecto antiinflamatorio tópico ± SEM

Resultados y Discusión

1.- Formulación de las emulsiones

Para la elaboración de las emulsiones, se desarrolló una formulación, en la cual se logró incorporar de manera efectiva los EETmat y EAEmur, sin generar incompatibilidades con ningún ingrediente utilizado además de aprobar los ensayos de estabilidad satisfactoriamente, dicha formulación (tabla 2) fue utilizada en la elaboración tanto de la E como de la EE.

Tabla 2: Formulaciones de las emulsiones utilizadas		
Ingredientes	Emulsión Base (E) (%)	Emulsión + Extractos (EE) (%)
Agua	74,2	74,2
Carbomer (<i>Carbopol ultrez</i>)	0,15	0,15
Glicerina	5,2	5,2
EET Matico	-----	1
TCC	15,5	15,5
AAC (<i>Pemulen TR-1</i>)	0,15	0,15
Alcohol cetearílico	2	2
EAE Murtilla	-----	1
Metilparabeno	0,25	0,25
Propilparabeno	0,25	0,25
NaOH	0,3	0,3

1.2 Controles productos terminados

1.2.1 Estabilidad

- En estufa a 40°C durante 3 meses
 E: Estable
 EE: Estable

- Estantería, 25°C durante 6 meses
 E: Estable
 EE: Estable

- Centrífuga durante 20 minutos a 3000 RPM

E: Estable

EE: Estable

1.2.2 Viscosidad (viscosímetro Brookfield HB DV2T, 22°C, aguja n°7, 200 RPM)

E: 5760 cps

EE: 12960 cps

1.2.3 pH

E: 6,5

EE: 6,5

Durante el proceso de elaboración de las emulsiones, no se presentó ningún problema de estabilidad, ni física, ni química, solo se presentó una gran diferencia en cuanto a la viscosidad de la E comparada con EE, luego de preparar la formulación que contenía los extractos (EE), la viscosidad de este preparado aumentó a más del doble en comparación con la emulsión base (E).

2.- Pre-ensayo

Durante el pre-ensayo el grupo al que se le aplicó la OX al 0,2% comenzó a presentar signos de DA el día 6, antes de este día, no hubo reacción por parte de los animales. El grupo con OX al 0,5% presentó signos el día 3, manteniéndose éstos dentro de un rango de severidad hasta el fin del pre-ensayo. Por otro lado, en el grupo con OX 1,0% comenzaron a manifestarse los signos a partir del día 2, aumentando progresivamente la severidad de éstos con el transcurso de los días, llegando a generar una DA severa. El Pre-ensayo se terminó el día 7, ya que fue este día cuando los signos del grupo tratado con 1,0% fueron severos, además en el grupo tratado con 0,5% se habían manifestado signos de dermatitis moderada, por lo que no fue necesario extender más el pre-ensayo.

Por los antecedentes antes mencionados, se eligió para la inducción de la DA, una concentración de OX de 0,5%, esta generó los signos de DA moderada, a diferencia de la OX al 0,2% y al 1,0% que generaron signos de DA leve y severa respectivamente.

3.- Ensayo

3.1 Inducción de DA

La inducción se realizó basándose en los resultados obtenidos del pre-ensayo. Durante la inducción, todos los grupos lograron desarrollar una DA moderada en la OD (figura 9), los principales signos fueron la presencia de: xerosis, edema, enrojecimiento, prurito y costras (tabla 3 por el rascado constante de las ODs. Respecto de las OIs, a las que se les aplicó solo el vehículo de las muestras (acetona) no se observaron signos de DA.

A todos los grupos se les aplicó la misma concentración de OX. Posteriormente, al ser tratados, se dividieron de la siguiente manera: Grupo 1: tratado con la emulsión crema gel sin extractos (E); Grupo 2: tratado con la emulsión crema gel con extractos (EE); Grupo 3 control positivo o grupo tratado con la emulsión con triamcinolona (TA); Grupo 4: control negativo o sin tratamiento.

Tabla 3: Evolución de los signos en la OD durante el tiempo de inducción de DA. Cada casilla representa un ratón miembro del grupo bajo el cual se encuentra, cada letra representa un signo según lo siguiente: N: Oreja Normal; E: Enrojecimiento; H: Edema (Hinchazón); X: Xerosis; P: Prurito

Día	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	E	E	E	N	N	N	N	N	N
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	EH	EH	EHX	EH	EH	EH	EH	EH	EH	EH	EH	EH
	EH	EH	EH	EH	EH	EH	EHX	EH	EH	EH	EH	EH
5	EHX	EHX	EHX									
	EHX	EHX	EHX									
6	EHXP	EHXP	EHXP									
	EHXP	EHXP	EHXP									
7	EHXP	EHXP	EHXP									
	EHXP	EHXP	EHXP									

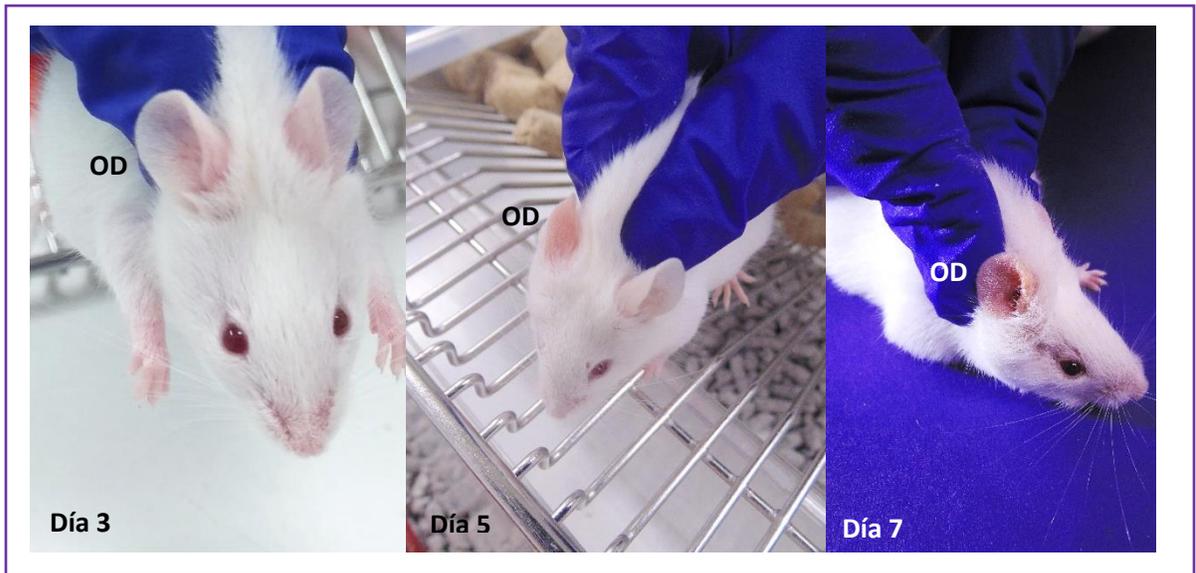


Figura 9: Evolución de las OD tratadas con OX durante la inducción de DA (grupo 1)

3.2 Evaluación del efecto farmacológico

El peso de la oreja es un indicativo principalmente de la aparición de edema producto de la inflamación, mientras que el aumento del grosor de la oreja está relacionado con una cicatrización anómala. Cuando una herida comienza a cicatrizar de manera normal los fibroblastos sintetizan una nueva matriz extracelular que en un principio está formada sobre todo por colágeno III y colágeno I, fibronectina y proteoglicanos, pero cuando ocurren anomalías en la cicatrización, como cicatrización hipertrófica o la formación de queloides, se presenta una actividad fibroblástica excesiva responsable de una gran producción de fibras de colágeno [36] lo que lleva al engrosamiento de la cicatriz, como la oreja de los ratones es muy delgada, esta cicatrización excesiva puede generar un aumento en el grosor.

3.2.1 Efecto de la emulsión con EETmat y EAEmur (EE)

Los resultados permitieron demostrar que la EE disminuyó los signos de DA progresivamente tras la aplicación diaria, disminuyendo la xerosis; lo que se puede observar en la figura 10, donde, en el último día de tratamiento, la piel de la oreja se ve hidratada a diferencia de los primeros 4 días de tratamiento, donde la piel se observaba reseca y con escamas. Hubo

mejoras en el prurito (observación directa de los animales) y también se evidenció por disminución de las costras, cabe destacar que los ratones se rascaban las ODs con menos frecuencia en los últimos 4 días de tratamiento que en los primeros 4. Se puede observar también que el enrojecimiento disminuyó a través del paso de los días (figura 10).

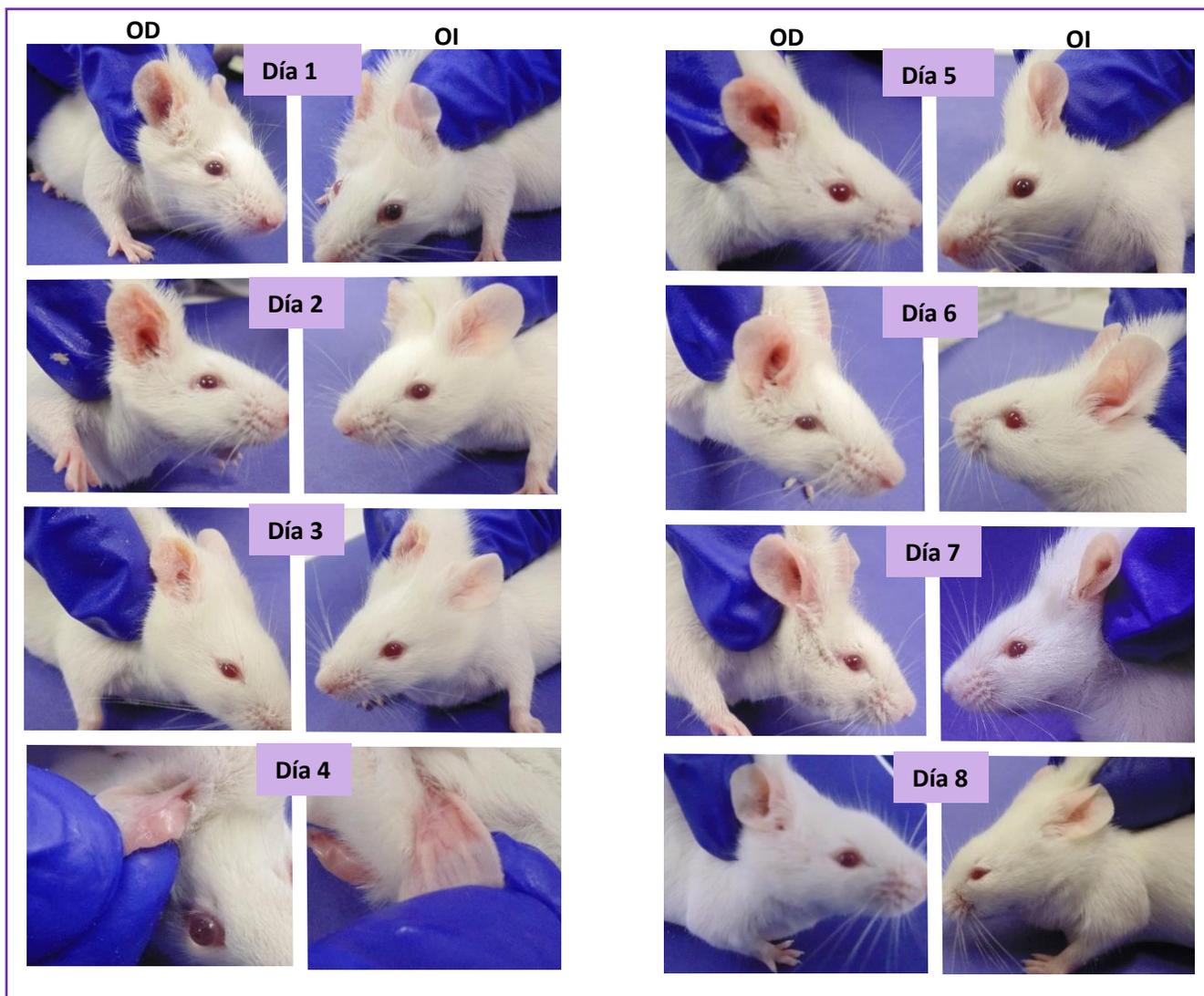


Figura 10: Evolución durante el tratamiento con EE

Tabla 4: Edema y grosor de las orejas de los animales del grupo EE							
n	Características macroscópicas	Peso		Grosor		Diferencia peso (OD-OI)	Diferencia grosor (OD-OI)
		OD (g)	OI (g)	OD (mm)	OI (mm)		
1	Oreja Derecha • Brillante Oreja Izquierda • Normal	0,0086	0,0069	0,33	0,27	0,0017	0,06
2	Oreja Derecha • Amarilla • Brillante Oreja Izquierda • Normal	0,0129	0,0082	0,37	0,27	0,0047	0,1
3	Oreja Derecha • Brillante Oreja Izquierda • Normal	0,0099	0,0076	0,37	0,29	0,0023	0,08
4	Oreja Derecha • Brillante • Queloide Oreja Izquierda • Normal	0,0100	0,0078	0,36	0,25	0,0022	0,11
5	Oreja Derecha • Normal Oreja izquierda • Normal	0,0090	0,0085	0,28	0,23	0,0005	0,05
6	Oreja Derecha • Brillante • Queloide Oreja izquierda • Normal	0,0164	0,0092	0,39	0,28	0,0072	0,11

La EE mostró prometedores resultados en términos de mostrar una tendencia en disminuir el edema de las ODs (30, 8%) con signos evidentes de DA. En este estudio se indujo una DA aguda, que es similar de un estado crónico de la enfermedad, específicamente cuando se presentan cuadros de exacerbación de los síntomas, es por esto que los resultados aquí obtenidos pueden ser relevantes para un potencial uso del EE en el tratamiento de la DA.

En relación a los productos naturales utilizados, se tienen antecedentes que el EETmat presenta una alta actividad analgésica y antiinflamatoria tópica debido a sus metabolitos Verbascósido y 7-O-glucósido de Luteolina ^[6,23], en cuanto al EAEmur, también tiene demostradas propiedades antiinflamatorias tópicas debido a la presencia de ácidos ursólico, oleanólico y asiático. ^[37] Una de

las principales características de la DA es que es una dermatosis en la cual los mediadores inflamatorios se liberan a través de un ciclo de auto amplificación (figura 1), al utilizar la mezcla de extractos probablemente se genera una disminución de estos mediadores, lo que lleva a la mejora de los signos presentes en la DA, que se pudo comprobar conforme avanzaban los días con el tratamiento.

3.2.2 Efecto sobre el edema de la oreja del corticoide tópico

El control positivo (grupo C+ tratado con TA), no mostró una disminución del edema de las ODs respecto del control negativo (9, 2%), a diferencia que el grupo tratado con EE que presentó una disminución del edema (30,8 %) aunque este resultado no fue significativo, muestra que el grupo EE tiene una tendencia a ser mejor antiinflamatorio tópico que la TA en el modelo usado en esta memoria. En la figura 11 se puede observar que, con el transcurso de los días, la TA no disminuyó ni el enrojecimiento, ni la xerosis, tampoco hubo mejora en el prurito, ya que producto del rascado frecuente se formaron costras en las ODs.

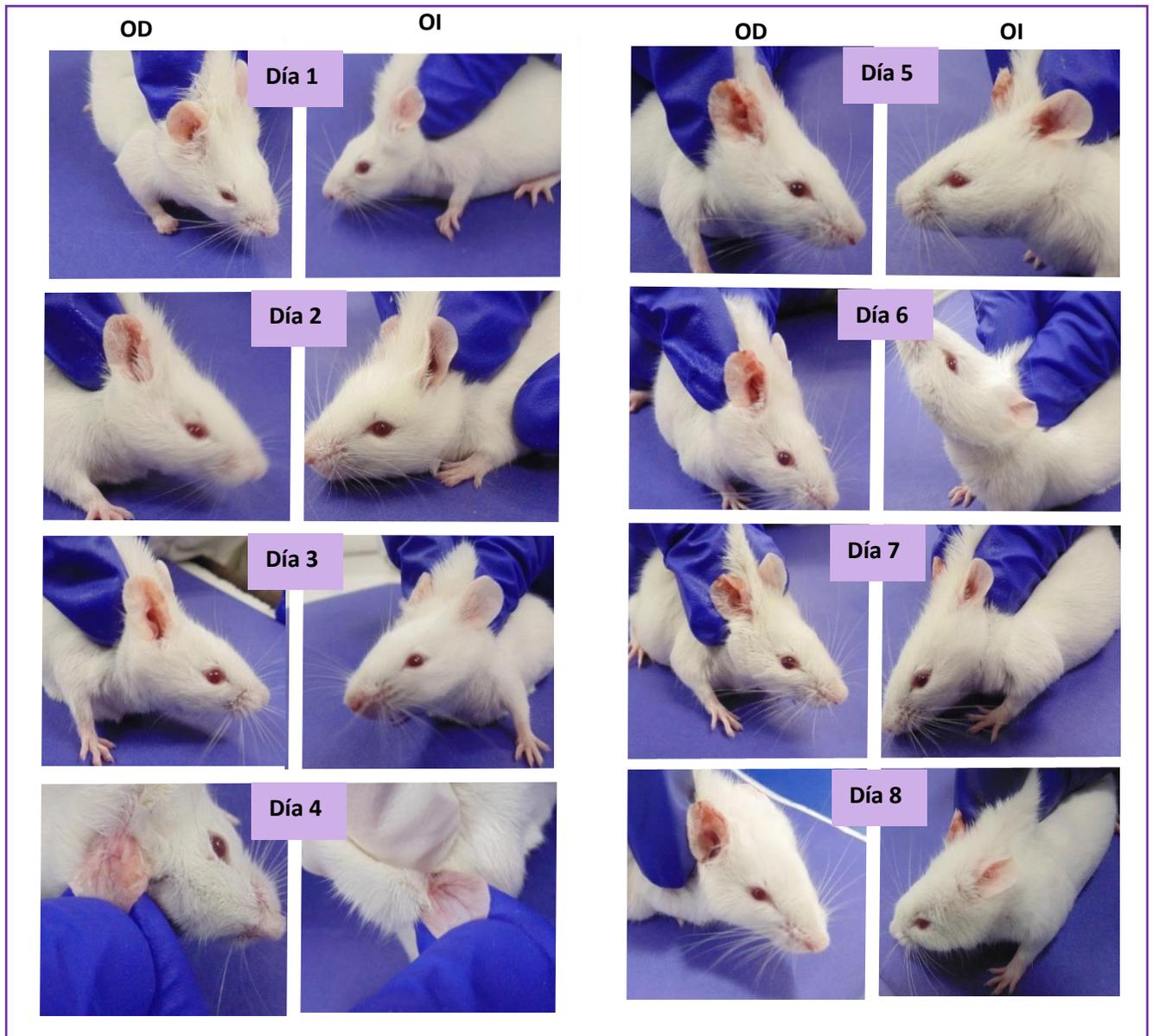


Figura 11: Evolución del edema y del enrojecimiento durante el tratamiento con corticoide tópico (C+)

En la tabla 5, se muestran las características de las orejas en el último día de tratamiento con el corticoide tópico, además de los parámetros comparables: y edema.

Tabla 5: Edema y grosor de las orejas de los animales del grupo C+							
n	Características macroscópicas	Peso		Grosor		Diferencia peso (OD-OI)	Diferencia grosor (OD-OI)
		OD (g)	OI (g)	OD (mm)	OI (mm)		
1	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Costra • Enrojecida • Edema Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0122	0,0051	0,52	0,24	0,0071	0,28
2	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Enrojecida • Brillante • Costras Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0083	0,0051	0,34	0,20	0,0032	0,14
3	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Costra Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0099	0,0072	0,66	0,20	0,0027	0,46
4	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Enrojecida • Costra Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0084	0,0076	0,43	0,18	0,0008	0,25
5	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Enrojecida • Costra Oreja izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0069	0,0069	0,23	0,16	0	0,07
6	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Costra • Edema Oreja izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0095	0,0063	0,3	0,19	0,0032	0,11

Los corticoides tópicos son el tratamiento de elección en la DA, sin embargo, hubo algunos resultados contrarios a los efectos normalmente esperados cuando se utilizan este tipo de fármacos. En los ratones se produjo un aumento de los signos, llegándose a formar costras debido al frecuente rascado; según los resultados, disminuyó el peso de la oreja, este hecho

probablemente se debe a que, al ser buenos antiinflamatorios, son capaces de disminuir el edema, pero no son capaces de detener el ciclo de autoamplificación, lo que evita que haya disminución en el prurito, en la xerosis y en el enrojecimiento, a consecuencia del rascado se forman costras que son removidas constantemente, la piel reacciona cicatrizando anómalamente y se genera mayor producción de las fibras de colágeno, engrosando la cicatriz, lo que explicaría el pequeño aumento de grosor.

3.2.3 Evolución natural de la DA

Las orejas derechas de los animales del grupo control negativo (sin tratamiento) se pueden observar en la figura 12, se pueden observar signos como prurito, enrojecimiento y costras. Sin embargo no se produjo el aumento esperado del edema y menos del grosor de las ODs.

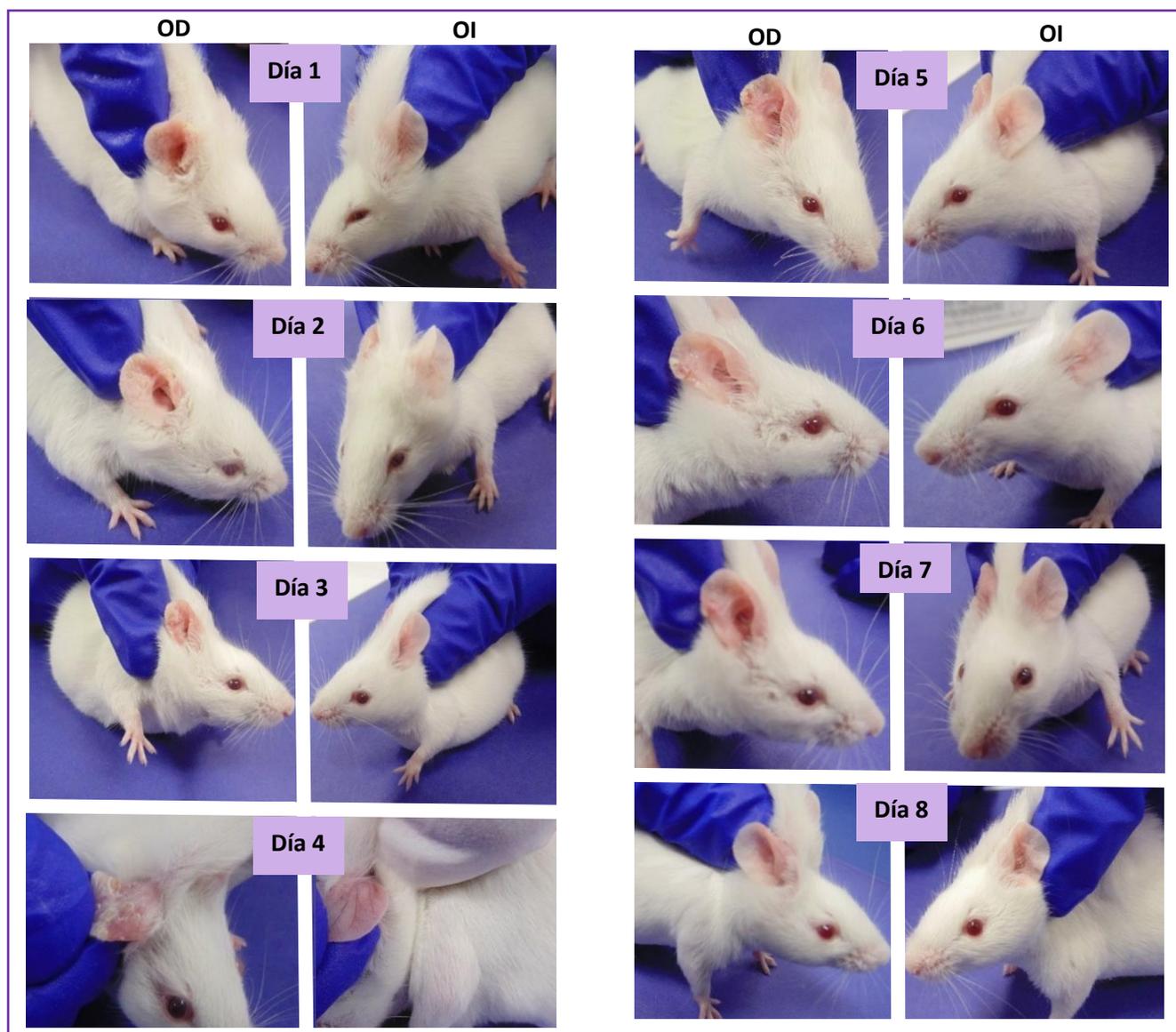


Figura 12: Evolución del edema del grupo control negativo (C-)

En la siguiente tabla, se detallan las características del grupo control negativo en el último día de tratamiento, además de los parámetros de comparación: peso y grosor.

Tabla 6: Edema y grosor de las orejas de los animales del grupo control negativo en el día 8							
n	Características macroscópicas	Peso		Grosor		Diferencia peso (OD-OI)	Diferencia grosor (OD-OI)
		OD (g)	OI (g)	OD (mm)	OI (mm)		
1	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Levemente enrojecida • Edema • Xerosis Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0112	0,0075	0,49	0,32	0,0037	0,17
2	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Levemente enrojecida • Edema Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0131	0,0092	0,44	0,30	0,0039	0,14
3	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Levemente enrojecida • Edema • Xerosis Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0116	0,0082	0,38	0,27	0,0034	0,11
4	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Levemente enrojecida • Edema • Xerosis Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0104	0,0073	0,35	0,27	0,0031	0,08
5	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Levemente enrojecida • Edema • Xerosis Oreja izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0111	0,0089	0,35	0,29	0,0021	0,06
6	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> • Levemente enrojecida • Edema Oreja izquierda <ul style="list-style-type: none"> • Normal 	0,0115	0,0102	0,33	0,30	0,0013	0,03

Tal como fue señalado anteriormente a todos los grupos se les aplicó la OX durante 7 días, al término de este periodo, los grupos 1, 2 y 3 fueron tratados, excepto el grupo control negativo. A partir de este día, la DA inducida en los animales del grupo control fue evolucionando en forma natural con los signos observables como el enrojecimiento, la xerosis, el prurito y la presencia de costras, el edema formado fue bajo, pero engrosamiento prácticamente no hubo.

3.2.4 Efecto de la emulsión base

El grupo tratado con la emulsión base, presentó una leve disminución de la xerosis, del enrojecimiento y de las costras producidas por el rascado debido al prurito. (ver figura 13). No disminuyó el edema.

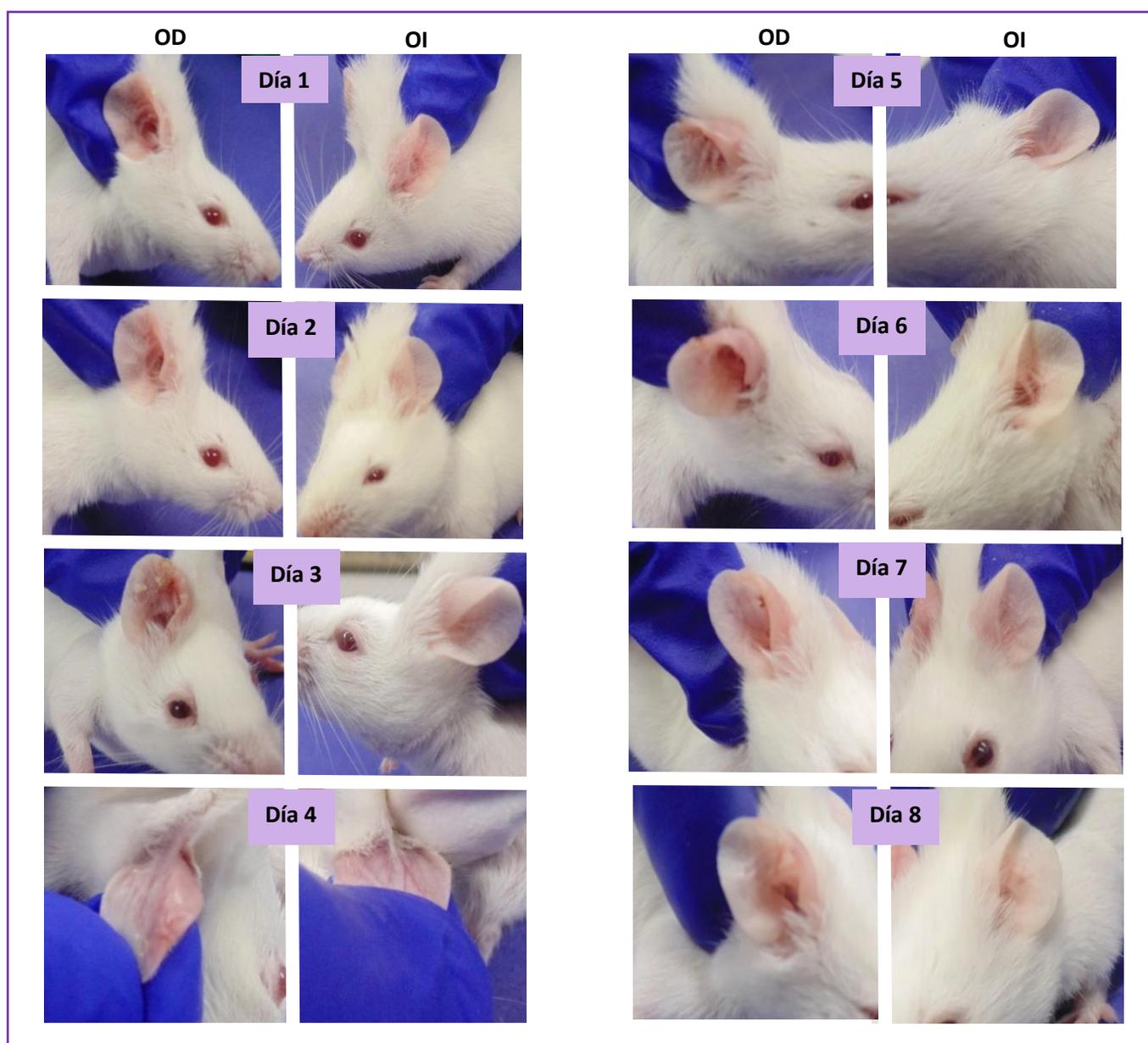


Figura 13: Evolución de la xerosis, enrojecimiento y formación de costras durante el tratamiento con emulsión base (E)

Tabla 7: Edema y grosor Características de las orejas de los animales grupo E

n	Características macroscópicas	Peso		Grosor		Diferencia peso (OD-OI)	Diferencia grosor (OD-OI)
		OD (g)	OI (g)	OD (mm)	OI (mm)		
1	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> Levemente enrojecida Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> Normal 	0,0089	0,0068	0,46	0,28	0,0021	0,18
2	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> Levemente enrojecida Edema Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> Normal 	0,0096	0,0088	0,35	0,3	0,0008	0,05
3	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> Levemente enrojecida Queloides Costra Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> Normal 	0,0109	0,0077	0,39	0,26	0,0032	0,13
4	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> Coloración amarilla Oreja Izquierda <ul style="list-style-type: none"> Normal 	0,0129	0,0090	0,39	0,22	0,0039	0,17
5	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> Brillante Enrojecida Oreja izquierda <ul style="list-style-type: none"> normal 	0,0105	0,0072	0,31	0,25	0,0033	0,06
6	Oreja Derecha <ul style="list-style-type: none"> Brillante Enrojecida Oreja izquierda <ul style="list-style-type: none"> normal 	0,0128	0,0082	0,35	0,28	0,0046	0,07

El grupo tratado con E disminuyó la xerosis, pero no la picazón que se debe principalmente a la vía histamínica, los ratones continuaron con el rascado de las ODs generando lesiones en la piel y costras.

La formulación elegida, es un factor importante que se debe considerar en la evolución del tratamiento. En el estudio realizado, tanto la emulsión sin extractos como la emulsión con la presencia de éstos, fue capaz de disminuir un signo muy importante en DA; la xerosis. Se habla de xerosis, cuando la piel se encuentra reseca, adquiriendo un color blanco, y cuando se comienza a observar descamación. Esta resequedad, es una de las principales causas de prurito en pacientes con DA. Para tratar esto, es relevante mantener hidratada la piel, y es aquí donde la formulación base cumple un rol significativo, el mayor porcentaje está compuesto por agua, además de contener glicerina, Pemulen y carbomer estos últimos son ingredientes muy relevantes debido a su capacidad de retener en la emulsión una cantidad importante de agua, por lo que al ser aplicada en la piel xerótica, es posible generar una hidratación momentánea del estrato córneo, lo cual lleva a disminuir la xerosis.

3.3 Porcentajes de disminución de edema

Tabla 8: Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico y porcentaje de disminución del grosor de las orejas derechas de los animales		
Tratamiento	% disminución de efecto antiinflamatorio \pm SEM	% disminución de grosor \pm SEM
Emulsión con extractos	30,8 \pm 0,0	5,23 \pm 0,0
Emulsión base	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0
Corticoide tópico	9,2 \pm 0,0	0 \pm 0,0

Los animales del grupo que fueron tratados con la EE, fueron los únicos que mostraron una tendencia a disminuir el edema inducido por la OX (30,7%) aunque este resultado no fue significativo (tabla 8).

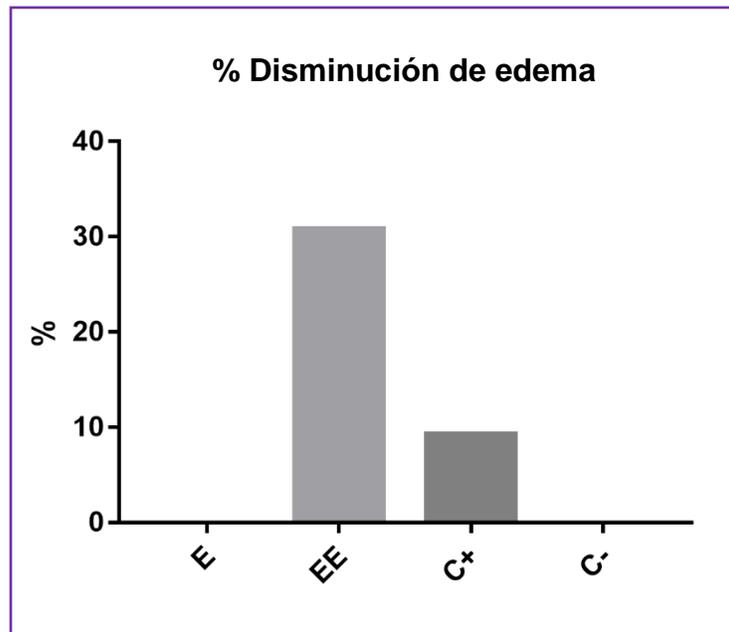


Figura 14: Porcentaje de disminución del edema

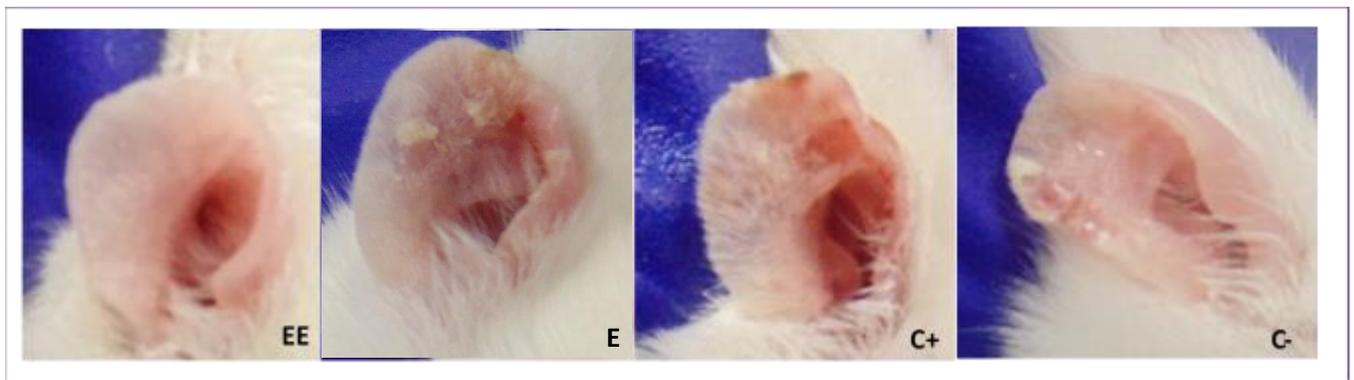


Figura 15: Comparación de la xerosis y enrojecimiento en las ODs de los 4 grupos: EE: formulación conteniendo los extractos de matico y murtila; E emulsión; C+ corticoide; C- control negativo

Como se puede observar en la figura 15 se observa claramente la disminución de la xerosis y del enrojecimiento, en el grupo tratado con la EE y además no se observaron signos de rascado constante (costras). En el grupo tratado con E se puede observar la presencia de costra, tal

como ha sido señalado las costras son el resultado de un rascado frecuente. En el grupo tratado con corticoide (C+) se observan en la oreja derecha los siguientes signos de DA: i) enrojecimiento, lo que indica una irritación presente, ii) costras, que son indicativo de rascado frecuente y iii) xerosis, que demuestra que la piel no tiene la hidratación suficiente debido a la situación a la que está expuesta. Por último el grupo C- que no fue tratado, no presentó un aumento de peso significativo de las ODs, lo que indica que el edema formado no fue el esperado, sin embargo, en las ODs se pudo observar tanto xerosis como costras producto del rascado (figura 15).

Se realizaron análisis estadísticos de los distintos datos con el fin de buscar diferencias significativas entre cada grupo en relación al edema, sin embargo, esto no fue posible ya que ningún análisis logró demostrar significancia estadística ($p < 0,05$). Ante esto se pueden realizar diversas observaciones que explicarían este hecho. En primer lugar, es probable que para el tipo de estudio realizado la cantidad de n utilizado no sea el adecuado para ver diferencias significativas entre cada grupo y se necesite una cantidad mayor de ratones para ello, ya que al tratarse de un ensayo *in vivo* la desviación estándar es muy alta, debido a la gran variación interindividual que hay en los grupos. Por último, el grupo control negativo presentó valores de edema de las ODs muy por debajo a lo esperado, esto puede deberse a la forma en que se trató a los animales, el grupo control negativo no fue manipulado de manera diaria a diferencia de los demás grupos, el hecho de ser manipulados diariamente genera estrés a los animales, como se mencionó anteriormente el estrés es un factor importante en el desencadenamiento del prurito, como el grupo control no estuvo sometido al mismo estrés, las lesiones de la piel pudieron recuperarse de mejor manera.

A pesar de que, en este estudio, no se logró la significancia estadística esperada para el efecto antiinflamatorio tópico de la EE y no se pudo evaluar su efecto sobre el grosor, el EE exhibió una tendencia positiva en la mejora de algunos de los signos de la DA como es la xerosis y las formación de costras.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden servir para abrir una puerta al uso de productos naturales en DA, se deben realizar más estudios, con un mayor número de animales y de acuerdo con los resultados de los estudios preclínico, se debería continuar con los estudios clínicos, con el objetivo de determinar si la combinación del extracto etanólico de hojas de matico y el extracto de acetato de etilo de hojas de murtila, son de utilidad en el tratamiento de la dermatosis atópica.

Conclusiones

La emulsión del tipo crema gel desarrollada con los extractos de matico y murtila, disminuyó algunos signos de dermatitis atópica, como xerosis, enrojecimiento y prurito evidenciado a través de la formación de costras, después de 7 días de tratamiento. Por lo tanto, la hipótesis planteada en esta investigación fue demostrada.

La emulsión desarrollada con la mezcla del extracto etanólico de matico y del extracto de acetato de etilo de murtila fue estable en las condiciones de los estudios de estabilidad.

La dermatitis atópica podría ser tratada con la mezcla de extractos de matico y murtila.

La mezcla de los extractos de murtila y matico, en la concentración utilizada (2%), y al ser aplicados en un vehículo adecuado, como lo fue la emulsión crema gel, disminuyeron el edema en la oreja de los ratones en un 30,8% pero no de forma significativa respecto a los otros tratamientos, sin embargo se demostró una tendencia positiva en la disminución de la inflamación. Se hace necesario aumentar el número de individuos tratados para corroborar la tendencia del estudio estadístico.

La emulsión de la mezcla de extractos de matico y murtila presentó un mayor efecto antiinflamatorio que la emulsión de Triamcinolona acetónido.

Dado que la oxazolona no aumentó el grosor de las orejas derechas, no se pudo evaluar el efecto sobre este parámetro de la emulsión con los extractos de matico y murtila. La emulsión base, ni la emulsión con la mezcla de extractos de matico y murtila, generaron algún tipo de irritación adicional en la piel dañada.

Proyecciones de los resultados

Aunque faltan estudios, el uso de la mezcla de los extractos de matico y murtila frente a la dermatitis atópica, podría tener grandes proyecciones en el campo de la dermatología y ser una alternativa ante el uso de corticoides.

Referencias

1. Eichenfield, L. F., Tom, W. L., Chamlin, S. L., Feldman, S. R., Hanifin, J. M., Simpson, E. L., ... Sidbury, R. (2014). GUIDELINES OF CARE FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS: Part 1: Diagnosis and Assessment of Atopic Dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(2), 338–351.
2. Awad P. Actualización en Dermatitis Atópica. *Avansalud*. 2002, 223-236.
3. Saraswat, A. (2010). Topical corticosteroid use in children: adverse effects and how to minimize them. *Indian Journal Of Dermatology, Venereology & Leprology*, 76(3), 225-228. doi:10.4103/0378-6323.62959
4. Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A. and Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 125-132.
5. Kang, S., Jung, H., Nam, J., Kim, W., Kang, J., Kim, Y., Cho, C., Cho, C., Park, Y. and Bae, H. (2018). *Effects of the Fruit Extract of Tribulus terrestris on Skin Inflammation in Mice with Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis through Regulation of Calcium Channels, Orai-1 and TRPV3, and Mast Cell Activation*.
6. Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., & Delporte, C. (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal Of Ethnopharmacology*, 116(2), 263-269.
7. Park, C. and Song, Y. (2013). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF-κB/AP-

- 1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutrition Research and Practice*, 7(6), p.423.
8. Hu, C. and Kitts, D. (2004). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265(1/2), pp.107-113
 9. Aguirre, M.C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M.E., Cassels, B.K., Silva, X., Alegria, S. y Negrete, R. Topical anti-inflammatory activity of 2alpha-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(16), 5673-5677, 2006.
 10. Lee, H. K., Nam, G. W., Kim, S. H. and Lee, S. H. (2006), Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR- α pathway. *Experimental Dermatology*, 15, 66-73.
 11. Wójciak-Kosior, M., Paduch, R., Matysik-Woźniak, A., Niedziela, P. and Donica, H. (2012). The effect of ursolic and oleanolic acids on human skin fibroblast cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(4), pp.664-669.
 12. Eichenfield, L. F., Tom, W. L., Berger, T. G., Krol, A., Paller, A. S., Schwarzenberger, K., ... Sidbury, R. (2014). GUIDELINES OF CARE FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS: Part 2: Management and Treatment of Atopic Dermatitis with Topical Therapies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(1), 116–132.
 13. Vega-Gálvez, A., Morales, A., Uribe, E., López, J., Shun Ah-Hen, K., & García-Segovia, P. (2017). Effects of drying methods on quality attributes of murta (*ugni molinae turcz*) berries: bioactivity, nutritional aspects, texture profile, microstructure and functional properties. *Journal Of Food Process Engineering*, 40(4), n/a. doi:10.1111/jfpe.12511

14. González Tejón, S., & Vázquez Doval, F. (2014). *Dermatitis Atópica en edad pediátrica* (2nd ed., p. 5), Barcelona: Esmon Publicidad
15. Ballona, R., & Ballona, C. (2004). Dermatitis atópica: Revisión de tema. *Folia Dermatología*, 15(1), 40-48.
16. Lv, W., Li, Y., Li, Y., Zhang, S., Deng, Q., Yang, Y., Cao, X. and Wang, Q. (2014). Ultra-stable aqueous foam stabilized by water-soluble alkyl acrylate crosspolymer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, pp.189-195.
17. Martín Mateos, M. (2011). *Guía de tratamiento de la dermatitis atópica en el niño* (2nd ed.), Majadahonda, Madrid: Ergón
18. Montes, M., y T. Wilkomirsky. 1985. Medicina tradicional chilena. p. 108-109. Editorial de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
19. Navas L.E. Flora de la cuenca de Santiago de Chile, Tomo III, Ediciones de la Universidad de Chile, 1979.
20. Conde-Taboada, A., González-Barcala, F., & Toribio, J. (2008). Dermatitis atópica infantil: revisión y actualización. *Actas Dermosifiliogr*, 99, 690-700.
21. Pesce, M., Franceschelli, S., Ferrone, A., De Lutiis, M., Patrino, A., & Grilli, A. et al. (2015). Verbascoside down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in the U937 cell

line. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 19(7), 1548-1556. doi: 10.1111/jcmm.12524

22. Avello, M., & Pastene, E. (2005). Actividad antioxidante de infusos de UGNI MOLINAE TURCZ ("MURTILLA"). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4 (2), 33-39.
23. 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.* (Titulo Química farmacéutica). Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas.
24. Huxley, A., Griffiths, M. y Levy, M. Ugni. En: *The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening*. New York, Grove's Dictionaries Inc., 1999, 4, pp. 543.
25. Goity Vivar, L. (2013). *Caracterización de los compuestos activos de Ugni molinae (murtilla) y sus potenciales efectos hipoglicemiantes, anti-inflamatorios y Antioxidantes* (Doctorado). Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile.
26. Pardo F., Perich, F., Villarroel, L., Torres, R. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. *J. of Ethnopharmacol*, 39, 221-222, 1993.
27. Muñoz, M. Barrera, E. Meza, I. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. *Museo de historia natural*, 33:52-53, 1981
28. Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., & Qu, C. (2018). Verbascoside Alleviates Atopic Dermatitis-Like Symptoms in Mice via Its Potent Anti-Inflammatory Effect. *International Archives Of Allergy And Immunology*, 175(4), 220-230. doi: 10.1159/000486958

29. Hu, C., & Kitts, D. (2004). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 265(1/2), 107-113. doi: 10.1023/b: mcbi.0000044364. 73144.fe
30. Jo, B., Park, N., Jegal, J., Choi, S., Lee, S., & Yi, L. et al. (2018). *Stellera chamaejasme* and Its Main Compound Luteolin 7-O-Glucoside Alleviates Skin Lesions in Oxazolone- and 2,4-Dinitrochlorobenzene-Stimulated Murine Models of Atopic Dermatitis. *Planta Medica*. doi: 10.1055/a-0746-8698
31. Huang, S., Chiu, C., Chen, H., Hou, W., Sheu, M., & Lin, Y. et al. (2011). Antinociceptive Activities and the Mechanisms of Anti-Inflammation of Asiatic Acid in Mice. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2011, 1-10. doi: 10.1155/2011/895857
32. Bobin, M., Michel, V. and Martini, M. (1999). Study of formulation and stability of emulsions with polymeric emulsifiers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), pp.53-58.
33. SERRA, M. S. Dermatología. Niterói: Grupo Pela Vidda Niterói, 2001.
34. National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=24888573, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24888573> (accessed Mar. 2, 2019).
35. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. (2014). *REGULACIÓN DEL USO Y CUIDADO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN* (10th ed.), Santiago: Área de Comunicaciones de CONICYT.
36. Senet, P. (2008). Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología*, 42(1), 1-10. doi: 10.1016/s1761-2896(08)70356-x

37. Peredo, N. (2008). *DESARROLLO DE UN PRODUCTO DERMATOLÓGICO A PARTIR DE UN EXTRACTO ESTANDARIZADO OBTENIDO DESDE LAS HOJAS DE UGNI MOLINAE TURCZ.* (Titulo Quimico Farmaceutico). Universidad de Chile, facultad de ciencias quimicas y farmaceuticas.
38. Lexol® GT-865, Caprylic/Capric Triglyceride por INOLEX Incorporated - Cuidado Personal y Cosméticos. (2019). Retrieved from <https://www.ulprospector.com/es/la/PersonalCare/Detail/1884/10347/Lexol-GT-865--Caprylic-Capric-Triglyceride?st=1&sl=76461878&crit=a2V5d29yZDpbQ2FwcnlsaWMvQ2FwcmljIFRyaWdseWNlcmlkZV0%3d&ss=2&k=Caprylic%2fCapric|Triglyceride&t=Caprylic%2fCapric+Triglyceride>

Anexos

Anexo 1 : Análisis estadístico del peso

Kruskal-Wallis test	
Valor de P	0,9197
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximado
Resumen del valor P	Ns
Las medianas varían significativamente. (P < 0.05)?	No
Número de grupos	4
Estadística Kruskal-Wallis	0,4963
Número de familias	1
Numero de comparaciones por familia	3
Alpha	0,05

Estadística descriptiva	E	EE	C+	C-
Mínimo	0,0008	0,0005	0	0,0013
Percentil 25%	0,001775	0,0014	0,0006	0,0019
Mediana	0,00325	0,00225	0,00295	0,00325
Percentil 75%	0,004075	0,005325	0,004175	0,00425
Máximo	0,0046	0,0072	0,0071	0,0059
Promedio	0,002983	0,0031	0,002833	0,00325
Desviación Std.	0,001353	0,002431	0,002476	0,001574
SEM	0,0005522	0,0009923	0,001011	0,0006428
Lower 95% CI	0,001564	0,0005492	0,0002349	0,001598
Upper 95% CI	0,004403	0,005651	0,005432	0,004902
Promedio Ranks	13,33	12	11,08	13,58

Peso											
Dosis: 3 mg/Kg											
Wilcoxon											
Ratón	O.derecha	O izquierda	EE				C- (solo ox)				
			(Od-Oi)	% INF	% EAI	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0090	0,0085	0,0005	5,9	84,6	1,0	0,0115	0,0102	0,0013	12,7	2
2	0,0086	0,0069	0,0017	24,6	47,7	3,0	0,0111	0,0089	0,0022	24,7	5,5
3	0,0100	0,0078	0,0022	28,2	32,3	5,5	0,0104	0,0073	0,0031	42,5	7
4	0,0099	0,0076	0,0023	30,3	29,2	6,0	0,0116	0,0082	0,0034	41,5	8
5	0,0129	0,0082	0,0047	57,3	-44,6	10,0	0,0112	0,0075	0,0037	49,3	9
6	0,0164	0,0092	0,0072	78,3	-121,5	12,0	0,0151	0,0092	0,0059	64,1	11
n	6	6	6	6	6		6	6	6	6	
promedio	0,0111	0,0080	0,0031	37,4	4,6		0,0118	0,0086	0,0033	39,1	
mediana	0,0100	0,0080	0,0023	29,2	30,8		0,0114	0,0086	0,0033	42,0	
Desv. Std	0,0030	0,0008	0,0024	25,9	74,8		0,0017	0,0011	0,0016	18,2	
Desv. Tip	0,0233	0,0083	0,0286	2,9	30,5		0,0007	0,0004	0,0006	7,4	
W						37,5					
% E con promedio		5,1									
% E CON MEDIANA		30,8									
mediana de controles		0,0033									
mediana de muestra		0,0023									
% E FINAL CON MEDIANA		30,8									
z =	-0,24										$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$
p =	0,4051										

Peso											
Dosis: 3m/Kg											
Wilcoxon											
	C+						C- (solo ox)				
Ratón	O.derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% INF	% EAI	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,0069	0,0069	0,0000	0,0	100,0	1,0	0,0115	0,0102	0,0013	12,7	3
2	0,0084	0,0076	0,0008	10,5	75,4	2,0	0,0111	0,0089	0,0022	24,7	4
3	0,0099	0,0072	0,0027	37,5	16,9	5,0	0,0104	0,0073	0,0031	42,5	6
4	0,0083	0,0051	0,0032	62,7	1,5	7,5	0,0116	0,0082	0,0034	41,5	9
5	0,0095	0,0063	0,0032	50,8	1,5	7,5	0,0112	0,0075	0,0037	49,3	10
6	0,0122	0,0051	0,0071	139,2	- 118,5	12,0	0,0151	0,0092	0,0059	64,1	11
n	6	6	6	6	6		6	6	6	6	
promedio	0,0092	0,0064	0,0028	50,1	12,8		0,0118	0,0086	0,0033	39,1	
mediana	0,0090	0,0066	0,0030	44,1	9,2		0,0114	0,0086	0,0033	42,0	
Desv. Std	0,0018	0,0011	0,0025	49,7	76,2		0,0017	0,0011	0,0016	18,2	
Desv. Tip	0,0164	0,0150	0,0294	4,2	31,1		0,0007	0,0004	0,0006	7,4	
W						35,0					
% E con promedio		13,3									
% E CON MEDIANA		9,2									
mediana de controles		0,0033									
mediana de muestra		0,0030									
% E FINAL CON MEDIANA		9,2									
z =	-0,64										$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$
p =	0,2609										

Anexo 2 : Análisis estadístico del grosor

Kruskal-Wallis test	Columna1
Valor de P	0,1572
Valor de P exacto o aproximado?	Aproximado
Resumen del valor P	Ns
Las medianas varían significativamente. (P < 0.05)?	No
Numero de grupos	4
Estadística Kruskal-Wallis	5,208
Numero de familias	1
Numero de comparaciones por familia	6
Alpha	0,05

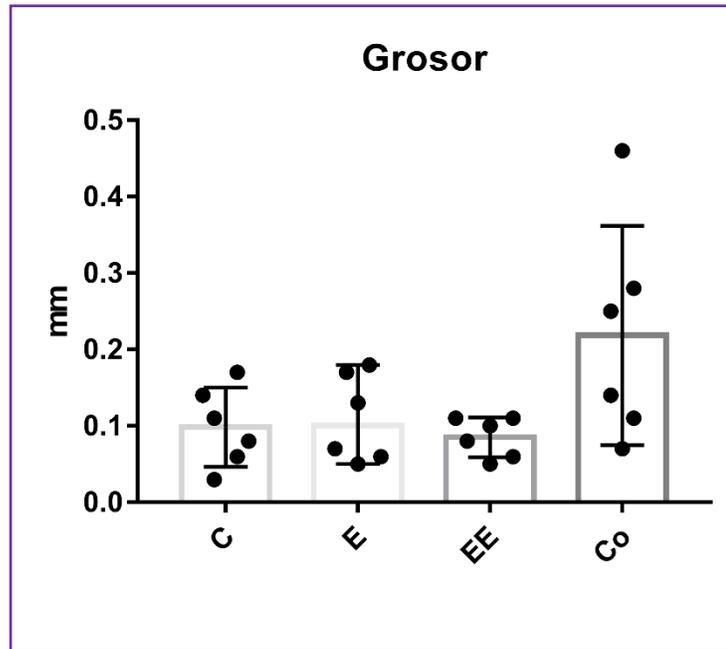
Estadística descriptiva	E	EE	C+	C-
Minimo	0,05	0,05	0,07	0,03
Percentil 25%	0,0575	0,0575	0,1	0,0525
Mediana	0,1	0,09	0,195	0,095
Percentil 75%	0,1725	0,11	0,325	0,1475
Maximo	0,18	0,11	0,46	0,17
Promedio	0,11	0,085	0,2183	0,09833
Desviación Std.	0,05762	0,02588	0,1436	0,05193
SEM	0,02352	0,01057	0,05862	0,0212
Lower 95% CI	0,04953	0,05784	0,06765	0,04384
Upper 95% CI	0,1705	0,1122	0,369	0,1528
Promedio Ranks	11,92	9,167	17,92	11

Grosor											
Dosis: 3mg/Kg											
Wilcoxon											
Ratón	O.derecha	O izquierda	E				C- (solo ox)				
			(Od-Oi)	% INF	% EAI	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,46	0,28	0,1800	64,3	-89,5	2,0	0,49	0,32	0,1700	53,1	1
2	0,35	0,3	0,0500	16,7	47,4	3,5	0,44	0,3	0,1400	46,7	3,5
3	0,39	0,26	0,1300	50,0	-36,8	5,0	0,38	0,27	0,1100	40,7	6
4	0,39	0,22	0,1700	77,3	-78,9	8,0	0,35	0,27	0,0800	29,6	7
5	0,31	0,25	0,0600	24,0	36,8	10,5	0,35	0,29	0,06	20,7	9
6	0,35	0,28	0,0700	25,0	26,3	12,0	0,3	0,33	-0,0300	-9,1	10,5
n	6	6	6	6	6		6	6	6	6	
promedio	0,3750	0,2650	0,1100	42,9	-15,8		0,3850	0,2967	0,0883	30,3	
mediana	0,3700	0,2700	0,1000	37,5	-5,3		0,3650	0,2950	0,0950	35,2	
Desv. Std	0,0513	0,0281	0,0576	24,7	60,7		0,0689	0,0250	0,0703	22,5	
Desv. Tip	0,0867	0,0531	0,2178	4,9	24,8		0,0281	0,0102	0,0287	9,2	
W						41,0					
% E con promedio		-24,5									
% E CON MEDIANA		-5,3									
mediana de controles		0,0950									
mediana de muestra		0,1000									
% E FINAL CON MEDIANA		-5,3									
z =	-0,16										$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$
p =	0,4364										

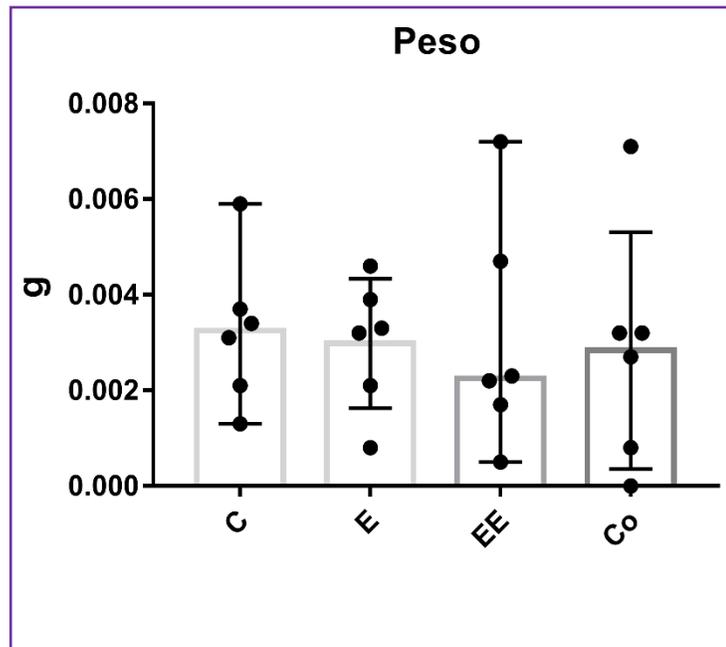
Grosor											
Dosis: 3mg/Kg											
Wilcoxon											
Ratón	O.derecha	O izquierda	EE				C- (solo ox)				
			(Od-Oi)	% INF	% EAI	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,33	0,27	0,0600	22,2	36,8	2,0	0,49	0,32	0,1700	53,1	1
2	0,37	0,27	0,1000	37,0	-5,3	3,5	0,44	0,3	0,1400	46,7	3,5
3	0,37	0,29	0,0800	27,6	15,8	5,5	0,38	0,27	0,1100	40,7	5,5
4	0,36	0,25	0,1100	44,0	-15,8	7,0	0,35	0,27	0,0800	29,6	9
5	0,28	0,23	0,0500	21,7	47,4	9,0	0,35	0,29	0,06	20,7	11
6	0,39	0,28	0,1100	39,3	-15,8	9,0	0,3	0,33	-0,0300	-9,1	12
n	6	6	6	6	6		6	6	6	6	
promedio	0,3500	0,2650	0,0850	32,0	10,5		0,3850	0,2967	0,0883	30,3	
mediana	0,3650	0,2700	0,0900	32,3	5,3		0,3650	0,2950	0,0950	35,2	
Desv. Std	0,0395	0,0217	0,0259	9,4	27,2		0,0689	0,0250	0,0703	22,5	
Desv. Tip	0,0632	0,0410	0,0780	1,5	11,1		0,0281	0,0102	0,0287	9,2	
W						36,0					
% E con promedio		3,8									
% E CON MEDIANA		5,3									
mediana de controles		0,0950									
mediana de muestra		0,0900									
% E FINAL CON MEDIANA		5,3									
z =	-0,16										$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$
p =	0,4364										

Grosor											
Dosis: 3mg/Kg											
Wilcoxon											
Ratón	O.derecha	O izquierda	C+				C- (solo ox)				
			(Od-Oi)	% INF	% EAI	Ranking	O derecha	O izquierda	(Od-Oi)	% Inflam.	Ranking
1	0,52	0,24	0,2800	116,7	-	3,0	0,49	0,32	0,1700	53,1	1
2	0,34	0,2	0,1400	70,0	-194,7	5,5	0,44	0,3	0,1400	46,7	2
3	0,66	0,2	0,4600	230,0	-	7,5	0,38	0,27	0,1100	40,7	4
4	0,43	0,18	0,2500	138,9	-	10,0	0,35	0,27	0,0800	29,6	5,5
5	0,23	0,16	0,0700	43,8	163,2	11,0	0,35	0,29	0,06	20,7	7,5
6	0,3	0,19	0,1100	57,9	-15,8	12,0	0,3	0,33	-	-9,1	9
n	6	6	6	6	6		6	6	6	6	
promedio	0,4133	0,1950	0,2183	109,5	-		0,3850	0,2967	0,0883	30,3	
mediana	0,3850	0,1950	0,1950	93,3	-		0,3650	0,2950	0,0950	35,2	
Desv. Std	0,1577	0,0266	0,1436	69,3	105,3		0,0689	0,0250	0,0703	22,5	
Desv. Tip	0,2879	0,0611	0,4329	9,1	151,1		0,0281	0,0102	0,0287	9,2	
W						49,0					
% E con promedio		-147,2									
% E CON MEDIANA		-105,3									
mediana de controles		0,0950									
mediana de muestra		0,1950									
% E FINAL CON MEDIANA		-105,3									
z =	-0,16										$Z = w - [n(m+n+1)/2] / \text{RAIZ}[m*n(m+n+1)/12]$
p =	0,4364										

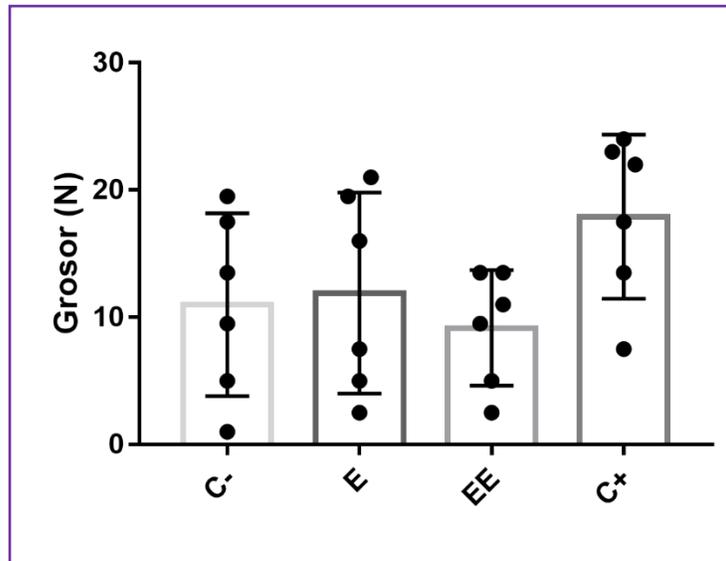
Anexo 3: Gráfico datos brutos del grosor



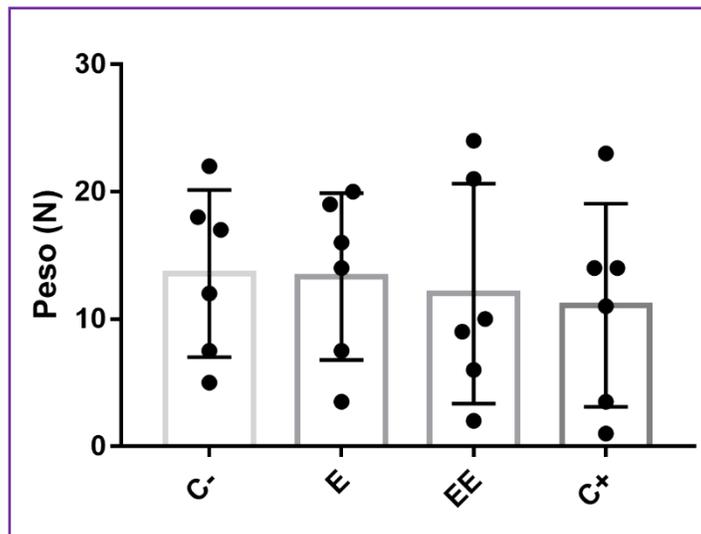
Anexo 4 : Gráfico datos brutos del peso



Anexo 5 : Gráfico de Ranks Grosor



Anexo 6 : Gráfico de Ranks Peso



Anexo 7: Materias primas utilizadas en la formulación de emulsiones

Acrylates C10/C30 Alkyl Acrylate Crosspolymer: El término “Acrylates” (acrilatos) se aplica a los copolímeros lineales no entrecruzados que contienen combinaciones de ácido acrílico y ácido metacrílico, junto con sus ésteres de metilo, etilo, propilo o butilo. El término “Crosspolymer” (polímero entrecruzado) se aplica a los polímeros distintos del carbomer que tienen enlaces cruzados.

Alcohol cetearílico: Es una mezcla de alcoholes cetílico y estearílico. Tiene un aspecto ceroso, es utilizado principalmente como factor de consistencia y estabilizante.

Carbomer: Es un polímero de ácido acrílico entrecruzado con alil éteres de pentaeritritol y alil éteres de sucrosa. El término “Carbomer” se aplica a los homopolímeros cruzados de ácido acrílico de elevado peso molecular, es un importante agente espesante y gelificante, además de actuar como estabilizador de emulsiones y suspensiones. Se trata de una sustancia muy hidrofílica, soluble en agua, alcohol y solventes polares. Sus propiedades como espesante son eficaces en un rango de pH que va desde cinco a diez; pero se ven reducidas por la presencia de electrolitos. Este producto es incompatible con algunos tensioactivos catiónicos y algunos polímeros catiónicos.

Glicerina: propanotriol, glicerol. Preparado por hidrólisis de grasas y aceites, de donde se obtienen ácidos grasos y glicerol.

Parabenos: Se denominan así por ser derivados del ácido p-aminobenzoico. Son conservantes de tipo fenólico, su solubilidad en agua disminuye a medida que aumenta el largo de la cadena alilo, su potencial antimicrobiano aumenta con el largo de esta cadena. Se suelen mezclar un par de ellos en la formulación ya que de esta manera aumenta la capacidad antimicrobiana.^[30]

Triglicérido cáprico caprílico: Es un emoliente de extensibilidad media de origen vegetal, es un líquido oleoso transparente de naturaleza polar, de color ligeramente amarillento y olor característico ^[38]